

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ (НФаУ)

УТВЕРЖДАЮ

Ректор НФаУ

чл.-кор. НАН Украины
профессор

В.П.Черных

“ ” 2014 р.



ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ ПО ТЕМЕ:
ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ И
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА ДЕКАСАН,
ПРОИЗВОДСТВА ООО «ЮРИЯ-ФАРМ» В ВИДЕ 0,02% РАСТВОРА
ДЕКАМЕТОКСИНА

Проректор НФаУ по научной работе,
профессор

С.Н.Коваленко

Руководитель НИР,
профессор

С.Ю.Штрыголь

Харьков 2014

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Научный руководитель,
зав.каф.фармакологии,
зав. ЦНИЛ НФаУ,
д.мед.н., профессор,
С.Ю. Штрыголь

“ ___ ” _____ 2014 г.

Ответственный исполнитель,
доц. каф. фармакологии НФаУ,
к.биол.н., О.Н. Шаповал

“ ___ ” _____ 2014 г.

Исполнители:

Ст.н.с. ЦНИЛ НФаУ,
к.биол.н., ст.н.с.
Ю.Б.Ларьяновская

“ ___ ” _____ 2014 г.

Профессор каф. физической
и коллоидной химии НФаУ,
д.хим.н., М.Е.Блажеевский

“ ___ ” _____ 2014 г.

Зав. каф. микробиологии,
вирусологии и иммунологии НФаУ,
д.мед.н., профессор,
Н.И.Филимонова

“ ___ ” _____ 2014 г.

Ассистент каф. фармакологии НФаУ

О.О.Койро



“ ___ ” _____ 2014 г.

Ст.н.с. ЦНИЛ НФаУ,

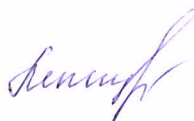
к.биол.н., Е.Ю. Кошева я



“ ___ ” _____ 2014 г.

Ст.н.с. ЦНИЛ НФаУ,

к.биол.н. Е.Б.Леницкая



“ ___ ” _____ 2014 г.

М.н.с. ЦНИЛ НФаУ

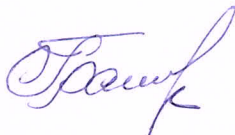
Т.К.Юдкевич



“ ___ ” _____ 2014 г.

М.н.с. ЦНИЛ НФаУ

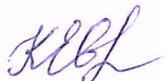
С.А.Гращенко



“ ___ ” _____ 2014 г.

М.н.с. ЦНИЛ НФаУ

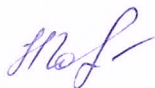
Е.А.Ковалева



“ ___ ” _____ 2014 г.

М.н.с. ЦНИЛ НФаУ

Н.С. Черная



“ ___ ” _____ 2014 г.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ОПЫТА ЗАРУБЕЖНЫХ И ОТЕЧЕСТВЕННЫХ УЧЕНЫХ ПО ИССЛЕДУЕМОЙ ПРОБЛЕМЕ	9
2. ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ДЕКАСАНА	33
3. ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ДЕКАСАНА	53
3.1. Изучение алергизирующих свойств Декасана в виде 0,02% раствора декаметоксина	53
3.1.1. Изучение алергизирующего действия Декасана на модели активной кожной анафилаксии на морских свинках...	55
3.1.2. Изучение алергизирующего действия Декасана в тесте «Конъюнктивальная проба» на морских свинках	57
3.1.3. Изучение алергизирующего действия Декасана в реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышах ...	60
3.2. Изучение иммуностропного действия Декасана	63
3.3. Изучение кумулятивных способностей Декасана	68
3.4. Изучение мутагенного потенциала Декасана	71
3.5. Изучение гонадотоксического действия Декасана	76
3.5.1. Изучение гонадотоксического действия на самках крыс	76
3.5.2. Изучение гонадотоксического действия на самцах крыс	82
3.6. Изучение эмбриотоксичности и тератогенности Декасана.....	88
3.7. Изучение влияния Декасана на репродуктивную функцию....	105
3.7.1. Изучение влияния Декасана на репродуктивную функцию самцов	105
3.7.2. Изучение репродуктивной токсичности Декасана у крыс самок	113

3.8.	Изучение местнораздражающего действия Декасана	123
3.8.1.	Изучение местнораздражающего действия препарата Декасана на кроликах.....	123
3.8.2.	Изучение местнораздражающего действия Декасана на крысах после длительного введения.....	128
4.	ИЗУЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ДЕКАСАНА.....	129
4.1	Влияние длительного введения терапевтической и токсической доз Декасана на биохимические и функциональные показатели внутренних органов и систем крыс	135
4.2	Изучение гистоструктуры внутренних органов и тканей крыс под влиянием длительного введения терапевтической и токсической доз Декасана	153
5.	ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕКАСАНА	169
5.1.	Изучение антимикробной активности Декасана в условиях in vitro.....	169
5.1.1.	Изучение антимикробной активности Декасана методом кратных серийных разведений.....	171
5.1.2.	Изучение антимикробной активности Декасана методом колодцев.....	173
5.2.	Изучение антимикробной активности Декасана в условиях in vivo	173
5.2.1.	Изучение антимикробной активности Декасана на модели инфекционного колопроктита у крыс, вызванного <i>S.aureus</i>	173
5.2.2.	Изучение антимикробной активности Декасана на модели инфекционного колопроктита у крыс, вызванного <i>P.aeruginosa</i>	188

6. ИЗУЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ДЕКАСАНА ...	204
6.1. Результаты изучения способности препарата «Декасан» всасываться в кишечнике у крыс.....	204
6.2. Изучение способности препарата «Декасан» всасываться в кровь после перорального введения у кроликов.....	208
ВЫВОДЫ	216
УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ	220

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы среди инфекционных болезней, по данным ВОЗ, наиболее распространенными являются бактериальные и вирусные диареи. Проблема острых кишечных инфекций (ОКИ) – одна из актуальнейших и в отечественном здравоохранении. С одной стороны, уровень заболеваемости остается достаточно высоким, без тенденции к отчетливому снижению, с другой – отмечается появление сероваров, обуславливающих тяжелое течение болезни (*Shigella flexneri* 2a, энтерогеморрагическая эшерихия O157 и др.). Наряду с сальмонеллами, шигеллами, ротавирусами все чаще в роли этиологического фактора выступают такие микроорганизмы, как *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, калицивирусы и другие энтеропатогенные вирусы. Многие из этих микроорганизмов легко передаются от человека к человеку с пищей или через воду. Некоторые из них чрезвычайно опасны для лиц с иммунодефицитным состоянием и патологией желудочно-кишечного тракта. Кроме «вклада» в острую заболеваемость и летальность, некоторые возбудители инфекционной диареи вызывают развитие тяжелых, длительно протекающих осложнений, таких как гемолитико-уремический синдром (ГУС) с почечной недостаточностью (при энтерогеморрагическом эшерихиозе), синдромы Гийена-Барре при заболеваниях, вызванных *C. jejuni*, и мальабсорбции с диареей или без нее при инфекции, обусловленной энтероагрегативными штаммами *E. coli*, криптоспоридиями и, возможно, другими возбудителями кишечных инфекций [1].

При ОКИ бактериальной этиологии большое значение имеет выбор антибактериального препарата, поскольку он должен эффективно воздействовать на патогенных микроорганизмов и не влиять на чувствительную и неустойчивую естественную кишечную микрофлору. Кроме того, препарат не должен всасываться в кровь и оказывать системное действие, проявляя свою активность только в кишечнике. Этим требованиям может соответ-

ствовать декаметоксин – антимикробный, противогрибковый препарат, являющийся поверхностно-активным веществом и не проникающий через слизистые оболочки, концентрирующийся на цитоплазматической мембране (ЦПМ) микробной клетки и соединяющийся с фосфатидными группами липидов мембраны, нарушая проницаемость ЦПМ микроорганизмов. До настоящего времени декаметоксин применялся для местного наружного лечения заболеваний кожи и слизистых оболочек.

Учитывая широкий спектр действия декаметоксина на микроорганизмы, было решено провести доклинические исследования по обоснованию применения препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина производства ООО «ЮРИЯ-ФАРМ» для лечения кишечных инфекций при его пероральном (внутрижелудочном) применении. Поэтому было запланировано проведение комплекса токсикологических, фармакологических и фармакокинетических исследований с целью изучения:

- острой токсичности при однократном внутрижелудочном введении лабораторным животным;
- алергизирующих свойств;
- иммунотоксического действия;
- мутагенного действия;
- кумулятивных свойств;
- гонадотоксического, эмбриотоксического и тератогенного действия;
- репродуктивной токсичности;
- хронической токсичности;
- антимикробного действия *in vitro*
- антимикробного действия *in vivo* на 2х моделях инфекционного колоректита у крыс;
- фармакокинетических свойств.

1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ЦЕЛЕСООБРАЗНОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ РАБОТЫ НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ОПЫТА ЗАРУБЕЖНЫХ И ОТЕЧЕСТВЕННЫХ УЧЕНЫХ ПО ИССЛЕДУЕМОЙ ПРОБЛЕМЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).

В последние годы среди инфекционных болезней, по данным ВОЗ, наиболее распространенными являются бактериальные и вирусные диареи. Проблема острых кишечных инфекций (ОКИ) – одна из актуальнейших и в отечественном здравоохранении. С одной стороны, уровень заболеваемости остается достаточно высоким, без тенденции к отчетливому снижению, с другой – отмечается появление сероваров, обуславливающих тяжелое течение болезни (*S. flexneri* 2a, энтерогеморрагическая эшерихия O157 и др.) [1-16]. ОКИ относятся к одним из наиболее распространенных в мире заболеваний, частота развития которых, по данным ВОЗ, составляет 1-1,2 млрд случаев в год. Эта проблема особенно актуальна для детского возраста. Так, по уровню заболеваемости среди детей младших возрастных групп ОКИ находятся на втором месте, уступая только острым респираторным вирусным инфекциям, а по уровню смертности от инфекционных причин эта патология занимает лидирующую позицию. Ежегодно во всем мире от кишечных инфекций и их осложнений умирает около 5 млн. детей.

Наряду с сальмонеллами, шигеллами, ротавирусами все чаще в роли этиологического фактора ОКИ выступают такие микроорганизмы, как *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium difficile*, калицивирусы и другие энтеропатогенные вирусы. Многие из этих микроорганизмов легко передаются от человека к человеку с пищей или через воду. Некоторые из них чрезвычайно опасны для лиц с иммунодефицитным состоянием и патологией желудочно-кишечного тракта. Кроме «вклада» в острую заболеваемость и летальность, некоторые возбудители инфекционной диареи вызывают развитие тяжелых, длительно протекающих

осложнений, таких как гемолитико-уремический синдром (ГУС) с почечной недостаточностью (при энтерогеморрагическом эшерихиозе), синдромы Гийена-Барре при заболеваниях, вызванных *S. jejuni*, и мальабсорбции с диареей или без нее при инфекции, обусловленной энтероагрегативными штаммами *E. coli*, криптоспоридиями и, возможно, другими возбудителями кишечных инфекций [6].

ОКИ представляют собой большую группу инфекционных заболеваний с энтеральным (фекально-оральным) механизмом заражения, вызываемых в большинстве случаев вирусами, а также патогенной (шигеллы, сальмонеллы и др.) и условно-патогенной (протей, клебсиеллы, клостридии и др.) бактериальной флорой. Основным путем передачи возбудителя у детей раннего возраста является контактно-бытовой, у детей старшего возраста и взрослых – алиментарный.

Патогенез ОКИ обусловлен способностью возбудителей преодолевать противомикробную защиту организма хозяина, используя различные механизмы: адгезию, инвазию, продукцию энтеро- и цитотоксинов. С помощью адгезии микроорганизмы колонизируют кишечник и размножаются, несмотря на наличие перистальтики и механизмов антимикробной резистентности. Прикрепление к стенке кишечника также способствует попаданию энтеротоксина, который продуцирует бактерия, в клетки кишечника. Например, энтеротоксин, продуцируемый *V. cholerae*, стимулирует внутриклеточную систему аденилатциклазы, что приводит к активной секреции электролитов и интерстициальной жидкости в просвет кишечника. Значительный объем секретлируемой жидкости в течение нескольких часов может приводить к угрожающему жизни обезвоживанию. *V. cholerae*, *E. coli*, *S. dysenteriae* способны также к продукции цитотоксинов. Инвазия возбудителя в слизистую оболочку кишечника приводит к развитию воспалительной реакции, морфологическим результатом которой может быть гибель клеток эпителия, а клиническими проявлениями – лихорадка, спастические сокращения ки-

печника, боли в животе и диарея. Главным клиническим проявлением ОКИ является диарея. Исходя из особенностей возбудителя, можно выделить инвазивную диарею, возникающую при инвазии микроорганизма в стенку кишечника, и секреторную. Последняя является следствием воздействия энтеротоксина на энтероциты и защитной секрецией жидкости и электролитов кишечным эпителием в просвет кишечника. Инвазивная диарея сопровождается токсемией и выраженным интоксикационным синдромом, при этом стул имеет патологические примеси (кровь, слизь), что не характерно для секреторной диареи. Однако отсутствие проявлений интоксикации и других общих признаков заболевания при ОКИ не должно быть поводом для беспечности врача и пациента. Выраженная потеря жидкости, которая возникает при массивной диарее, может послужить причиной не только осложнений заболевания и ухудшения состояния больного, но и летального исхода. Особо остро проблема эксикоза стоит при заболевании ОКИ детей раннего и среднего возраста, поскольку незрелость защитно-адаптационных механизмов детского организма приводит к быстрой и обильной потере жидкости. Исходя из этого при наличии анамнестических или лабораторных данных, свидетельствующих о бактериальной этиологии диареи, применение антибиотиков наряду с регидратацией и энтеросорбцией является главным методом лечения.

Целесообразно рассмотреть основные понятия и определения.

Острые кишечные инфекции (острые диарейные болезни), по терминологии ВОЗ, – это большая группа заболеваний, объединенных развитием диарейного синдрома. Число клинических форм превышает 30 нозологических единиц, возбудителями которых могут быть бактерии, вирусы и простейшие [13, 16].

В соответствии с Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем (МКБ-10 пересмотра; 1995), в группу кишечных инфекций (А.00–А.09) входят следующие заболевания:

- А.00 – холера;
- А.01 – брюшной тиф и паратифы А, В, С;
- А.02 – другие сальмонеллезные инфекции;
- А.03 – шигеллез;
- А.04 – другие бактериальные инфекции, в том числе эшерихиоз, кампилобактериоз, кишечный иерсиниоз, клостридиоз, вызванный *Cl. difficile*;
- А.05 – другие бактериальные пищевые отравления, в том числе стафилококковое, ботулизм, клостридиоз, вызванный *Cl. perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Bac. cereus*, бактериальное пищевое отравление неуточненной этиологии;
- А.06 – амебиаз;
- А.07 – другие протозойные кишечные болезни, в том числе балантидиаз, лямблиоз, криптоспоридиоз, изоспороз;
- А.08 – вирусные кишечные инфекции, в том числе ротавирусный энтерит, вызванный агентом Норфолк, аденовирусный гастроэнтерит;
- А.09 – диарея и гастроэнтерит предположительно инфекционного происхождения.

В зависимости от источника инфекции и естественного резервуара возбудителя ОКИ могут быть разделены на антропонозы, зоонозы и сапронозы. В 30-40% случаев инфекционная диарея обусловлена вирусами, в 20% – патогенными бактериями, в 40% – микроорганизмы выделить не удается [8].

Под *диареей* понимают изменение нормальной характеристики фекалий, проявляющееся увеличением содержания жидкости, объема или частоты дефекаций. Изменение консистенции (разжижение) фекалий и увеличение частоты стула до 3 и более раз в сутки часто используются в качестве определения диареи при проведении эпидемиологических исследований.

Инфекционная диарея – это диарея, обусловленная инфекционными причинами, часто сопровождающаяся тошнотой, рвотой или схваткообразной болью в животе.

Острая диарея – это эпизод диареи продолжительностью до 14 дней.

Персистирующая диарея – диарея продолжительностью более 14 дней. Некоторые специалисты выделяют понятие хронической диареи с продолжительностью более 30 дней [6].

Инфекционные диареи могут быть 2 типов: инвазивные, которые сопровождаются воспалительными изменениями кишечника, и неинвазивные, при которых воспалительных изменений нет или они минимальные [1]. Известны 4 вида диареи, в основе которых лежат различные патогенетические механизмы. При этом каждому заболеванию кишечника присущ тот или иной вид диареи, а иногда их сочетание.

Секреторная диарея. В ее основе лежит усиление секреции натрия и воды в просвет кишки. Реже она обусловлена снижением всасывательной способности кишечника. Примером секреторной диареи может служить диарея при холере. Экзотоксин («холероген») проникает через рецепторные зоны в энтероциты и активирует аденилатциклазу, которая способствует усилению синтеза циклического 3'-5'-аденозин-монофосфата (цАМФ). Это приводит к повышению секреции энтероцитами электролитов и воды в просвет кишки в соотношении: 5 г натрия хлорида, 4 г натрия гидрокарбоната и 1 г калия хлорида в 1 литре испражнений. Определенная роль отводится простагландинам, стимулирующим синтез цАМФ. Помимо холеры, секреторная диарея наблюдается и при других кишечных инфекциях – сальмонеллезе, эшерихиозе, клебсиеллезе. Однако она может возникать и у неинфекционных больных при терминальном илеите, постхолецистэктомическом синдроме, поражении поджелудочной железы (так называемая панкреатическая холера), ворсинчатой аденоме прямой кишки, а также под влиянием повышенной продукции свободных и длинноцепочечных жирных кис-

лот, секретина, серотонина, кальцитонина и высокоактивных пептидов. При секреторной диарее осмотическое давление каловых масс ниже осмотического давления плазмы крови. Стул у больных водянистый, обильный, иногда зеленого цвета.

Гиперэкссудативная диарея. В ее основе лежит выпотевание плазмы, крови, слизи и сывороточных белков в просвет кишки. Этот вид диареи наблюдается при инфекционно-воспалительных процессах в кишечнике, например при шигеллезе, кампилобактериозе, сальмонеллезе, клостридиозе. Следует помнить, что гиперэкссудативная диарея может возникать при неинфекционных заболеваниях кишечника – неспецифическом язвенном колите, болезни Крона, лимфоме и карциноме кишечника. Осмотическое давление фекальных масс выше осмотического давления плазмы крови. Стул у больных жидкий, с примесью слизи, крови и гноя.

Гиперосмолярная диарея. Наблюдается при синдроме мальабсорбции – расстройстве всасывания в тонкой кишке одного или нескольких питательных веществ и нарушении обменных процессов. В основе синдрома мальабсорбции лежат не только морфологические изменения слизистой оболочки, но и функциональные нарушения ферментных систем, моторики и транспортных механизмов, а также развивающийся дисбактериоз. Гиперосмолярная диарея может наблюдаться при неумеренном употреблении солевых слабительных. Осмотическое давление каловых масс выше осмотического давления плазмы крови. Стул у больных обильный, жидкий, с примесью полупереваренной пищи.

Гипер- и гипокINETическая диарея. Возникает при нарушениях транзита кишечного содержимого. В ее основе лежит повышенная или пониженная моторика кишки. Она часто наблюдается у больных с синдромом раздраженного кишечника, при неврозах и злоупотреблении слабительными и антацидами. Осмотическое давление каловых масс соответствует осмотическому давлению плазмы крови. Стул у больных жидкий или кашицеобраз-

ный, необильный. Таким образом, третий и четвертый тип диареи встречается только у неинфекционных больных [13].

К настоящему времени по диагностике и лечению острых кишечных инфекций накоплено большое количество сведений, содержащихся в отдельных статьях и руководствах. Ценность тех или иных рекомендаций для практического врача определяется, в первую очередь, их соответствием принципам доказательной медицины. С этой точки зрения большой интерес представляют рекомендации Американского общества инфекционных болезней [6], которые основаны на доказательных данных и сопровождаются характеристикой качества доказательств (оцениваются по шкале от I до III) и степени достоверности рекомендаций (оцениваются по шкале от A до E). Эти рекомендации касаются таких вопросов, как оральная регидратация, клиническое и эпидемиологическое обследование пациента, проведение селективных бактериологических исследований испражнений, избирательное назначение антимикробной терапии, противопоказания к применению противодиарейных препаратов, использование доступных специфических вакцин. Сбор анамнеза, клиническое обследование. Всестороннее изучение анамнеза пациента, включая клинические и эпидемиологические данные, должно быть первым шагом в обследовании больных, имеющих характерные признаки диареи. Существенное значение имеют следующие клинические особенности:

- когда и как началось заболевание (например, внезапное или постепенное начало, продолжительность симптомов);
- характеристика испражнений (водянистые, кровянистые, с примесью слизи или гноя, жирные и т. д.);
- частота стула и относительное количество испражнений;
- наличие симптомов дизентерии (лихорадка, тенезмы, примесь крови и/или гноя в испражнениях);
- симптомы эксикоза – жажда, тахикардия, ортостатическая гипотензия,

уменьшение диуреза, вялость и заторможенность, снижение тургора кожи;

- сопутствующие симптомы, их частота и интенсивность (тошнота, рвота, боль в животе, спазмы, головная и мышечная боль, расстройства сознания).

Кроме того, у всех пациентов должно быть выяснено наличие эпидемиологических факторов риска развития отдельных заболеваний или их распространения. Они включают следующие обстоятельства:

- поездки в развивающиеся страны;
- посещение детских учреждений и род занятий (профессия);
- употребление в пищу небезопасных продуктов (недостаточно термически обработанного мяса, сырых яиц, непастеризованного молока и соков); купание в загрязненных водоемах или использование для питья сырой воды из них (например, из озера или реки);
- контакт с дикими или домашними животными, у которых отмечается диарея;
- наличие в окружении больных, имеющих сходные симптомы (например, в общежитии, на работе);
- регулярный или недавний прием лекарств (антибиотиков, антацидных препаратов, противодиарейных средств);
- наличие медицинских факторов, предрасполагающих к развитию инфекционной диареи (СПИД, прием иммунодепрессантов, гастрэктомия в анамнезе, ранний детский или старческий возраст);
- анальный секс или орально-анальные половые контакты (герпетический проктосигмоидит может проявляться диареей);
- принадлежность к декретированным группам населения (работники питания, воспитатели детских учреждений).

Для клинической картины ОКИ характерно наличие 3 синдромов: гастроэнтерита (или гастроэнтероколита, энтероколита или колита); интоксикации; обезвоживания [4, 16].

При разных кишечных инфекциях локализация поражения того или иного отдела желудочно-кишечного тракта различна. Примерами могут служить пищевые токсикоинфекции с преимущественным поражением желудка и тонкой кишки и шигеллез с преимущественным поражением толстой кишки. Особую значимость при ОКИ имеют синдромы интоксикации и обезвоживания.

Интоксикация – это сложный симптомокомплекс, обусловленный, с одной стороны, интегрированным действием микробов и их токсинов, и ответной реакцией организма – с другой. При этом происходит нарушение функционально-адаптационных процессов во многих органах, системах и, в итоге, обменные нарушения на уровне клетки. Различают 3 степени интоксикации при ОКИ: легкую, среднюю и тяжелую.

Обезвоживание – синдром, обусловленный потерей организмом жидкости и солей, имеющий место при рвоте и диарее. У взрослых больных при ОКИ отмечается изотонический тип обезвоживания. Выявляется трансудация бедной белком изотонической жидкости, которая не в состоянии реабсорбироваться в толстой кишке. При этом происходит потеря не только воды, но и электролитов Na^+ , K^+ , Cl^- . Различают 4 степени обезвоживания при ОКИ: при I степени потеря массы тела не превышает 3%, при II – 4-6%, при III – 7-9%, при IV – 10% и более [13]. Ранняя диагностика ОКИ должна иметь синдромальный характер с целью выявления симптомов, свойственных синдромам интоксикации и обезвоживания. Только при этом может быть обеспечено снижение числа диагностических ошибок и своевременное и адекватное проведение неотложной патогенетической терапии [9].

Для диагностики ОКИ используются бактериологические, серологические методы, ПЦР (особенно для выявления L-форм сальмонелл). Поскольку анамнестические и клинические данные во многих случаях позволяют судить о возможной этиологии диареи, существует множество мнений о том, что с медицинской точки зрения следует считать показанием для проведения бактериологического исследования фекалий. Большинство авторов сходятся в том, что этиологическая расшифровка прежде всего необходима для проведения противоэпидемических мероприятий. Так как результаты лабораторных исследований часто запаздывают, а большая часть ОКИ проходит без лечения, данные тесты могут дать мало диагностически значимой информации, непосредственно относящейся к ведению конкретных пациентов, и вести к необоснованным затратам. В то же время каждый положительный результат культурального исследования фекалий может оказаться важным для эпидемиологической службы, стремящейся своевременно выявлять вспышки инфекционных заболеваний и принимать адекватные меры.

Американским обществом инфекционных болезней рекомендуется избирательный подход для назначения культурального исследования испражнений. Использование методов иммуноферментного анализа (ИФА) и ПЦР позволяют значительно повысить чувствительность диагностического исследования. При серологических исследованиях надо учитывать, что нарастание титра антител в сыворотке крови больного зависит не только от вида возбудителя, но и от реактивности организма и зачастую выражено незначительно [13,16].

В тех случаях, когда при использовании полного набора микробиологических диагностических методов не определен конкретный возбудитель, следует думать и о неинфекционных, или внекишечных, причинах диареи, к которым относятся:

- синдром раздраженного кишечника;
- воспалительные заболевания толстой кишки (если диарея имеет персистирующий или рецидивирующий характер, в испражнениях содержатся лейкоциты или лактоферрин, а природа диареи остается не установленной);
- ишемическое поражение кишечника (возраст пациента старше 50 лет или наличие облитерирующего поражения периферических сосудов);
- употребление слабительных средств;
- частичная обструкция;
- ректосигмоидный абсцесс;
- болезнь Аддисона-Бирмера;
- синдром мальабсорбции;
- дивертикулы тонкой кишки;
- склеродермия;
- целиакия.

Дополнительные лабораторно-инструментальные исследования, такие как биохимический анализ крови, развернутый общий анализ крови, исследование ее на стерильность, общий анализ мочи, рентгенологическое исследование органов брюшной полости, ректороманоскопия и эндоскопическое исследование, следует назначать только тогда, когда степень тяжести заболевания или клинические и эпидемиологические данные свидетельствуют о необходимости использования данных методов [6].

Рекомендации по лечению. Регидратационная терапия. Регидратационная терапия – это основа лечения ОКИ. Ее целями являются дезинтоксикация и восстановление водно-электролитного и кислотно-основного состояний. Регидратация в основном осуществляется полиионными кристаллоидными растворами (трисоль, квартасоль, хлосоль, ацесоль). Доказана нецелесообразность использования моноионных растворов (физиологический раствор поваренной соли, 5% раствор глюкозы). Коллоидные растворы (декс-

транов) можно использовать в целях дезинтоксикации лишь при отсутствии обезвоживания [3,16]. Лишь 5-15% больных с ОКИ нуждаются во внутривенной терапии, в 85-95% случаев лечение должно осуществляться оральным путем [9]. С этой целью используют растворы цитроглюкосалана, глюкосалана, регидрона. В последнее время с успехом стали применять сложные углеводы – рис в виде пудры и другие злаковые. Они способствуют повышению эффективности оральных регидратационных растворов и снижению потребности в них, уменьшению продолжительности заболевания и объема каловых масс [5].

Регидратационная терапия (внутривенная и оральная) осуществляется в 2 этапа: I этап – ликвидация имеющегося обезвоживания; II этап – коррекция продолжающихся потерь. Водно-солевая терапия ОКИ (пищевые токсикоинфекции, сальмонеллез) при тяжелом течении болезни осуществляется внутривенно со скоростью 70-90 мл/мин и в объеме 60-120 мл/кг, при среднетяжелом течении – со скоростью 60-80 мл/мин и в объеме 55-75 мл/кг. При холере с обезвоживанием II-IV степени оптимальная скорость внутривенной инфузии составляет 70-120 мл/мин, а объем инфузии определяется массой тела и степенью обезвоживания. При шигеллезе объемная скорость введения полиионных кристаллоидных растворов составляет 50-60 мл/мин. При более низкой объемной скорости и меньшем объеме регидратационной терапии возникают условия для прогрессирования обезвоживания, развития гемодинамической недостаточности, отека легких и пневмонии, ДВС-синдрома и острой почечной недостаточности [4,16]. Оральная регидратационная терапия проводится в тех же объемах, но с объемной скоростью 1-1,5 л/ч.

Антидиарейные препараты. Для лечения ОКИ предложено несколько групп препаратов с антидиарейным действием:

- *Индометацин* – ингибитор биосинтеза простагландинов, способствующий купированию секреторной диареи. Назначают по 50 мг 3 раза с интервалами

в 3 часа в течение 1 или 2 дней. Отсутствие или недостаточный эффект лечения в некоторых случаях зависит от того, что при сальмонеллезе и пищевых токсикоинфекциях патогенез диареи обусловлен не только ее секреторной формой, на которую индометацин воздействует, но и гиперэкссудативной, на которую индометацин влияния не оказывает.

- *Октреотид* – ингибитор синтеза активных секреторных агентов, способствующий снижению секреции и моторной активности. Это синтетический октапептид, являющийся производным соматостатина. Выпускается в ампулах по 0,05, 0,1 и 0,5 мг. Вводится подкожно 1-2 раза в день.
- *Препараты кальция*, активизирующие фосфодиэстеразу, которая препятствует образованию цАМФ. Рекомендуют применение 5 г глюконата кальция *per os* 2 раза с интервалом в 12 ч.
- *Сорбенты* (полифепан, энтеросгель, полисорб, карболонг, пепидол и др.) применяют с целью уменьшения интоксикации.
- *Диосмектит* – препарат многоцелевого действия (сорбент и протектор, защищающий слизистую оболочку кишечника).
- *Атропиноподобные препараты* (реасек, лиспафен).
- Препараты, воздействующие на опиоидные рецепторы (*лоперамид, тримебутин*).
- *Вяжущие препараты* (десмол, порошки Кассирского).
- *Пробиотики* (аципол, линекс, ацилак, бифидумбактерин форте), в том числе биококтейль «НК».
- *Ферменты*.
- *Кишечные антисептики*. В основном применяют 4 препарата указанной группы (для лечения легкой и средней степени тяжести энтероинвазивных диарей).

Интестопан обладает антибактериальной и антипротозойной активностью, является 8-оксихинолином. Назначают взрослым по 1-2 таблетки 4-6 раз в день.

Интетрикс эффективен в отношении широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, дизентерийных амеб и грибов типа *Candida*. Назначают по 1-2 капсуле 3 раза в день. *Энтеро-седив* активен против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных бактерий, некоторых простейших, является оксихинолином. Назначают по 1 таблетке 3 раза в день. *Энтерол* – противодиарейный препарат биологического происхождения. Противомикробное действие осуществляется дрожжами *Saccharomyces boulardii*. Назначают по 1-2 капсулы 2 раза в день.

Антибактериальная терапия. Целесообразность проведения системной антибактериальной терапии и ее характер полностью зависят от этиологии диареи и, соответственно, от особенностей диарейного синдрома. При большинстве кишечных инфекций не требуется проведения специфической антибиотикотерапии. Это касается всех случаев секреторной диареи, вызванной бактериями, продуцирующими энтеротоксины, а также вирусами и простейшими. Антибиотики назначают лишь при холере с целью сокращения периода бактериовыделения и предотвращения распространения возбудителя в окружающей среде.

Диарея с выраженными признаками воспаления (присутствие крови, гноя, слизи и лейкоцитов в фекалиях), сопровождающаяся лихорадкой, скорее всего, вызвана патогенами, в отношении которых назначение этиотропных препаратов может обеспечить клинический и бактериологический эффекты. Эмпирическая антимикробная терапия в случае спорадического возникновения диареи с лихорадкой и признаками воспаления в фекалиях предполагает назначение фторхинолонов (норфлоксацин по 0,4 г каждые 12 ч в течение 3-5 дней, или ципрофлоксацин в дозе 0,5 г каждые 12 ч на протяжении 3-5 дней, или офлоксацин по 0,2 г каждые 12 ч в течение 3-5 дней) [7].

Таким образом, терапия острых кишечных инфекций должна быть комплексной, учитывающей этиологию и патогенез клинических симптомов при различных заболеваниях.

При ОКИ бактериальной этиологии большое значение имеет выбор антибактериального препарата, поскольку он должен эффективно воздействовать на патогенных микроорганизмов и не влиять на чувствительную и неустойчивую естественную кишечную микрофлору. Кроме того, препарат не должен всасываться в кровь и оказывать системное действие, проявляя свою активность только в кишечнике. Этим требованиям отвечает нифуроксазид – антибактериальный препарат нитрофуранового ряда, который показан для лечения острой диареи инфекционного генеза.

Антибактериальная терапия ОКИ бактериального генеза нифуроксазидом. Зачастую на выделение возбудителя и определение его чувствительности при ОКИ бактериального генеза времени и возможностей нет, а при проведении лабораторных анализов верифицировать патогенный микроорганизм удается лишь в 60% случаев. В связи с этим назначение антибактериальной терапии проводится эмпирически. В таком случае препарат, с одной стороны, должен обладать максимально широким спектром действия, а с другой – быть интактным по отношению к нормальной микрофлоре кишечника. Про- и пребиотические препараты, которые сегодня активно рекламируются как средства против диареи, не имеют антибактериальной активности и являются лишь дополнением к лечению антибиотиками.

В качестве стартового антибактериального препарата для лечения диареи бактериального генеза у детей и взрослых может быть рекомендован препарат из группы нитрофуранов нифуроксазид. Кроме острой диареи, этот препарат также эффективен при хронических колитах и энтеритах инфекционной этиологии. Нифуроксазид (Гродзиский фармацевтический завод «Польфа» Сп. з о.о./Gedeon Richter group) обладает широким спектром антибактериального действия, проявляя свою активность в отношении таких

энтеропатогенных микроорганизмов, как *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Clostridium*, *E.coli*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Proteus spp.*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *V. cholerae*, *H. pylori*, *Yersinia* и др. При этом он практически не влияет на сапрофитную микрофлору кишечника и не вызывает дисбактериоз. Более того, активность нифуроксазида по отношению к патогенной и условно-патогенной флоре наряду с интактностью к естественной позволяет использовать его в комплексной терапии кишечных дисбактериозов, в том числе обусловленных приемом других антибактериальных средств. Препарат не вызывает резистентности и перекрестной устойчивости бактерий к действию других противомикробных средств, что дает возможность назначать его в комплексной терапии с системными лекарственными средствами. Нифуроксазид обладает широким профилем безопасности и практически не вызывает побочных эффектов (кроме случаев индивидуальной гиперчувствительности к препарату). После консультации с врачом нифуроксазид можно применять при беременности и лактации, а его использование у детей может быть показано уже с 2-месячного возраста. Препарат удобен для применения в педиатрической практике, поскольку имеет лекарственную форму для детей в виде жидкой суспензии с фруктовыми вкусами. Механизм антибактериального действия нифуроксазида обусловлен блокированием дегидрогеназы и угнетением дыхательной цепи цикла трикарбоновых кислот, синтеза белков и ряда других биохимических процессов в бактериальной клетке, за счет чего достигается угнетение клеточного деления микроорганизмов (бактериостатический эффект). Кроме того, в высоких концентрациях нифуроксазид способен разрушать цитоплазматическую мембрану, проявляя бактерицидный эффект, снижать продукцию энтеротоксинов патогенами, уменьшая тем самым раздражение энтероцитов и секрецию жидкости в просвет кишечника. Препарат также активизирует иммунную систему, повышая фагоцитирование микроорганизмов и титр комплемента. Для детей в возрасте от 2 до 6 мес рекомендуемая доза нифуроксазида со-

ставляет 100 мг 2-3 раза в сутки; от 7 мес до 2 лет – 100 мг (2,5 мл, или 1/2 мерной ложки) 4 раза в сутки; от 2 до 6 лет – 200 мг 3 раза в сутки (суточная доза – 600 мг) Взрослым и детям старше 6 лет препарат показан по 200 мг 4 раза в сутки. Перед применением суспензию необходимо перемешать [16].

Клинический опыт применения нифуроксазида. Одно из первых исследований по изучению эффективности и безопасности нифуроксазида было проведено в 1989 г. в госпитале Бисетр г. Ле Кремлин-Бисетр (Франция). В двойном слепом рандомизированном плацебо контролируемом исследовании участвовали 88 пациентов с синдромом диареи, которые в течение 5 дней принимали нифуроксазид 400 мг (основная группа) или плацебо дважды в сутки. При этом средняя длительность диареи в основной группе составила 2,09 дня против 3,26 дня – в группе плацебо ($p \geq 0,004$). Повышенная перистальтика и слизь в стуле в группе нифуроксазида исчезли гораздо быстрее, чем в группе плацебо. Антибактериальная терапия этим препаратом хорошо переносилась пациентами, побочных эффектов от проводимого лечения отмечено не было. Таким образом, в результате проведенного исследования нифуроксазид зарекомендовал себя как эффективное средство для лечения диареи. Авторами было рекомендовано его применение даже без результатов культурального исследования или в случае, если выделить возбудителя не удалось. Клиническая эффективность нифуроксазида также изучалась в сравнительном исследовании с использованием триметоприма/сульфаметоксазола и бактисубтила при диарее бактериальной этиологии ($n=329$) и алиментарной токсикоинфекции с явлениями диареи ($n=89$). В зависимости от степени тяжести заболевания (легкая, средняя, тяжелая) пациенты были разделены на три группы. Нормализация стула быстрее всего произошла среди пациентов, принимавших нифуроксазид, – в среднем за 2,2; 3,5 и 4,05 дня по группам соответственно. При приеме триметоприма/сульфаметоксазола и бактисубтила эти показатели составили 3,0 и 3,9; 4,4 и 3,4; 4,6 и 5,4 дня соответственно.

Исследование эффективности и безопасности нифуроксазида было проведено и в Украине. Так, в исследовании, которое проводилось по программе Государственного фармакологического центра МЗ в 2004 г. в рамках изучения безопасности нитрофуранов, принимали участие 400 пациентов в возрасте от 2 мес. до 14 лет с ОКИ легкой и средней степени тяжести. В их лечении использовался антибактериальный препарат нифуроксазид. В результате у 93% пациентов отмечена высокая эффективность такого лечения и у 7% – умеренная. Не выявлено ни одного случая низкой эффективности или отсутствия таковой. При этом лишь у 3% пациентов наблюдались незначительные побочные реакции, которые не вызывали серьезных проблем и не требовали отмены препарата (тошнота и незначительные высыпания на коже, которые исчезали после назначения антигистаминных препаратов) [16].

Нифуроксазид внесен в Национальный перечень основных лекарственных средств (Постановление Кабинета Министров Украины от 29.03.2006 г. № 400), а также внесен в Перечень лекарственных средств, которые могут закупать учреждения здравоохранения за бюджетные средства (Приказ МЗ Украины от 27.02.2006 г. № 86). В заключение следует отметить, что заболеваемость ОКИ имеет сезонный характер, существенно увеличиваясь в летнее время года, что обусловлено благоприятным для размножения бактерий температурным режимом. Поэтому в каждой аптечке должен присутствовать антибиотик из группы кишечных антисептиков, который обладает максимально широким спектром антибактериальной активности, минимальным влиянием на нормальную микрофлору кишечника, локальным действием и доступностью. Этим требованиям отвечает нифуроксазид – эффективный и безопасный антибактериальный препарат производства Гродзиского фармацевтического завода «Польфа» (Польша).

Альтернативной нифуроксазиду может быть декаметоксин – 1,10-декаметилен-бис(диметилментоксикарбонилметил)-аммония дихлорид. Препарат был синтезирован А.И. Лопушанским и В.В. Удовицким. Он представляет собой белым мелкокристаллический порошок с едва заметным характерным запахом, легко растворяется в воде, 95 % спирте и практически нерастворим в эфире (ГФ XI , вып. 1, с . 175) [17].

Декаметоксин является бисчетвертичным аммониевым соединением, разлагается при плавлении при температуре 163°C. Молекулярная масса составляет 693,9 (ТФС 42-1814-88). Препарат декаметоксин соответствует временной фармакопейной статье Украине. Антимикробный спектр изучали на 250 штаммах микроорганизмов, относящихся к разным семействам и видам.

Высокие противомикробные свойства декаметоксина проявляются по отношению к музейным и антибиотикорезистентным штаммам стафилококка, стрептококка, коринебактерий дифтерии, возбудителям дизентерии, дрожжеподобным грибам семейства *Candida*, гонококкам, менингококкам, вирусам, хламидиям, патогенным простейшим, вибрионам, возбудителям трихофитии, микроспории, эпидермофитии.

Минимальная микробицидная концентрация (МмкЦ) декаметоксина по отношению к вышеперечисленным микроорганизмам составляет 0,24-16 мкг/мл. Минимальная микростатическая концентрация (ММСК) для этих видов и штаммов микроорганизмов равна 0,12-8 мкг/мл.

Антисептик декасан в соответствии с ТФС 42У-17-93 имеет в своем составе следующие соотношения компонентов: декаметоксин (в пересчете на сухое вещество) – 0,2 г (ТФС 42-1814-88); натрия хлорид (ФС 42-2572-88) – 9,0 г; вода для инъекций (ФС 42-2620-89) – до 1 л. Декасан изготавливают на воде для инъекций массово-объемным методом.

Декасан согласно ТФС является бесцветной (ГФ XI , вып. 1, с.194), прозрачной жидкостью (ГФ XI , вып.1, с.198). Потенциометрически опреде-

ляют рН Декасана, которая должна быть в пределах от 5,0 до 6,8 (ГФ XI, вып.1, с.113). Декасан должен выдерживать требования «Временной инструкции по контролю инъекционных растворов на механические включения (И 42-3-85)». Препарат должен быть стерильным. Испытание стерильности проводят в соответствии с ГФ XI, вып.2, с.187 с учетом антимикробного действия Декасана, используя метод прямого посева на питательные среды при соотношении посевного материала и питательной среды 1:250 [17].

Декасан обладает способностью повышать чувствительность антибиотикорезистентных штаммов бактерий к антибиотикам и потенцирует противомикробной активностью традиционных лекарственных средств в процессе комплексного лечения больных.

Согласно инструкции по применению [18] Декасан (0,02% р-р декаметоксина) – антимикробный, противогрибковый препарат, концентрирующийся на цитоплазматической мембране (ЦПМ) микробной клетки и соединяющийся с фосфатидными группами липидов мембраны, нарушая проницаемость ЦПМ микроорганизмов. Декаметоксин оказывает выраженное бактерицидное действие на стафилококки, стрептококки, дифтерийную и синегнойную палочки, капсульные бактерии и фунгицидное действие на дрожжи, дрожжеподобные грибы, возбудителей эпидермофитии, трихофитии, микроспории, эритразмы, некоторые виды плесневых грибов (аспергиллы, пеницилы), протистоцидное действие на трихомонады, лямблии, вирусоцидное действие на вирусы. Высокоактивен относительно микроорганизмов, стойких к антибиотикам (пенициллин, левомецетин, тетрациклины, стрептомицин, мономицин, канамицин, неомицины, новобиоцин, эритромицин, олеандомицин и др.). Образование стойких к декаметоксину форм при длительном применении происходит медленно и не превышает эффективных концентраций препарата. Бактериостатические (фунгистатические) концентрации сходны с его бактерицидными (фунгицидными), вирусоцид-

ными, протистоцидными концентрациями. В процессе лечения декасаном повышается чувствительность антибиотико-резистентных микроорганизмов к антибиотикам.

Фармакокинетика. Препарат для наружного применения в виде промываний или примочек; практически не всасывается слизистыми оболочками, неповрежденной кожей и раневой поверхностью.

Показания к применению. Декасан применяют для лечения гнойничковых бактериальных и грибковых заболеваний кожи, микробной экземы, гнойно-воспалительных поражений мягких тканей (абсцессы, карбункулы, флегмоны, фурункулы, нагноившиеся раны, панариции). Препарат назначают при стоматологических заболеваниях (стоматиты, язвенно-некротический гингивит, дистрофически-воспалительная форма пародонтоза I-II степени в стадии обострения). Декасан также применяют при абсцессе легких, бронхоэктатической болезни, кистозной гипоплазии легких, осложненной нагноением, хроническом бронхите в фазе обострения, хроническом тонзиллите, ангине, носительстве стафилококков и дифтерийных палочек, язвенном колите, парапроктите. В гинекологической практике декасан применяют для лечения кандидоза слизистой влагалища, воспалительных заболеваний гениталий микробного происхождения, предродовой санации родовых путей, лечения послеродового эндометрита. Декасан применяют для гигиенической дезинфекции кожи рук медперсонала и резиновых перчаток во время обследования больных, проведения медицинских манипуляций и малых хирургических вмешательств, предстерилизационной дезинфекции медицинских инструментов и диагностического оборудования из металлов, резины, полимерных материалов и стекла.

Способ применения и дозы. При гнойных и грибковых поражениях кожи, нагноившихся ранах раствор применяют в виде промываний и примочек. Для лечения проктита и язвенного колита теплый раствор вводят в виде клизм по 50-100 мл 2 раза в сутки до полного стихания признаков острого

воспаления. Свищи при хроническом парапроктите промывают Декасаном ежедневно на протяжении 3-4 суток. Для промывания мочевого пузыря у взрослых раствор декаметоксина применяют после предварительного разведения 1:7 очищенной водой в дозе 500-600 мл (на курс лечения 7-20 промываний). Поражения слизистой оболочки полости рта лечат путем аппликаций по 25-50 мл на протяжении 10-15 мин, либо полоскания (100-150 мл). Дистрофически-воспалительную форму пародонтоза I-II степени в стадии обострения лечат путем ирригации патологических карманов десен теплым раствором (50-70 мл) либо аппликаций на десны до затихания воспалительных явлений. Больным с кандидозным поражением слизистой оболочки рта, язвенно-некротическим гингивитом назначают полоскания полости рта (100-150 мл) 4 раза в сутки на протяжении 5-10 дней. Лечение кандидоза миндалин, хронического тонзилита проводят промыванием лакун поднебных миндалин (50-75 мл на промывание). Санацию носителей стафилококка, дифтерийной палочки проводят путем полоскания зева, промывания лакун, орошения носоглотки, миндалин. Лакуны промывают 3-5 раз через день. При абсцессе легких, бронхоэктатической болезни, кистозной гипоплазии легких, осложненных нагноением, хроническом бронхите в фазе обострения Декасан вводят эндобронхиально:

- через микротрахеостому – по 25-50 мл 1-2 раза в день;
- через трансназальный катетер – по 5-10 мл 1 раз в день;
- методом ультразвуковых ингаляций – по 5-10 мл 1-2 раза в день;
- при помощи лаважа трахеобронхиального дерева – в объеме 100

мл. Длительность лечения – 2-4 недели.

Для лечения микробных, грибковых и трихомонадных поражений слизистой оболочки влагалища Декасан применяют в виде спринцеваний (50-100 мл подогретого до 38°C препарата 3 раза в день). Таким же образом проводят предродовую санацию родовых путей однократно. Лечение после-

родового эндометрита осуществляют путем промывания теплым препаратом полости матки (150-200 мл 2 раза в сутки).

Побочное действие. В одиночных случаях возможна индивидуальная невосприимчивость. У лиц с индивидуальной невосприимчивостью лекарств возможно появление сыпи на коже после применения препарата; при эндобронхиальном введении – ощущение жара за грудиной, которое проходит самостоятельно через 20-30 мин после окончания процедуры.

Противопоказания. Индивидуальная сверхчувствительность к препарату.

Взаимодействие с другими лекарственными средствами: Фармацевтическое: декаметоксин является катионным поверхностно-активным веществом, поэтому он несовместим с мылом и другими анионными соединениями. Фармакодинамическое: декаметоксин повышает чувствительность антибиотико-резистентных микроорганизмов к антибиотикам.

Передозировка. В связи с отсутствием всасывания передозировок не наблюдается.

Особенности применения. Декаметоксин в концентрации, которая применяется в Декасане, не имеет токсического действия. Длительное применение Декасана не вызывает каких либо аллергических реакций. Подогревание препарата до +38 °С перед употреблением повышает эффективность действия.

Таким образом, вышеприведенные данные свидетельствуют о том, что декаметоксин проявляет выраженные антимикробные и противогрибковые свойства, является поверхностно-активным веществом и не проникает через слизистые оболочки, концентрируется на цитоплазматической мембране (ЦПМ) микробной клетки и соединяется с фосфатидными группами липидов мембраны, нарушая проницаемость ЦПМ микроорганизмов. До настоящего времени декаметоксин применялся исключительно для местного наружного лечения инфекционных заболеваний кожи и слизистых оболочек.

Учитывая широкий спектр действия декамтоксина на микроорганизмы, было решено провести доклинические исследования по обоснованию применения препарата Декасан в виде 0,02% раствора декамтоксина производства ООО «ЮРИЯ-ФАРМ» для лечения кишечных инфекций при его пероральном (внутрижелудочном) применении. Поэтому было запланировано проведение всестороннего экспериментального исследования безопасности и эффективности препарата.

2. ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ДЕКАСАНА

Одной из важных токсикологических характеристик лекарственных средств является безвредность, характеризующаяся среднетоксической (среднелетальной) дозой препарата – ЛД₅₀. При исследовании генерического лекарственного средства необходимым наряду с подтверждением терапевтических свойств является определение показателя ЛД₅₀, получаемого в процессе изучения острой токсичности. Это позволяет определить класс токсичности препарата, широту его терапевтического действия и соотношение токсичность/безвредность в условиях применения препарата в дозах, в десятки и сотни раз превышающих терапевтическую.

С целью определения ЛД₅₀ и воспроизведения клиники острого отравления острую токсичность препарата Декасан в виде 0,02% раствора декаметоксина изучали в соответствии с методическими рекомендациями по Доклиническому изучению лекарственных средств [19] на крысах обоего пола массой 180-200г и 18-20 г в условиях однократного внутрижелудочного введения. Путь введения выбран согласно предлагаемой лекарственной форме – раствор для внутреннего применения. Учитывая концентрацию действующего вещества в препарате, составляющую 0,02%, данные литературы и методические рекомендации по Доклиническому изучению лекарственных средств, в которых указано, что максимально вводимая доза жидких лекарственных форм для перорального применения составляет 20 мл/кг, а максимальный объем жидкости, который можно ввести крысе массой 200-240 г перорально – 5 мл [19-23], препарат Декасан вводили внутрижелудочно однократно в максимально вводимой дозе 20 мл/кг. За животными наблюдали в течение 14 дней. В течение первых 3-х дней и до конца периода наблюдения гибели и признаков интоксикации у крыс обоего пола не наблюдали.

Таким образом, установить значение ЛД₅₀ для препарата Декасан в виде 0,02% раствора декаметоксина при его однократном пероральном введении не представляется возможным, так как максимально вводимая доза 20 мл/кг не оказывает токсического влияния на физиологическое состояние животных.

В связи с вышесказанным и с целью воспроизведения клиники острого отравления далее были проведены исследования по определению ЛД₅₀ действующего вещества препарата Декасан – субстанции декаметоксина в соответствии с методическими рекомендациями по Доклиническому изучению лекарственных средств и метода Пастушенко Т.В. и соавт. [19] на крысах и мышях обоего пола массой 180-200 г и 18-20 г соответственно в условиях однократного внутрижелудочного введения. С целью выявления возможных токсических свойств субстанции декаметоксина и определение ее влияния на организм мышей и крыс самцов и самок, их состояние сравнивали с состоянием интактных животных обоего пола. Изучение острой токсичности субстанции начинали с предварительных исследований на белых крысах [19]. Каждую дозу препарата испытывали на двух животных. Наблюдения вели в течение двух недель. Результаты представлены в таблице 2.1.

Таблица 2.1

Предварительные исследования острой токсичности субстанции декаметоксина на крысах при внутрижелудочном введении

№ п/п	Доза, мг/кг	Число животных	Наблюдаемый эффект, погибшие животные/число животных
1	200	2	0/2
2	400	2	0/2
3	500	2	1/2
4	708	2	2/2
5	1260	2	2/2

Результаты таблицы 2.1 свидетельствуют о гибели крыс при внутрижелудочном однократном введении субстанции декаметоксина в интервале доз 500-700 мг/кг. Однако полученные данные недостаточно информативны. Для дальнейшего определения ЛД₅₀ необходимо было согласно методике [19] испытать дополнительно еще несколько доз, при введении которых эффект в одной группе животных должен превышать 50% (но не достигать 100%), а в других быть меньше 50%, но не 0.

В результате проведенного эксперимента был выделен необходимый интервал доз (таблица 2.2) по шкале, предложенной авторами [19] с учетом предварительных исследований по определению ЛД₅₀ на крысах.

Таблица 2.2

Заключительное исследование острой токсичности субстанции декаметоксина на крысах при внутрижелудочном введении

№ п/п	Доза, мг/кг	Число животных	Наблюдаемый эффект, погибшие животные/число животных
1	398	3	0/3
2	500	3	1/3
3	750	3	2/3
4	1000	3	2/3
5	1580	3	3/3

Полученные данные показали, что величина ЛД₅₀ субстанции декаметоксина для крыс находится в интервале доз 500-750 мг/кг. В соответствии с методикой [19] по наименьшей дозе выделенного интервала определено значение ЛД₅₀ с доверительным интервалом, которое составило 586 (484:588) мг/кг при внутрижелудочном введении субстанции крысам. Согласно общепринятой классификации [19], субстанция декаметоксина при

однократном внутрижелудочном введении крысам относится к IV классу малотоксичных веществ ($500 \text{ мг/кг} < \text{ЛД}_{50} < 5000 \text{ мг/кг}$).

Для определения влияния на функциональное состояние организма однократного внутрижелудочного введения токсической дозы субстанцию декаметоксина вводили крысам самцам и самкам с массой тела 180-200 г в максимальной токсической дозе, которая не вызывает гибели – 400 мг/кг. Предварительно животных рандомизировали по группам, как показано в табл. 2.3.

Таблица 2.3

Распределение лабораторных животных в процессе исследования влияния на организм однократного внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина

№ п/п	Условия опыта	Количество животных в группе	
		Самцы	Самки
1.	Интактный контроль	6	6
2.	Декаметоксин, 400 мг/кг	6	6

После введения субстанции декаметоксина за животными наблюдали в течение 14 дней и оценивали общее состояние животных, летальность, динамику массы тела, а по окончании опыта после вывода животных из эксперимента проводили макроскопическую оценку состояния внутренних органов и систем и рассчитывали коэффициенты массы внутренних органов. Результаты исследования представлены в табл. 2.4-2.6.

Таблица 2.4.

Изучение влияния на организм однократного внутрижелудочного введения крысам обоего пола токсической дозы субстанции декаметоксина

Условия опыта	Доза, мг/кг	Наблюдаемый эффект, количество погибших/общее количество животных в группе	
		Самцы	Самки
Интактный контроль	–	0/6	0/6
Декаметоксин	400	0/6	0/6

Таблица 2.5

Динамика массы тела крыс обоего пола (г) после однократного внутрижелудочного введения токсической дозы субстанции декаметоксина

Условия опыта	Исходные данные	3 дня	7 дней	14 дней
Самцы				
Интактный контроль	188±3	190±5	194±4	202±2
Декаметоксин, 400 мг/кг	190±4	192±4	196±4	204±3
Самки				
Интактный контроль	189±5	193±4	196±4	204±5
Декаметоксин, 400 мг/кг	191±6	195±6	198±5	205±5

Таблица 2.6

Коэффициенты массы внутренних органов крыс (г/100 г) обоего пола после однократного внутрижелудочного введения токсической дозы субстанции декаметоксина

Органы		Самцы		Самки	
		Интактный контроль	Декаметоксин, 400 мг/кг	Интактный контроль	Декаметоксин, 400 мг/кг
Печень		2,99±0,09	3,04±0,09	3,13±0,13	2,99±0,14
Почки	пра- вая	0,36±0,01	0,37±0,01	0,38±0,01	0,38±0,01
	левая	0,35±0,01	0,36±0,01	0,38±0,01	0,38±0,01
Сердце		0,39±0,01	0,40±0,01	0,39±0,01	0,36±0,02
Легкие		0,79±0,01	0,79±0,01	0,79±0,00	0,78±0,01
Селезенка		0,59±0,01	0,58±0,01	0,59±0,00	0,59±0,00
Надпочечники		0,041±0,002	0,044±0,001	0,044±0,001	0,043±0,001
Тимус		0,078±0,003	0,083±0,001	0,084±0,001	0,083±0,001
Се- мен- ники	Правый	0,58±0,01	0,57±0,01	—	—
	Левый	0,57±0,01	0,58±0,01	—	—

Как показали проведенные исследования, после однократного внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг крысам обоего пола животные были неопрытными, с взъерошенным шерстным покровом, вялыми; без аппетита, плохо поедали пищу, нормально реагировали на звуковые и световые раздражители; процессы мочеиспускания и дефекации были в норме; нарушения дыхания и судорог не наблюдали; рефлекторная возбудимость у всех животных была сохранена. Впоследствии,

начиная с 3-го дня и до конца наблюдения, состояние животных нормализовалось, потребление воды и пищи у всех подопытных мышей не отличалась от такового в группах интактных животных. Гибели животных в течение всего периода наблюдения не зарегистрировано (табл. 2.4).

Согласно методике изучения острой токсичности [19], для оценки токсического влияния субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг, проводили исследование динамики массы тела животных, которое показало, что у крыс после однократного внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина и в группах интактных животных в течение всего срока наблюдения происходит одинаковое увеличение массы тела относительно исходных данных (табл. 2.5).

После окончания эксперимента через 14 суток было проведено вскрытие животных, макроскопический осмотр внутренних органов и взяты органы для гистологического исследования. Исследована морфологическая структура внутренних органов крыс обоего пола через 2 дня и 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг.

В соответствии с положениями Европейской конвенции по защите прав позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей [19,20], выведение крыс из эксперимента проведено путем щадящей декапитации.

Образцы внутренних органов фиксировали в 10 % растворе формалина, обезживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в целлоидин-парафин, окрашивали гематоксилином и эозином [19]. Просмотр микропрепаратов проводили под микроскопом Mikros 400 (Австрия), микрофотографирование микроскопических изображений выполняли цифровым фотоаппаратом Nikon Cool Pix 4500. Фотоснимки обрабатывали на компьютере Pentium 2,4GHz с помощью программы Nikon V1w 5.

Макроскопическое обследование. Крысы, выведенные из эксперимента через 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции декаметок-

сина, нормальной упитанности. Шерстный покров опрятный. Из естественных отверстий выделений нет. Поверхностные лимфоузлы обычного размера. При вскрытии в грудной полости изменений в состоянии легких и сердца не отмечено. Тимус обычных размеров, эластичный на ощупь, серовато-розоватого цвета. В брюшной полости постороннего содержимого не выявлено. Брюшина прозрачная, гладкая. Поверхность печени гладкая, доли обычного размера, цвета, края не утолщены. Поджелудочная железа не имеет вид компактно сформированного органа, представляет собой слабо ветвящийся рыхлый тяж, цветом и консистенцией похожий на жир. Селезенка упругая, красновато-коричневого цвета. На разрезе видна мелкая зернистость ткани. Почки с легко снимающейся капсулой, на разрезе темно-красные, плотные, с сохраненным рисунком слоев. Надпочечники округлой формы, плотно прилегают к краниальным полюсам почек. Слизистая оболочка желудка с характерным рельефом складок, без геморрагий, отека, эрозивных повреждений. Слизистая оболочка различных отделов кишечника без видимых признаков раздражения. Содержимое соответствует отделам. Внутренние половые органы имеют обычный вид. Череп и позвоночный канал не вскрывались.

У животных, которых вывели из эксперимента через 2 дня после введения субстанции декаметоксина, отмечен отек морды, загрязнение основания хвоста. Желудок растянут, заполнен плохо переваренным химусом. Рисунок складок сглажен, поверхность слизистой оболочки под химусом имела «студенистый» вид. Со стороны других органов и систем видимых изменений не выявлено.

Микроскопическое исследование. Печень крыс, забитых через 2 дня и 14 дней после однократного внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина, была без патологии. Дольковый рисунок ткани сохранен, в дольках радиальная ориентация балок не нарушена, междольковые соединительно-тканые прослойки не выражены. Перипортальные зоны интактные.

Гепатоциты характеризовались равномерно окрашенной цитоплазмой, содержание двуядерных клеток нормальное, часть ядер с умеренной гиперхромией. В ядре преимущественно 1-2 ядрышка. Микроциркуляторные нарушения не выявлены (рис. 2.1).

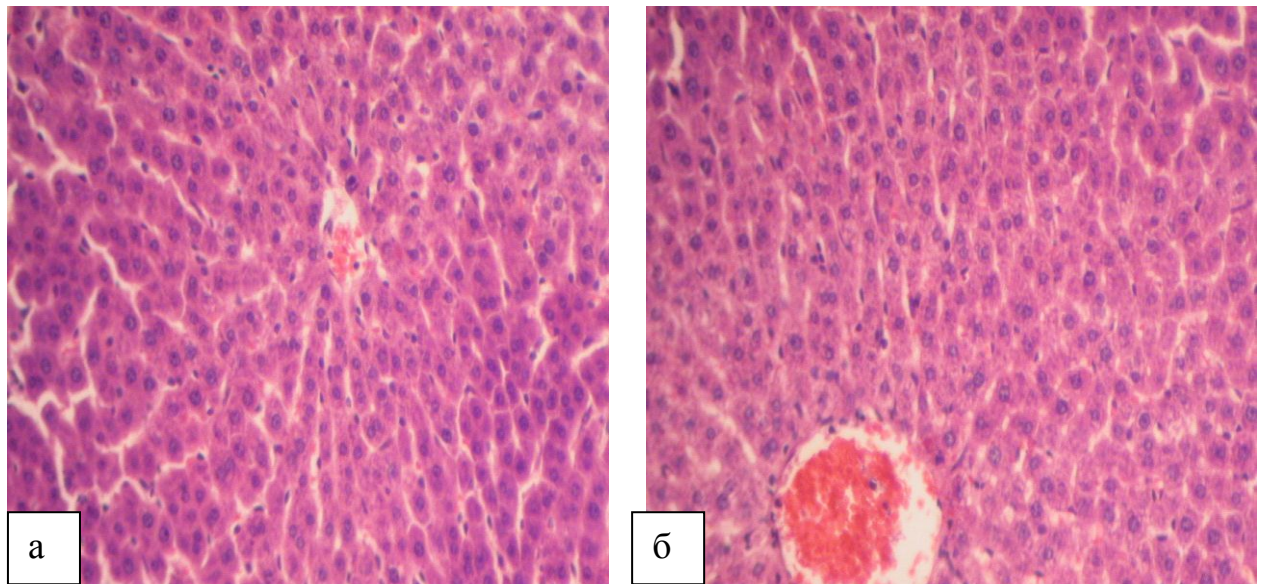


Рис. 2.1. Печень крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Отсутствие изменений в состоянии печеночной паренхимы. Гематоксилин-эозин. $\times 200$.

Почки животных, независимо от срока наблюдения, на момент исследования по морфологической структуре соответствовали физиологической норме. Нефроны обычного размера, достаточно плотно расположены. Четкость рисунка гломерулярных капилляров, ядерная насыщенность в целом достаточная. Состояние системы извитых и прямых канальцев нефронов находилось в пределах нормы (рис. 2.2).

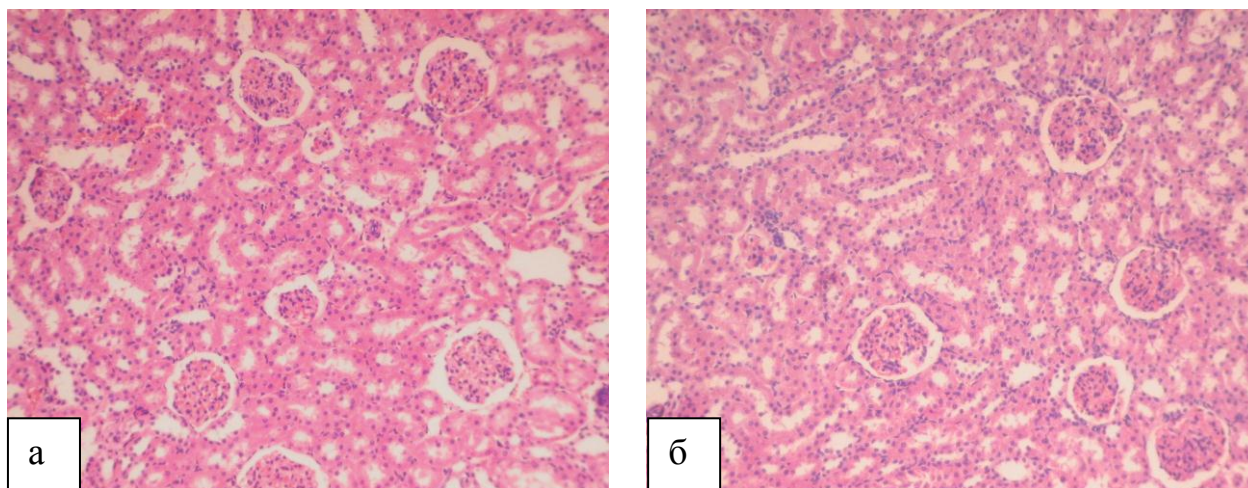


Рис. 2.2. Почки крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Почечные клубочки и канальцы не изменены. Гематоксилин-эозин. $\times 200$.

Миокард. На препаратах миокарда всех исследованных животных сохранялась нормальная морфологическая структура сердечно-мышечных волокон. Признаков гипо – или гипертрофии, дистрофии волокон не выявлено. В кардиомиоцитах поперечная исчерченность миофибрилл, занимающих всю свободную от ядра саркоплазму, выражена умеренно. Ядра центрально расположены, преимущественно овально-удлиненной формы, нормохромны. Сосуды венозного типа полнокровны (рис. 2.3).

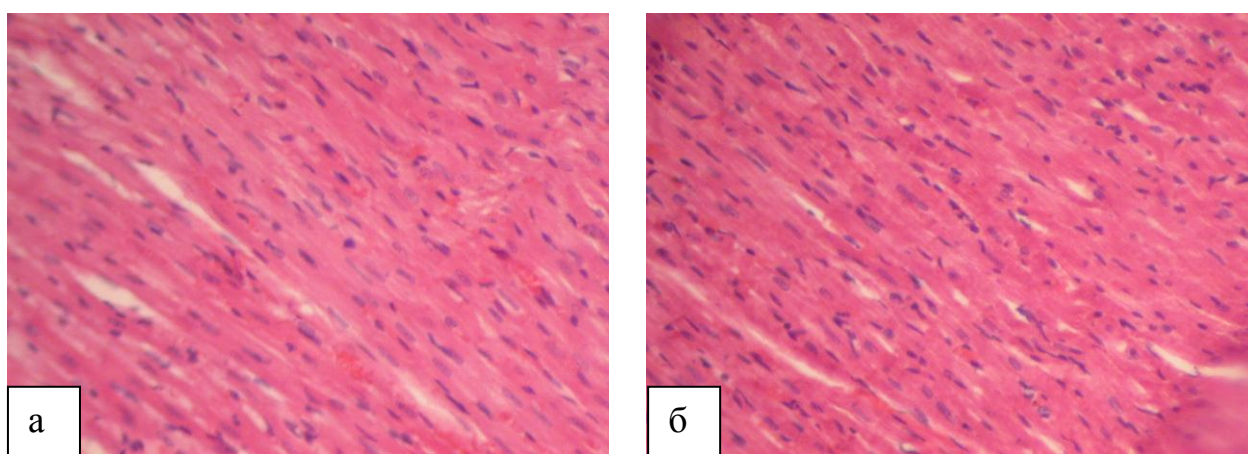


Рис. 2.3. Миокард крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Сердечно-мышечные волокна не изменены. Гематоксилин-эозин. $\times 200$.

В легких крыс опытной группы альвеолярный рисунок паренхимы четкий. Дыхательная поверхность обычная (рис. 2.4). Признаков альвеолярного отека, увеличения клеточной насыщенности межальвеолярных перегородок не отмечено. Лимфоцитарная реакция в строме альвеолярного дерева умеренная. Эпителий бронхов и бронхиол интактный.

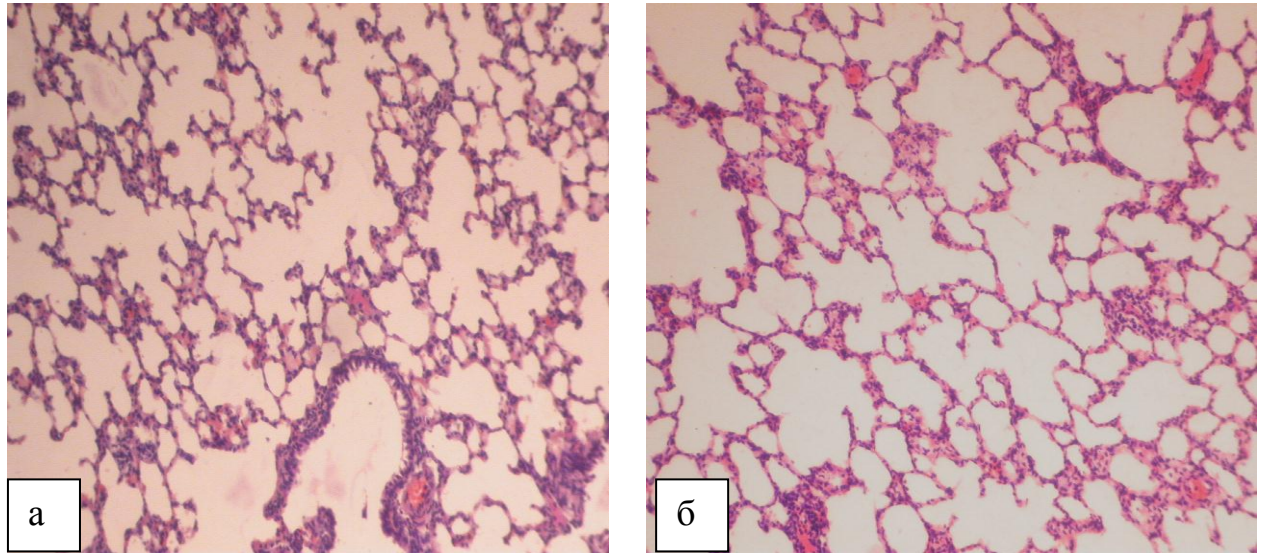


Рис. 2.4. Легкие крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Альвеолярный рисунок не нарушен. Гематоксилин-еозин. $\times 100$.

В надпочечниках крыс, выведенных из эксперимента через 2 дня и 14 дней после введения субстанции декаметоксина, четкость и соотношение поперечников клубочковой, пучковой и сетчатой зон коры визуально обычное, гистоархитектоника каждой из зон сохранена. Несколько различается выраженность жировых включений цитоплазмы спонгиоцитов через 2 дня и 14 дней исследования: через 2 дня насыщенность цитоплазмы клеток вакуолями (представляют собой жировые капли, содержащие холестерин – исходный материал для синтеза стероидных гормонов) меньше, чем через 14 дней, что можно расценить как усиление функциональной активности их. В мозговом слое в этот срок наблюдения повышено содержание клеток с более интенсивно окрашенной цитоплазмой, что также говорит об определен-

ном напряжении функции хромафинных клеток. Возможно, такую преходящую стимуляцию спонгиоцитов и хромафинных клеток можно рассматривать как защитную реакцию на введение токсической дозы субстанции декаметоксина (рис. 2.5).

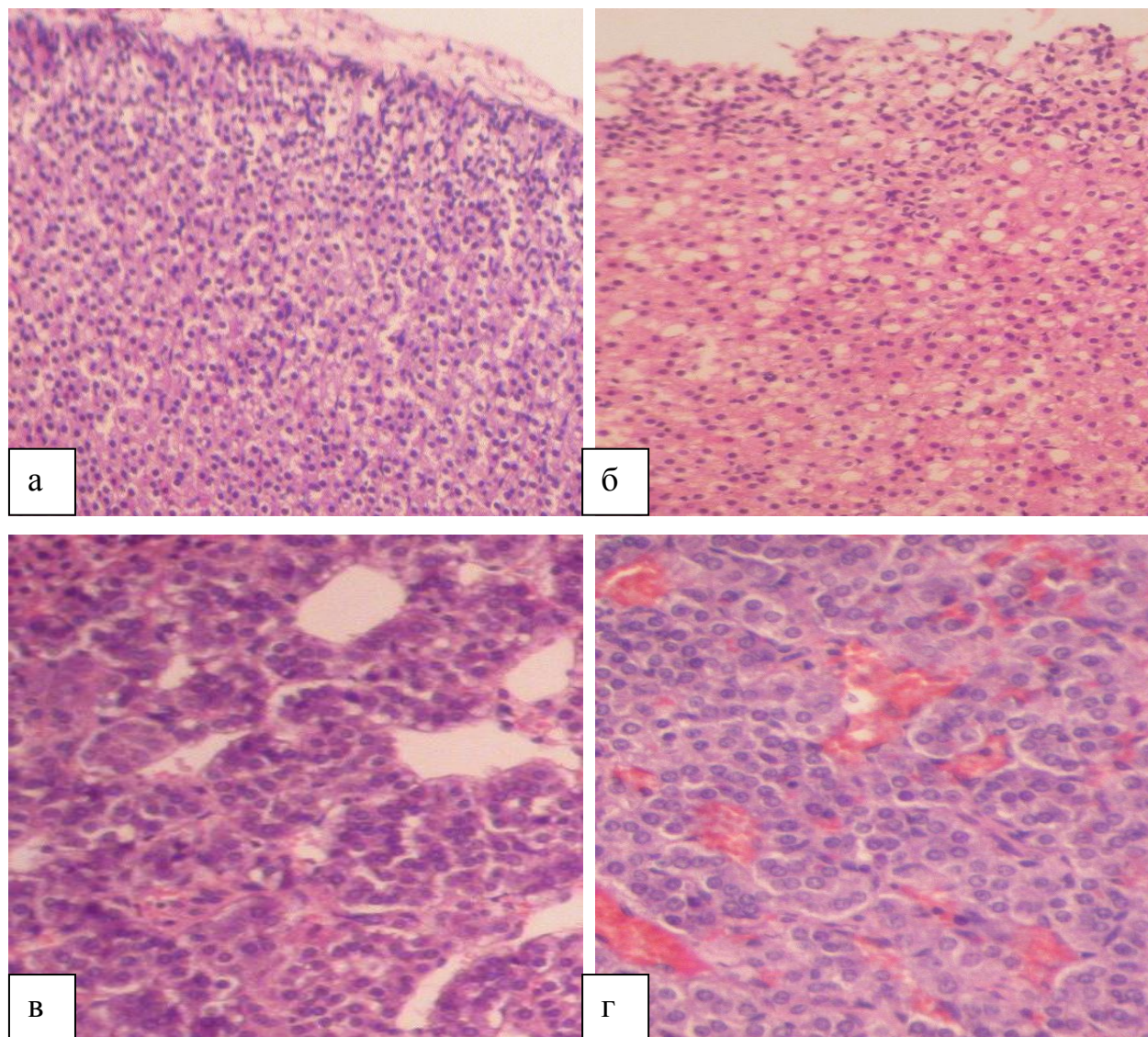


Рис. 2.5. Надпочечники крыс: а, в – через 2 дня (а – менее выраженная вакуолизация цитоплазмы спонгиоцитов, в – интенсивнее окраска цитоплазмы хромафинных клеток); б – 14 дней (б – более выраженная вакуолизация цитоплазмы спонгиоцитов, г – слабее окраска цитоплазмы хромафинных клеток) после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Гематоксилин-эозин. а-б – $\times 200$, в-г – $\times 250$.

В селезенке крыс и через 2, и через 14 дней исследования не выявлено признаков гипо- или гипертрофии белой пульпы. В лимфатических узелках герминативные центры находились преимущественно в активном состоянии, маргинальные зоны умеренны по размеру. Красная пульпа содержала нормальное количество ядерных клеточных форм (рис. 2.6).

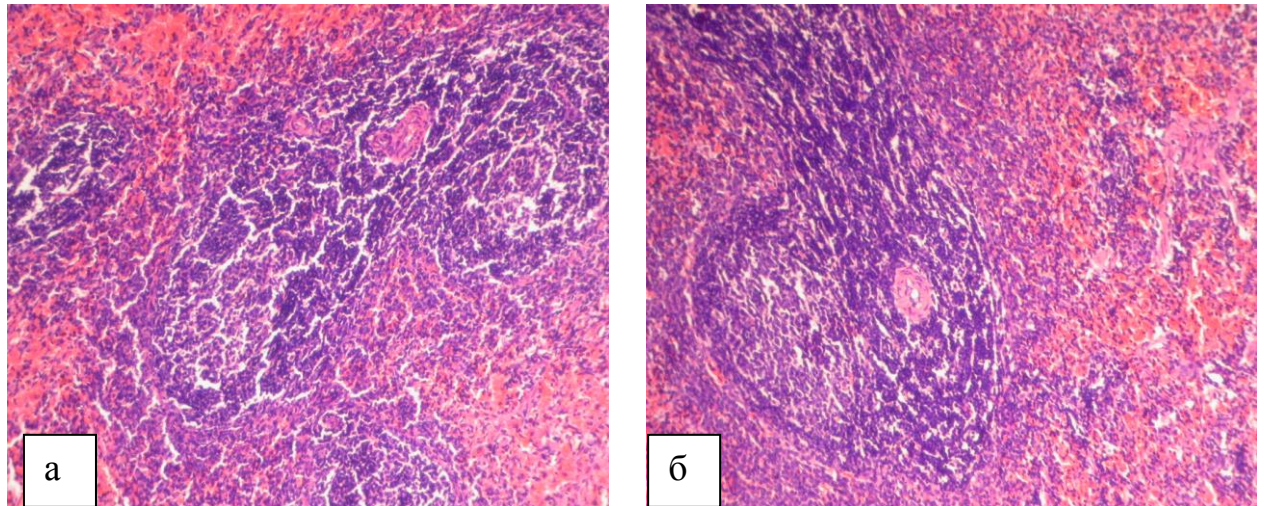


Рис. 2.6. Селезенка крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Состояние белой и красной пульпы нормальное. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

Тимус. У всех исследованных животных через 2 дня после введения 0,02% раствора «Декасан» наблюдали обратимое опустошение субкортикального слоя, инверсию слоев (реакция органа на введение ксенобиотика). Эти изменения исчезали через 14 дней после введения субстанции декаметоксина и морфоструктура железистой ткани соответствовала норме. У некоторых животных наблюдали умеренно выраженный рисунок «звездного неба» в корковом веществе (рис. 2.7).

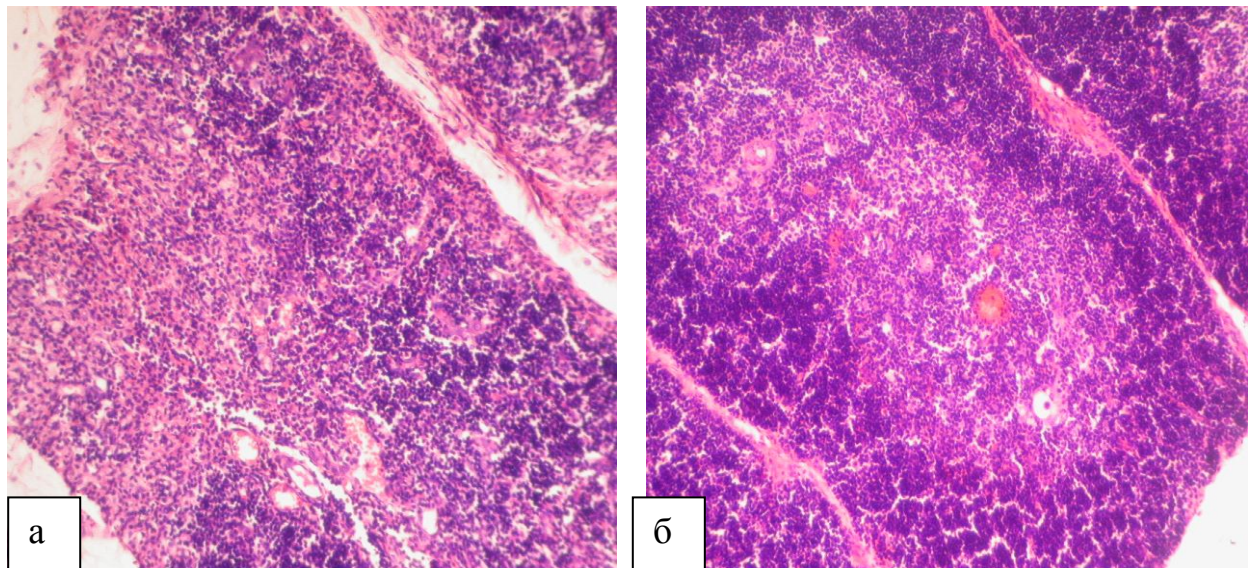


Рис. 2.7. Тимус крыс: а – через 2 дня (опустошение субкортикального слоя, инверсия слоев); б – через 14 дней (нормальное состояние железистой ткани) после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

Поджелудочная железа. Внешнесекреторная паренхима ткани как через 2 дня, так и через 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг имела нормальную гистоструктуру. Соотношение зимогенсодержащей и ядросодержащей зон в ацинозных клетках не изменялось. Панкреатические островки различны по размеру, достаточно плотно и равномерно заполнены β -клетками, α -клетки расположены цепочкой по периферии островков (рис. 2.8).

Яички. Морфология органа через 2 дня и 14 дней после введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг не нарушена, признаков угнетения сперматогенеза не выявлено (рис. 2.9).

Яичники исследованных самок в оба срока наблюдения содержали достаточное количество различных по степени созревания яйцевых фолликулов, желтых тел. Атрезия фолликулов была в пределах нормы, носила физиологический характер (рис. 2.10).

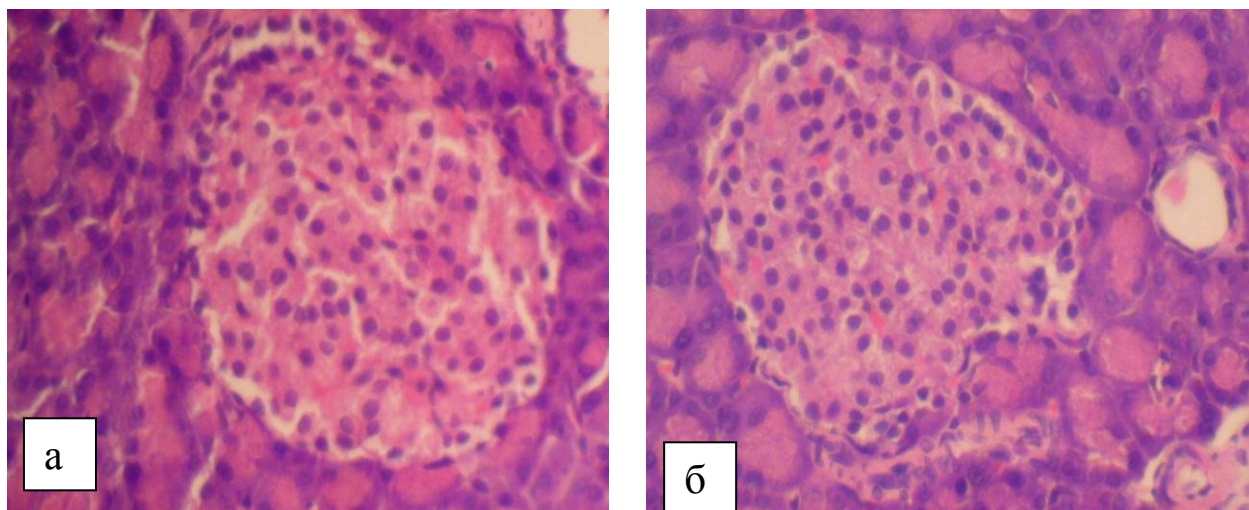


Рис. 2.8. Поджелудочная железа крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Ацинарный рисунок ткани сохранен. Панкреатические островки нормальны. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

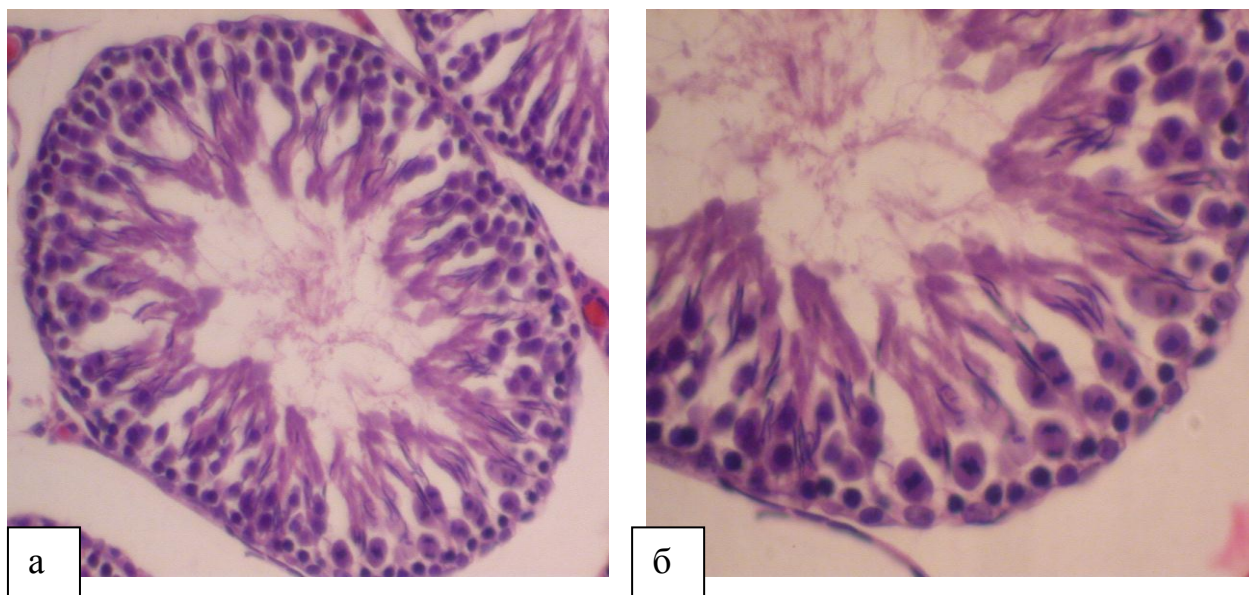


Рис.2.9. Яичко крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. В семенном канальце видны половые клетки различного этапа развития. Гематоксилин-эозин. $\times 250$.

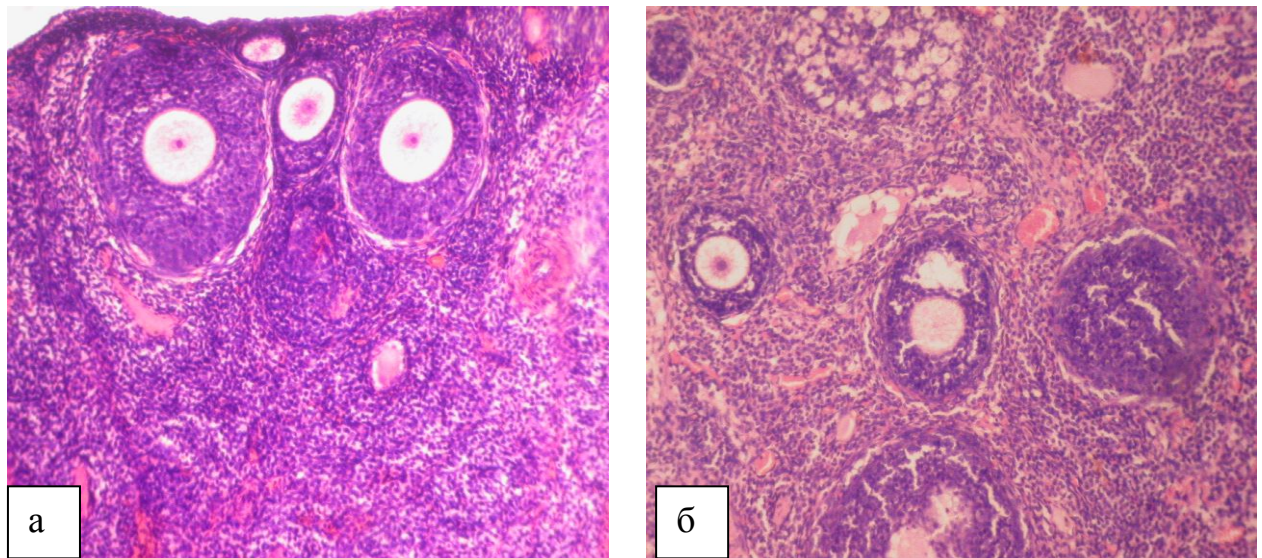


Рис. 2.10. Яичник крыс: а – через 14 дней; б – через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Хорошо видны разные по развитию яйцевые фолликулы, желтые тела. Гематоксилин-эозин. $\times 250$.

При исследовании слизистой оболочки желудка через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг отмечены нарушения в состоянии эпителиального покрова как в области дна, так и пилорической части. Эпителиальные клетки уплощены, повышено слущиваются. Местами видны начальные этапы формирования поверхностных эрозий, подэпителиальная капиллярная сеть полнокровна. Видны единичные кистоподобно расширенные железистые трубки. Наблюдали резко выраженный отек подслизистого слоя, полнокровие сосудов, местами отчетлив подэпителиальный отек стромы (рис. 2.11, 2.12).

Через 14 дней наблюдения состояние слизистой оболочки железистого отдела желудка у всех крыс было в пределах физиологической нормы (рис. 2.13).

В слизистой оболочке тонкой (тощей) кишки через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг отмече-

но небольшое утолщение ворсинок, расширение их стромы, местами сдвиг ядер всасывающих энтероцитов в сторону апикальных отделов клеток.

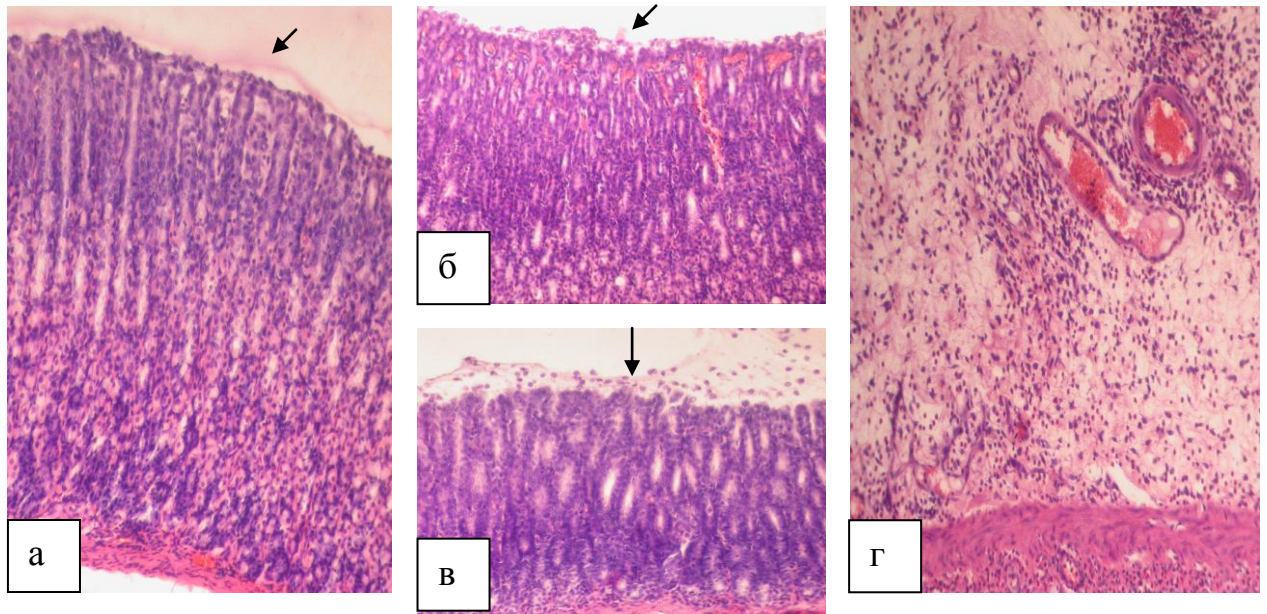


Рис. 2.11. Желудок крыс через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг: а – уплощение покровных клеток в области дна, отек подэпителиально; б-в – десквамация покровных клеток дна и пилоруса; г – отек подслизистого слоя, тромбоз сосудов. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

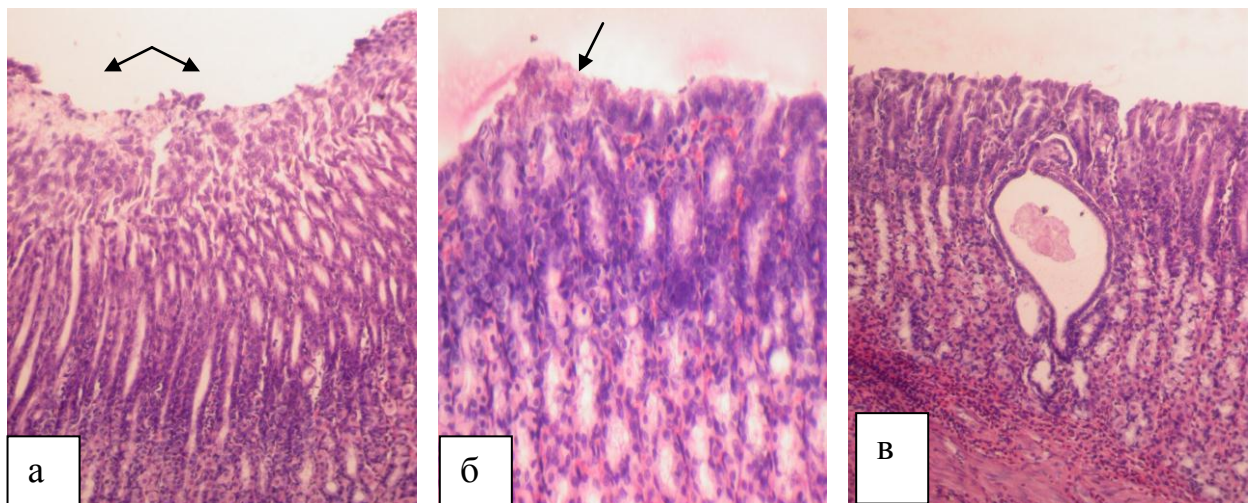


Рис. 2.12. Желудок крыс через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг: а-б – формирование поверх-

ностной эрозии в области пилоруса и дна; в – кистозоподобное расширение железы. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

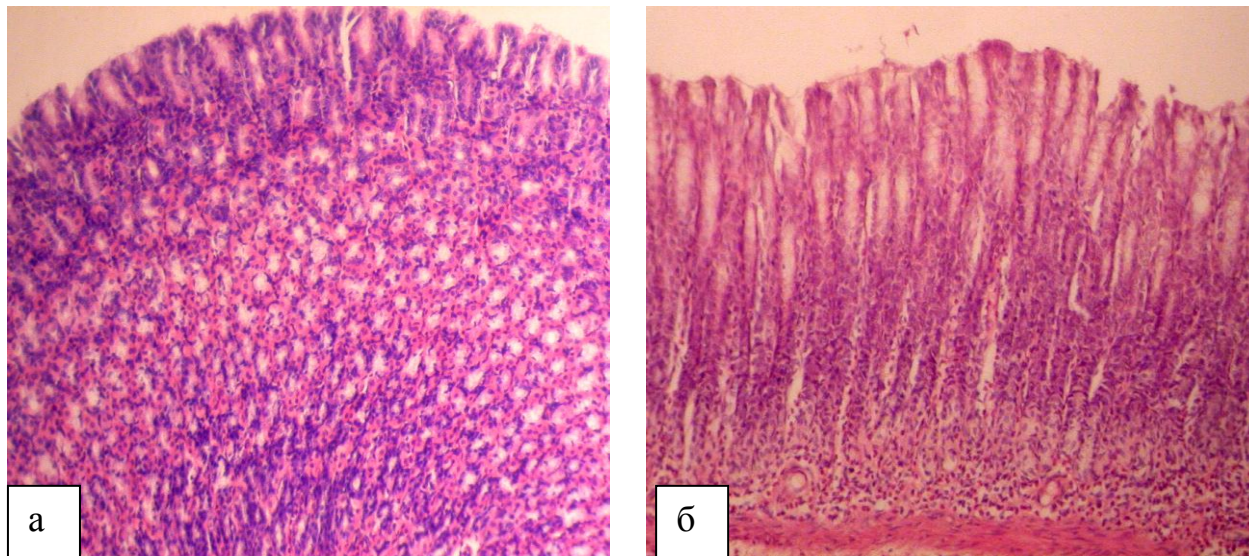


Рис. 2.13. Желудок крыс через 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Нормальное состояние слизистой дна (а) и пилоруса (б). Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

Через 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг состояние ворсинок было в пределах нормы. Число бокаловидных клеток, состояние кишечных крипт в оба срока наблюдения нормальное. Число клеток Панета в кишечных криптах через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг не превышало 1-2 на одну крипту, через 14 дней – колебалось от 2 до 4 (рис. 2.14, рис. 2.15). Известно, что клетки Панета играют важную роль в механизме защиты кишечника, в том числе в осуществлении его бактерицидной функции.

Возможно, кратковременное снижение численности клеток Панета, наблюдаемое через 2 дня после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг, связано с определенными дистрофическими проявлениями в ворсинках и признаками диспепсии у животных в этот срок.

Слизистая оболочка толстой кишки (тазовый отдел прямой кишки). На всех обзорных препаратах сохранен нормальный вид складок слизистой

оболочки, морфологические характеристики эпителиоцитов, интенсивность секретообразования (рис. 2.16).

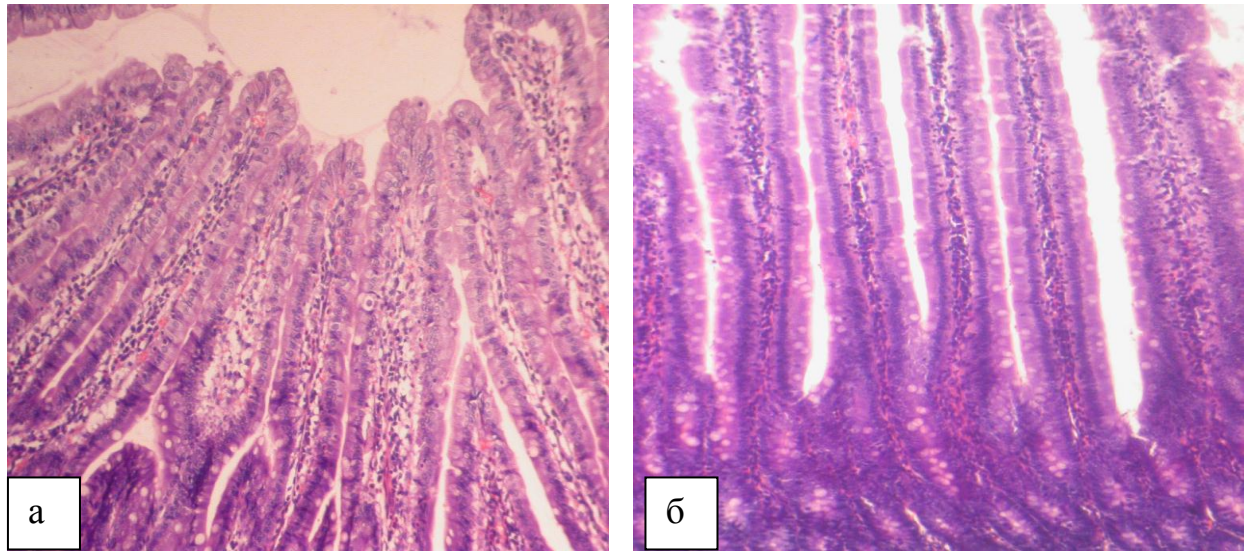


Рис. 2.14. Тонкая кишка крыс: а – через 2 дня (умеренное утолщение ворсинок, расширение стромы); б – через 14 дней (нормальное состояние ворсинок) после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

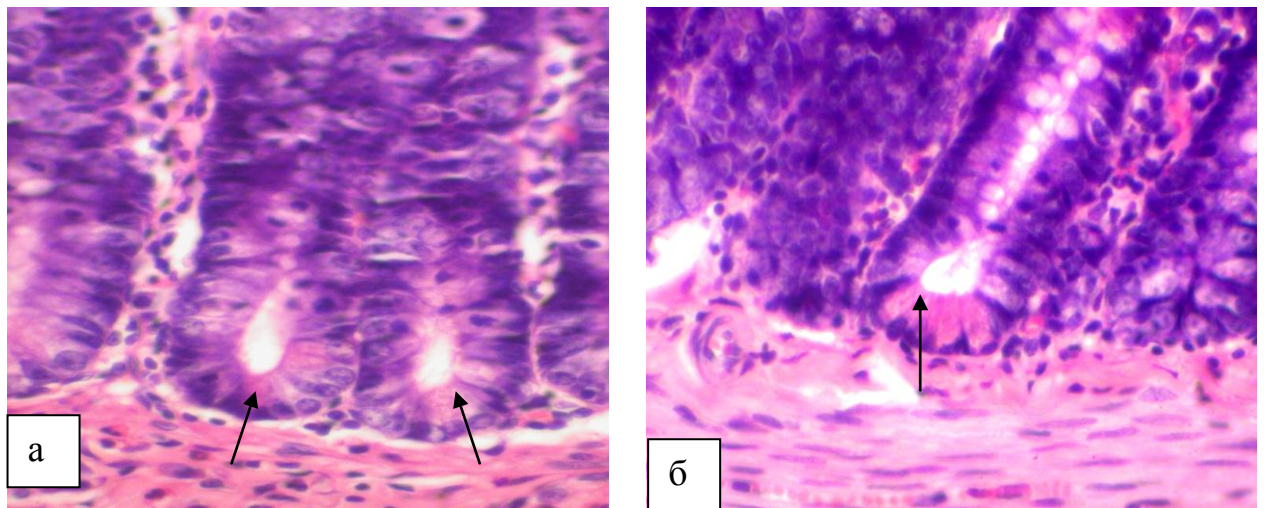


Рис. 2.15. Тонкая кишка крыс: а – через 2 дня (количество клеток Панета не превышает 1-2 на крипту); б – через 14 дней (4 клетки Панета на крипту) после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Гематоксилин-эозин. $\times 400$.

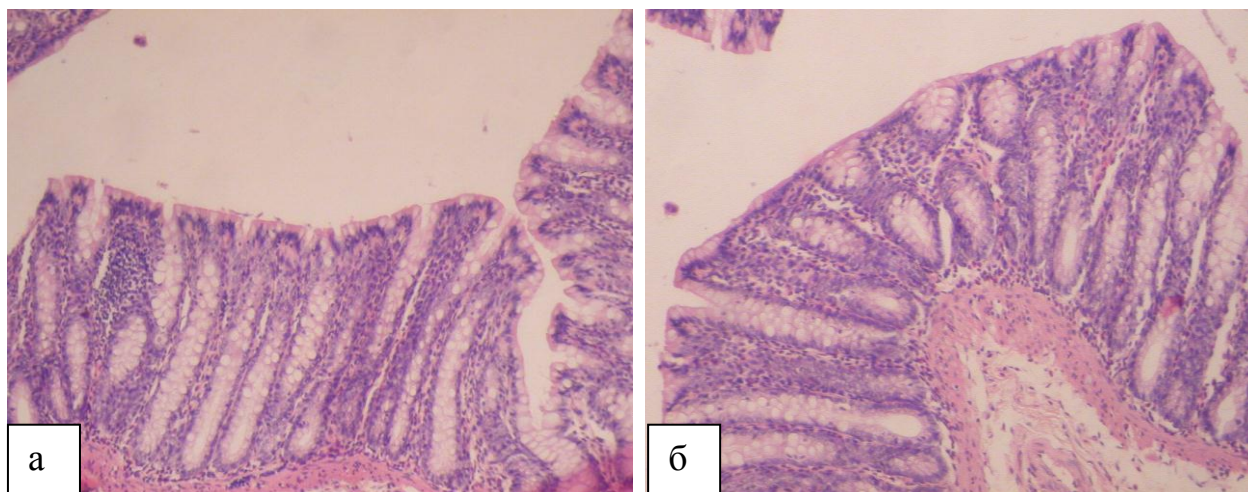


Рис. 2.16. Толстая кишка крыс: а – через 2 дня; б – через 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг. Состояние слизистой не изменено. Гематоксилин-эозин. $\times 200$.

Таким образом, анализируя полученные макро- и микроскопические данные, можно сделать вывод о том, что однократное внутрижелудочное введение субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг приводит в ранние сроки наблюдения (через 2 дня) к развитию признаков раздражения слизистой оболочки желудка, реактивным сдвигам в тимусе, некоторому напряжению адренокортикоцитов пучковой зоны коры и хромафинных клеток мозгового слоя надпочечников, незначительному снижению защитных возможностей слизистой оболочки тонкой кишки. Эти изменения носят преходящий характер и через 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции декаметоксина в дозе 400 мг/кг морфологические нарушения в перечисленных выше тканевых структурах не регистрируются. Со стороны других органов и систем видимых изменений ни в один из сроков исследования не выявлено.

3. ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

ДЕКАСАНА

3.1 Изучение аллергизирующих свойств Декасана в виде 0,02% раствора декаметоксина

Возможные аллергизирующие свойства препарата «Декасан», раствор 0,02%, оценивали по его способности вызывать реакции гиперчувствительности немедленного и замедленного типов на модели активной кожной анафилаксии (АКА), в тесте «Конъюнктивальная проба» (КП) и в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [24,25,26,27,28,29].

Исследование аллергизирующего действия препарата «Декасан», раствор 0,02%, проведено на 60-ти морских свинок самках и 40-ка белых беспородных мышках самках. В начале эксперимента масса животных составляла: 300 ± 30 г (морские свинки), 20 ± 2 г (мыши). Было использовано 6 групп морских свинок, 4 группы мышечей. В каждой группе было по 10 животных.

Исследуемый препарат «Декасан», раствор 0,02%, вводили в соответствии со схемой сенсibilизации, предложенной в методических рекомендациях [24,25]. Сенсibilизацию мышечей в реакции ГЗТ проводили парентерально, в тестах АКА и КП на морских свинок проводили пероральную сенсibilизацию животных.

Для выявления аллергизирующего действия препарата «Декасан», раствор 0,02%, в тестах АКА и КП выбраны дозы: 3 мл/кг и 30 мл/кг – для морских свинок [26]. Так как препарат «Декасан», раствор 0,02%, является жидкой лекарственной формой и его условнотерапевтическая доза для мышечей составляет 6,5 мл/кг (максимальная доза 65 мл/кг), а объем на 1 животное равен 0,13 мл (максимальная доза 1,3 мл), что значительно превышает необходимый объем для проведения сенсibilизации в реакции ГЗТ, дозы исследуемого препарата пересчитывали на сухое вещество: таким образом, данный тест был проведен для субстанции декаметаксина в дозах 1,3 мг/кг та 13 мг/кг, а не для лекарственной формы.

Цель работы заключалась в изучении возможного аллергизирующего действия препарата «Декасан», раствор 0,02%.

Данное исследование регламентируется требованиями нормативных документов и входит в комплекс доклинических исследований, необходимых для регистрации продукта. Исследование проведено в соответствии с Методическими рекомендациями по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [24,25,27]. Использованы следующие параметры оценки аллергизирующих свойств препарата «Декасан», раствор 0,02% (табл.3.1).

Таблица 3.1

**Параметры для оценки аллергизирующих свойств
препарата «Декасан», раствор 0,02%**

Экспериментальная модель	Параметры	Срок наблюдения, сутки
АКА	Площадь окрашенного пятна, мм ²	21 сутки от начала сенсibilизации
КП	Выраженность офтальморезакции, баллы	10, 20, 30-е сутки от начала сенсibilизации
ГЗТ	Индекс реакции	6 сутки от начала сенсibilизации

Для оценки результатов исследования использованы методы математической статистики. Для изучаемых параметров определяли медиану, верхний и нижний квартили. Оценку статистической значимости различий между выборками проводили с помощью непараметрических критериев Краскела-Уоллиса и критерия Манна-Уитни с поправкой Бонферони (Statistica 6.0) [21-23].

3.1.1. Изучение аллергизирующего действия Декасана на модели активной кожной анафилаксии на морских свинках

Кроме общих проявлений анафилаксии в виде анафилактического шока, в сенсibilизированном организме возникают и местные реакции, например феномен Артюса. Феномену Артюса у человека соответствует феномен Овери у животных или анафилактические реакции кожи, которые воспроизводятся у животных в двух формах: активная и пассивная кожная анафилаксия. В основе обоих феноменов лежит явление быстрого увеличения проницаемости кожных капилляров под влиянием реакции антиген-антитело [28,29]. Вещества, способные сенсibilизировать организм (антигены) инициируют выброс медиаторов аллергических реакций, в том числе гистамина, последний повышает проницаемость капилляров и активирует развитие феномена Овери. Модель АКА представляет собой реакцию капилляров кожи на месте внутрикожного введения антигена (в данном случае препарат «Декасан») активно сенсibilизированным морским свинкам [24,25, 29]. Внутривенное введение раствора красителя (синего Эванса), который легко разносится кровью по всему организму, и за счет выхода из кровяного русла в месте воспаления ткани (внутрикожного введения антигена) образует синее пятно. Для изучения аллергизирующего действия препарата «Декасан», раствор 0,02%, на модели АКА использовали 30 морских свинок массой тела 300 ± 30 г, которых распределяли на 3 группы по 10 животных (табл.3.2).

Таблица 3.2

Морские свинки, распределение по группам и дозы при изучении аллергизирующих свойств препарата «Декасан», раствор 0,02%, на модели АКА

Группы животных	Доза, мл/кг	Количество животных в группе
Контроль	–	10
Декасан	3	10
Декасан	30	10

Сенсибилизация. На данной модели использовали оптимальную схему сенсибилизации: животным опытных групп вводили перорально препарат «Декасан», раствор 0,02%, без предварительной подготовки, в дозах 3 мл/кг и 30 мг/кг 1 раз в день в течение 14 дней [24,25].

Тестирование. На 21-е сутки от начала сенсибилизации животных вводили в наркоз с помощью раствора тиопентала натрия, который вводили в объеме 1 мл/кг в дозе 40 мг/кг. Затем на выстриженном участке правого бока морским свинкам внутрикожно вводили 50 мкл препарата «Декасан», раствор 0,02%, в двукратных разведениях, приготовленных на физиологическом растворе, в концентрации, которая не вызывает кожно-раздражающего действия. Для контроля реактивности кожи на участке левого бока животным внутрикожно вводили 50 мкл физиологического раствора. Животным контрольной группы также вводили внутрикожно препарат «Декасан», раствор 0,02%, и растворитель [24,25].

Затем морским свинкам вводили внутривенно (в бедренную вену) 0,5 мл 1% раствора Эванса синего. Через 30 минут животных забивали передозировкой эфира и определяли диаметр и площадь синего пятна на внутренней поверхности кожи в месте введения антигена – препарат «Декасан», раствор 0,02% [24,25].

В тесте *in vivo*, как описано выше, диаметр окрашенного пятна на месте внутрикожной инъекции антигена является показателем местной анафилактической реакции. При введении вещества, которое проявляет свойства антигена, образуется комплекс «антиген-антитело», который вызывает высвобождение гистамина из клеточного депо. Под действием гистамина резко повышается проницаемость стенок капилляров кожи, что приводит к выходу красителя в ткани. Чем больше диаметр пятна, тем больше выраженность аллергической реакции [24]. При положительной реакции диаметр пятна не менее 6 мм. У контрольных животных диаметр пятна не должен превышать 2-3 мм [24,25,29].

Результаты приведены в таблице 3.3.

Определение аллергизирующего действия препарата «Декасан», раствор 0,02%, на модели «Активная кожная анафилаксия», Me(Q₂₅;Q₇₅)

Группы животных	Доза, мл/кг	n	Площадь окрашенного пятна, мм ²	Критерий Краскела-Уоллиса
контроль	–	10	7,1(0; 12,6)	<i>p=0,15</i>
Декасан	3	10	0 (0; 0)	
Декасан	30	10	7,1 (7,1; 19,6)	

Примечания:

1. n – количество животных в группе;
2. p – уровень достоверности различий по отношению к контролю.

Данные таблицы 3.3 свидетельствуют о том, что в группах животных, сенсibilизированных препаратом «Декасан», раствор 0,02%, в дозе 3 мл/кг и 30 мл/кг, не наблюдали увеличения размера окрашенного пятна по сравнению с размерами окрашенного пятна в группе контроля. Анализ полученных данных позволяет составить следующее представление о препарате «Декасан», раствор 0,02%: исследуемый препарат не является потенциальным аллергеном, поскольку при пероральном введении в изученных дозах не вызывает сенсibilизации организма и развития анафилактической реакции немедленного типа.

Согласно методическим рекомендациям [24,25] исследуемый препарат не относится к потенциальным аллергенам.

3.1.2. Изучение аллергизирующего действия Декасана в тесте «Конъюнктивальная проба» на морских свинках

Конъюнктивальная проба является наиболее простым и чувствительным тестом в комплексе моделей для определения аллергизирующих свойств

новых лекарственных препаратов. Выраженность офтальморезакции зависит от способности аллергена (исследуемого препарата) сенсibilизировать организм и в месте введения завершающей дозы резко увеличивать проницаемость стенок капиллярных сосудов и вызывать, таким образом, отек тканей в месте введения антигена [28].

Для изучения алергизирующего действия препарат «Декасан», раствор 0,02%, в тесте КП использовали 30 морских свинок массой тела 300 ± 30 г, которых распределяли на 3 группы. В каждой группе было по 10 животных (табл.3.4).

Таблица 3.4

**Дизайн эксперимента при изучении алергизирующих свойств
препарата «Декасан», раствор 0,02%, в тесте КП**

Группы животных	Доза, мл/кг	Количество животных в группе
Контроль	–	10
Декасан	3	10
Декасан	30	10

Сенсibilизация. В тесте КП использовали оптимальную схему сенсibilизации: животным опытных групп вводили перорально препарат «Декасан», раствор 0,02%, без предварительной подготовки, в дозах 3 мл/кг и 30 мг/кг 1 раз в день в течение 30-ти дней [24,25].

Тестирование. На 10-й, 20-й и на 30-й день проводили тестирование: вводили под верхнее веко животных 1 каплю исследуемого препарата, в концентрации, которая не вызывала у интактных животных местнораздражающего действия. Второй глаз служил контролем. Через 15 минут, 1 час (реакция гиперчувствительности немедленного типа) и 24 часа (гиперчувствительность замедленного типа) проводили оценку выраженности офтальморезакции по бальной шкале:

0 – отсутствие алергической воспалительной реакции глаза;

- 1 – легкое покраснение слезного протока;
 2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;
 3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры [1].

Результаты приведены в таблице 3.5.

Таблица 3.5

Определение аллергизирующего действия препарата «Декасан», раствор 0,02%, в тесте «Конъюнктивальная проба», Me(Q₂₅;Q₇₅)

Группы животных	До-за, мл/кг	n	Выраженность офтальморекции, мм			Выраженность офтальморекции, мм			Выраженность офтальморекции, мм		
			10 сутки			20 сутки			30 сутки		
			15 мин	1 ч	24 ч	15 мин	1 ч	24 ч	15 мин	1 ч	24 ч
Контроль	–	10	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Декасан	3	10	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Декасан	30	10	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)

Примечание. n – количество животных в группе.

Как свидетельствуют данные таблицы 3.5, у всех животных опытных групп наблюдали отсутствие аллергической воспалительной реакции слизистой оболочки глаза.

Из полученных данных можно заключить, что исследуемый препарат «Декасан», раствор 0,02%, в дозах 3 и 30 мл/кг не вызывает сенсibilизацию организма и развитие аллергической реакции немедленного и замедленного типа в тесте «Конъюнктивальная проба».

3.1.3. Изучение аллергизирующего действия Декасана в реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышах

Анализ данных литературы свидетельствует о том, что один и тот же аллерген может вызывать различные по типу аллергические реакции. Также могут быть различные комбинации и перекрестные аллергические реакции немедленного и замедленного типов, что свидетельствует о связи между этими двумя типами гиперчувствительности, как на этиологическом, так и на патогенетическом уровне [24, 28]. Приведенные данные обосновывают изучение аллергизирующих свойств препарата «Декасан», раствор 0,02%, на модели аллергической реакции, которая развивается по замедленному типу.

Поставленную цель осуществляли с помощью экспериментальной модели – реакции ГЗТ на мышах.

Данная реакция позволяет выявить способность исследуемого вещества sensibilizировать лимфоциты-эффекторы, что приводит к выбросу из них медиаторов, под действием которых происходит инфильтрация ткани клеточными элементами и локальный отек. Интенсивность реакции и ее продолжительность зависят от сроков формирования и сочетанного действия различных субпопуляций Т-супрессоров, подавляющих ГЗТ. Поэтому при индукции ГЗТ путем введения мышам химических аллергенов в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), при котором не происходит формирования Т-супрессоров, возможно усиление кожных аллергических реакций и выявление аллергенных свойств даже слабых химических аллергенов [24,25].

Для изучения аллергизирующего действия препарата «Декасан», раствор 0,02%, в реакции ГЗТ использовали 40 мышей (массой тела 20 ± 2 г), животных распределяли на 4 группы. В каждой группе было по 10 животных (табл. 3.6).

Мыши, распределение по группам и дозы при изучении аллергизирующих свойств препарата «Декасан», раствор 0,02%, в реакции ГЗТ

Группы животных	Доза, мл/тв	Количество животных в группе
Контроль 1	–	10
Декаметоксин	0,06 (1,3 мг/кг декаметоксина)*	10
Контроль 2	–	10
Декаметоксин	0,06 (13 мг/кг декаметоксина)*	10

Сенсибилизация. Сенсибилизацию животных (кроме группы контроля) осуществляли путем однократного введения 60 мкл эмульсии декаметоксина в ПАФ (в соотношении 1:1) в дозах 1,3 мг/кг и 13 мг/кг. Для приготовления такой эмульсии использовали раствор Хенкса с рН 7,5 [24,25].

Тестирование. Для выявления сенсибилизации через 5 суток мышам в подушечку задней правой лапы (опытной) вводили 40 мкл суспензии исследуемой субстанции декаметоксина в растворе Хенкса. В подушечку левой лапы (контрольной) – эквивалентный объем раствора Хенкса. Через 24 часа определяли местную воспалительную реакцию, которую оценивали по разнице массы опытной (P_o) и контрольной (P_k) лап. Количественную оценку реакции выражали индексом реакции (ИР) по формуле [24, 25]:

$$\text{ИР} = \frac{P_o - P_k}{P_k} \times 100\%$$

Результаты исследования аллергизирующих свойств субстанции декаметоксина, которое является действующим веществом препарата «Декасан», раствор 0,02%, в реакции ГЗТ представлены в таблице 3.7.

**Изучение алергизирующих свойств препарата «Декасан», раствор
0,02%, в реакции ГЗТ, Me(Q₂₅;Q₇₅)**

Группы животных	Сенсиби- ли- зирующая доза, мг/кг	Завер- шающая доза, мг/кг	n	Индекс реак- ции (ИР), % <i>критерий Манна-Уитни</i>
Не сенсибилизированный кон- троль	–	1,3	9	5,0(3,8;9,7)
Декаметоксин	1,3	1,3	8	2,9(1,7;7,0) <i>p=0,29</i>
Не сенсибилизированный кон- троль	–	13	7	33,1(9,0;38,6)
Декаметоксин	13	13	10	34,8(29,6;45,0) <i>p=0,21</i>

Примечания:

1. n – количество животных в группе;
2. p – уровень достоверности различий по отношению к не сенсибилизиро-
ванному контролю;

При воспроизведении реакции ГЗТ в группах животных, которым вводили субстанцию декаметоксина в дозе 1,3 мг/кг и 13 мг/кг, не установлено достоверных различий ИР относительно показателя группы соответствующего не сенсибилизированного контроля. Полученные данные свидетельствуют о том, что введение субстанции декаметоксина в дозе 1,3 мг/кг и 13 мг/кг не сенсибилизирует организм животных и не вызывает развитие аллергического воспаления, которое протекает по замедленному типу гиперчувствительности. Так как исследуемый препарат «Декасан», раствор 0,02%, содержит одно действующее вещество, то полученные данные для субстанции

декаметоксина можно экстраполировать на препарат «Декасан», раствор 0,02%.

Таким образом, в реакции ГЗТ на мышах установлено, что субстанция декаметоксина, а следовательно и препарат «Декасан», раствор 0,02%, при парентеральном введении не проявляет алергизирующих свойств.

3.2 Изучение иммуотропного действия Декасана

Определение возможного иммуотоксического действия препарата «Декасан», производства ООО «Юрия-Фарм» в виде 0,02% раствора декаметоксина проводили на половозрелых мышах в соответствии с методическими рекомендациями по определению потенциального иммуотоксического действия препаратов [30].

Влияние препарата «Декасан» на клеточный иммунный ответ изучали в тесте «Реакция гиперчувствительности замедленного типа» (ГЗТ) по методу К.Р. Kitamura [30, 31]. Реакция нацелена на определение способности исследуемого средства влиять на продукцию сенсibilизированными Т-лимфоцитами-эффекторами медиаторов, которые вызывают инфильтрацию ткани клеточными элементами. Введение антигена в подушечку лапки животного приводит к развитию локального отека.

Препарат «Декасан» вводили в виде раствора внутривентриально один раз в сутки за час до и в течение всего периода иммунизации (5 суток) до дня учета результатов в условнотерапевтической дозе 6,5 мл/кг (1,3 мг/кг по декаметоксину) и в 10 раз большей – 65 мл/кг (13 мг/кг по декаметоксину)

В исследовании использовали 40 половозрелых нелинейных мышей массой 20,0-22,0 г.

Были сформированы следующие группы по 10 животных в каждой:

1-я группа – интактный (неиммунизированный) контроль;

2-я группа – иммунизированный контроль;

3-я и 4-я группы – животные, которым за 1 час до и на протяжении всего срока иммунизации вводили препарат «Декасан».

Животных иммунизировали однократным введением суспензии свежеотмытых эритроцитов барана (ЭБ) в дозе 2×10^8 клеток в объеме 0,5 мл 0,9% раствора натрия хлорида на 20 г массы тела в межлопаточную область.

На 5-е сутки для выявления иммунизации мышам под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей (опытная лапа, правая) вводили завершающую дозу антигена (10^8 ЭБ, объем 0,02 мл на животное). В контролатеральную лапу (контрольная лапа, левая) вводили раствор Хенкса в том же объеме. Через 24 часа животных выводили из эксперимента путем дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом. Стопы задних конечностей животных отрезали на уровне голеностопного сустава, взвешивали на торсионных весах. Выраженность местной реакции оценивали по соотношению масс стоп подопытной и контрольной лап в каждой группе животных, рассчитывали индекс реакции (ИР) по формуле:

$$\text{ИР} = \frac{\text{Масса}_{\text{опыт. лапы}} - \text{Масса}_{\text{контр. лапы}}}{\text{Масса}_{\text{контр. лапы}}} \times 100\%,$$

где:

Масса_{опыт. лапы} – масса опытной лапы (ЭБ);

Масса_{контр. лапы} – масса контрольной лапы (раствор Хенкса).

Характер влияния препарата «Декасан» на гуморальный иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке и титров гемагглютининов (ГА) в сыворотке крови иммунизированных мышей. Препарат «Декасан» вводили в виде раствора внутривенно один раз в сутки за час до и в течение всего периода иммунизации (4 суток) до дня учета результатов в условнотерапевтической дозе 6,5 мл/кг (1,3 мг/кг по декаметоксину) и в 10 раз большей – 65 мл/кг (13 мг/кг по декаметоксину) [30,32]. В исследовании использовали 30 половозрелых нелинейных мышей массой 20,0-25,0 г. Были сформированы следующие группы по 10 животных в каждой:

5 группа – иммунизированный контроль (ЭБ);

6 и 7 группы – животные, которым за 1 час до и на протяжении всего срока иммунизации вводили препарат «Декасан» в дозах 6,5 мл/кг и 65 мл/кг.

Мышей иммунизировали однократным внутрибрюшинным введением 3% суспензией ЭБ в дозе 0,2 мл/20г массы тела животного. На 5-е сутки после иммунизации определяли количество АОК в селезенке, в сыворотке крови – титры ГА.

Определение количества АОК в селезенке проводили с помощью метода локального гемолиза в геле. Этот метод основан на способности лимфоидных клеток экспериментальных животных, иммунизированных чужеродными эритроцитами, секретировать антиэритроцитарные антитела, вызывающие лизис эритроцитов в присутствии комплемента [32]. По числу макроскопически видимых зон гемолиза вокруг антителообразующих клеток определяли количество продуцентов антител на лимфоидный орган.

Титры ГА в сыворотке крови иммунизированных животных определяли методом серийных разведений в полистироловых планшетах. Реакция агглютинации основывается на способности антител (агглютининов), содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, склеивать в изотоническом растворе хлористого натрия эритроциты барана, используемые как антиген [32,33].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica, v. 6,0 »[21-23]. Для значений количества АОК вычисляли среднее арифметическое и его стандартную ошибку. Обобщенные данные по определению индекса реакции и титров ГА контрольных и опытных групп представляли в виде медианы и верхнего и нижнего квартилей. Для получения статистических выводов при сравнении выборок относительных переменных (количества АОК) применяли однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмана-Кейлса, а также непараметрические методы: критерии Краскела-Уоллиса и Вилкоксона Манна-Уитни (для значений ИР и ГА).

Различия между контрольными и опытными группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты определения потенциальных иммунотоксических свойств препарата «Декасан», производства ООО «Юрия-Фарм», в виде 0,02% раствора декаметоксина, приведенные в таблице 3.8, показали, что введение препарата Декасан в дозе 6,5 мл/кг (1,3 мг/кг по декаметоксину) и 65 мл/кг (13 мг/кг по декаметоксину) не приводило к достоверному увеличению количества АОК в селезенке мышей и титров ГА в сыворотке крови. Это свидетельствует об отсутствии иммунотоксического действия Декасана на гуморальный иммунный ответ.

Таблица 3.8

Влияние Декасана на первичный гуморальный иммунный ответ мышей, иммунизированных эритроцитами барана

Группы животных	Дозы, мл/кг	Количество АОК на селезенку		Титры ГА, <i>Log</i> 2	
		n	(<i>mean ± St. er</i>) <i>Тест Ньюмена-Кейлса</i>	n	(<i>Me (Q25; Q75)</i>) <i>тест Манна-Уитни</i>
Иммунизированный контроль (ЭБ)	–	10	17992,0±3506,5	10	11,0 (9; 12)
Декасан	6,5	9	16168,9±2631,2	10	9,5 (9; 11)
	65	9	20204,4±2976,2	10	11,0 (11; 12)

Примечание: n – количество наблюдений.

Результаты исследования влияния Декасана на функциональную активность Т-клеток-эффекторов в реакции гиперчувствительности замедленного типа приведены в таблице 3.9. В ответ на введение завершающей дозы антигена в лапу предварительно иммунизированных мышей наблюдали раз-

витие локального отека: ИР в этой группе достоверно увеличивался в 4 раза. Введение Декасана в дозах 6,5 мл/кг и 65 мл/кг одновременно с иммунизацией мышей не влияло на развитие реакции ГЗТ, о чем свидетельствуют результаты расчета ИР, который в опытных группах статистически не отличался от ИР в группе иммунизированного контроля и был достоверно выше, чем в группе интактных животных.

Таблица 3.9

Влияние Декасана на первичный клеточный иммунный ответ мышей, иммунизированных эритроцитами барана

Группы животных	Дозы, мл/кг	n	Индекс реакции (<i>Me (Q25; Q75)</i> <i>тест Манна-Уитни</i>)
Неиммунизированный контроль	–	10	3,6 (2,4; 5,0)
Иммунизированный контроль (ЭБ)	–	8	14,6 (8,5; 19,8)*
Декасан	6,5	7	10,7 (8,3; 21,3)*
	65	8	9,8 (6,9; 14,8)*

Примечания:

1. * – уровень достоверности различий по отношению к неиммунизированному контролю;
2. n – количество наблюдений.

Таким образом, на основании проведенных исследований можно заключить, что препарат «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина, производства ООО «Юрия-Фарм», при внутрижелудочном введении в условно-терапевтической дозе 6,5 мл/кг (1,3 мг/кг по декаметоксину) и в 10 раз ее превышающей – 65 мл/кг (13 мг/кг по декаметоксину) – не обладает иммунотоксическим действием на гуморальный и клеточный иммунный ответ мышей.

3.3. Изучение кумулятивных способностей Декасана

Определение кумулятивных свойств препарата «Декасан» проведено согласно Методическим рекомендациям [33] по методу Lim и соавт. [34]. Эксперимент поставлен на 12 беспородных белых крысах обоих полов массой тела 170-220 г. Согласно методике, препарат вводили крысам внутрижелудочно в течении 28 дней в возрастающих дозах, составляющих 0,1; 0,15; 0,22; 0,34; 0,5; 0,75; 1,12 от ЛД₅₀ (600 мг/кг для крыс). Увеличение дозы производили каждые 4 дня, учитывая изменения массы тела животных. При этом учитывали дни гибели крыс и суммарные дозы вводимых веществ. Результаты приведены в таблицах 3.10 и 3.11.

Таблица 3.10

Определение кумулятивного эффекта Декасана по методу Lim. Гибель животных в зависимости от суммарной дозы

Дни эксп-та	Доза ежедневная		Доза суммарная		Гибель животных
	в частях от дозы ЛД ₅₀	в мг/кг	в частях от дозы ЛД ₅₀	в мг/кг	
1	0,1	60	0,1	60	-
2	-"-	-"-	0,2	120	-
3	-"-	-"-	0,3	180	-
4	-"-	-"-	0,4	240	-
5	0,15	90	0,55	330	-
6	-"-	-"-	0,70	420	-
7	-"-	-"-	0,85	510	-
8	-"-	-"-	1,00	600	-
9	0,22	132	1,22	732	-
10	-"-	-"-	1,44	864	-
11	-"-	-"-	1,66	996	-
12	-"-	-"-	1,88	1128	-
13	0,34	204	2,22	1332	-

14	-"-	-"-	2,56	1536	-
15	-"-	-"-	2,90	1740	-
16	-"-	-"-	3,24	1944	-
17	0,5	300	3,74	2244	-
18	-"-	-"-	4,24	2544	-
19	-"-	-"-	4,74	2844	-
20	-"-	-"-	5,24	3144	-
21	0,75	450	5,99	3594	-
22	-"-	-"-	6,74	4044	-
23	-"-	-"-	7,49	4494	-
24	-"-	-"-	8,24	4944	-
25	1,12	672	9,36	5616	-
26	-"-	-"-	10,40	6288	-
27	-"-	-"-	11,60	6960	-
28	-"-	-"-	12,72	7632	-

Таблица 3.11

Динамика массы тела животных при изучении кумулятивного действия препарата Декасан, 0,02% раствор, ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Срок исследования	Крысы самцы	Крысы самки
Исходные данные	177,5±1,6	204,6±5,6
4 сетки	176,3±3,1	199,2±8,6
8 сутки	176,3±4,4	194,2±9,3
12 сутки	195,0±6,6	205,0±11,3
16 сутки	198,8±2,2*	204,6±10,7
20 сутки	193,3±2,4*	202,9±8,9
24 сутки	200,8±2,6*	204,2±9,4
28 сутки	200,0±1,8*	203,8±8,4

Примечание: * – отклонение достоверно относительно исходных показателей, $p \leq 0,05$.

Результаты изучения кумулятивного действия препарата «Декасан» указывают на отсутствие гибели животных, что свидетельствует не только об отсутствии кумулятивных свойств у препарата, но и о развитии адаптивных процессов, которые в результате длительного введения изучаемого ЛС способствуют выживанию животных при введении дозы, превышающей ЛД₅₀.

Непосредственно при введении животным больших доз Декасана наблюдали у них движения, свидетельствующие о дискомфорте. Об этом же свидетельствуют результаты макроскопического исследования желудка животных после проведения эксперимента. После вскрытия животных извлекали желудок, разрезали его по большой кривизне. Наблюдали, что железистая часть желудка набухшая, на верхушках валиков умеренное полнокровие. Слизистая оболочка пищеводной части покрыта очень плотно прилегающим налетом, похожим на фибрин, который с трудом отделялся от поверхности. После соскабливания налета обнаруживались различные по размеру множественные кратерообразные образования. Возможно, описанные выше изменения слизистой оболочки желудка являются адаптивным фактором, который поспособствовал выживанию животных. Через неделю после последнего введения исследуемого ЛС у животных наблюдали полное восстановление слизистой оболочки желудка.

Внешне животные выглядели опрятными, спокойными, поедали корм. У некоторых изредка наблюдалась диарея. Масса экспериментальных животных увеличивалась по ходу эксперимента медленно, особенно у самок (табл. 3.11).

Таким образом, препарат «Декасан» не проявляет кумулятивных свойств.

3.4. Изучение мутагенного потенциала Декасана

Потенциальную мутагенную активность Декасана в виде 0,02% раствора декаметоксина изучали по методу учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей [35].

Исследование проведено на 24 беспородных самцах мышей. В начале эксперимента масса животных составляла: 20 ± 2 г. Было использовано 4 группы самцов (табл. 3.12). Каждая группа состояла из 6 животных.

Таблица 3.12

Мыши, распределение по группам и дозы при исследовании мутагенных свойств Декасана, 0,02% раствора

Экспериментальные группы	Доза сухого вещества декаметоксина, мг/кг	Объем введения Декасана в виде 0,02% раствора декаметоксина, мл/кг	Номера мышей в группе
Интактный контроль	0	0	1-6
Негативный контроль (растворитель)	0	50*	7-12
Декасан	1	5	13-18
Декасан	10	50	19-24

Примечание: * – животным группы негативного контроля вводили носитель (натрия хлорид в концентрации 9 г/л) в эквивалентном количестве.

В основе метода учета хромосомных aberrаций лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга мышей в стадии метафазы.

Декасан в виде 0,02% раствора декаметоксина вводили в виде суспензии внутривентрикулярно один раз в сутки в дозах 5 мл/кг и 50 мл/кг. Через 24 часа после последнего введения субстанции животных выводили из экспери-

мента путем дислокации шейных позвонков. За 2 часа до этого с целью накопления клеток в метафазе деления внутрибрюшинно вводили 0,025% раствор колхицина в дозе 2,5 мг/кг (по 0,1 мл на 10 г массы тела мышей) [36,37,38]. У каждого животного брали обе бедренные кости из которых вымывали костный мозг подогретым до 37° С раствором Хенкса.

Полученную суспензию клеток костного мозга центрифугировали при 1000 об / мин в течение 5 минут, отбирали надосадочную жидкость и ресуспендировали. Полученный осадок подвергали обработке предварительно нагретым до 37° С гипотоническим раствором хлористого калия (0,55%), в течение 10 минут в термостате, снова центрифугировали. Фиксацию клеток проводили в трех сменах смеси метанол-уксусная кислота в соотношении 3:1, приготовленной *ex tempore*. Полученную в последней порции фиксатора клеточную взвесь желаемой плотности наносили каплями на охлажденное, смоченное водой предметное стекло. Фиксатор сжигали в пламени спиртовой горелки легким прикосновением к пламени. Стекла высушивали в термостате. Препараты окрашивали смесью азура и эозина приготовленной *ex tempore* в соотношении 6 частей азура, 3 частей эозина и 9 частей водопроводной воды [36].

Анализ хромосомных aberrаций проводили на микроскопе под иммерсионным объективом при увеличении 10×90. На каждое животное анализировали 100 метафаз. Учитывали число одиночных и парных фрагментов, хромосомных и хроматидных обменов, ахроматических пробелов (гепов), число клеток с множественными aberrациями. При обнаружении 10 и более клеток с aberrациями хромосом в одной метафазной пластинке, регистрируют как клетку с множественными aberrациями.

Анализировали метафазные пластинки хромосомы, которых были хорошо прокрашены и равномерно разбросаны, не имели более 2-3 наложений мешающих оценить. Выбирали уровень конденсации пластинок в интервале от минимум – хромосом четко разделенных на две хроматиды, до максимум – хромосом малых размеров, но с четко выраженной структурой [37,38].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica, 6,0». Для межгруппового сравнения показателей: количество одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, количество клеток с множественными аберрациями, общее количество аберраций на 100 клеток в метафазе использовали непараметрический критерий Краскела-Уоллиса и Манна-Уитни. Процент клеток в метафазе с аберрациями хромосом сравнивали с помощью критерия χ^2 [23].

Результаты приведены в таблице 3.13.

Таблица 3.13

Результаты оценки цитогенетической активности Декасана в тесте по учету хромосомных аберраций в клетках костного мозга мышей самцов, *Me (Q25; Q75) (n=6)*

Показатели	Интак- ный кон- троль	Негатив- ный кон- троль	5 мл/кг	50 мл/кг,	<i>p</i> (по крите- рию Крус- ка- Уоллиса)
1	2	3	4	5	6
Количество про- анализированных метафаз	600	600	600	600	–
Одиночные фраг- менты	2(2;3)	2(2;3)	2(2;2)	2(2;3)	<i>p</i> =0,8545
Парные фрагмен- ты	1(0;1)	1(0;2)	1(0;1)	1(0;2)	<i>p</i> =0,9703
Хромосомные об- мены	2(1;2)	1,5(0;2)	2(1;3)	1(1;3)	<i>p</i> =0,7237

1	2	3	4	5	6
Хроматидные об-мены	0(0;1)	0,5(0;1)	0,5(0;1)	0,5(0;1)	$p=0,9227$
Полиплоидия	0(0;1)	0(0;0)	0(0;0)	0(0;1)	$p=0,8370$
Количество мета-фаз с абберациями	4(3;5)	5(4;5) $p1 = 0,5862$	5(3;6) $p1 = 0,7815$ $p2 = 0,789$ 2	4,5(4;7) $p1 = 0,5001$ $p2 = 0,896$ 4	–
Ахроматические пробелы (гепы)	1,5(1;2)	1,5(1;2)	2(1;2)	1,5(1;2)	$p=0,8983$

Примечания:

1. $p1$ – уровень достоверности различий по отношению к интактному контролю, χ^2 ;
2. $p2$ – уровень достоверности различий по отношению к негативному контролю, χ^2 ;
3. n – количество наблюдений.

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии мутагенного действия при применении Декасана. Статистический анализ не выявил достоверных отличий относительно групп интактного и негативного контролей. В каждой экспериментальной группе проанализировано 600 метафазных пластинок по 100 от каждого животного. Нормальные метафазные пластинки характеризовались диплоидным набором хромосом. Анализируемые пластинки содержали 40 ± 1 хромосом и имели достаточное расхождение хромосом и равномерную окраску. Уровень конденсации хромосом позволял в достаточной мере оценить полноценность структуры.

Общее количество метафаз с абберациями в опытной группе при введении субстанции в дозах 5 и 50 мл/кг не отличалось от данных групп интактного и негативного контролей.

Спектр выявленных аббераций во всех экспериментальных группах в основном был представлен одиночными фрагментами, что совпадает с данными других авторов [39, 40]. Хромосомные обмены были представлены слиянием двух хромосом с образованием дицентрических хромосом, а также слиянием двух хроматид разных хромосом с образованием так называемой абберации «end to end» [41]. Хроматидные обмены были представлены кольцами, образованными участком хроматиды. Абберации, представленные обменами, имели низкую встречаемость, которая не различалась в разных экспериментальных группах. Ахроматические пробелы (гепы) встречались с одинаковой частотой во всех экспериментальных группах и в соответствии с методическими рекомендациями не были учтены как абберации. Количество гепов в интактной группе составило 1,5(1;2), в группе негативного контроля – 1,5(1;2), что не отличалось от значений в группах животных, которым вводили Декасан в виде 0,02% раствора декаметоксина в дозах 5 мл/кг и 50 мл/кг. Явление полиплоидии (слияние двух и более метафазных пластинок) встречались редко и не свидетельствовали о мутагенных свойствах. Множественные абберации не регистрировали ни в одной из групп.

Пятидневное внутрижелудочное введение Декасана в виде 0,02% раствора декаметоксина в дозах 5 мл/кг и 50 мл/кг самцам мышей не стимулировало увеличение числа абберантных клеток, а так же не вызывало аббераций хромосомного и хроматидного типов.

Таким образом, результаты количественной оценки цитогенетической активности Декасана в клетках костного мозга мышей самцов при внутрижелудочном пути введения свидетельствуют об отсутствии мутагенных свойств.

3.5 Изучение гонадотоксического действия Декасана

3.5.1. Изучение гонадотоксического действия на самках крыс

Согласно требованиям ГФЦ МЗ Украины, все новые лекарственные препараты должны подвергаться исследованиям по изучению определенных видов специфической токсичности [42]. Изучение гонадотоксического действия препарата «Декасан», производства ООО «Юрия-Фарм» в виде 0,02% раствора декаметоксина проводили в соответствии с методическими рекомендациями [42]. Исследование выполнено на 32 беспородных самках крыс. В начале эксперимента масса животных составляла 200 ± 20 г. Дизайн исследования представлен в таблице 3.14.

Таблица 3.14

Дизайн исследования гонадотоксического действия Декасана у самок, распределение крыс по группам и дозы

Экспериментальные группы	Доза, мл/кг	Доза действующего вещества, мг/кг	Количество крыс в группе
Интактный контроль	–	–	8
Негативный контроль (вода)	–	–	8
Декасан	3	0,6	8
Декасан	30	6	8

Изучаемый препарат «Декасан». 0,02 % раствор декаметоксина, вводили внутривентрикулярно один раз в сутки в условнотерапевтической дозе 3 мл/кг и в дозе, которая соответствует 10-кратной (максимальной) дозе – 30 мл/кг в течение 15 дней, что соответствует 3 эстральным циклам самок.

Изучение гонадотоксического действия препарата «Декасан» включало функционального состояния и микроструктуры яичников самок крыс.

После окончания срока введения изучали длительность эстрального цикла у 8 самок каждой группы путем анализа влагалищных мазков. Определение продолжительности эстрального цикла проводили по соотношению клеточных элементов вагинального эпителия в мазках.

Для исследования микроструктуры яичников животных выводили из эксперимента в стадии проэструса или эструса. Поскольку правый и левый яичники по количественному и качественному составу структурных компонентов мало отличаются друг от друга, для исследования брали по одному яичнику от каждого животного. В соответствии с требованиями методических рекомендаций для анализа микроструктуры яичников для каждой группы достаточно 5 образцов от разных животных. Яичники взвешивали, после чего фиксировали в 10% растворе формалина, проводили по спиртам с возрастающей концентрацией, заливали в целлоидин-парафин. Из каждого органа делали серийные срезы по топографическому типу (через весь орган) [43].

Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. На срезах по всей поверхности подсчитывали количество:

- 1) примордиальных фолликулов и фолликулов с одним слоем гранулезных клеток (в каждом 10-м срезе, затем результат умножали на 10),
- 2) фолликулов с двумя и более слоями гранулезных клеток,
- 3) зрелых фолликулов (графовы пузырьки),
- 4) атретических фолликулов (2-4 – в каждом 5-м срезе, результат умножали на 5),
- 5) желтых тел (на срединном срезе),
- 6) общее количество генеративных форм.

При подсчете клеточных элементов учитывали только те фолликулы, которые содержали ядро с ядрышком [42].

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica, V. 6,0». Для показателя коэффициент массы яичников вычисляли

среднее арифметическое и его стандартную ошибку. Результаты по продолжительности эстрального цикла, а также данные микроструктурного анализа представляли в виде медианы и верхнего и нижнего квартилей. Для получения статистических выводов при сравнении выборок относительных переменных применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и критерий Ньюмана-Кейлса (для значений массовых коэффициентов яичников) или непараметрические методы: критерии Краскела-Уоллиса и Вилкоксона Манна-Уитни (для значений продолжительности эстрального цикла и данных микроструктурного анализа яичников). Различия между контрольными и опытными группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$ [21-23].

Результаты показали, что внутрижелудочное применение препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг у половозрелых фертильных крыс самок в течение 3 эстральных циклов не повлияло на продолжительность эстрального цикла и качественный клеточный состав влагалищного эпителия ($p=0,9285$, по критерию Краскела-Уоллиса). У крыс всех экспериментальных групп наблюдали последовательную смену четырех фаз цикла: диэструс, проэструс, эструс и метаэструс. У большинства крыс продолжительность цикла составляла 4-5 дней (табл.3.15).

Таблица 3.15

Продолжительность эстрального цикла у крыс самок, которым вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг, Me (Q25; Q75) (n = 8)

Показатели	Доза, мл/кг	Продолжительность цикла, дни	
		до введения препарата	после введения препарата
Интактный контроль	–	4 (4; 5)	4,5 (4; 5)
Негативный контроль	–	4,5 (4; 5)	5 (4; 5)
Декасан	3	4,5 (4; 5)	4,5 (4; 5)
Декасан	30	5 (4,5; 5)	5 (4; 5)

Полученные результаты соответствуют данным литературы и являются физиологической нормой для данного вида животных.

При проведении вскрытия и макроскопического осмотра органов малого таза не выявлено видимых отклонений. Выведение самок из эксперимента проводили в стадии эструса эстрального цикла, о чем свидетельствовали состояние матки и кровенаполненность яичников.

При изучении влияния на коэффициенты массы яичников установлено тенденцию к статистически значимым отклонениям относительно группы интактного контроля ($p=0,0808$, критерий Ньюмана-Кейлса). Результаты представлены в таблице 3.16.

Таблица 3.16

Макрометрические показатели яичников крыс самок, которым вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг, $M \pm m$ ($n = 5$)

Показатели	Доза, мл/кг	Коэффициент массы яичников, мг/100г
Интактный контроль	–	0,064±0,003
Негативный контроль	–	0,066±0,003
Декасан	3	0,060±0,004
Декасан	30	0,054±0,004

Примечание. n – количество животных в группе.

Микроскопически у всех самок крыс яичники обычной структуры. В них хорошо различается корковое и мозговое вещество. В самом наружном слое коркового вещества видны примордиальные (первичные) фолликулы, в более глубоких слоях – растущие фолликулы, фолликулы, находящиеся в состоянии атрезии, желтые тела. Среди растущих фолликулов представлены разные категории, соответствующие разным стадиям оогенеза. Атрезия фол-

ликулов носит физиологический характер и в основном затрагивает первичные и мелкие-средние фолликулы. Среди желтых тел различались молодые (данного цикла) и уже находящиеся в состоянии регрессивного процесса (тела предыдущих циклов). Среди клеток стромы коркового вещества видны немногочисленные интерстициальные клетки. Мозговая часть яичника представлена рыхлой соединительной тканью с большим количеством кровеносных сосудов. У всех самок яичники находятся в состоянии физиологической гиперемии, характерной для стадии эструс эстрального цикла.

Проведенный количественный анализ структурно-функциональных элементов яичников самок крыс, получавших препарат «Декасан» в дозе 3 мл/кг, подтвердил отсутствие качественных структурных изменений, показал стабильность резерва фолликулогенеза (численности примордиальных фолликулов), отсутствие признаков угнетения созревания ооцитов (уменьшения наличия желтых тел, фолликулов различной степени зрелости), не выявил интенсификации процесса атрезии фолликулов. Практически не менялось процентное соотношение элементов фолликулярной системы сравнительно с контрольными самками (табл. 3.17). Повышение дозы препарата «Декасан» до 30 мл/кг достоверно снижало численности примордиальных фолликулов и пул растущих фолликулов (табл. 3.17).

Таким образом, на основании полученных результатов можно сделать вывод о том, что препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг не влияет на эстральный цикл самок, в дозе 30 мг/кг приводит к небольшому снижению массовых коэффициентов яичников.

Препарат «Декасан» в дозе 3 мл/кг не оказывает негативного влияния на структурную организацию яичников, не снижает резерв фолликулогенеза, не влияет на темпы развития яйцевых фолликулов, не повышает уровень атрезии фолликулов, а в дозе 30 мл/кг снижает численность примордиальных и растущих фолликулов, что можно расценить как проявление в дозе, в 10 раз превышающей условнотерапевтическую, гонадотоксического действия у самок.

Таблица 3.17

Состав структурно-функциональных элементов яичников крыс самок, получавших препарат «Декасан» (n = 5)

Показатели	Экспериментальные группы							
	Интактный контроль		Негативный контроль		Декасан			
					3 мл/кг		30 мл/кг	
	<i>Me (Q25; Q75)</i>	%	<i>Me (Q25; Q75)</i>	%	<i>Me (Q25; Q75)</i>	%	<i>Me (Q25; Q75)</i>	%
Примордиальные фолликулы и фолликулы с 1-м слоем гранулезных клеток	750 (650; 770)	36,9	710 (670; 750)	35,4	720 (670; 810)	36,8	550 (510; 640) *	32,4 *
Фолликулы с 2-мя и более слоями гранулезных клеток	70 (70; 80)	3,81	70 (65; 75)	3,58	70 (70; 75)	3,69	50 (45; 50) */**	2,83 */**
Зрелые фолликулы (граафовы пузырьки)	5 (0; 5)	0,16	0 (0; 5)	0,10	5 (0; 5)	0,20	5 (0; 5)	0,17
Атрезизирующие фолликулы и атретические тела	1130 (1105; 1190)	58,5	1140 (1125; 1280)	60,2	1245 (1105; 1255)	58,6	1055 (1050; 1085)	63,8 *
Желтые тела	11 (10; 14)	0,63	15 (13; 16)	0,74	15 (13; 16)	0,70	12 (12; 18)	0,86
Общее количество генеративных форм	1974 (1841; 2030)	100	1948 (1885; 2136)	100	2096 (2003; 2100)	100	1702 (1511; 1768)	100

Примечания: 1. * – статистически значимые различия относительно интактного контроля, ** – негативного контроля, критерий Манна-Уитни ($p \leq 0,05$),

2. n – количество животных в каждой группе.

3.5.2. Изучение гонадотоксического действия на самцах крыс

Согласно требованиям ГФЦ МЗ Украины все новые лекарственные препараты должны подвергаться исследованиям по изучению определенных видов специфической токсичности [42]. Изучение гонадотоксического действия препарата «Декасан», производства ООО «Юрия-Фарм» в виде 0,02% раствора декаметоксину проводили в соответствии с методическими рекомендациями [42]. Исследование проведено на 40 беспородных самцах крыс. В начале эксперимента масса животных составляла 250 ± 20 г. Дизайн исследования представлен в табл. 3.18.

Таблица 3.18

Дизайн исследования гонадотоксического действия препарата «Декасан» у самцов, распределение крыс по группам и дозы

Экспериментальные группы	Доза, мл/кг	Доза действующего вещества, мг/кг	Количество крыс в группе
Интактный контроль	–	–	10
Негативный контроль (вода)	–	–	10
Декасан	3	0,6	10
Декасан	30	6	10

Исследуемый препарат 0,02 % раствор «Декасан» вводили внутривентрально один раз в сутки в условнотерапевтической дозе 3 мл/кг и в дозе, которая соответствует 10-ти кратной (максимальной дозе) – 30 мл/кг в течение всего периода сперматогенеза с учетом периода созревания сперматозоидов в эпидидимусе – 60 дней.

Изучение гонадотоксического действия препарата «Декасан» включало: наблюдение за физиологическим состоянием и динамикой массы животных, макроскопическое исследование семенников, исследования функцио-

нального состояния сперматозоидов и морфологических показателей состояния сперматогенного эпителия.

После завершения периода применения препарата животных выводили из эксперимента путем декапитации, вынимали семенники и определяли их макрометрические показатели: длину и массу, с последующим расчетом коэффициентов массы. При макроскопическом исследовании семенников проводили внешний осмотр с целью выявления патологических отклонений (кровенаполнения, воспалительных процессов, атрофии и др.).

Для исследования функционального состояния сперматозоидов использовали суспензию содержимого хвостового придатка семенника в физиологическом растворе. Показателями функционального состояния сперматозоидов были: концентрация сперматозоидов, относительное количество их неподвижных и патологических форм, показатели осмотической и кислотной резистентности, продолжительность движения сперматозоидов.

Ткань семенников подлежала гистологическому исследованию путем световой микроскопии. Семенники фиксировали в 10% растворе формалина, заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином [44]. На срезах проводили количественную оценку структурно-функциональных элементов с использованием следующих параметров:

1) J - индекс сперматогенеза. Его подсчитывали по 4-х бальной системе, для чего фиксировали в извилистом семенном канальце наличие сперматогоний, сперматоцитов I-го и II-го порядка, сперматид и сперматозоидов (каждый слой составлял один балл). Индекс сперматогенеза рассчитывали по формуле:

$$J = \frac{A}{100}$$

где A – количество слоев сперматогенного эпителия, обнаруженных в канальце;

100 – число просмотренных канальцев.

- 2) Относительное количество извитых канальцев со слущенным семяродным эпителием, который подсчитывали при просмотре 100 канальцев;
- 3) Относительное количество извитых канальцев с метафазой 2-го деления созревания, которые подсчитывали при просмотре 100 канальцев;
- 4) Количество нормальных сперматогоний в извитых семенных канальцах, которые подсчитывали при просмотре 20 канальцев.

Для статистического анализа гонадотоксического действия при сравнении выборок относительных переменных (длины семенников, концентрации сперматозоидов, времени подвижности сперматозоидов, количества нормальных сперматогоний) применяли однофакторный дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кейлса ($p < 0,05$). Непараметрический метод Краскела-Уоллиса (аналог дисперсионного анализа) и критерий Мана-Уитни ($p < 0,05$) применяли для других параметров гонадотоксического действия [21-23]. Результаты представлены в таблицах 3.19-3.21 .

Таблица 3.19

Макрометрические показатели семенников крыс, которым внутрижелудочно вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг, $M \pm m$ (n=10)

Показатели		Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан	
				3 мл/кг	30 мл/кг
Коэффициент массы семенников, г/100 г	правый	0,573±0,017	0,586±0,018	0,560±0,016	0,582±0,013
	левый	0,582±0,022	0,590±0,016	0,567±0,017	0,572±0,019
Длина семенников, мм	правый	21,6±0,2	22,3±0,4	21,6±0,3	21,9±0,3
	левый	21,9±0,1	22,3±0,3	21,9±0,2	22,2±0,2
Коэффициент массы придатков семенников, г/100 г		0,182±0,006	0,185±0,005	0,185±0,005	0,189±0,005

Таблица 3.20

Показатели функционального состояния сперматозоидов крыс, которым внутрижелудочно вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг (n=10)

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан	
			3 мл/кг	30 мл/кг
Концентрация , млн/мл, $M \pm m$	52,9±2,1	59,7±4,3	56,6±3,5	57,6±1,8
Длительность подвижности, мин, $M \pm m$	399±10	408±6	393±6	405±5
Осмотическая резистентность, %, $Me (LQ;UQ)$	4,6 (4,4; 4,8)	4,8 (4,6; 4,8)	4,2 (4,2; 4,8)	4,4 (4,0; 4,6)
Кислотная резистентность, рН, $Me (LQ;UQ)$	3,8 (3,6; 3,9)	3,5 (3,3; 3,9)	3,9 (3,8; 4,0)	3,8 (3,4; 4,2)
Относительное количество патологических форм, %, $Me (LQ;UQ)$	60 (59; 64)	59 (57; 67)	67 (60; 70)	61 (59; 65)
Относительное количество неподвижных, %, $Me (LQ;UQ)$	7,5 (7; 8)	7,5 (5; 9)	9 (6; 11)	8 (7; 10)

Таблица 3.21

Морфометрические показатели процесса сперматогенеза крыс, которым внутрижелудочно вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан	
			3 мл/кг	30 мл/кг
Количество нормальных сперматогоний, $M \pm m$	60,20±0,89	60,81±0,84	61,29±0,86	60,94±0,76
Индекс сперматогенеза, балы, $Me (LQ;UQ)$	3,33 (3,33; 3,35)	3,33 (3,32; 3,34)	3,33 (3,33; 3,35)	3,34 (3,33; 3,34)
Количество канальцев с 12-й стадией мейоза, %, $Me (LQ;UQ)$	4,0 (3,5; 4,5)	4,0 (3,5; 4,0)	4,0 (3,5; 4,0)	4,0 (3,0; 4,0)
Количество канальцев со слущенным эпителием, %, $Me (LQ;UQ)$	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,5)	0,0 (0,0; 0,5)	0,0 (0,0; 0,0)

Данные макрометрических показателей семенников крыс, которые получали в течение всего периода сперматогенеза, приведены в таблице 3.19. Анализ полученных результатов показывает, что длительное применение препарата не повлияло на коэффициенты массы и длину семенников и их придатков по сравнению с показателями контрольных животных.

Анализ результатов функционального состояния сперматозоидов (табл. 3.20) также свидетельствует об отсутствии статистически значимых

различий между показателями у животных, получавших препарат и группами интактного и негативного контролей.

Как показала микроскопия, у всех подопытных и контрольных животных морфологическая структура яичек соответствовала норме. Семенные канальцы, срезанные в поперечном сечении, достаточно плотно прилегали друг к другу. Диаметр канальцев обычен, собственная оболочка, а также белочная и сосудистая оболочки без особенностей. В семенных канальцах видны 3-4 генерации сперматогенных клеток, которые находятся на разных стадиях развития. Клетки расположены концентрическими слоями, упорядоченно, в соответствии со стадиями сперматогенного цикла. У всех крыс клеточная популяция представлена в полном объеме. Около собственной оболочки канальца лежат достаточно многочисленные суспенциты (клетки Сертоли). Между семенными канальцами в соединительной ткани, чаще вокруг кровеносных сосудов, группируются немногочисленные клетки с умеренно варьирующими по размеру ядрами – гландулоциты (клетки Лейдига). В разных канальцах у крыс разных групп эксперимента четко прослежен не только сперматогенез (процесс последовательных перестроек зародышевых клеток: сперматогония – сперматозоид), но и спермиогенез – этапы клеточных превращений от сперматиды до сперматозоида.

Количественные показатели процесса сперматогенеза подтвердили визуальную оценку морфологической структуры семенников крыс, получавших в течение всего периода сперматогенеза препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг (табл. 3.21).

Анализируя данные, полученные в результате исследования, можно констатировать, что препарат «Декасан» в обеих изученных дозах не оказывает негативного влияния как на функциональное состояние сперматозоидов, так и на структуру тестикулярной ткани и процесс сперматогенеза, т.е. не обладает гонадотоксическим действием на мужские гонады.

3.6. Изучение эмбриотоксичности и тератогенности Декасана

Изучение эмбриотоксического и тератогенного действия препарата «Декасан», производства ООО «Юрия-Фарм» в виде 0,02% раствора декаметоксину проводили в соответствии с методическими рекомендациями [45]. Исследование проведено на 120 беспородных самках крыс. В начале эксперимента масса животных составляла: 200 ± 20 г. Первый день беременности устанавливали на основании наличия сперматозоидов в мазках из влагалища. Беременные самки были разделены на 6 групп (табл. 3.22). В каждой группе было по 20 животных.

Таблица 3.22

Дизайн исследования эмбриотоксического и тератогенного действия препарата «Декасан», распределение животных по группам и дозы

Экспериментальные группы	Дни беременности, в которые вводили декасан	Доза, мл/кг	Доза действующего вещества, мг/кг
Интактный контроль	–	–	–
Негативный контроль (вода)	1-19	–	–
Декасан	1-6	30	6
Декасан	6-16	3	0,6
Декасан	6-16	30	6
Декасан	16-19	3	0,6

Под эмбриотоксическим действием понимают способность исследуемого вещества оказывать токсическое действие на развивающиеся зародыши. Эмбриотоксичность может проявляться как в повышении уровня эмбриональной смертности (эмбриолетальное действие), так и в виде отклоне-

ний в развитии: изменение массы тела, кранио-каудального размера плодов, задержке оксификации скелета.

Изучаемый препарат 0,02 % раствор «Декасан» вводили внутривентрикулярно один раз в сутки в условнотерапевтической дозе 3 мл/кг и в дозе, которая соответствует 10-ти кратной (максимальной дозе) – 30 мл/кг, в одно и то же время утром в разные периоды беременности: 1-6 день – в дозе 30 мл/кг, 6-16 день – в дозах 3 и 30 мл/кг, 16-19 день – в дозе 30 мл/кг. На 20-й день беременности самок подвергали эвтаназии и проводили вскрытие [45].

При проведении вскрытия беременных самок на 20 день гестации регистрировали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации и резорбции в матке, живых и мертвых плодов. Проводили макроскопический осмотр плодов на наличие аномалий развития, подкожных гематом, измеряли кранио-каудальный размер плодов (ККР), взвешивали плоды и плаценту. На основании этих данных определяли уровень предимплантационной смертности (ПрИС) и постимплантационной смертности (ПИС) зародышей, которые рассчитываются в соответствии с формулами (1, 2).

$$\text{ПрИС} = \frac{\text{ЖТ} - \text{МИ}}{\text{ЖТ}} * 100\% \quad (1)$$

$$\text{ПИС} = \frac{\text{МР}}{\text{МИ}} * 100\% \quad (2)$$

где: ЖП – количество живых плодов,

МИ – количество мест имплантации,

МР – количество мертвых и резорбированных эмбрионов,

ЖТ – количество желтых тел в яичниках.

Изучение тератогенного действия декасана.

При вскрытии беременных самок плодов осматривали на наличие видимых внешних аномалий развития и гематом. Половину плодов каждого помета (в равном соотношении самцов и самок) фиксировали в смеси Буэна для исследования внутренних органов по методу Вильсона в модификации

А. П. Дыбана [46] на серии параллельных разрезов головы и туловища, сделанных безопасной бритвой от руки. Вторую половину плодов пометов фиксировали в 96% этиловом спирте для последующего изучения состояния костной системы. Для этого готовили тотальные препараты, окрашенные красным ализарином по методу Даусона-Дыбана [46]. При исследовании костной системы оценивали пространственную ориентацию костей, интенсивность окраски костного материала. Подсчитывали количество центров окостенения в грудине, позвонках позвоночного, крестцового отделов позвоночника, определяли наличие и количество костей пясти и плюсны, реберных пар. Микроанатомическую оценку состояния внутренних органов, костей черепа, туловища и конечностей проводили под стереоскопическим микроскопом МБС-8.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica, 6,0». Для межгруппового сравнения непараметрических данных использовали аналог дисперсионного анализа – метод Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни, для параметрических данных оценку достоверности различий между выборками проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA или ANOVA RM и критерия Ньюмана-Кейлса [21-23].

Результаты представлены в таблицах 3.23-3.26.

Таблица 3.23

Показатели, регистрируемые при вскрытии беременных самок на 20-й день гестации, после введения препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг в разные периоды беременности

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 1-6 день 30 мл/кг	Декасан, 6-16 день 3 мл/кг	Декасан, 6-16 день 30 мл/кг	Декасан, 16-19 день 30 мл/кг
Количество беременных самок	18	19	19	16	15	18
Количество желтых тел, <i>Me (LQ;UQ)</i>	12,0 (10,0; 13,0)	11,0 (10,0; 13,0)	11,0 (10,0; 13,0)	10,0 (9,5; 11,5)	11,0 (10,0; 13,0)	11,0 (10,0; 13,0)
Количество мест имплантации, <i>Me (LQ;UQ)</i>	10,0 (9,0; 12,0)	11,0 (9,0; 11,0)	10,0 (8,0; 10,0)	9,0 (9,0; 10,5)	10,0 (9,0; 12,0)	11,0 (10,0; 12,0)
Количество мест резорбции, <i>Me (LQ;UQ)</i>	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,0)	0,0 (0,0; 1,5)	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0,0; 2,0)
Количество живых плодов, <i>Me (LQ;UQ)</i>	9,0 (8,0; 11,0)	10,0 (9,0; 11,0)	9,0 (7,0; 10,0)	9,0 (8,0; 10,0)	9,0 (8,0; 10,0)	9,5 (9,0; 11,0)
Количество мертвых плодов, <i>Me (LQ;UQ)</i>	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Кранио-каудальный размер, мм, <i>M±m</i>	31,4±0,4	31,7±0,4	29,6±0,8	30,0±0,4	29,2±0,4**	29,7±0,6
Масса плодов, г, <i>M±m</i>	2,59±0,05	2,55±0,05	2,51±0,13	2,32±0,06	2,19±0,06*/**	2,29±0,08
Масса плаценты, г, <i>M±m</i>	0,62±0,01	0,65±0,03	0,67±0,03	0,60±0,01	0,61±0,04	0,57±0,01
Плодовоплацентарный индекс, <i>M±m</i>	0,24±0,00	0,25±0,01	0,27±0,01	0,26±0,01	0,28±0,02	0,25±0,01

Примечания: 1.* - статистически значимые отличия при сравнении с группой интактного контроля, критерий Ньюмана-Кейлса ($p \leq 0,05$), 2. ** - статистически значимые отличия при сравнении с группой негативного контроля, критерий Ньюмана-Кейлса ($p \leq 0,05$)

Таблица 3.24

**Показатели эмбриолетального действия при введении препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг
в разные периоды беременности**

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 1-6 день 30 мл/кг	Декасан, 6-16 день 3 мл/кг	Декасан, 6-16 день 30 мл/кг	Декасан, 16-19 день 30 мл/кг
Количество беременных самок	18	19	19	16	15	18
Предимплантационная смертность, %, <i>Me (LQ;UQ)</i>	0,0 (0,0; 18,1)	9,0 (0,0; 15,3)	11,1 (9,0; 35,7) *	8,7 (0,0; 12,1)	0,0 (0,0; 10,0)	8,0 (0,0; 10,0)
Постимплантационная смертность, %, <i>Me (LQ;UQ)</i>	8,3 (0,0; 11,1)	9,0 (0,0; 11,1)	0,0 (0,0; 16,6)	0,0 (0,0; 9,1)	10,0 (0,0; 14,2)	10,0 (0,0; 16,6)
Общая эмбриональная смертность, %, <i>Me (LQ;UQ)</i>	10,0 (7,1; 25,0)	15,3 (9,0; 30,7)	22,2 (10,0; 35,7)	10,0 (0,0; 25,1)	12,5 (9,0; 25,0)	18,1 (10,0; 23,0)

Примечание: * - статистически значимые отличия при сравнении с группой интактного контроля, критерий Манна-Уитни ($p \leq 0,05$).

Таблица 3.26

Состояние скелетной системы плодов самок 20-го дня гестации, после внутрижелудочного введения препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мг/кг в разные периоды беременности

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан			
			1-6 30 мг/кг	6-16 3 мг/кг	6-16 30 мг/кг	16-19 30 мг/кг
1	2	3	4	5	6	7
Количество осмотренных плодов	90	93	81	78	73	77
Снижение количества костных закладок пясти, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 20)	0 (0; 0)	0 (0; 20)	30 (0; 77) */**	40 (0; 75) */**	0 (0; 50)
Снижение количества костных закладок плюсны, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 10)	0 (0; 20)	0 (0; 0)
Отсутствие окостенения в подъязычной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	16 (0; 50)	0 (0; 0)	0 (0; 20)	0 (0; 40)	0 (0; 0)
Задержка окостенения в лобковой кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 6)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Отсутствие окостенения в лобковой кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 20)	10 (0; 33,3)	45 (10; 77,5)	40 (0; 80)	20 (0; 33,3)
Задержка окостенения в седалищной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 10)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Отсутствие окостенения в седалищной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 10)	0 (0; 50) **	0 (0; 20)

Продолжение таблицы 3.26

1	2	3	4	5	6	7
Задержка окостенения в затылочной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Отсутствие окостенения в затылочной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 50)	0 (0; 33)
Задержка окостенения в межтеменной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 12)	0 (0; 40)	0 (0; 16)
Отсутствие окостенения в межтеменной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0;33)	0 (0; 20)
Задержка окостенения в теменной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 20)	0 (0; 0)	0 (0; 40)	10 (0; 37)	0 (0;75)	0 (0; 33)
Отсутствие окостенения в теменной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Задержка окостенения в лобной кости, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 10)	0 (0; 50)	0 (0; 0)
Отсутствие окостенения в дугах позвонков поясничного отдела позвоночника, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 12)	0 (0; 20)	0 (0; 0)
Отсутствие окостенения в телах позвонков поясничного отдела позвоночника, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 20)	0 (0; 0)
Отсутствие окостенения в дугах позвонков крестцового отдела позвоночника, %, $M(Q25;Q75)$	17 (0; 20)	0 (0; 40)	29 (0; 60)	50 (0; 100) */**	75 (40; 100) */**	33 (0; 83)

Продолжение таблицы 3.26

1	2	3	4	5	6	7
Отсутствие окостенения в телах позвонков крестцового отдела позвоночника, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 28)	0 (0; 20)	29 (0; 60) *	66 (20; 100) */**	20 (0; 80)
Количество центров окостенения в поясничном отделе позвоночника, $M\pm m$	17,9±0,02	17,9±0,05	17,5±0,46	17,2±0,47	17,2±0,39	17,4±0,35
Количество центров окостенения в крестцовом отделе позвоночника, $M\pm m$	10,97±0,50	9,89±0,75	9,81±0,78	8,0±0,83 *	7,74±0,80 *	9,26±0,78
Количество центров окостенения в грудине, $M\pm m$	3,35±0,28	3,20±0,30	2,85±0,32	1,64±0,37 *	1,57±0,27 *	2,41±0,36
Наличие 14-го рудиментарного ребра, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 20)
Укорочение 13-го ребра, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Увеличение родничка, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 20)	0 (0; 16)	0 (0; 20)	12 (0; 70)	60 (0; 80) */**	0 (0; 33)
Слияние дуг, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 20)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Отсутствие грудных дуг, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)
Перерыв в ленте, %, $M(Q25;Q75)$	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0 (0; 0)

Примечание: * – статистически значимые отличия с интактным, ** – с негативным контролем, критерий Манна-Уитни ($p \leq 0,05$).

Самок, которые забеременели, разделили на 6 экспериментальных групп. В каждой группе было по 20 беременных самок, которых выводили из эксперимента на 20-й день гестации.

У самок всех экспериментальных групп регистрировали нормальное количество желтых тел в яичниках, что соответствовало физиологическому уровню и не отличалось у животных разных экспериментальных групп. Практически во всех группах у половины самок отсутствовали резорбированные эмбрионы, что свидетельствует о невысокой постимплантационной гибели (табл. 3.24). В группе 1-6 (30 мл/кг) у одной самки был один мертворожденный плод примерно 15 дня гестации, что не связано с введением препарата, а является спонтанной аномалией развития. В остальных группах не наблюдали мертворожденных плодов. В целом при проведении сравнительного анализа по всем показателям эмбриотоксического действия, рассчитанным как среднее значение на каждую самку, было установлено только одно различие – увеличение предимплантационной смертности в группе 1-6 (30 мл/кг) относительно группы интактного контроля, что свидетельствует о негативном влиянии препарата в первом триместре гестации (табл. 3.24).

При осмотре плодов встречались мелкие подкожные гематомы в единичных случаях. По количеству живых плодов в приплодах экспериментальные группы не отличались и отвечали физиологическому уровню (табл. 3.23). При сравнении экспериментальных групп по показателям массы тела плодов и их кранио-каудальному размеру установлено статистически значимые отличия в группе 6-16 (30 мл/кг) относительно групп интактного и негативного контролей, что свидетельствует о негативном влиянии препарата у максимальной дозе.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наличии токсического влияния препарата «Декасан» в дозе 30 мл/кг как при введении в ранние сроки беременности (с 1 по 6 день), что выражалось в повышении

предимплантационной смертности, так и при введении в период имплантации и органогенеза (6-16 день), что выражалось в уменьшении массы плодов и их кранио-каудального размера. Полученные результаты дают основания к противопоказаниям применения препарата «Декасан» в период беременности.

Исследование возможного тератогенного действия препарата «Декасан» проводили в соответствии с методическими рекомендациями [45,46]. Всего исследовали 941 плод: 449 при изучении состояния внутренних органов и 492 при изучении костной системы.

Макроскопический осмотр плодов.

У всех живых плодов 20-го дня гестации, полученных из пометов самок крыс опытных и контрольных групп, внешний осмотр не выявил пороков развития лицевого и мозгового черепа, конечностей, туловища, кожных покровов. Ушные раковины и веки глаз закрыты, хвост обычной длины, анальное отверстие открыто, есть у всех плодов. В помете самки, которой препарат «Декасан» вводили в дозе 30 мл/кг с 1-го по 6-й день беременности, обнаружен один замерший плод размером до 1 см. Кости свода черепа, затылочная кость, мягкие покровы головы у плода полностью отсутствовали, вследствие чего практически весь головной мозг открыто располагался на поверхности. В самом головном мозге достаточно хорошо различимы все отделы, в затылочной области мозг несколько «приплюснут». Лицевой череп смят, нижняя челюсть плода укорочена, язык не помещался во рту. Ушные раковины расположены очень низко, приоткрыты, глаза не видны из-за «нависшего» головного мозга. В области пупка передняя брюшная стенка открыта. Через дефект на поверхность проникают петли кишечника, доли печени. Известно, что в 1-5-й день после оплодотворения у крыс происходит дробление яйца до бластоцисты, и только на 6-й день беременности бластоциста приходит в контакт с эпителием слизистой оболочки матки [47,48]. В процессе имплантации (до 7-9 дня беременности), а также в период органо-

генеза (до 16-го дня беременности) происходит закладка и дальнейшее развитие практически всех внутренних органов зародыша [47]. Что касается окостенения скелета, то первый центр окостенения появляется у зародыша крысы на 15½ день в теле нижней челюсти [48]. Препарат «Декасан» беременной самке вводили с 1 по 6-й день беременности, т. е. в доимплантационный период, поэтому никакого воздействия на антенатальное развитие зародышей, в том числе тератогенного, он оказывать не мог.

Исследование состояния внутренних органов плодов. Состояние внутренних органов и головы плодов всех групп оценивали на серии параллельных разрезов, сделанных безопасной бритвой от руки. Исключение составил замерший плод, описание которого приведено выше.

Разрезом параллельно нижней челюсти отделяли голову от туловища плода. Первый разрез головы проводили непосредственно за усами, перпендикулярно нижней челюсти. У всех просмотренных плодов передний отдел твердого неба без признаков расщепления. Нижняя и верхняя челюсти обычны по виду. Язык свободно помещался во рту. Носовые косточки парные, носовая перегородка не искривлена, раковины носовой кости нормального вида. Носовые полости свободны. Второй разрез головы проходил через середину глазных яблок. Изменений в размере, уровне расположения, парности глазных яблок и их орбит не выявлено. Обонятельные луковицы, которые также просматривались на разрезе, овальные, крупные, расположены в лобной доле головного мозга. Третий разрез головы проводили через большой поперечный диаметр черепа, четвертый – параллельно ему, за ушами. На срезах просматривали состояние различных отделов головного мозга: коры больших полушарий, промежуточного мозга, продолговатого мозга, полушарий мозжечка, боковых желудочков мозга, третьего и четвертого желудочков мозга. У всех плодов опытных и контрольных групп все отделы мозга пропорционально развиты, изменений патологического характера не выявлено. Боковые желудочки мозга имеют вид узкой щели. Третий

желудочек на разрезе каплевидный, небольшой. Четвертый желудочек на разрезе уплощен, шатрообразной формы. Субдуральное пространство в пределах нормы. Пятый разрез (им отделяли голову от туловища) проходит по шее, на нем исследовали состояние гортани, пищевода, спинного мозга, слюнных желез, крупных кровеносных сосудов. Состояние пищевода, спинного мозга, крупных кровеносных сосудов, а также трахеи просматривали и на шестом разрезе (отделял шею от туловища). На всех этих уровнях разрезов изменений в состоянии перечисленных выше образований не выявлено. Пищевод нормально проходим, кольца трахеи хорошо развиты. Гортань, слюнные железы обычны, проницаемость сосудистых стенок в норме (отсутствие кровоизлияний), диаметр сосудов у плодов опытных и контрольных групп визуально примерно одинаков. Спинной мозг без признаков грыжевидных выпячиваний, подпаутинное пространство обычно. Седьмой разрез проводили сразу за передними конечностями и просматривали на нем сердце, легкие, пищевод, спинной мозг. Как топографически, так и анатомически эти органы были без отклонений. В сердце отчетливо видна межжелудочковая перегородка (без дефектов), оба желудочка и предсердия. У некоторых плодов разных групп в желудочках и правом предсердии содержится кровь. Левое легкое однодольное, в правом хорошо различимы 4 доли. Ткань легкого имеет хорошо выраженную ячеистую структуру, четко определяются поперечные разрезы бронхов. Пищевод и спинной мозг и на данной глубине без видимых отклонений. У некоторых плодов из помета самки, получавшей препарат «Декасан» в дозе 30 мл/кг с 6 по 16-й день беременности на этом уровне разреза туловища выявлен небольшой отек подкожной клетчатки. На восьмом разрезе, который проводили между седьмым разрезом и пупочным кольцом, просматривали состояние печени и диафрагмальной перегородки. У всех просмотренных плодов опытных и контрольных групп печень обычного вида, консистенции, все доли ее четко просматривались. Диафрагмальная перегородка у всех просмотренных плодов без

изъяна. Девятый разрез проводили параллельно предыдущим ниже пупочного кольца. На разрезе просматривали печень, петли кишечника, поджелудочную железу, селезенку, желудок. Они обычной топографии. Желудок большой, на разрезе нежноскладчатый. Поджелудочная железа и селезенка обычны по размеру и состоянию. Петли кишечника плотно упакованы, без признаков грыжи, дивертикулов. Удалив просмотренные органы, осматривали мочеполовую систему. Почки парные, немного ассиметрично расположены. На разрезе почечная лоханка без особенностей. Надпочечники парные, расположены кзади от почек, бобовидной формы. Мочеточники прямые по всей длине. Мочевой пузырь у всех просмотренных плодов нормального размера. Внутренние половые органы самцов (яички с придатками, предстательная железа, пузырьковая железа) и самок (двурогая матка, яичники) соответствовали норме. Прямая кишка, анальное отверстие обычного вида.

Показатели состояния внутренних органов плодов представлены в таблице 3.25.

Исследование скелета плодов. Как показал осмотр, процесс окостенения у всех опытных и контрольных плодов просматривался практически во всех протестированных костях черепа и туловища. У подавляющего большинства плодов разных групп динамика роста ядер окостенения в закладках одноименных костей правой и левой сторон тела происходит синхронно и симметрично.

В черепе нижняя челюсть, пластинки небной кости (различаются не сросшиеся левая и правая половины горизонтальной пластины), верхнечелюстная, носовая кости, скуловая дуга, височные косточки нормально развиты и интенсивно окрашены у всех плодов. У большинства плодов лобная, теменная, межтеменная (обызвествленные участки не примыкают к заднему краю теменной кости), затылочная (представлена правой и левой половиной только верхней части кости, имеющей форму трапеции, располагаю-

щейся каудально межтеменной кости), подъязычная (обызвествлена только небольшая центральная часть) кости также хорошо развиты, костный материал ярко окрашен. В то же время, у части плодов разных групп, включая контрольные, центры окостенения отсутствуют, или отмечены признаки задержки окостенения (снижение окраски костного материала, уменьшение костной массы) в подъязычной, затылочной, теменной, межтеменной и (реже) лобной костях. Следствием этой задержки явилось увеличение размеров теменного родничка у некоторой части плодов. Статистически значимые отличия в увеличении размеров теменного родничка установлены в группе, которой вводили препарат в дозе 30 мл/кг с 6 по 16 день беременности относительно групп интактного и негативного контроля.

В позвоночнике процесс окостенения четко прослеживается в шейном (дуги позвонков), грудном, поясничном и крестцовом отделах (дуги и тела позвонков). У достаточно большого числа плодов и контрольных, и опытных групп выявлена задержка окостенения в дугах и телах позвонков крестцового отдела позвоночника, а у небольшой части – и в дугах позвонков грудного, и в дугах и телах позвонков поясничного отделов позвоночного столба. Статистически значимые установлены отличия в задержке окостенения в дугах и телах позвонков крестцового отдела позвоночника в группах, которым вводили препарат в дозах 3 и 30 мл/кг с 6 по 16 день беременности относительно групп интактного и негативного контролей. Также в этих группах регистрировали уменьшение количества центров окостенения в крестцовом и грудном отделах позвоночника относительно группы интактного контроля.

В тазовом поясе центры окостенения видны в трех отдельных костях: подвздошной, седалищной и лонной. Они вполне достаточны по размеру и степени окрашивания костной массы. Но у определенной части плодов разных групп процесс окостенения в седалищной и лонной костях не выражен или задерживается. Установлены статистически значимые отличия в отсут-

ствии окостенения в седалищной кости в группе, которой вводили препарат в дозе 30 мл/кг с 6 по 16 день беременности относительно группы негативного контроля.

Скелет верхних и нижних конечностей, плечевого пояса у всех просмотренных плодов был без видимых изменений. Пространственная ориентация, степень окрашивания, длина всех трубчатых костей соответствовали норме. У большинства плодов разных групп в пясти и плюсне насчитывали по 4 косточки. У некоторых плодов количество ядер окостенения в этих косточках уменьшено. Уменьшение количества ядер окостенения в пясти в группе, которой вводили препарат в дозах 3 и 30 мл/кг с 6 по 16 день беременности относительно группах интактного и негативного контролей.

В сегментах грудины количество ядер окостенения варьировало у плодов разных групп в нормальных пределах (3-5), но у части плодов ядра окостенения или отсутствовали, или число их было снижено.

Окостенение тел реберных лент хорошо выражено, но концы ребер не окостеневшие. Количество реберных пар у преобладающего большинства плодов составляло 13, но в ряде случаев, как у контрольных животных, так и в опытных группах выявляли дополнительную 14 пару ребер или закладку ее в виде точки или небольшой линии с одной или по обе стороны позвоночника. Выявлены отдельные плоды с искривлением реберных лент, «перерывами» в костном материале, укорочением 13-й пары ребер.

Показатели состояния скелета плодов разных групп приведены в таблице 3.26. Анализ представленных в таблицах 3.25 и 3.26 данных свидетельствует о следующем:

– при исследовании состояния внутренних органов плодов 20-го дня гестации, полученных из пометов самок, которым вводили препарат «Декасан» с 1-6, 6-16, 16-19 день беременности в дозе 30 мл/кг и с 6-16 день беременности в дозе 3 мл/кг, не выявлены никакие изменения, свидетельствующие о наличие каких-либо отклонений в их развитии. Отмеченные неспеци-

фические нарушения в виде умеренного отека подкожной клетчатки выявлены лишь в единичных случаях в одном помете, не носят повторяющегося и дозозависимого характера и потому могут быть отнесены к так называемым спонтанным изменениям. Что касается единичного случая уродства, выявленного в помете крысы, которой препарат «Декасан» вводили с 1 по 6 день беременности, то известно, что в 1-5 день после оплодотворения у крыс происходит дробление яйца до бластоцисты, и только на 6 день беременности бластоцист приходит в контакт с эпителием слизистой оболочки матки [49]. В процессе имплантации (до 7-9 дня беременности), а также в период органогенеза (10-16 дня беременности) происходит закладка и дальнейшее развитие практически всех внутренних органов зародыша [47]. Что касается окостенения скелета, то первый центр окостенения появляется у зародыша крысы на 15½ день в теле нижней челюсти [48]. Поскольку препарат «Декасан» беременной самке вводили с 1 по 6 день беременности, т. е. в доимплантационный период, то никакого воздействия на антенатальное развитие зародышей, в том числе тератогенного, он оказывать не мог. Обнаруженный плод с аномалиями развития относится к спонтанному проявлению тератогенеза.

– при исследовании скелета плодов 20-го дня гестации выявлено замедление темпов окостенения в костях пясти, дугах и телах позвонков крестцового отдела позвоночника, седалищной кости, уменьшение количества центров окостенения в крестцовом и грудном отделах позвоночника и увеличение теменного родничка у плодов из приплодов самок, которым вводили препарат в дозах 3 и 30 мл/кг с 6 по 16 день беременности.

3.7. Изучение влияния Декасана на репродуктивную функцию

3.7.1. Изучение влияния Декасана на репродуктивную функцию самцов

Изучение влияния на репродуктивную функцию самцов препарата «Декасан», производства ООО «Юрия-Фарм» в виде 0,02% раствора декаметоксина проводили в соответствии с методическими рекомендациями [49]. Целью исследования было установление влияния препарата на стадии прогенеза: формирования мужских и женских гамет, нарушении полового поведения и транспорта продуктов зачатия. Исследование проведено на 60 беспородных самцах крыс и 120 самках. В начале эксперимента масса животных составляла 220 ± 20 г. Дизайн исследования представлен в таблице 3.27.

Таблица 3.27

Дизайн исследования влияния препарата «Декасан» на репродуктивную функцию крыс-самцов, распределение живых по группам и дозы

Экспериментальные группы	Пол животных	Доза, мл/кг	Доза действующего вещества, мг/кг	Количество животных в группе
Интактный контроль (группа №1)	самцы	-	-	15
Негативный контроль (группа №2)	самцы	-	-	15
Декасан (группа №3)	самцы	3	0,6	15
Декасан (группа №4)	самцы	30	6	15
Интактные самки для спаривания с самцами группы №1	самки	-	-	30
Интактные самки для спаривания с самцами группы №2	самки	-	-	30
Интактные самки для спаривания с самцами группы №3	самки	-	-	30
Интактные самки для спаривания с самцами группы №4	самки	-	-	30

Изучаемый препарат «Декасан» вводили внутривентрикулярно один раз в сутки в условно-терапевтической дозе 3 мл/кг и в дозе, которая соответствует 10-кратной (максимальной дозе) – 30 мл/кг в течение всего периода сперматогенеза с учетом периода созревания сперматозоидов в эпидидимисе – 60 дней. Затем животных спаривали с интактными самками. Самок подсаживали к самцам в соотношении 2:1 сроком на 2 эстральных цикла. Оплодотворение регистрировали с помощью вагинальных мазков. Половину отсаженных самок подвергали эвтаназии на 20-й день беременности и проводили вскрытие. Другую половину самок оставляли до родов и наблюдали за физическим развитием потомства до окончания периода вскармливания.

Оценку влияния на генеративную функцию проводили по показателям оплодотворительной способности [49]. Рассчитывали индекс плодовитости и индекс фертильности в соответствии в формулами (1) та (2):

$$\text{индекс плодовитости} = \frac{\text{количество оплодотворенных самок}}{\text{количество подсаженных к самцам самок}} * 100\% \quad (1)$$

$$\text{индекс фертильности} = \frac{\text{количество беременных самок}}{\text{количество оплодотворенных самок}} * 100\% \quad (2)$$

При проведении вскрытия беременных самок на 20 день гестации регистрировали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации и резорбции в матке, живых и мертвых плодов. Проводили макроскопический осмотр плодов на наличие аномалий развития, подкожных гематом, измеряли кранио-каудальный размер плодов (ККР), взвешивали плоды и плаценту. На основании этих данных определяли уровень предимплантационной смертности (ПрИС), постимплантационной смертности (ПИС) и общей эмбриональной смертности (ОЭС) зародышей, которые рассчитываются в соответствии с формулами (3, 4, 5).

$$\text{ПрИС} = \frac{\text{ЖТ} - \text{МИ}}{\text{ЖТ}} * 100\% \quad (3)$$

$$\text{ПИС} = \frac{\text{МР}}{\text{МИ}} * 100\% \quad (4)$$

$$OЭС = \frac{ЖТ - ЖП}{ЖТ} * 100\% \quad (5)$$

где: ЖП – количество живых плодов,

МИ – количество мест имплантации,

МР – количество мертвых и резорбированных эмбрионов,

ЖТ – количество желтых тел в яичниках.

Наблюдение за постнатальным развитием потомства второй половины самок проводили с первого дня после рождения и в течение первого месяца жизни. Изучение постнатального развития потомства включало выживаемость крысят, еженедельную регистрацию динамики массы тела, сроки отлипания ушных раковин, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, открытие глаз, опускание семенников у самцов и открытие влагалищной щели у самок.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica, 6,0». Для межгруппового сравнения непараметрических данных использовали аналог дисперсионного анализа для – метод Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни, для параметрических данных оценку достоверности различий между выборками проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA или ANOVA RM и критерия Ньюмана-Кейлса [21-23]. Результаты представлены в таблицах 3.28-3-32.

Таблица 3.28

Показатели оплодотворяющей способности у самцов, получавших препарат «Декасан», при спаривании с интактными самками

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Индекс плодовитости, %	93	86	93	96
Индекс фертильности, %	85	79	85	92

Таблица 3.29

Показатели, регистрируемые при вскрытии беременных самок на 20-й день гестации, оплодотворенных самцами, которым вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Количество беременных самок	12	11	13	13
Количество желтых тел, $Me (LQ;UQ)$	12,5 (10,0; 13,0)	13,0 (12,0; 13,0)	12,0 (11,0; 13,0)	11,0 (10,0; 13,0)
Количество мест имплантации, $Me(LQ;UQ)$	10,5 (9,5; 11,5)	12,0 (10,0; 13,0)	10,0 (9,0; 12,0)	10,0 (10,0; 11,0)
Количество мест резорбции, $Me (LQ;UQ)$	1,0 (0,0; 1,0)	1,0 (0; 2,0)	1,0 (0; 1,0)	1,0 (0; 1,0)
Количество живых плодов, $Me (LQ;UQ)$	9,5 (9,0; 11,0)	11,0 (9,0; 12,0)	10,0 (9,0; 11,0)	9,0 (9,0; 11,0)
Количество мертвых плодов, $Me (LQ;UQ)$	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Кранио-каудальный размер, мм, $M\pm m$	29,9±0,8	28,7±0,4	29,6±0,9	28,3±0,7
Масса плодов, г, $M\pm m$	2,25±0,12	2,23±0,10	2,35±0,15	2,14±0,11
Масса плаценты, г, $M\pm m$	0,54±0,02	0,54±0,03	0,55±0,02	0,59±0,02
Плодово-плацентарный индекс, $M\pm m$	0,244±0,009	0,241±0,008	0,245±0,017	0,283±0,016

Таблица 3.30

**Показатели эмбриолетального действия при введении препарата
«Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг**

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Предимплантационная смертность, %, Me (LQ;UQ)	3,8 (0,0; 12,7)	0,0 (0,0; 9,1)	8,3 (0,0; 11,1)	0,0 (0,0; 10,0)
Постимплантационная смертность, %, Me (LQ;UQ)	9,2 (0,0; 11,1)	10,0 (8,3; 15,4)	8,3 (0,0; 12,5)	7,1 (0,0; 11,1)
Общая эмбриональная смертность, % Me (LQ;UQ)	10,6 (9,2; 16,0)	14,3 (8,3; 23,1)	16,7 (8,3; 30,8)	10,0 (9,1; 18,2)

Таблица 3.31

**Размер приплодов и половая принадлежность потомства самок,
оплодотворенных самцами, которым вводили препарат «Декасан»
в дозах 3 и 30 мл/кг, Me (LQ;UQ)**

Показатели Экспериментальная группа	n	Количество новорожденных в приплодах	Распределение по полу	
			самцы	самки
Интактный контроль	10	8,0 (8,0; 9,0)	4,5 (4,0; 5,0)	4,0 (4,0; 6,0)
Негативный контроль	8	10,0 (8,5; 11,0)	5,0 (4,0; 5,5)	5,5 (3,5; 6,5)
Декасан, 3 мл/кг	10	9,0 (8,0; 10,0)	5,0 (4,0; 5,0)	5,0 (3,0; 6,0)
Декасан, 30 мл/кг	10	9,0 (8,0; 10,0)	4,0 (4,0; 5,0)	4,5 (3,0; 5,0)

Таблица 3.32

Динамика массы тела потомства самок, оплодотворенных самцами, которым вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг, $M \pm m$

Срок наблюдения	Интактный контроль		Негативный контроль		Декасан, 3 мл/кг		Декасан, 30 мл/кг	
	п	масса тела, г	п	масса тела, г	п	масса тела, г	п	масса тела, г
1 день	89	6,01±0,10	81	6,31±0,14	72	6,21±0,07	82	6,04 ±0,09
7 день	89	13,7±0,4*	67	14,4±0,4*	72	14,4±0,4 *	82	13,0±0,4 *
14 день	88	23,1±0,7*	67	23,0±0,7*	70	24,8±0,7 *	82	24,4±0,7 *
21 день	88	37,0±1,0*	67	34,5±1,0*	70	39,8±1,0 *	82	37,0±1,2 *
28 день	88	56,5±1,5*	67	55,3±1,5*	70	59,4±1,6 *	82	59,6±0,6 *

Примечание: * - статистически значимые изменения относительно исходных данных, $p \leq 0,05$ (метод ANOVA RM)

Интегральным показателем при исследовании влияния на репродуктивную функцию является изучение способности к зачатию. После внутрижелудочного введения препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг самцам кпыс в течение 60 дней проводили спаривание самцов с интактными самками. Результаты расчета индексов плодовитости и индекса фертильности, приведенные в таблице 3.28, показывают отсутствие межгрупповых отличий оплодотворяющей способности и свидетельствуют об отсутствии влияния препарата на генеративную функцию у самцов крыс.

Результаты изучения влияния препарата на антенатальное развитие плода. Самок, которые забеременели в результате оплодотворения самцами, получавшими препарат, разделили на две части. Самки первой части были выведены из эксперимента на 20-й день гестации с целью изучения показателей эмбриолетальности.

У самок всех экспериментальных групп регистрировали нормальное количество желтых тел в яичниках, что соответствовало физиологическому уровню. При проведении сравнительного анализа по показателям эмбриолетальности, рассчитанным как среднее значение на каждую самку, не было установлено никаких межгрупповых различий. По количеству плодов в приплодах, их кранио-каудальным размерам и массе тела экспериментальные группы не различались (табл.3.29).

При расчете уровней пред- и постимплантационной смертности, общей эмбриональной смертности использовали индивидуальные данные по каждой самке, после чего полученные ряды подвергались статистической обработке, определению медианы, нижнего и верхнего квартилей. Показатели пред-, пост- и общей эмбриональной смертности, приведенные в таблице 3.30, свидетельствуют, что введение исследуемого препарата не оказывало негативного влияния на рассматриваемые показатели относительно интактного и негативного контролей.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии эмбриолетального действия при применении препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг самцам крыс в половозрелом возрасте в течение 60 дней.

В данном разделе приведены результаты наблюдения за самками крыс, которые забеременели в результате оплодотворения самцами, получавшими Декасан, и были оставлены до родов. При наблюдении за беременными самками ни в одной из экспериментальных групп не было обнаружено нарушений поведения во время беременности и родов. Продолжительность беременности во всех группах была в пределах 22-24 дня, что соответствует физиологической норме. Самок, которые не смогли родить или умерли при родах, не было ни в одной из экспериментальных групп.

Каждая самка во время родов и в последующий период вскармливания потомства находилась в индивидуальной клетке. За крысятами наблюдали

ежедневно, регистрируя их выживаемость. Случаев каннибализма и отказа от потомства практически не наблюдалось.

Размеры приплодов и половая принадлежность крысят не отличалась от контрольных групп и соответствовала физиологической норме (табл.3.31).

Количество крысят в экспериментальных группах за весь период наблюдения уменьшилась только в группе негативного контроля, что было связано с гибелью всего приплода у одной самки на 5-6 день после рождения. У двух самок группы самок, которым вводили препарат в дозе 3 мл/кг, были рождены мертвые крысята.

Одним из наиболее показательных параметров физиологического развития является скорость прироста массы тела у крысят. При первом взвешивании и осмотре новорожденных не было установлено отклонений ни в одной из экспериментальных групп. У самок всех групп приплоды были практически одинаковые, что обеспечивало равномерность полученных результатов по приросту массы тела крысят, которые регистрировали еженедельно (табл.3.32).

При изучении физиологического развития крысят выделяли основные этапы: отлипание ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, прорезывание зубов, открытие глаз, опускание семенников у самцов и открытие вагинальной щели у самок.

Во всех экспериментальных группах у крысят наблюдали отлипание ушных раковин на 3-4 сутки, прорезывание резцов, появление волосяного покрова на 6-7 сутки, открытие глаз на 15-16 сутки, опускание семенников у самцов на 25-28 сутки, открытие вагинальной щели на 40-50 сутки, что соответствует физиологической норме.

Таким образом, стабильная динамика набора массы тела на фоне практически неизменного количества крысят в приплодах и своевременное фи-

зиологическое развитие крысят свидетельствует об отсутствии негативного влияния препарата «Декасан» на репродуктивную функцию самцов.

Изучение влияния на репродуктивную функцию самцов показало, что введение препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг в течение 60 дней здоровым половозрелым животным не приводило к нарушению генеративной функции, не вызывало отклонений в развитии плодов в конце антенатального периода, не оказывало негативного влияния на физиологическое развитие крысят в постнатальном периоде.

Таким образом, результаты изучения влияния препарата «Декасан» на репродуктивную функцию самцов показали отсутствие негативного действия.

3.7.2. Изучение репродуктивной токсичности Декасана у крыс самок

Изучение влияния на репродуктивную функцию самок препарата «Декасан», производства ООО «Юрия-Фарм» в виде 0,02% раствора декаметоксина проводили в соответствии с методическими рекомендациями [49]. Целью исследования было установление влияния препарата на стадии прогестоза: формирования мужских и женских гамет, нарушении полового поведения и транспорта продуктов зачатия. Исследование проведено на 120 беспородных самках крыс и 40 самцах. В начале эксперимента масса животных составляла 220 ± 20 г. Дизайн исследования представлен в таблице 3.33.

Таблица 3.33

Дизайн исследования влияния препарата «Декасан» на репродуктивную функцию самок крыс, распределение животных по группам и дозы

Экспериментальные группы	Пол животных	Доза, мл/кг	Доза действующего вещества, мг/кг	Количество животных в группе
Интактный контроль	самки	-	-	30
Негативный контроль	самки	-	-	30
Декасан	самки	3	0,6	30
Декасан	самки	30	6	30
Интактные самцы для спаривания с самками	самцы	-	-	40

Изучаемый препарат 0,02% раствор «Декасан» вводили внутривентрикулярно один раз в сутки в условнотерапевтической дозе 3 мл/кг и в дозе, которая соответствует 10-кратной (максимальной дозе) – 30 мл/кг в течение 3 эстральных циклов – 15 дней. Затем животных спаривали с интактными самцами. Самок подсаживали к самцам в соотношении 2:1, сроком на 2 эстральных цикла. Оплодотворение регистрировали с помощью вагинальных мазков. Половину отсаженных самок подвергали эвтаназии на 20-й день беременности и проводили вскрытие. Другую половину самок оставляли до родов и наблюдали за физическим развитием потомства до окончания периода вскармливания.

Оценку влияния на генеративную функцию проводили по показателям оплодотворительной способности [49]. Рассчитывали индекс плодовитости и индекс беременности в соответствии в формулами (1) та (2):

$$\text{индекс плодовитости} = \frac{\text{количество оплодотворенных самок}}{\text{количество подсаженных к самцам самок}} * 100\% \quad (1),$$

$$\text{индекс беременности} = \frac{\text{количество беременных самок}}{\text{количество оплодотворенных самок}} * 100\% \quad (2).$$

При проведении вскрытия беременных самок на 20-й день гестации регистрировали количество желтых тел в яичниках, мест имплантации и резорбции в матке, живых и мертвых плодов. Проводили макроскопический осмотр плодов на наличие аномалий развития, подкожных гематом, измеряли кранио-каудальный размер плодов (ККР), взвешивали плоды и плаценту. На основании этих данных определяли уровень предимплантационной смертности (ПрИС), постимплантационной смертности (ПИС) и общей эмбриональной смертности (ОЭС) зародышей, которые рассчитываются в соответствии с формулами (3, 4, 5).

$$\text{ПрИС} = \frac{\text{ЖТ} - \text{МИ}}{\text{ЖТ}} * 100\% \quad (3),$$

$$\text{ПИС} = \frac{\text{МР}}{\text{МИ}} * 100\% \quad (4),$$

$$\text{ОЭС} = \frac{\text{ЖТ} - \text{ЖП}}{\text{ЖТ}} * 100\% \quad (5)$$

где: ЖП – количество живых плодов,

МИ – количество мест имплантации,

МР – количество мертвых и резорбированных эмбрионов,

ЖТ – количество желтых тел в яичниках.

Наблюдение за постнатальным развитием потомства второй половины самок проводили с первого дня после рождения и в течение первого месяца

жизни. Изучение постнатального развития потомства включало выживаемость крысят, еженедельную регистрацию динамики массы тела, сроки отлипания ушных раковин, появления первичного волосяного покрова, прорезывания резцов, открытие глаз, опускание семенников у самцов и открытие влагалищной щели у самок.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica, 6,0». Для межгруппового сравнения непараметрических данных использовали аналог дисперсионного анализа для – метод Краскела-Уоллиса и критерий Манна-Уитни, для параметрических данных оценку достоверности различий между выборками проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA или ANOVA RM и критерия Ньюмана-Кейлса [21-23]. Результаты представлены в таблицах 3.34-3.38.

Таблица 3.34

Показатели оплодотворяющей способности у самок, получавших препарат «Декасан», при спаривании с интактными самцами

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Индекс плодовитости, %	97	93	93	93
Индекс беременности, %	83	68	71	82

Таблица 3.35

**Показатели, регистрируемые при вскрытии беременных самок
на 20-й день гестации, которым, вводили препарат «Декасан»
в дозах 3 и 30 мл/кг**

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Количество беременных самок	12	8	10	12
Количество желтых тел, <i>Me (LQ;UQ)</i>	10,5 (9,0; 13,0)	12,0 (10,5; 13,5)	12,0 (10,0; 15,0)	11,0 (10,0; 12,5)
Количество мест имплантации, <i>Me (LQ;UQ)</i>	10,0 (8,0; 11,5)	11,5 (10,0; 13,0)	10,5 (10,0; 12,0)	10,0 (8,0; 11,5)
Количество мест резорбции, <i>Me (LQ;UQ)</i>	1,0 (0,5; 2,0)	1,0 (0; 2,0)	1,0 (0; 3,0)	0,5 (0; 1,0)
Количество живых плодов, <i>Me (LQ;UQ)</i>	8,0 (7,0; 10,5)	10,5 (8,5; 11,5)	9,0 (8,0; 12,0)	10,0 (6,0; 11,0)
Количество мертвых плодов, <i>Me (LQ;UQ)</i>	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)	0,0 (0,0; 0,0)
Кранио-каудальный размер, мм, <i>M±m</i>	30,9±0,4	30,2±1,0	29,4±0,5	30,3±0,3
Масса плодов, г, <i>M±m</i>	2,49±0,08	2,33±0,13	2,25±0,08	2,41±0,06
Масса плаценты, г, <i>M±m</i>	0,60±0,02	0,54±0,03	0,55±0,02	0,60±0,03
Плодово-плацентарный индекс, <i>M±m</i>	0,243±0,008	0,234±0,012	0,249±0,012	0,250±0,011

Таблица 3.36

Показатели эмбриолетального действия самок, которым вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг

Показатели	Интактный контроль	Негативный контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Предимплантационная смертность, %, Me (LQ;UQ)	4,6 (0,0; 11,1)	7,6 (0,0; 9,2)	3,3 (0,0; 23,53)	3,9 (0,0; 31,7)
Постимплантационная смертность, %, Me (LQ;UQ)	12,5 (3,6; 23,2)	9,4 (0,0; 16,8)	10,0 (0,0; 27,3)	4,2 (0,0; 9,7)
Общая эмбриональная смертность, % Me (LQ;UQ)	20,7 (9,6; 33,3)	16,8 (11,3; 24,3)	15,0 (7,7; 36,4)	13,3 (0,0;40,0)

Таблица 3.37

Размер приплодов и половая принадлежность потомства самок, которым вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг, Me (LQ;UQ)

Показатели Экспериментальная группа	n	Количество новорожденных в приплодах	Распределение по полу	
			самцы	самки
Интактный контроль	12	8,0(6,5; 8,0)	3,0(2,0; 5,0)	3,5(3,0; 5,0)
Негативный контроль	9	8,0(7,0; 9,0)	3,0(2,0; 5,0)	4,0(3,0; 7,0)
Декасан, 3 мл/кг	10	9,0(8,0; 10,0)	4,0(3,0; 6,0)	5,0(4,0; 5,0)
Декасан, 30 мл/кг	11	9,0(7,0; 9,0)	5,0(3,0; 5,0)	4,0(3,0; 5,0)

Таблица 3.38

Динамика массы тела потомства самок, оплодотворенных самцами, которым вводили препарат «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг, $M \pm m$

Срок наблюдения	Интактный контроль		Негативный контроль		Декасан, в дозе 3 мл/кг		Декасан, в дозе 30 мл/кг	
	п	масса тела, г	п	масса тела, г	п	масса тела, г	п	масса тела, г
1 день	90	5,91±0,08	76	6,04±0,10	86	5,86±0,10	88	6,10 ±0,08
7 день	87	13,4±0,3*	68	13,9±0,3*	84	14,0±0,3*	76	14,5±0,8 *
14 день	86	24,1±0,5*	63	24,8±0,7*	83	24,8±0,5*	75	24,5±0,6 *
21 день	85	38,4±1,0*	63	39,9±1,1*	83	36,1±0,7*	75	37,2±0,9 *
28 день	85	57,2±1,4*	63	54,4±1,3*	80	53,8±1,4*	75	54,1±1,2*

Примечание: * - изменения статистически значимые относительно исходных данных, $p \leq 0,05$ (метод ANOVA RM)

Интегральным показателем при исследовании влияния на репродуктивную функцию является изучение способности к зачатию. После внутрижелудочного введения препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг самкам крыс в течение 15 дней проводили спаривание самок с интактными самцами. Результаты расчета индекса плодовитости и индекса беременности, приведенные в таблице 3.34, показывают отсутствие межгрупповых различий оплодотворяющей способности и свидетельствуют об отсутствии влияния препарата на генеративную функцию у самок крыс.

Результаты изучения влияния препарата на антенатальное развитие плода.

Самок, которые забеременели в результате оплодотворения интактными самцами, разделили на две части.

Самки первой части были выведены из эксперимента на 20-й день гестации с целью изучения показателей эмбриолетальности. У самок всех экспериментальных групп регистрировали нормальное количество желтых тел в яичниках, что соответствовало физиологическому уровню. При проведении сравнительного анализа по показателям эмбриолетальности, рассчитанным как среднее значение на каждую самку, не было установлено межгрупповых различий. По количеству плодов в приплодах, их кранио-каудальным размерам и массе тела экспериментальные группы не отличались (табл.3.35).

При расчете уровней пред- и постимплантационной смертности, общей эмбриональной смертности использовали индивидуальные данные по каждой самке, после чего полученные ряды подвергались статистической обработке, определению медианы, нижнего и верхнего квартилей. Показатели пред-, пост- и общей эмбриональной смертности, приведенные в таблице 3.36, свидетельствуют, что введение исследуемого препарата не оказывало негативного влияния на данные показатели относительно интактного и негативного контролей.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют об отсутствии эмбриолетального действия при применении препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг самкам крыс в половозрелом возрасте в течение 15 дней.

В данном разделе приведены результаты наблюдения за самками крыс, которые забеременели в результате оплодотворения интактными самцами, и были оставлены до родов. При наблюдении за беременными самками ни в одной из экспериментальных групп не было обнаружено нарушений поведения во время беременности и родов. Продолжительность беременности во всех группах была в пределах 22-24 дня, что соответствует физиологической

норме. Самок, которые не смогли родить или умерли при родах, не было ни в одной из экспериментальных групп.

Каждая самка во время родов и в последующий период вскармливания потомства находилась в индивидуальной клетке. За крысятами наблюдали ежедневно, регистрируя их выживаемость. Случаев каннибализма и отказа от потомства не наблюдалось.

Размеры приплодов и половая принадлежность крысят не отличалась от таковых в контрольных группах и соответствовала физиологической норме (табл.3.37). Количество крысят в экспериментальных группах за весь период наблюдения уменьшилось в группе интактного контроля на 5%, в группе негативного контроля – на 17%, в группе животных, получавших Декасан в дозе 3 мл/кг – на 7%, в группе животных, получавших Декасан в дозе 30 мл/кг – на 15%. В группах интактного и негативного контроля и в группе животных, получавших Декасан в дозе 3 мл/кг, уменьшение количества крысят происходило за счет гибели слабых крысят по 1-2 в разных нескольких приплодах. В группе животных, получавших Декасан в дозе 30 мл/кг, уменьшение количества крысят произошло за счет гибели всего приплода у одной самки на 8-9 день, при этом у крысят наблюдали истощение, что свидетельствует о недостаточном количестве молока для вскармливания, и гибели всего приплода еще у одной самки этой группы в первый день после рождения.

Одним из наиболее показательных параметров физиологического развития является скорость прироста массы тела у крысят. При первом взвешивании и осмотре новорожденных не было установлено отклонений ни в одной из экспериментальных групп. У самок всех групп приплоды были практически одинаковые, что обеспечивало равномерность полученных результатов по приросту массы тела крысят, которые регистрировали еженедельно (табл.3.38).

При изучении физиологического развития крысят выделяли основные этапы: отлипание ушных раковин, появление первичного волосяного покрова, прорезывание зубов, открытие глаз, опускание семенников у самцов и открытие вагинальной щели у самок.

Во всех экспериментальных группах у крысят наблюдали отлипание ушных раковин на 3-4 сутки, прорезывание резцов, появление волосяного покрова на 6-7 сутки, открытие глаз на 15-16 сутки, опускание семенников у самцов на 25-28 сутки, открытие вагинальной щели на 40-50 сутки, что соответствует физиологической норме.

Таким образом, стабильная динамика набора массы тела на фоне практически неизменного количества крысят в приплодах и своевременное физиологическое развитие крысят свидетельствует об отсутствии негативного влияния препарата «Декасан» на репродуктивную функцию самок.

Изучение влияния на репродуктивную функцию самок показало, что введение препарата «Декасан» в дозах 3 и 30 мл/кг в течение 15 дней здоровым половозрелым животным не приводило к нарушению генеративной функции, не вызывало отклонений в развитии плодов в конце антенатального периода, не оказывало негативного влияния на физиологическое развитие крысят в постнатальном периоде.

Таким образом, результаты изучения влияния препарата «Декасан» на репродуктивную функцию самок показали отсутствие негативного действия.

3.8. Изучение местнораздражающего действия Декасана

3.8.1. Изучение местнораздражающего действия Декасана на кроликах

В эксперименте использовали 3 кроликов массой $3 \pm 0,5$ кг. Препарат «Декасан», 0,02 % раствор декаметоксина, в объеме 0,01 мл вводили в конъюнктивальный мешок правого глаза кролика [49, 50]. Левый глаз служил контролем, в него в аналогичном объеме вводили растворитель – дистиллированную воду.

В целях регистрации каких-либо проявлений дискомфорта, которые могут появиться в результате действия препарата, наблюдали за состоянием глаз (вокруг глаз, включая веки, бульбарную конъюнктиву, глазную перегородку, роговую и радужную оболочки) каждого животного через 15 минут и через 1, 24, 48 и 72 часа. Обнаруженные реакции регистрировали в баллах в соответствии со шкалой (табл. 3.39).

Таблица 3.39

Классификация тяжести поражения глаз при исследовании местнораздражающего действия препарата «Декасан» на кроликах, баллы

Реакция	Баллы
1. Роговая оболочка	
А. Помутнение: степень плотности	
1. Отдельные или диффузные участки, детали радужной оболочки четко видны.	1
2. Едва заметные полупрозрачные участки, детали радужной оболочки четко видны.	2
3. Наличие участков перламутровости, детали радужной оболочки не просматриваются, размер зрачка едва различается	3
4. Помутнение роговой оболочки, радужки не просматриваются	4

вследствие помутнения	
<i>Б. Площадь повреждения роговой оболочки</i>	
1. четвертая часть или меньше, но не ноль	1
2. больше четверти, но меньше половины	2
3. больше половины, но меньше всей площади	3
4. более $\frac{3}{4}$ всей площади.	4
Количество баллов для каждого из 5 наблюдений для каждого животного составляет А×Б	
<i>II Радужная оболочка</i>	
А. Оценка	
1. Четкие глубокие рубцы, скопления, выпячивания, умеренная гиперемия вокруг роговой оболочки или кровоизлияния (любое нарушение или любая комбинация), радужная оболочка реагирует на свет (замедленная реакция остается положительной)	1
2. Отсутствует реакция на свет, геморрагии, тяжелые повреждения (некоторые или все указанные нарушения)	2
Количество баллов для каждого из 5 наблюдений одного животного равен: А×Б	
<i>III Слизистая оболочка глаза</i>	
А. Покраснение (касается век, бульбарной конъюнктивы, роговой и радужной оболочек)	
1. Для некоторых кровеносных сосудов наблюдается гиперемия (кровоизлияния)	1
2. Диффузная кровавая окраска, отдельные сосуды невыразительные	2
3. Диффузное сильное покраснение	3
Б. Хемоз (веки или мигательные перепонки)	
1. Незначительный отек, который превышает норму (включает мигательные перепонки)	1

2. Заметен отек с частичным выворачиванием век	2
3. Отек век с закрытием глаза наполовину	3
4. Отек век с закрытием глаза более чем наполовину	4
В. Выделение	
1. Определенное количество, выше нормы (за исключением небольшого количества во внутреннем углу глазной щели)	1
2. Утечка с увлажнением век и шерсти, размещенной в непосредственной близости к векам	2
3. Утечка с увлажнением век и значительных участков вокруг глаза	3
Количество баллов для каждого из 5 наблюдений для одного животного составляет А + Б + В	

Результаты исследований представлены в таблице 3.40.

Сразу же после нанесения препарата на конъюнктиву глаза у всех животных наблюдали временный дискомфорт (беспокойное состояние, движение головой), который длился 10-15 минут, что свидетельствует о местной реакции на введение препарата. Через 15 минут у 1 кролика из 3 была обнаружена слабая реакция – едва заметное покраснение в области слезного протока. Наблюдение через 1 час не выявило ни у одного из подопытных животных какой-либо негативной реакции – состояние слизистой оболочки опытных и контрольных глаз был одинаково нормальным, без видимых изменений, что указывает на отсутствие раздражающего действия.

Таким образом, полученные данные позволяют сделать вывод об отсутствии местнораздражающего действия препарата «Декасан».

продолжение табл. 40

Условия эксперимента	Слизистая оболочка глаза															Общее количество баллов для каждого животного
	Покраснение/ (количество животных с реакцией)					Хемоз (отек)/ (количество животных с реакцией)					Выделения/ (количество животных с реакцией)					
	15 мин	1 ч	24 ч	48 ч	72 ч	15 мин	1 ч	24 ч	48 ч	72 ч	15 мин	1 ч	24 ч	48 ч	72 ч	
Декасан, 0,02% раствор (правый глаз)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0
Дистиллированная вода (левый глаз)	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0

Примечания. 0 – реакция отсутствует; n=3 – количество животных.

3.8.2. Изучение местнораздражающего действия Декасана на крысах после длительного введения

Данный вид исследований проводили с целью прогнозирования кумулятивного раздражения, которое может проявиться при длительном применении препарата. Декасан применяли внутрижелудочно крысам (самцам и самкам) в дозах 3 мл/кг и 30 мл/кг на протяжении 28 суток ежедневно. Летальность, поведение, активность, потребление еды и воды оценивали ежедневно. Изучение местнораздражающего действия при внутрижелудочном введении препарата предусматривает исследование органов на пути введения препарата и его продвижения по желудочно-кишечному тракту – пищевод, желудок, тонкая, толстая и прямая кишка.

Через 28 дней введения препарата животных под легким хлороформным наркозом выводили из эксперимента. Проводили макро- и микроскопические исследования, которые представлены в разделе 4 по «Изучению хронической токсичности препарата «Декасан». Как показали результаты макро- и микроскопического исследований, препарат «Декасан» не вызывает раздражающего действия на перечисленные ранее органы крыс.

Проведенные исследования позволили установить отсутствие местного действия лекарственного средства «Декасан» как в условиях однократного воздействия на конъюнктиву глаза кроликов, так и на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта при повторных внутрижелудочных введениях у крыс, которые могли бы вызвать кумулятивное действие.

Таким образом, проведенные исследования по изучению местнораздражающего действия препарата «Декасан» свидетельствуют о его отсутствии.

4. ИЗУЧЕНИЕ ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ДЕКАСАНА

До начала эксперимента, создав рандомизированную выборку в популяции животных, которых взяли в экспериментальные группы, регистрировали усредненные показатели исходного состояния организма животных в группах самцов и самок (по 6 животных). Исследования проводили на 36 животных: 18 самцах и 18 самках, которые были рандомизированы следующим образом (табл.4.1):

Таблица 4.1

Распределение животных при исследовании хронической токсичности препарата «Декасан», 0,02% раствор декаметоксина

№ п/п	Условия опыта	Количество животных в группе	
		Самцы	Самки
1.	Контроль	6	6
2.	Декасан, 3 мл/кг	6	6
3.	Декасан, 30 мл/кг	6	6

Для эксперимента сформировали 6 групп по 6 животных: две – контрольные и четыре – получавшие исследуемый препарат. Значения доз для изучения хронической токсичности препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина, производства ООО «Юрия-Фарм», были выбраны согласно с Методическими рекомендациями по Доклиническому изучению лекарственных средств [19, 51]: условно-терапевтическая доза для крыс была получена в процессе пересчета с разовой дозы препарата для человека и составила 3 мл/кг (0,6 мг/кг по декаметоксину); соответственно доза, в 10 раз ее превышающая, составила 30 мл/кг (6 мг/кг по декаметоксину). Для

введения препарата экспериментальным животным использовали внутрижелудочный путь [19]. Учитывая, что максимальный объем для разового внутрижелудочного введения крысам составляет 5 мл, токсическую дозу препарата 30 мл/кг вводили дробно – в два приема утром и вечером, чтобы избежать перегрузки объемом [19]. Животные контрольных групп получали 30 мл/кг изотонического раствора. Продолжительность исследования составила 1 месяц, что соответствует требованиям Методических рекомендаций [19,51] по изучению лекарственных средств и прогнозируемым срокам применения препарата в клинике (максимум 3-5 дней). Декасан вводили животным ежедневно на протяжении всего периода исследований.

На протяжении всего периода хронического эксперимента животных содержали в одинаковых условиях вивария на полноценном рационе соответственно с установленными нормами [51,52], проводили наблюдения за общим состоянием здоровья и поведением животных, выживаемостью, потреблением пищи, развитием возможной клинической симптоматики токсического действия исследуемого вещества. Подопытные животные по внешнему виду, поведению и потреблению пищи не отличались от животных контрольных групп. В ходе эксперимента не было отмечено угнетения активности и других поведенческих нарушений у крыс.

Выбор показателей для оценки общетоксического действия препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина, производства ООО «Юрия-Фарм», на организм в хроническом эксперименте проводили соответственно поставленной цели: оценить степень повреждающего действия препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина при длительном применении, а также определить наиболее чувствительные к нему органы и системы [19, 51-68].

Действие препарата «Декасан» оценивали по изменению показателей периферической крови, функционального состояния печени и почек, состо-

яния центральной нервной и сердечно-сосудистой систем, коэффициентов массы внутренних органов.

По окончании периода исследований животных под эфирным наркозом декапитировали, собирали кровь для получения сыворотки и препарировали внутренние органы (печень, почки, сердце, легкие, селезенку, надпочечники, семенники), которые подвергали макроскопическому и гистологическому исследованию [53] методом световой микроскопии с окраской гематоксилин-эозином.

Для биохимических исследований использовали соответствующие рекомендуемые методы [19, 51].

Условно-терапевтическая доза для крыс составляет 3 мл/кг. Максимальная доза при изучении токсичности составляет 30,0 мл/кг, которая в 10 раз превышает условно-терапевтическую дозу.

В данном эксперименте использовали физиологические показатели жизнедеятельности, морфологические и биохимические показатели крови, мочи животных. В конце эксперимента всех животных подвергали эвтаназии под легким эфирным наркозом для проведения макро- и микроскопии внутренних органов.

Физиологические методы исследования включали наблюдения за поведенческими реакциями, общим состоянием, потреблением пищи и воды, регистрацию динамики массы тела животных, оценку состояния электрофизиологической активности миокарда методом электрокардиографии, функционального состояния центральной нервной системы [54].

Регистрацию массы тела животных проводили в динамике (исходное состояние, 1 неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели) на протяжении всего эксперимента. Оценка влияния препарата Декасан в различных дозах на состояние ЦНС крыс проводили с использованием метода „открытого поля“ в конце срока (28 дней) [19].

ЭКГ у животных регистрировали в конце срока исследования (28 суток) во втором стандартном отведении при скорости движения диаграмной ленты 50 мм/с на электрокардиографе ЭКГТ-03М. При расшифровке электрокардиограмм учитывали следующие показатели: RR – длительность полного сердечного цикла; длительность интервала PQ, характеризующего предсердно-желудочковую проводимость; длительность желудочкового комплекса QRS и электрической систолы желудочков – интервала Q-T; вольтаж зубцов P, T и R. Рассчитывали следующие показатели: частоту сердечных сокращений (ЧСС, уд/мин), систолический показатель (СП) как отношение длительности интервала QT к длительности сердечного цикла RR (QT/RR , %), характеризующий сократимость миокарда [62].

В периферической крови определяли концентрацию гемоглобина, количество эритроцитов, концентрацию лейкоцитов, подсчитывали процентное соотношение различных форм лейкоцитов (лейкоцитарную формулу). Кровь у крыс брали из хвостовой вены в конце срока (28 суток). Гемоглобин в крови определяли гемоглобинцианидным методом (набор фирмы "Филисит-Диагностика", Украина), эритроциты определяли колориметрическим методом [54], лейкоциты – в камере Горяева, подсчет лейкоцитарной формулы проводили с помощью счетчика форменных элементов СЛ-01 общепринятым методом [56].

Оценку влияния исследуемого препарата «Декасан» на функциональное состояние печени и различные метаболические процессы проводили по ряду биохимических показателей крови (28 суток) [56]. При проведении биохимических исследований использовали биохимические наборы производства фирм "Филисит-Диагностика" (Украина), «PLIVA-Lachema Diagnostica sro» (Чехия). Концентрацию общего белка в крови определяли биуретовым методом («PLIVA-Lachema Diagnostica sro», Чехия); активность аланинаминотрансферазы и аспартатаминотрансферазы

(АлАТ и АсАТ) – с 2,4-динитрофенилгидразином («PLIVA-Lachema Diagnostica sro», Чехия); концентрацию глюкозы в крови - глюкозооксидазным методом ("Филисит-Диагностика", Украина); концентрацию мочевины в крови с помощью диацетилмонооксидного метода «PLIVA-Lachema Diagnostica sro», Чехия); альбумины и глобулины, концентрацию щелочной фосфатазы и креатинина с помощью наборов фирмы "Филисит-Диагностика", (Украина).

Для оценки влияния исследуемых препаратов на функциональное состояние почек крыс определяли концентрацию мочевины по диацетилмонооксидному методу, креатинина – по реакции Яффе с помощью наборов фирмы "Филисит-Диагностика" (Украина) [54,55]. Концентрацию мочевины в моче пересчитывали на объем собраной мочи у животных за 3 часа [19, 54,59]. Изучение влияния препарата Декасан на функциональное состояние почек животных проводили в конце срока (28 суток).

После 28-ми дней внутрижелудочного введения, животных выводили из эксперимента в соответствии с правилами и нормами биоэтики – под легким хлороформным наркозом. После этого проводили вскрытие животных: оценивали макроскопическое состояние внутренних органов и систем (головной мозг, легкие, сердце, печень, селезенка, поджелудочная железа, двенадцатиперстная кишка, прямая кишка, почки, надпочечники, семенники/яичники, пищевод, желудок), определяли абсолютную массу внутренних органов (головной мозг, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, надпочечники, семенники) для дальнейших расчетов их коэффициентов массы (МК) по формуле:

$$KM_{органа} = \frac{масса_{органа}}{масса_{животного}} \times 100\% .$$

Для гистологических исследований морфологической структуры органов были взяты головной мозг, легкие, печень, почки, сердце, селезенка [53], для исследования местнораздражающего действия препарата «Декасан» – пищевод и желудок, кишечник. Материалы фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и заливали в целлоидин-парафин. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином и еозином [54], головной мозг – по Нислю [54]. Обзор микропрепаратов проводили под микроскопом Micros 400. Микрофотографирование микроскопических изображений проводили с помощью цифрового фотоаппарата Nikon Cool Pix 4500. Фотографии обрабатывали на компьютере Pentium 2,4 GHz с помощью Nikon View 5.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методом вариационной статистики (вычисляли среднее арифметическое выборки и его стандартную ошибку). Чтобы правильно выбрать статистический метод, учитывали характер данного признака (количественный, порядковый или качественный) и тип распределения (нормальный или другой) [21-23].

Проверку на нормальность распределения фактических данных выполняли с помощью теста на однородность (тест Левен). При нормальности распределения признака оценку значимых различий проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим использованием критерия Даннета. Критический уровень значимости p принимали равным 0,05. Обработку результатов с повторными измерениями (например, масса животных) проводили с помощью дисперсионного анализа ANOVA RM с последующим использованием критерия Даннета.

При отсутствии нормального распределения данных выборки и тех выборок, которые по характеру признака не подчиняются нормальному распределению, использовали непараметрический метод – метод Краскела - Уоллиса с последующим использованием критерия Мана-Уитни. Уровень

значимости для множественных сравнений с помощью критерия Манна-Уитни пересчитан с учетом поправки Бонферони по формуле $p = p_0 / k$, где $p_0 = 0,05$, k – количество парных сравнений, которое в данном исследовании составляет 2: «контроль – препарат «Декасан» в дозе 3 мл/кг», «контроль – препарат «Декасан» в дозе 30 мл/кг». Принятый уровень значимости $p \leq 0,05$.

Для проведения математических расчетов использовали стандартный пакет статистических программ «Statistica 6.0».

4.1. Влияние длительного введения терапевтической и токсической доз Декасана на биохимические и функциональные показатели внутренних органов и систем крыс

Ежедневное внутрижелудочное введение ЛС в течение 28 дней исследования выявило, что в группах, которым вводили препарата «Декасан» (табл. 4.2) гибель животных отсутствовала.

Таблица 4.2

Летальные исходы у лабораторных крыс после внутрижелудочного введения препарата Декасан при длительном наблюдении

№ групп-пы	Экспериментальные группы	Доза, мл/кг	Вызванный эффект, погибшие животные/количеству животных	
			самцы	самки
1	Контроль (растворитель)	30	0/8	0/8
2	Декасан	3	0/8	0/8
3	Декасан	30	0/8	0/8

Влияние препарата Декасан на массу тела белых крыс было изучено в течение 28 дней введения. Полученные результаты представлены в таблицах 4.3 и 4.4.

После 28 дней эксперимента в контрольной группе самцов (таблица 4.3) отмечено увеличение массы тела крыс относительно исходной на 15 %, в группе крыс, получавших Декасан в дозе 3 мл/кг – на 17%, в группе крыс, получавших Декасан в дозе 30 мл/кг – на 22%. Результаты статистического анализа не выявили достоверных различий относительно группы контроля.

Таблица 4.3

Влияние препарата «Декасан» на массу тела (г) крыс самцов ($\bar{X} \pm S_x$)

Сроки исследования	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Исходное состояние	257±8	260±9	259±5
1 неделя	266±9	271±10	272±7
2 неделя	276±9	280±11	281±9
3 неделя	285±10	287±11	289±9
4 неделя	296±11*	303±12*	316±10*

Примечание: * – отклонения значимы относительно исходных данных, $p < 0,05$.

В группах самок, которым вводили препарат Декасан в разных дозах в течение 28 дней, показатель прироста массы тела не отличался от такового в группе контроля. Прирост во всех группах к концу эксперимента увеличился в группе контроля на 10%, в группах, которые получали Декасан в дозах 3 и 30 мл/кг – на 11 и 8 % соответственно.

Таблица 4.4

Влияние препарата «Декасан» на массу тела (г) крыс самок ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Сроки исследования	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Исходное состояние	231±4	229±4	229±5
1 неделя	240±4	239±4	233±5
2 неделя	245±3	245±4	238±6
3 неделя	252±5*	252±3*	243±5
4 неделя	253±3*	254±7*	249±5*

Примечание: * – отклонения значимы относительно исходных данных, $p < 0,05$.

Таким образом, экспериментальные группы животных имели положительную динамику прироста массы тела относительно исходных значений, статистические отклонения от соответствующих групп контроля отсутствовали. Полученные результаты показали, что длительное введение исследуемого образца не оказывает токсического влияния на обменные процессы в организме животных.

В таблицах 4.5 и 4.6 представлены данные по влиянию препарата «Декасан» на показатели функционального состояния ЦНС. Достоверные изменения в структуре поведения животных относительно группы контроля не имели места ни у самцов, ни у самок. Все показатели физиологической активности укладываются в нормальные пределы физиологических колебаний.

Таблица 4.5

Влияние препарата «Декасан» на показатели функционального состояния ЦНС крыс самцов в тесте открытого поля ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$)

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Количество пересеченных квадратов	13,63 (5÷34)	12,00 (4÷24)	12,63 (4÷26)
Количество вертикальных стоек	1,50 (0÷4)	3,50 (0÷8)	1,13 (0÷3)
Количество обследованных отверстий	5,50 (3÷9)	9,63 (2÷18)	5,75 (3÷11)
Количество дефекаций	1,63 (0÷5)	2,38 (0÷6)	0,88 (0÷3)
Количество уринаций	1 (0÷3)	2,75 (0÷15)	0,50 (0÷2)
Количество умываний	0,50 (0÷3)	0,25 (0÷1)	0,00 (0÷0)
Сумма всех активностей	23,75 (13÷51)	32,13 (7÷67)	20,88 (9÷38)

Таблица 4.6

Влияние препарата «Декасан» на показатели функционального состояния ЦНС крыс самок в тесте открытого поля ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$)

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Количество пересеченных квадратов	12,87 (3÷23)	11,25 (4÷21)	9,50 (7÷15)
Количество вертикальных стоек	4,25 (1÷8)	4,00 (1÷7)	3,75 (0÷5)
Количество обследованных отверстий	7,38 (5÷11)	5,13 (2÷10)	6,13 (3÷10)
Количество дефекаций	0,88 (0÷3)	1,38 (0÷4)	0,88 (0÷2)
Количество уринаций	0,25(0÷1)	1,00 (0÷4)	0,25 (0÷1)
Количество умываний	0,50 (0÷2)	0,63 (0÷2)	0,75 (0÷3)
Сумма всех активностей	26,13 (13÷40)	23,38 (12÷41)	21,25 (16÷27)

Таким образом, после 28 дней введения ЛС в поведении животных не выявлены отличия, которые можно было бы связать с влиянием препарата.

Оценку влияния препарата «Декасан» на гематологические показатели изучали через 28 дней после начала введения. Полученные данные представлены в таблицах 4.7 и 4.8.

Из приведенных в таблицах данных видно, что у животных всех подопытных групп каких-либо статистически значимых изменений по отношению к контролю в количестве эритроцитов, лейкоцитов, а также в содержании гемоглобина не отмечалось. Показатели состава лейкоцитарной формулы у подопытных животных не отличались от таковых в контрольной группе. Патологических сдвигов не отмечали. Ни у самцов, ни у самок статистически значимых различий между группами относительно контроля не выявлено.

Таблица 4.7

Влияние препарата «Декасан» на гематологические показатели у крыс самцов ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
гемоглобин, г/л	155,8±3	139,9±5	146,8±5
эритроциты, $10^{12}/л$	6,8±0,2	6,3±0,2	6,7±0,1
лейкоциты, $10^9/л$	15,6±1,1	15,1±1,7	14,5±0,8
<i>Лейкоцитарная формула, %:</i>			
нейтрофилы палочкоядерные	0,0(0÷0)	0,3(0÷1)	0,2(0÷1)
нейтрофилы сегментоядерные	18,3(10÷27)	33,2(17÷60)	26,7(17÷51)
эозинофилы	1,8(0÷5)	3,2(1÷5)	3,3(0÷8)
лимфоциты	79,2(72÷87)	68,7(61÷79)	69,3(46÷77)
моноциты	0,7(0÷1)	0,5(0÷2)	0,5(0÷1)

Таблица 4.8

Влияние препарата «Декасан» на гематологические показатели у крыс самок ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
гемоглобин, г/л	158,2±2,5	156,6±2,9	151,4±3,8
эритроциты, $10^{12}/л$	6,1±0,2	5,7±0,1	5,6±0,1
лейкоциты, $10^9/л$	9,2±1,3	8,6±0,6	8,4±0,3
<i>Лейкоцитарная формула, %:</i>			
нейтрофилы палочкоядерные	0,2(0÷1)	0,0(0÷0)	0,0(0÷0)
нейтрофилы сегментоядерные	29,3(23÷40)	24,0(14÷33)	29,0(20÷40)
эозинофилы	3,8(2÷7)	3,2(1÷6)	6,0(1÷10)
лимфоциты	66,2(54÷75)	72,2(63÷82)	64,5(53÷74)
моноциты	0,5(0÷2)	0,7(0÷3)	0,5(0÷1)

Таким образом, препарат «Декасан» не оказывает влияния на систему эритро- и лейкопоза экспериментальных животных.

В таблицах 4.9 и 4.10 представлены данные по влиянию препарата Декасан на основные биохимические показатели крови белых крыс.

Значения большинства показателей в сыворотке крови крыс самцов после 28 суток внутрижелудочного введения препарата «Декасан» находились в пределах диапазона физиологических колебаний соответствующей контрольной группы. Исключение составляет умеренная гипоальбуминемия, которую можно объяснить раздражающими свойствами препарата «Декасан» в отношении слизистой оболочки желудка, обусловленными поверхностной активностью действующего вещества препарата – декаметоксина. В целом результаты свидетельствуют об

отсутствии токсического действия препарата «Декасан» на показатели метаболизма в организме самцов.

Таблица 4.9

Влияние препарата «Декасан» на биохимические показатели сыворотки крови у крыс самцов ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Показатели		Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Общий белок, г/л		71,83±1,03	69,82±0,66	71,76±1,48
Альбумины, %		34,66±1,58	23,35±1,43*	26,51±1,97*
Глобулины, %	α_1	5,72±0,94	6,37±0,62	5,43±0,98
	α_2	14,4±1,37	16,08±1,10	16,65±1,16
	β	13,08±0,62	15,90±1,48	16,64±1,64
	γ	11,18±1,13	12,45±1,05	14,22±2,48
АсАТ, ммоль/л·час		0,83±0,04	0,90±0,03	0,84±0,05
АлАТ, ммоль/л·час		0,69±0,02	0,72±0,03	0,65±0,04
Креатинин, ммоль/л		0,1222±0,010	0,117±0,003	0,124±0,007
Мочевина, ммоль/л		3,98±0,13	4,37±0,16	4,60±0,59
Щелочная фосфатаза, мкмоль/л		6,99±0,82	7,47±0,95	7,93±0,74
Глюкоза, ммоль/л		6,84±0,21	6,66±0,17	6,50±0,22
Холестерин, ммоль/л		1,06±0,18	0,94±0,14	1,21±0,13
Общие липиды, г/л		1,85±0,10	1,68±0,13	1,69±0,14
Хлориды, ммоль/л		86,54±3,34	93,32±7,41	82,57±2,91

Примечание. * – отклонения значимы относительно контроля, $p < 0,025$.

Как видно из представленных ниже данных (таблица 4.10), при исследовании влияния препарата Декасан на показатели метаболизма самок

не отмечено значимых различий по сравнению с группой контроля. В экспериментальных группах крыс самок дисперсионный анализ не выявил различий по отношению к контрольной группе. Это указывает на отсутствие токсического действия лекарственного средства.

Таблица 4.10

Влияние препарата «Декасан» на биохимические показатели сыворотки крови у крыс самок ($\bar{X} \pm S_x$)

Показатели		Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Общий белок, г/л		69,58±2,62	66,06±1,58	70,13±0,71
Альбумины, %		32,54±4,87	31,31±6,22	27,73±2,89
Глобулины, %	α_1	6,35±2,13	3,45±0,31	5,45±0,94
	α_2	19,03±1,58	14,92±1,66	14,98±1,57
	β	12,15±2,04	14,10±2,10	19,05±1,99
	γ	14,57±0,85	12,98±1,96	17,8±0,82
АсАТ, ммоль/л·час		0,88±0,03	0,80±0,03	0,82±0,04
АлАТ, ммоль /л·час		0,53±0,02	0,60±0,03	0,57±0,02
Креатинин, ммоль/л		0,161±0,004	0,155±0,006	0,150±0,005
Мочевина, ммоль/л		4,30±0,12	4,70±0,28	3,91±0,15
Щелочная фосфатаза, мкмоль/л		4,24±0,34	5,62±0,25	5,44±0,74
Глюкоза, ммоль/л		6,58±0,20	7,16±0,38	7,15±0,28
Холестерин, ммоль/л		0,84±0,13	0,91±0,13	1,21±0,17
Общие липиды, г/л		1,68±0,12	1,57±0,23	1,93±0,20
Хлориды, ммоль/л		82,07±3,69	82,64±2,64	81,21±3,42

Таким образом, препарат «Декасан» не оказывает существенного влияния на биохимические показатели сыворотки крови у крыс самцов и

самок за исключением гипоальбуминемии у самцов, обусловленной химическими свойствами действующего вещества декметоксина.

Для углубленной характеристики состояния системы крови исследовали показатели коагуляционного гемостаза, таких как время свертывания крови, количество фибриногена в плазме крови и протромбиновое время. Анализ полученных результатов представлен в таблицах 4.11 и 4.12.

Таблица 4.11

Результаты влияния Декасана на показатели гемостаза у крыс самцов

$$(\bar{X} \pm S_x)$$

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Время свертывания крови, мин	155,3±9,3	168,3±18,4	150,8±13,2
Фибриноген, г/л	2,53±0,11	2,50±0,13	2,24±0,15
Протромбиновое время, с	15,54±0,99	15,13±0,83	14,95±0,52

Таблица 4.12

Результаты влияния Декасана на показатели гемостаза у крыс самок

$$(\bar{X} \pm S_x)$$

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Время свертывания крови, мин	155,3±9,3	168,3±18,4	150,8±13,2
Фибриноген, г/л	2,78±0,30	2,44±0,15	2,43±0,14
Протромбиновое время, с	18,39±1,25	16,21±0,77	16,40±0,48

Результаты указывают на отсутствие влияния препарата «Декасан», 0,02% раствор, на показатели гемостаза как у самцов, так и у самок крыс.

Функциональное состояние почек изучали через 28 дней после начала введения препарата «Декасан». Полученные данные представлены в таблицах 4.13 и 4.14.

Таблица 4.13

Влияние препарата «Декасан» на показатели функционального состояния почек у крыс самцов в моче ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Диурез, мл/100г массы	1,54±0,17	1,91±0,18	1,85±0,10
pH мочи	7,33±0,17	7,42±0,40	7,67±0,21
Плотность	1,013±0,002	1,012±0,001	1,011±0,001
Креатинин, ммоль/л	0,62±0,11	0,90±0,19	0,96±0,13
СКФ, мл/мин на100 г массы	0,05±0,01	0,07±0,03	0,08±0,02
Реабсорбция воды, %	82,49±1,62	78,62±7,16	83,88±4,54
Экскреция мочевины, мкМ/3 часа на100 г массы	453,97±77,39	416,70±44,30	513,66±40,38
Хлориды, ммоль/л	18,11±4,11	13,38±4,40	12,51±1,35
Калий, ммоль/л	17,19±4,63	17,66±4,69	17,14±2,42
Экскреция калия, мкМ/3 часа на100 г массы	21,91±5,01	28,68±10,53	22,82±3,42
Натрий, ммоль/л	13,63±2,53	13,82±4,06	12,34±1,56
Экскреция натрия, мкМ/3 часа на100 г массы	28,27±8,66	36,74±12,04	31,10±3,78
Фильтрационный заряд натрия, мкмоль/мин на100 г	1182,9±170,7	1702,3±634,4	1938,3±528,0
Реабсорбция натрия, %	97,64±0,68	98,07±0,54	98,01±0,47

Таблица 4.14

**Влияние препарата «Декасан» на показатели функционального
состояния почек у крыс самок в моче ($\bar{X} \pm S_x$)**

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Диурез, мл/100г массы	1,57±0,18	1,70±0,26	1,78±0,21
pH мочи	7,08±0,15	7,58±0,15	7,25±0,36
Плотность,	1,011±0,001	1,011±0,002	1,010±0,001
Креатинин, ммоль/л	0,94±0,20	0,91±0,24	0,74±0,06
СКФ, мл/мин на100 г массы	0,05±0,01	0,05±0,01	0,04±0,01
Реабсорбция воды, %	75,46±7,38	74,02±5,83	77,33±2,5
Экскреция мочевины, мкМ/3 часа на100 г массы	400,82±49,11	526,75±72,11	439,57±64,68
Хлориды, ммоль/л	8,54±1,38	12,05±2,64	7,73±0,87
Калий, ммоль/л	5,37±2,43	20,49±5,79	7,46±2,44
Экскреция калия, мкМ/3 часа на100 г массы	10,70±5,76	31,55±7,41	13,59±4,55
Натрий, ммоль/л	11,43±3,08	23,06±4,06	12,95±3,05
Экскреция натрия, мкМ/3 часа на100 г массы	21,08±8,07	38,07±7,37	22,36±5,35
Фильтрационный заряд натрия, мкмоль/мин на100 г	1141,9±212,5	1032,9±186,0	1022,2±185,6
Реабсорбция натрия, %	97,62±0,90	96,22±0,61	97,98±0,45

Как показали результаты, существенных изменений со стороны выделительной функции почек при введении Декасана крысам в течение 28 дней не выявлено. Все изученные показатели мочи и сыворотки крови

находились в границах физиологических колебаний и достоверно не отличались от контроля. Поэтому можно сделать вывод о том, что длительное введение препарата «Декасан» не нарушило выделительную функцию почек животных.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о безопасности Декасана в отношении функционального состояния почек.

Данные о влиянии препарата «Декасан» на частоту сердечных сокращений и показатели электрокардиограммы представлены в таблицах 4.15 и 4.16. Изучение влияния препарата «Декасан» на сердце проводили в конце эксперимента. У всех животных сохранялся правильный синусовый ритм – во II стандартном отведении постоянно присутствовал положительный зубец Р перед характерным желудочковым комплексом QRS.

Таблица 4.15

Влияние препарата «Декасан» на показатели ЭКГ у крыс самцов

$$(\bar{X} \pm S_x)$$

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
ЧСС, уд/мин	501,63±21,96	461,54±17,41	498,23±25,10
СП,%	51,25±2,19	47,25±2,02	54,38±1,96
PQ, с	0,044±0,002	0,044±0,003	0,041±0,001
QRS, с	0,011±0,001	0,014±0,001	0,013±0,001
QT, с	0,061±0,001	0,061±0,001	0,065±0,002
R, мВ	0,49±0,03	0,52±0,05	0,063±0,10
P, мВ	0,09±0,01	0,10±0,01	0,13±0,01
T, мВ	0,16±0,02	0,14±0,01	0,18±0,01

Таблица 4.16

Влияние препарата «Декасан» на показатели ЭКГ у крыс самок

$$(\bar{X} \pm S_x)$$

Показатели	Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
ЧСС, уд/мин	505,20±19,77	462,09±29,91	504,38±16,86
СП,%	51,63±2,21	47,63±2,43	50,63±1,75
PQ, с	0,044±0,002	0,048±0,002	0,043±0,002
QRS, с	0,013±0,001	0,015±0,001	0,010±0,003
QT, с	0,063±0,001	0,061±0,001	0,060±0,000
R, мВ	0,50±0,06	0,66±0,06	0,049±0,05
P, мВ	0,13±0,02	0,12±0,01	0,12±0,02
T, мВ	0,15±0,02	0,16±0,01	0,12±0,01

Электрокардиографических признаков нарушения внутрисердечной проводимости, судя по длительности интервала PQ, не выявлено. Частота сердечных сокращений у всех животных находилась в пределах видовой физиологической нормы.

Из представленных данных (таблицы 4.15 и 4.16) видно, что Декасан не вызывал значимых изменений ЭКГ ни у самцов, ни у самок крыс.

Все показатели варьировали в пределах значений контрольной группы. Все вышеизложенное указывает на то, что препарат «Декасан» не проявляет кардиотоксического влияния.

При проведении макроскопических исследований все животные патологических изменений не имели. Крысы правильного телосложения, нормальной упитанности. Деформации или отека конечностей не было. При

наружном осмотре выделений из естественных отверстий не обнаружено. Шерсть блестящая, опрятного вида, очагов облысения не наблюдали. Зубы сохранены. Видимые слизистые оболочки нормальной окраски, блестящие. Молочные железы самок без уплотнений на ощупь, выделения из сосков отсутствовали. Половые органы самцов развиты правильно.

При вскрытии грудная и брюшная полости выпота не содержат. Положение внутренних органов грудной и брюшной полостей анатомически правильное. Parietalный и висцеральный листки плевры и брюшины тонкие, блестящие, гладкие.

Интима аорты гладкая, блестящая, беловатого цвета. Диаметр аорты не изменен. Листки перикарда тонкие, прозрачные, гладкие. Величина и форма сердца не изменены. Левый желудочек сокращен, в правом содержится незначительное количество темной жидкой крови. Клапаны сердца тонкие, блестящие, гладкие. Мышца сердца на разрезе однородной красно-коричневатой окраски, умеренно плотная.

Просвет трахеи и крупных бронхов не изменен, слизистая оболочка блестящая, гладкая, бледного цвета. Легкие воздушные, без уплотнений на ощупь, бледно-розовой окраски.

Слизистая оболочка пищевода блестящая, гладкая, бледного цвета. Желудок обычной величины и формы, заполнен пищевым содержимым. Слизистая оболочка безжелезистой части желудка складчатая, розоватая, блестящая. Слизистая оболочка тела желудка складчатая, розоватая, блестящая. Слизистая оболочка тонкого кишечника бледно-розового цвета, блестящая, гладкая. Слизистая оболочка толстой кишки сероватого цвета, блестящая, гладкая.

Форма и величина печени не изменены. Поверхность печени гладкая, однородной темно-красной окраски, капсула тонкая, прозрачная. Ткань печени на разрезе полнокровная, умеренно плотная.

Поджелудочная железа плоской формы, имеет вид ветвистого тяжа, по цвету и консистенции похожа на жировую ткань плоской формы.

Селезенка обычной формы, темно-вишневого цвета, умеренно плотной консистенции. Поверхность органа гладкая, капсула тонкая. На разрезе на темно-красном фоне селезенки видны мелкие сероватого цвета фолликулы.

Величина и форма почек не изменены. Поверхность почек коричневого цвета, гладкая, капсула тонкая, прозрачная, легко снимаемая. На разрезе органа хорошо различимы корковое и мозговое вещества.

Надпочечники округлой формы, бледно-желтого цвета, с гладкой поверхностью, умеренно плотные. На разрезе четко выделяется темно окрашенное мозговое вещество.

Тело матки самок обычной плотности, величины и формы. Рога матки тонкие, слизистая оболочка блестящая, бледная. Яичники темно-красного цвета, с неровной поверхностью, умеренно плотные. Яички самцов беловатого цвета, обычных размеров и плотности.

Оболочки головного мозга тонкие, прозрачные. Вещество мозга обычной плотности, поверхность мозга гладкая. На фронтальных разрезах мозга отчетливо выделяются серое и белое вещества. Желудочки мозга обычной величины, расширений нет.

Была определена абсолютная масса внутренних органов для расчета их коэффициентов массы. В таблицах 4.17 и 4.18 представлены данные по влиянию препарата «Декасан» на коэффициенты массы органов у белых крыс всех экспериментальных групп.

Расчет и последующий анализ коэффициентов массы внутренних органов животных показал, что внутрижелудочное введение Декасана самцам и самкам не привело к изменениям коэффициентов массы органов по сравнению с животными контрольной группы. Показатели находятся в

пределах физиологической нормы. Статистически значимых различий не обнаружено.

Таблица 4.17

Влияние препарата «Декасан» на коэффициенты массы внутренних органов у крыс самцов ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$)

Показатели		Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Печень		3,54 (3,05÷3,97)	3,47 (2,99÷3,96)	3,52 (2,70÷3,95)
Почки	прав.	0,32 (0,29÷0,36)	0,30 (0,28÷0,34)	0,32 (0,23÷0,37)
	лев.	0,32 (0,30÷0,36)	0,30 (0,27÷0,34)	0,32 (0,23÷0,37)
Сердце		0,31 (0,27÷0,36)	0,28 (0,26÷0,30)	0,29 (0,21÷0,33)
Легкие		0,59 (0,48÷0,68)	0,62 (0,44÷0,99)	0,58 (0,39÷0,73)
Селезенка		0,35 (0,25÷0,46)	0,37 (0,26÷0,56)	0,37 (0,22÷0,52)
Надпочечники		0,015 (0,007÷0,024)	0,015 (0,009÷0,019)	0,016 (0,013÷0,020)
Тимус		0,109 (0,066÷0,176)	0,109 (0,068÷0,171)	0,090 (0,031÷0,138)
Семенники	прав.	0,54 (0,44÷0,65)	0,54 (0,42÷0,64)	0,53 (0,43÷0,61)
	лев.	0,54 (0,47÷0,64)	0,54 (0,42÷0,65)	0,54 (0,43÷0,62)
Головной мозг		0,65 (0,55÷0,77)	0,59 (0,47÷0,72)	0,59 (0,52÷0,68)

Таблица 4.18

Влияние препарата «Декасан» на коэффициенты массы внутренних органов крыс самок ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$)

Показатели		Контроль	Декасан, 3 мл/кг	Декасан, 30 мл/кг
Печень		3,32 (3,06÷3,58)	3,47 (3,29÷3,74)	3,46 (3,21÷3,80)
Почки	прав.	0,29 (0,26÷0,35)	0,30 (0,26÷0,36)	0,31 (0,28÷0,36)
	лев.	0,28 (0,24÷0,35)	0,30 (0,27÷0,35)	0,31 (0,26÷0,36)
Сердце		0,30 (0,26÷0,36)	0,30 (0,26÷0,44)	0,33 (0,28÷0,39)
Легкие		0,62 (0,51÷0,87)	0,63 (0,50÷0,98)	0,63 (0,53÷0,79)
Селезенка		0,36 (0,25÷0,50)	0,39 (0,30÷0,52)	0,37 (0,30÷47)
Надпочечники		0,029 (0,020÷0,043)	0,030 (0,021÷0,041)	0,34 (0,022÷0,044)
Тимус		0,138 (0,059÷0,194)	0,134 (0,074÷0,192)	0,147 (0,093÷0,203)
Головной мозг		0,72 (0,55÷0,90)	0,70 (0,63÷0,81)	0,71 (0,63÷0,78)

Таким образом, введение препарата «Декасан» в течение 28 дней крысам обоего пола не оказывает негативного влияния на внутренние органы.

4.2. Изучение гистоструктуры внутренних органов и тканей крыс под влиянием длительного введения терапевтической и токсической доз Декасана

Исследование влияния длительного внутрижелудочного введения препарата «Декасан» на морфоструктуру внутренних органов половозрелых крыс. Изучена морфологическая структура печени, почек, сердца, надпочечников, селезенки, тимуса, желудка, толстого и тонкого кишечника, поджелудочной железы, пищевода, яичек, яичников, головного мозга половозрелых белых беспородных крыс обоего пола после ежедневного в течение месяца внутрижелудочного введения препарата «Декасан» (в виде 0,02% раствора декаметоксина) в дозах 3 мл/кг и 30 мл/кг и аналогичных органов интактных крыс. В соответствии с положениями Европейской конвенции по защите прав позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей [19], выведение крыс из эксперимента проведено путем щадящей декапитации. Макроскопическое исследование внутренних органов проведено непосредственно после выведения животных из эксперимента. Отобранные образцы органов фиксировали в 10% растворе формалина, проводили по спиртам восходящей концентрации, заливали в целлоидин-парафин. Срезы органов окрашивали гематоксилином и эозином [54]. Просмотр микропрепаратов проводили под микроскопом Granum, микрофотографирование микроскопических изображений выполняли цифровой видеокамерой Granum ДСМ 310. Фотоснимки обрабатывали на компьютере Pentium 2,4GHz с помощью программы Tour View.

Результаты макроскопического исследования.

Животные нормальной упитанности, шерсть их опрятная, блестящая, плотно прилегающая к телу. Регионарные лимфатические узлы на ощупь не увеличены. Из глаз, носа и других естественных отверстий отделяемого не

обнаружено, шерсть и кожа в области ануса и влагалища, наружного отверстия уретры чистая, без признаков раздражения.

Макроскопическое исследование грудной полости: у всех животных легкие эластичные, воздушные, без спаек между листками плевры, занимают всю плевральную полость, стенки бронхов не утолщены. Расположение органов средостения соответствует нормальному: трахея и пищевод проходимы, слизистая пищевода розовая. Тимус умеренный по размеру, конусообразной формы с четко выраженными двумя долями, блестящий, серо-розового цвета. Сердце обычной конфигурации, мышечные стенки плотные, упругие. Полости левого и правого желудочка узкие и щелевидные, в полости сердечной сумки жидкости не обнаружено, поверхность эпикарда без особенностей, миокард на разрезе чуть волокнистый.

Положение органов брюшной полости у всех животных анатомически правильное. Брюшина прозрачная, гладкая, без кровоизлияний. В полости постороннего содержимого не обнаружено. В печени хорошо определяются все доли, капсула ее не напряжена, края долей не закруглены, поверхность органа гладкая, без узелковых образований, паренхима на разрезе ровного красно-коричневого цвета. Поджелудочная железа представляет собой слабо ветвящийся рыхлый тяж, паренхима железы всех животных бледная, розовато-желтоватого цвета, без признаков кровоизлияний и жировых некрозов. Селезенка упругая, красновато-коричневого цвета. На разрезе видна мелкозернистость ткани. Почки с легко снимающейся капсулой, на разрезе темно-красные, плотные, с сохраненным рисунком слоев. Надпочечники представляют собой небольшие, округлые желто-белые образования, расположенные в забрюшинном пространстве в тесном соседстве с почками. Слизистая оболочка желудка с характерным рельефом складок, без геморрагий, отека, эрозивных повреждений. Кишечник без видимых изменений. Внутренние половые органы обычны. Головной мозг – сосуды мягкой мозговой оболочки

обычного кровенаполнения, изменений ткани мозга визуально не обнаружено.

Результаты микроскопического исследования.

Печень. После введения препарата «Декасан» как в дозе 3 мл/кг, так и 30 мл/кг, дольчатый рисунок ткани сохранен, внутри долек сохранена радиальная ориентация печеночных балочек. У всех животных междольковые соединительнотканые прослойки не выражены, что типично для крыс. Перипортальные зоны интактны. Гепатоциты с равномерно окрашенной цитоплазмой содержат четко определяемые 1-2 ядра, часть ядер с небольшой гиперхромией. Степень выраженности анизонуклеоза незначительна и сопоставима во всех группах. Ядрышек преимущественно 1-2 на ядро. Микроциркуляторных нарушений не обнаружено (рис. 4.1).

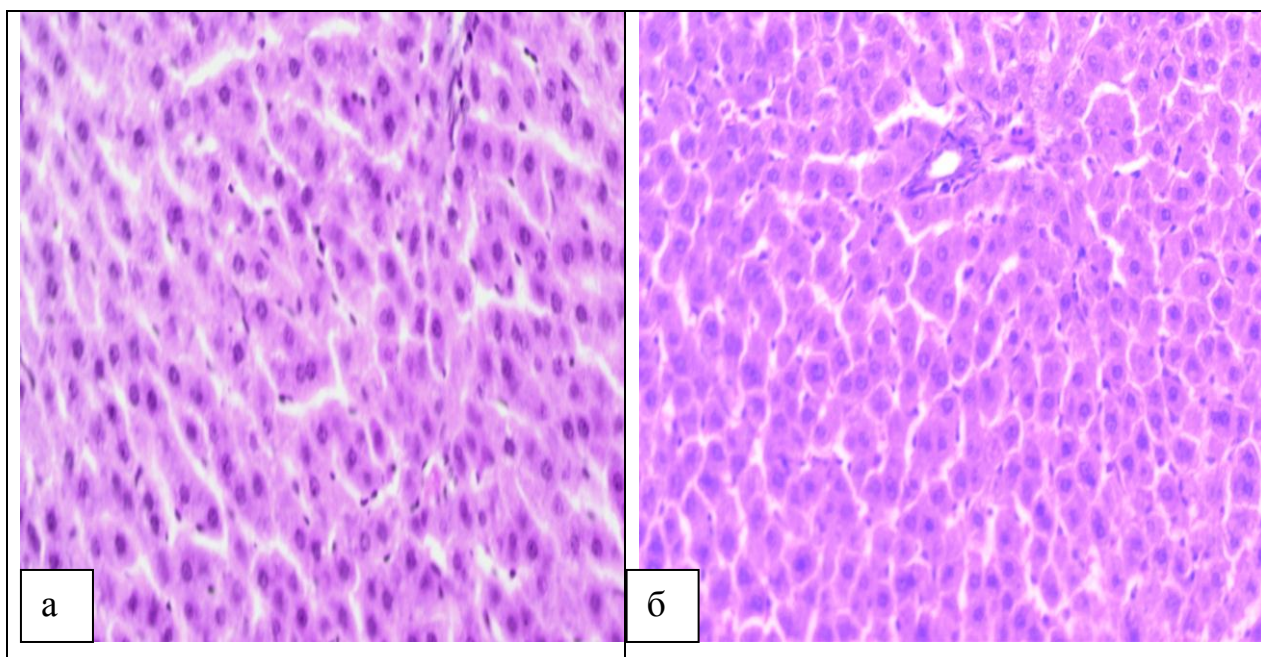


Рис. 4.1. Печень крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самец №17) и 30 мл/кг (б, самец №33). Структура печеночной паренхимы не изменена. Гематоксилин-эозин. x250.

Почки. У животных всех групп наблюдается четкое разделение на кору и мозговое вещество. Почечные клубочки умеренно варьируют по размерам,

капиллярная сеть в них имеет отчетливый ажурный рисунок. Полнокровие капилляров, клеточная насыщенность и выраженность мочевого пространства в клубочках опытных животных не отличается от контроля так же, как и плотность расположения самих клубочков. Проксимальные и дистальные отделы канальцевого аппарата без изменений, степень разрыхления апикальных частей эпителиоцитов умеренная. Эпителиоциты конечных отделов собирательных трубок не изменены. Состояние сосудов не нарушено (рис. 4.2).

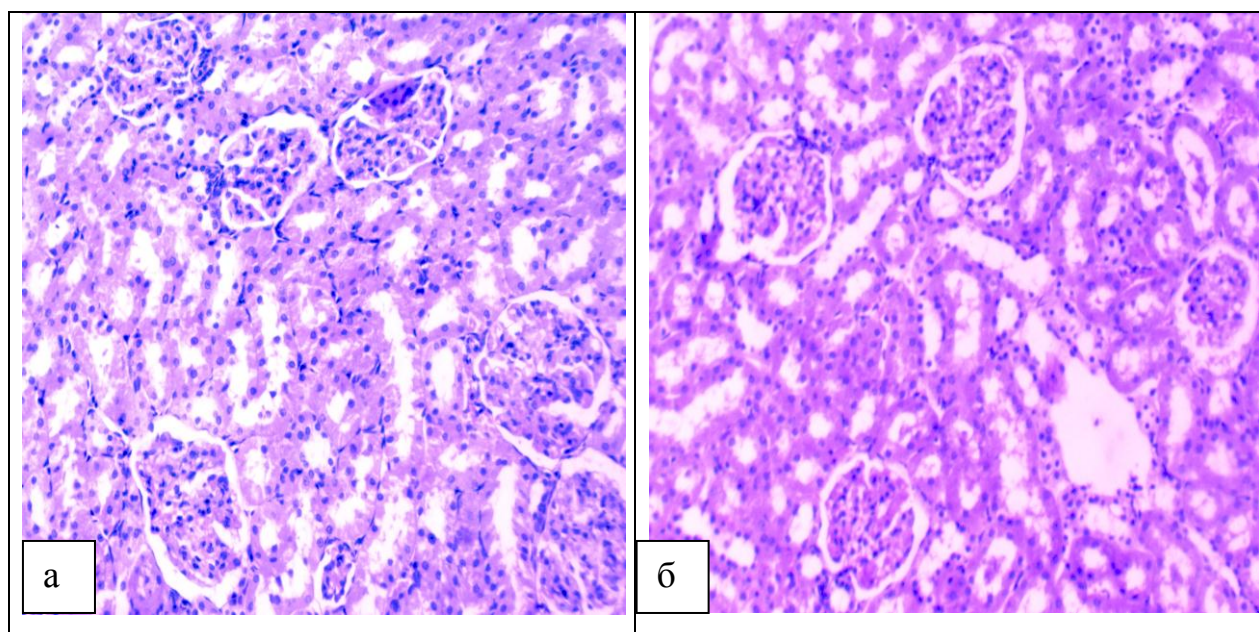


Рис. 4.2. Почки крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самец №24) и 30 мл/кг (б, самка №41). Неизменная структура почечных клубочков и системы канальцев. Гематоксилин-эозин. х200.

Миокард. На всех срезах выявляются сердечные мышечные волокна, образующие единый массив. Толщина волокон, их способность воспринимать окраску не различаются у контрольных и опытных крыс. Пространства между волокнами невелики, клеточная насыщенность эндомиокардия умеренная. Ядра кардиомиоцитов удлиненно-овальной формы, нормохромные, центрально расположенные. Поперечная исчерченность миофибрилл, вставочные диски отчетливо видны. Микроциркуляторных нарушений не отмечено (рис. 4.3).

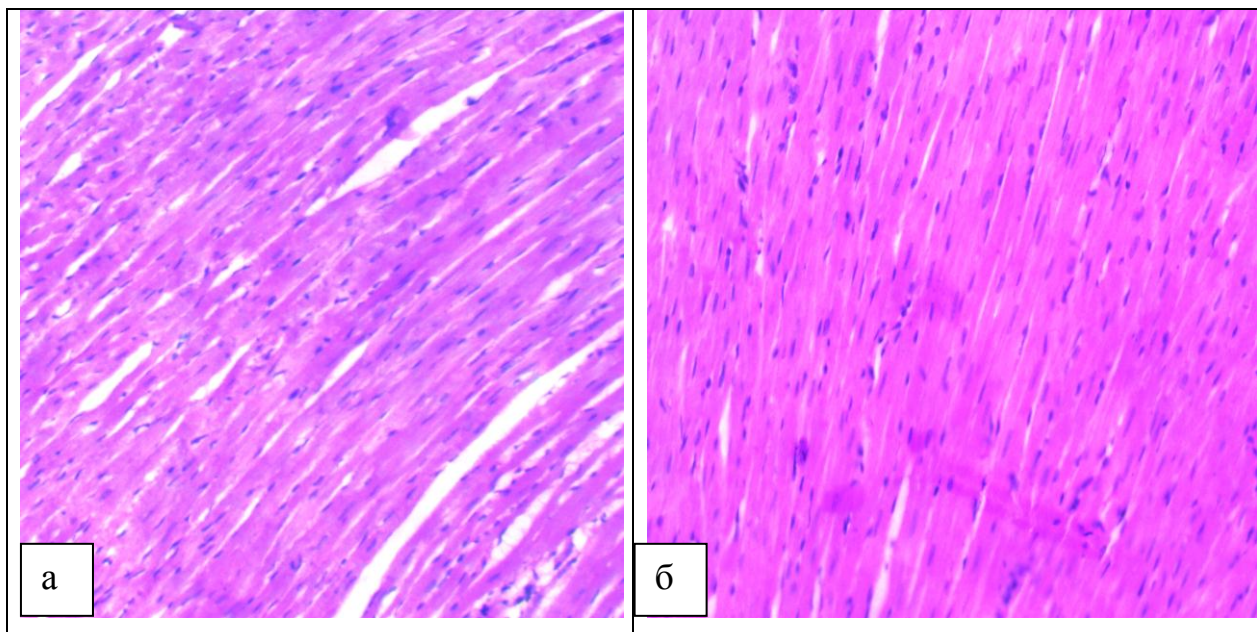


Рис. 4.3. Миокард крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самка №32) и 30 мл/кг (б, самка №41). Сердечно-мышечные волокна, ядра кардиомиоцитов без изменений. Гематоксилин-эозин. х200.

Легкие. В легких животных вне зависимости от группы эксперимента структура альвеолярных ходов, полостей и мешочков четкая, признаков альвеолярного отека не отмечено. Межалвеолярные перегородки по клеточному составу однородны. Лимфоцитарная реакция в системе бронхиального дерева у всех крыс в пределах нормы. Бронхиальный эпителий обычен (рис. 4.4).

Тимус. Тимус всех крыс покрыт плотной соединительнотканной капсулой, под которой видны сформировавшиеся дольки различной величины с четким разделением на корковое и мозговое вещество. Ширина субкапсулярной зоны в каждой дольке, соотношение слоев, клеточная плотность в них сопоставима у контрольных и опытных крыс. Кора содержит преимущественно малые и средние лимфоциты со скудной цитоплазмой. В медулле определяются менее плотно расположенные средние и большие тимоциты. Тимические тельца не крупные (2-3 клетки) и немногочисленные (рис. 4.5).

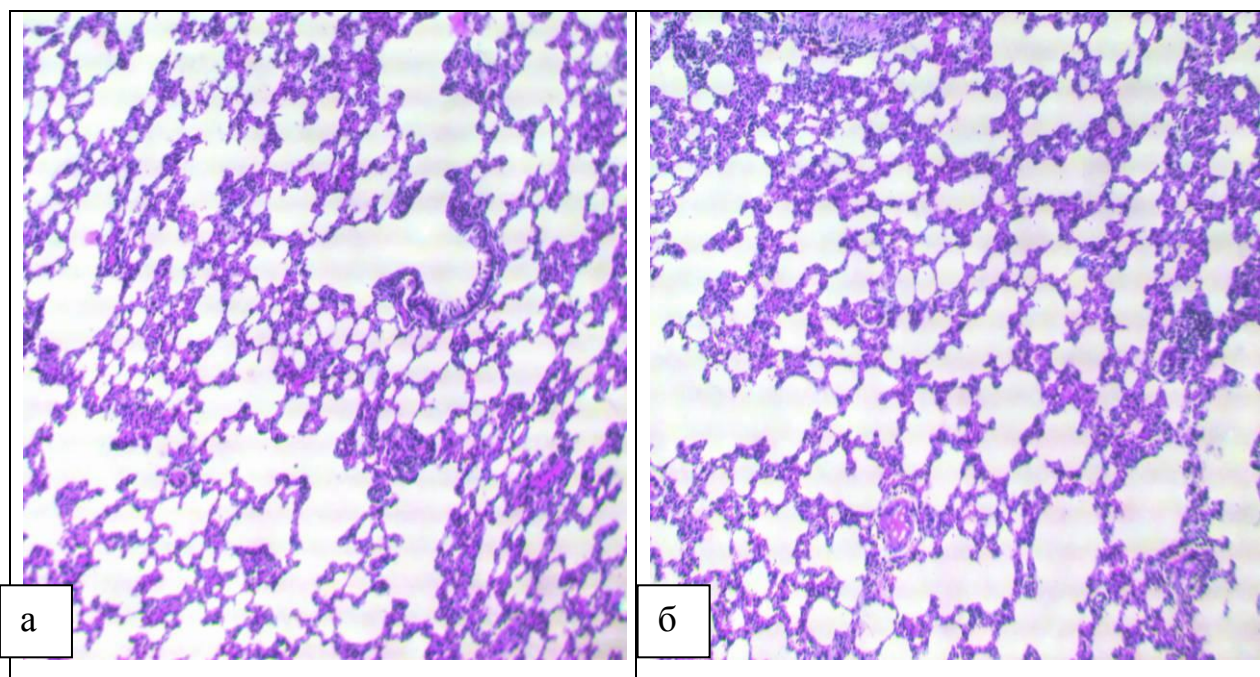


Рис. 4.4. Респираторный отдел легких крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самец №19) и 30 мл/кг (б, самка №48). Альвеолярный рисунок ткани сохранен, альвеолярный и бронхиолярный эпителий без изменений. Гематоксилин-эозин. х100.

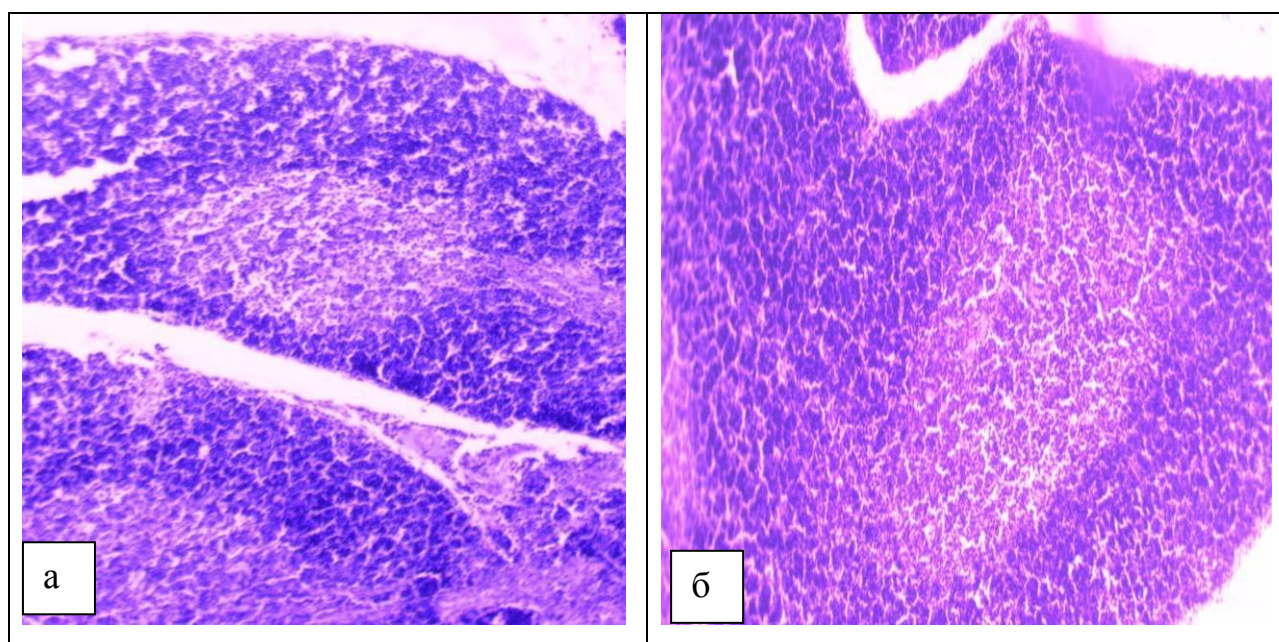


Рис. 4.5. Тимус крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самка №27) и 30 мл/кг (б, самец № 40). Видно: корковое и мозговое вещество, нормальная плотность тимоцитов, умеренная картина «звездного неба». Гематоксилин-эозин. х100.

Селезенка. Капсула, покрывающая орган и трабекулярная система у животных всех групп слабо выражены. Граница между белой и красной пульпой выражена умеренно четко. Белая пульпа в селезенках крыс представлена лимфоидными узелками (фолликулами) округлой, овальной, вытянутой формы, почти всегда имеющими три выраженные зоны: периартериальную Т-зону, маргинальную В-зону и герминативный центр. Центральные артерии расположены в периартериальных Т-зонах эксцентрично, стенки их не изменены, просвет свободен. Визуальное соотношение площадей Т- и В-зон фолликулов, а также соотношение между красной и белой пульпой у опытных крыс сопоставимо с контролем (рис. 4.6).

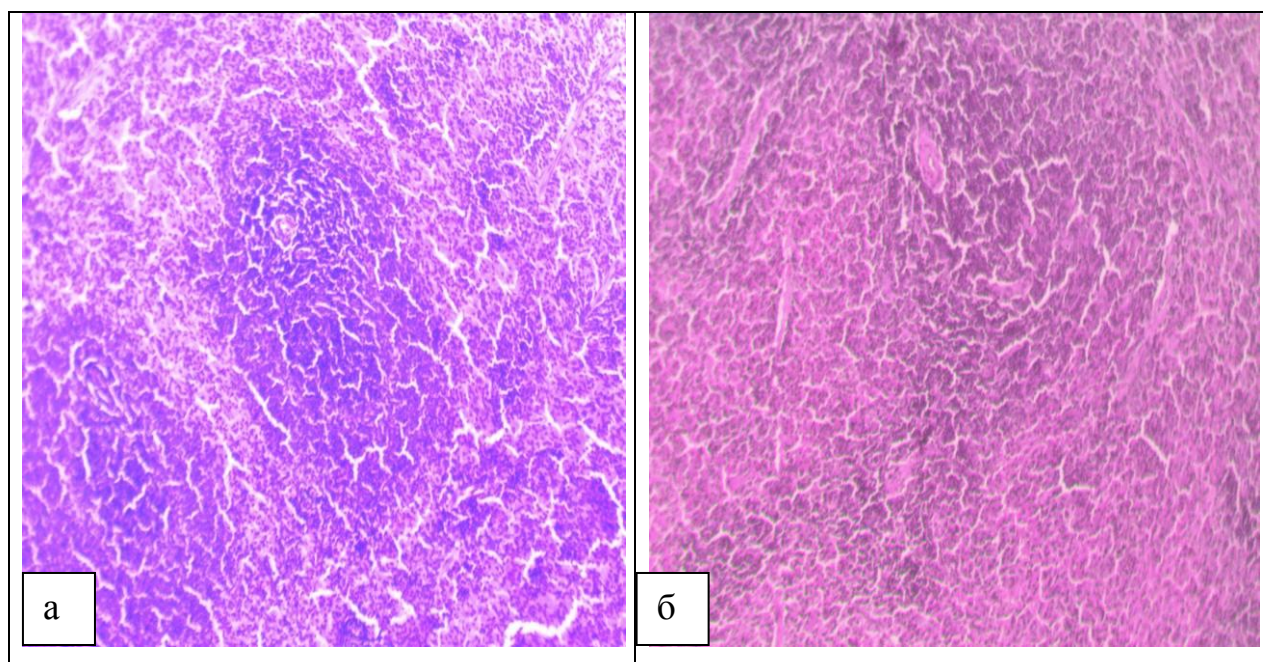


Рис. 4.6. Селезенка крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самец № 23) и 30 мл/кг (б, самка № 47). Лимфатические узелки и красная пульпа в пределах физиологической нормы. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

Надпочечники всех опытных животных сохраняют свойственную им гистоструктуру. Соотношение между слоями и зонами слоев у опытных крыс соответствует контрольным показателям, так же, как и содержание липидов в клетках клубочковой и пучковой зон. Клубочковая зона коры со-

держит клетки с небольшими ядрами, в цитоплазме есть включения в виде отдельных капель липидов. Клетки пучковой зоны отличаются более крупными размерами ядер, а цитоплазма их из-за определенного содержания липидов имеет ажурный вид. Очагов делипидизации не определялось. В сетчатой зоне встречаются клетки с гипо- и гиперхромными ядрами. Мозговой слой без особенностей (рис. 4.7).

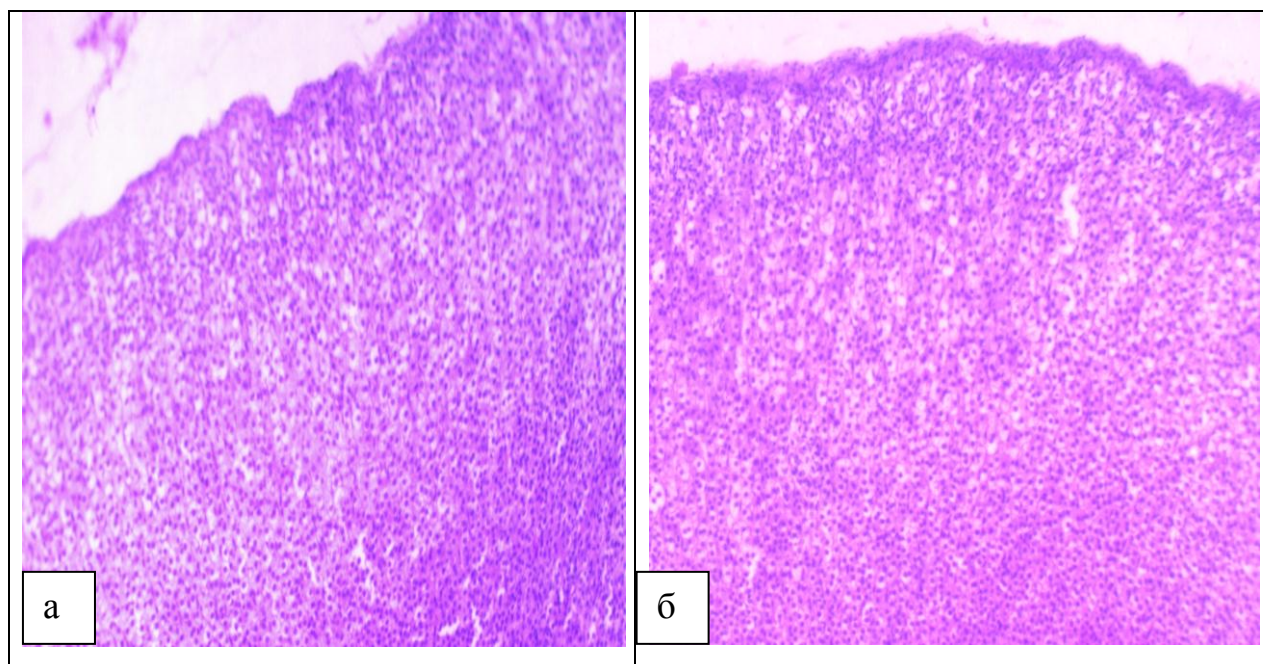


Рис. 4.7. Надпочечники крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самка № 26) и 30 мл/кг (б, самка №47). Нормальное состояние адренокортицитов клубочковой и пучковой зон коры. Гематоксилин-эозин. x100.

Поджелудочная железа. На срезах органа всех животных видны разделенные тонкими перегородками железистые дольки. Экзокринная часть представлена плотно расположенными ацинусами. Соотношение между апикальной, зимогенсодержащей, и базальной (ядросодержащей) частями панкреоцитов, у опытных и контрольных крыс сопоставимо. Эндокринный аппарат представлен островками округло-овальной формы, преобладают образования средних и крупных размеров. Заполнение островков β -клетками достаточно равномерное, α -клетки менее многочисленны, расположены по периферии островков (рис. 4.8).

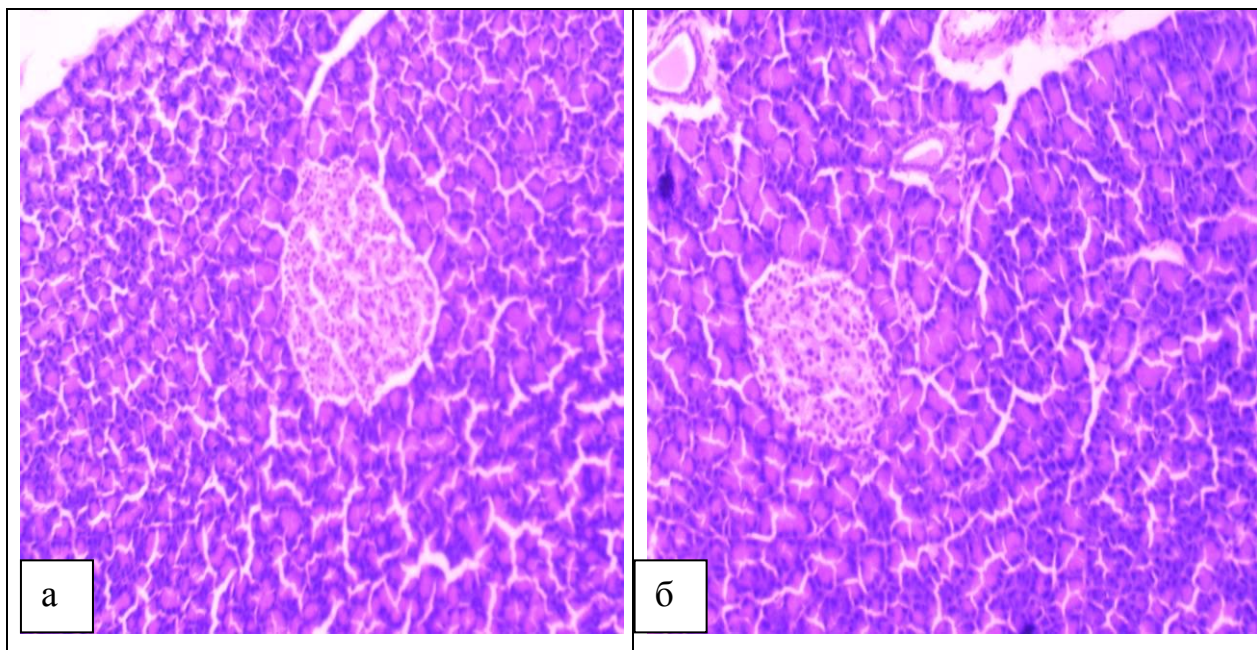


Рис. 4.8. Поджелудочная железа крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самец № 24) и 30 мл/кг (б, самка № 41). Состояние ацинусов экзокринной части железистой ткани и панкреатических островков не изменено. Гематоксилин-эозин. х100.

Яичники у всех самок микроскопически обычной структуры. С поверхности орган покрыт однослойным кубическим эпителием. Хорошо различается корковое и мозговое вещество. В корковом веществе видны яйцевые фолликулы различной степени зрелости (от примордиальных и растущих до преовуляторных). Часть фолликулов находилась на разной стадии атрезии. Развитие и атрезия фолликулов протекают асинхронно. Атрезия фолликулов носит физиологический характер и, в основном, затрагивает первичные и мелкие, средние фолликулы. Желтых тел много. Среди желтых тел четко различались свежие (молодые, данного цикла) и находящиеся в состоянии регрессивного процесса (тела предыдущих циклов), а также рубцы после инволюции желтых тел. В строме коркового вещества среди клеток стромы различаются немногочисленные интерстициальные клетки. Мозговая часть яичника представлена рыхлой соединительной тканью с боль-

шим количеством кровеносных сосудов. Объем мозгового слоя зрительно меньше коркового (рис. 4.9).

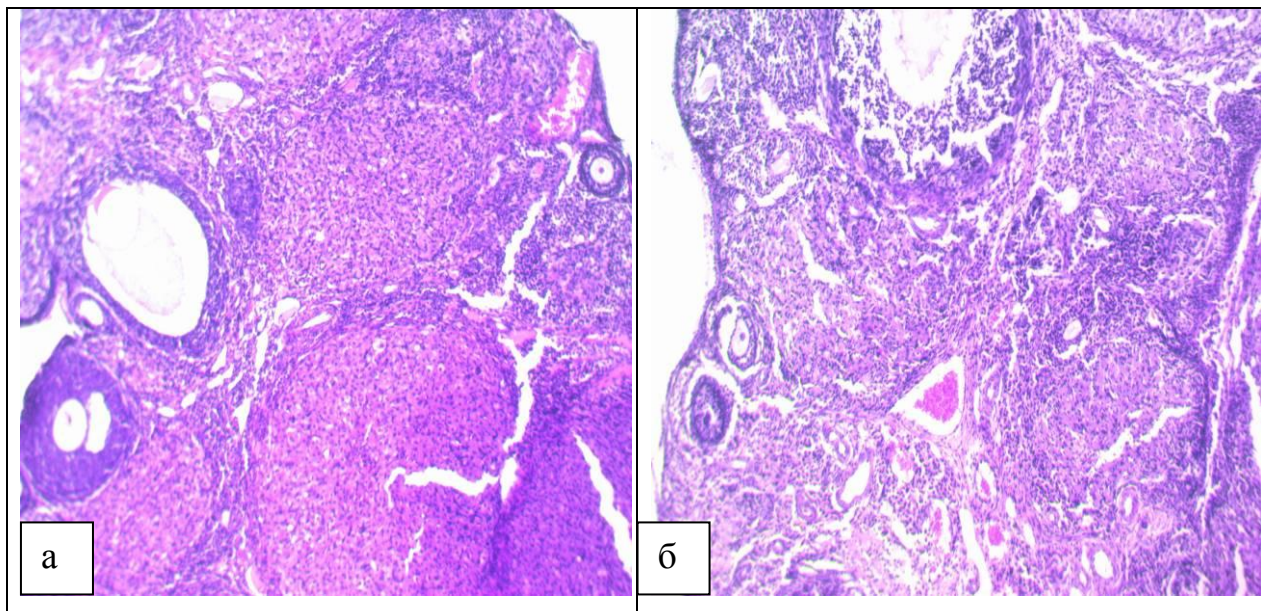


Рис. 4.9. Яичник самок крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, №25) и 30 мл/кг (б, №44). Видны яйцевые фолликулы разной степени зрелости, желтые тела. Гематоксилин-эозин. x100.

Яичко. Дольки яичка заполнены концентрическими или уплощенными профилями срезов семенных канальцев, достаточно плотно прилегающими друг к другу. Диаметр канальцев обычен, собственная оболочка канальцев, а также белочная и сосудистая оболочки соответствуют норме. В семенных канальцах видны 3-4 генерации сперматогенных клеток, которые находятся на разных стадиях развития. Клетки расположены концентрическими слоями, упорядоченно, в соответствии со стадиями сперматогенного цикла. У всех опытных и контрольных крыс клеточная популяция представлена в полном объеме. Около собственной оболочки канальца лежат достаточно многочисленные sustentocytes (клетки Сертоли), имеющие широкое основание и узкую вершину. Между семенными канальцами в соединительной ткани, чаще вокруг кровеносных сосудов, группируются немногочис-

ленные клетки с умеренно варьирующими по размеру ядрами – гландулоциты (клетки Лейдига). В разных канальцах у крыс разных групп эксперимента четко прослежен не только сперматогенез (процесс последовательных перестроек зародышевых клеток: сперматогония – сперматозоид), но и спермиогенез – этапы клеточных превращений от сперматиды до сперматозоида (рис. 4.10).

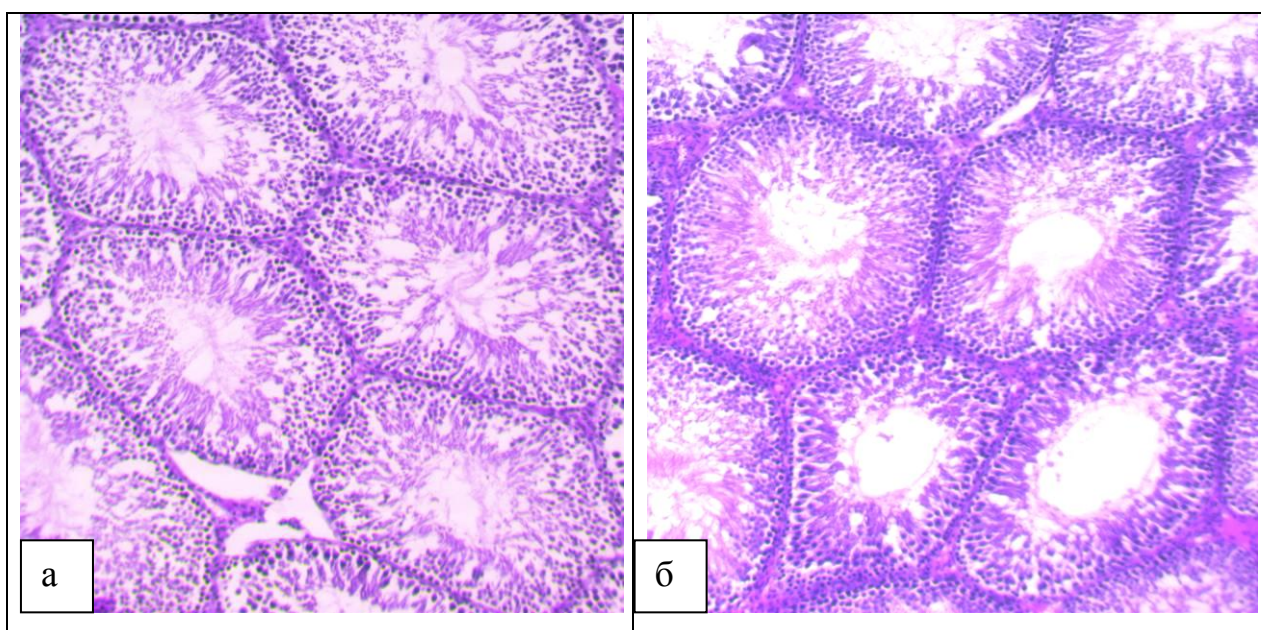


Рис. 4.10. Яичко самцов крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, №18) и 30 мл/кг (б, №43). В семенных канальцах представлены все типы половых клеток, процесс сперматогенеза не изменен. Гематоксилин-эозин. х200.

В исследованном фундальном отделе желудка крыс всех опытных и контрольной групп после длительного введения препарата «Декасан» эпителий, покрывающий слизистую оболочку, ямочный эпителий умеренно активный. Эпителиальные поверхностные клетки обычные по размеру, кое-где отмечено слущивание клеток. В собственных железах желудка дифференцируются все обязательные типы секреторных клеток, преобладают обкладочные клетки. Визуально функциональное состояние секреторных клеток у

опытных и контрольных животных сопоставимо. У части крыс разных групп просвет базальных отделов единичных железистых трубок несколько расширен. В строме слизистой оболочки содержание круглоклеточных элементов умеренное, нарушений микроциркуляции не отмечено (рис. 4.11).

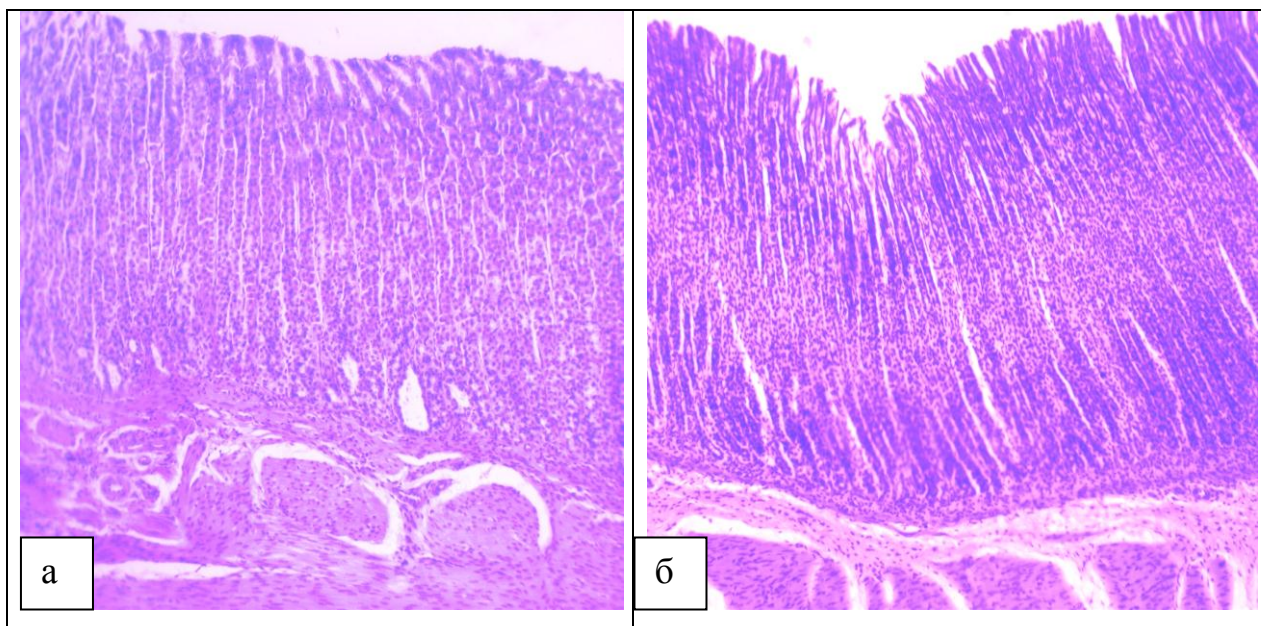


Рис. 4.11. Фундальный отдел желудка крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самец № 24) и 30 мл/кг (б, самец № 40). Нормальное состояние собственных желез, покровно-ямочного эпителия, всех облигатных клеток железистых трубок. Гематоксилин-эозин. $\times 100$.

Слизистая оболочка фрагмента тощей кишки. На микропрепаратах ворсинки слизистой по форме, толщине, высоте, плотности расположения после введения препарата «Декасан» в дозах 3 мл/кг и 30 мл/кг существенно не отличались от контрольных образцов. Морфофункциональное состояние всасывающих энтероцитов в эпителиальной выстилке ворсинок обычное. Количественное содержание бокаловидных клеток среди них не менялось. Кишечные крипты, клеточный состав стромы ворсинок и межкриптовых пространств, степень сосудистого полнокровия без особенностей (рис. 4.12).

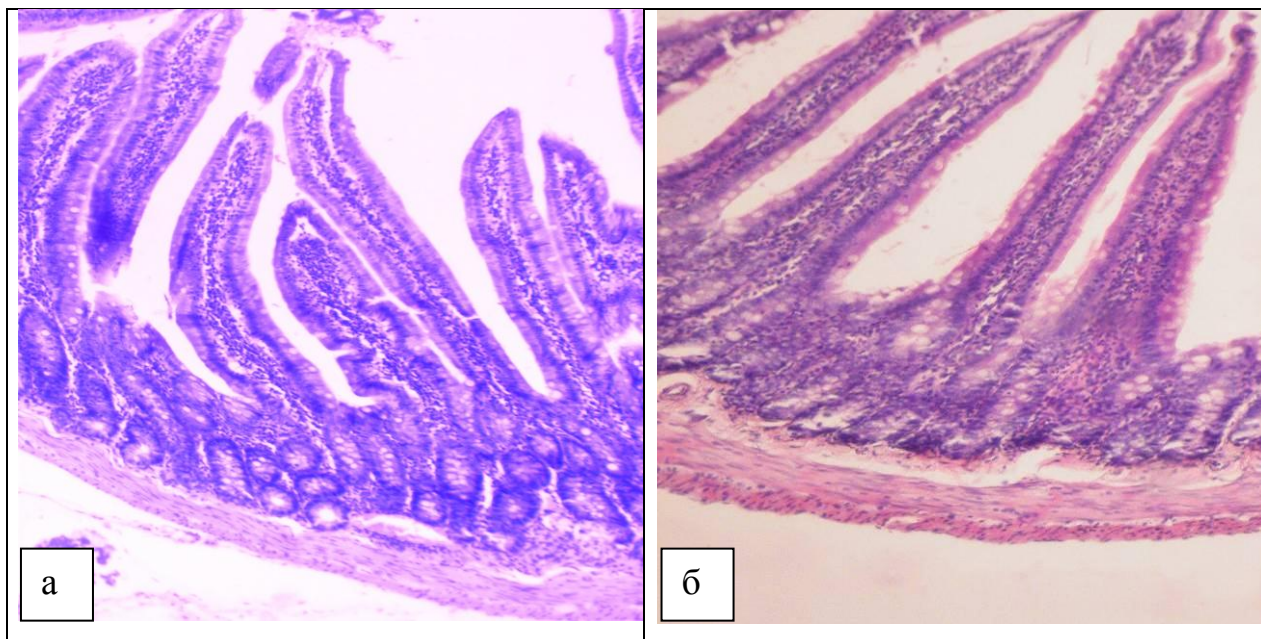


Рис. 4.12. Тонкая кишка крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самка № 28) и 30 мл/кг (б, самец №35). Состояние ворсинок слизистой не изменено, кишечные крипты и строма без особенностей. Гематоксилин-эозин. x100.

Слизистая оболочка толстой кишки (тазовый отдел прямой кишки). На всех обзорных препаратах сохранен характер складок слизистой оболочки, нормальные морфологические характеристики эпителиоцитов, интенсивность секретообразования бокаловидными клетками, клеточная и сосудистая насыщенность стромы (рис. 4.13).

Пищевод. У всех крыс слизистая оболочка пищевода выстлана многослойным плоским ороговевающим эпителием. Подслизистая основа слизистой оболочки выражена очень умеренно, прилежащий мышечный слой мощный. Признаки раздражения, дистрофии как в самой слизистой оболочке, так и в ее подслизистой основе отсутствовали (рис. 4.14).

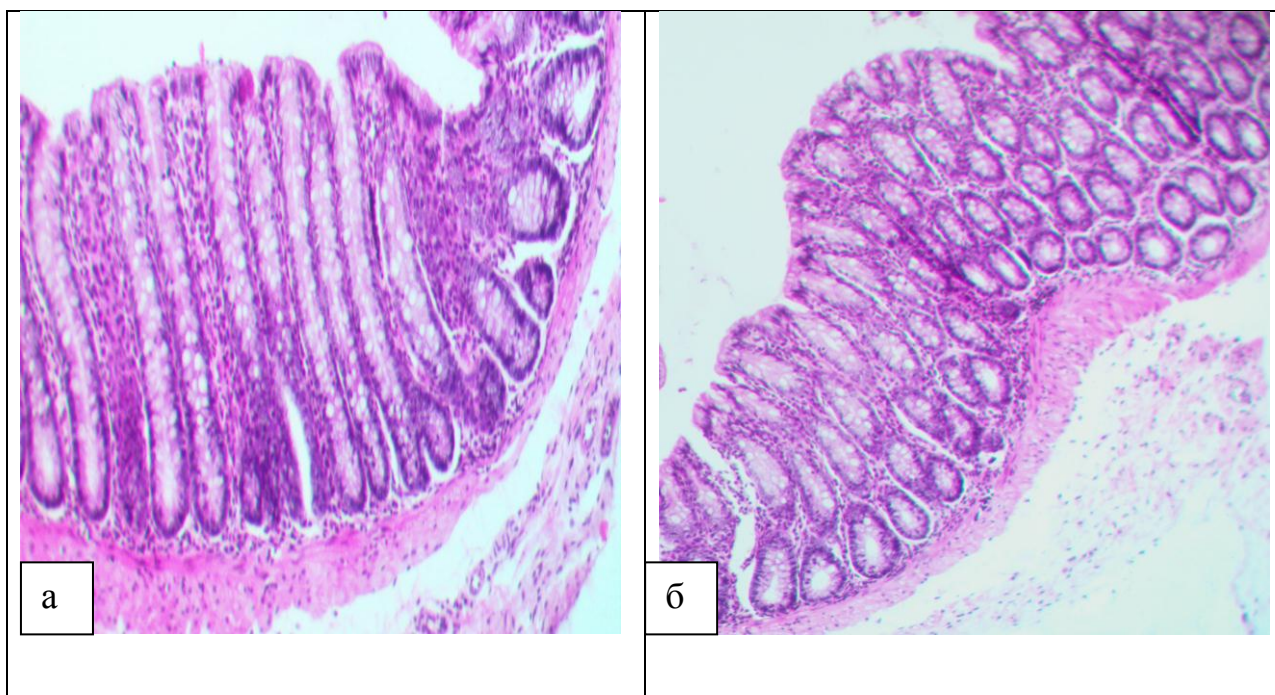


Рис. 4.13. Прямая кишка крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самка № 25) и 30 мл/кг (б, самец № 39). Нормальное состояние покровного эпителия, численности бокаловидных клеток, кишечных крипт. Гематоксилин-эозин. x100.

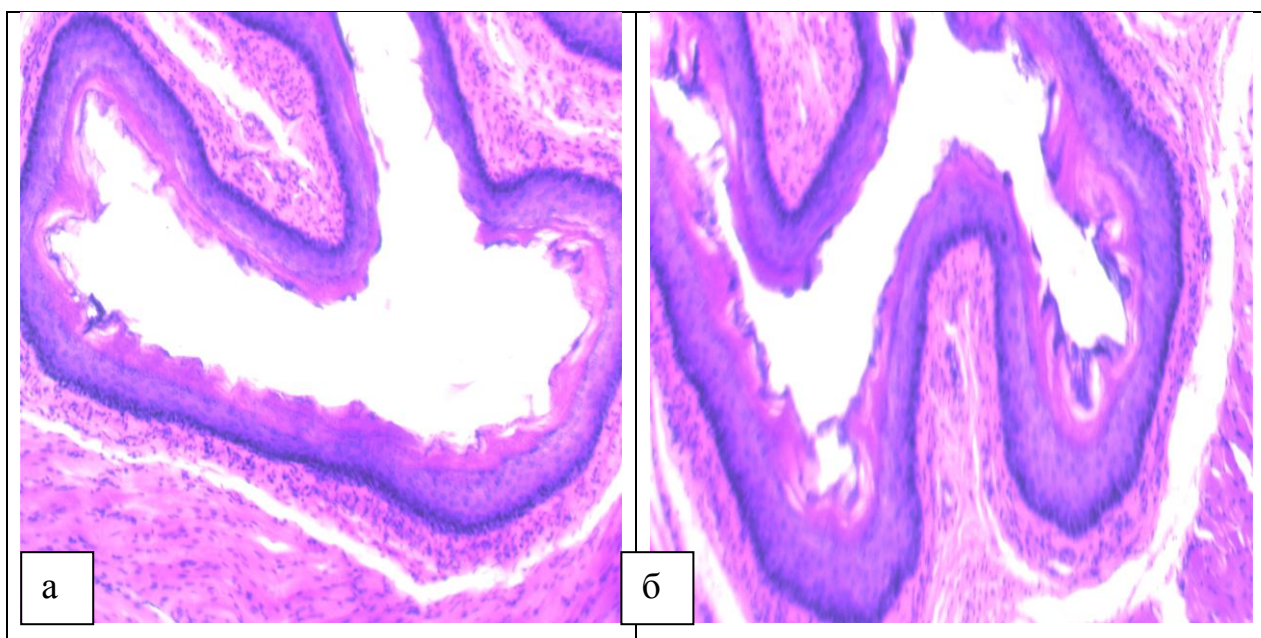


Рис. 4.14. Пищевод крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самка № 27) и 30 мл/кг (б, самка № 48). Слизистая оболочка без изменений, представлена многослойным ороговевающим эпителием, умеренно клеточной стромой. Гематоксилин-эозин. x100.

В головном мозге исследовали область двигательного и чувствительного анализаторов коры больших полушарий – сенсомоторную зону. Для этого делали фронтальный разрез головного мозга на уровне передних краев височных костей. На образованной пластинке тестировали только кору. Как показала обзорная микроскопия, у опытных крыс после введения препарата «Декасан» в обоих исследованных дозах лапидарность (четкость) и вертикальная упорядоченность слоев в сенсомоторной зоне коры больших полушарий не изменялись сравнительно с контрольными животными. Не заметны были изменения в состоянии нейропиля, расположении нервных клеток в слоях и размерах нейронов (в пределах одного слоя). Введение препарата «Декасан» в исследованных дозах не влияло на взаимоотношения клеток глии и нейронов (отсутствие усиления сателлитоза). Отсутствовали видимые при световой микроскопии изменения в состоянии сосудов мягкой мозговой оболочки и капилляров ткани мозга (рис. 4.15).

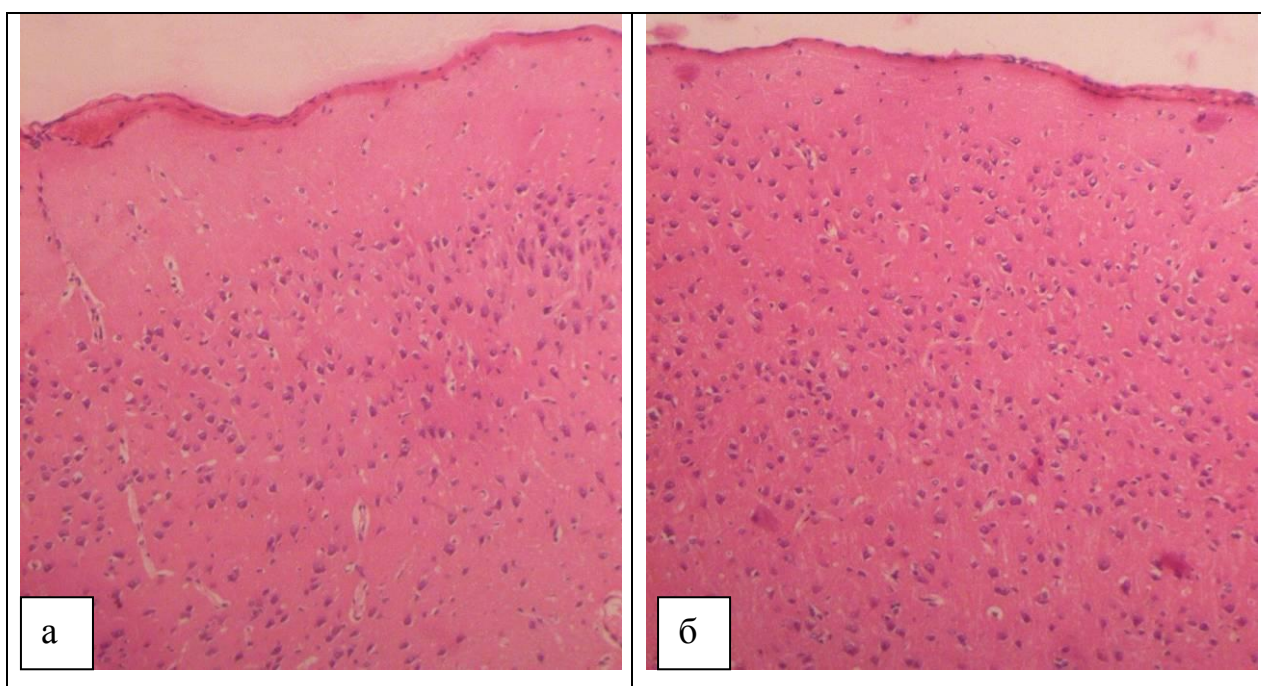


Рис. 4.15. Сенсомоторная зона коры больших полушарий головного мозга крыс после введения препарата «Декасан» в дозе 3 мл/кг (а, самец № 23) и 30 мл/кг (б, самец № 38). Нормальная гистоархитектоника слоев. Гематоксилин-эозин. x100.

Анализируя полученные в данном эксперименте данные патоморфологических исследований, можно сделать выводы, что препарат «Декасан» в исследованных дозах не вызывает морфологических признаков кардиотоксического, нефротоксического, гепатотоксического действия на организм экспериментальных животных, не вызывает реактивных изменений коры надпочечников, не нарушает состояние легочной ткани, не оказывает влияния на морфофункциональное состояние органов иммунной системы, репродукции, сенсомоторной коры больших полушарий. Препарат «Декасан» при внутрижелудочном пути введения как в дозе 3 мл/кг, так и в дозе 30 мл/кг не оказывает раздражающего действия на слизистую оболочку пищевода и желудка.

5. ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ДЕКАСАНА

5.1. Изучение антимикробной активности Декасана в условиях *in vitro*

5.1.1. Изучение антимикробной активности Декасана методом кратных серийных разведений

Исследование антимикробной активности Декасана *in vitro* проводили методом кратных серийных разведений с использованием следующих штаммов микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC25923=NCDC=25923=F-49; *Streptococcus pyogenes* IBC(№1)=ГICK 130001; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853= NCDC=F-51; *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) = NCDC=F 50; *Klebsiella pneumoniae* NCTC 5055=SS B 5055; *Bacillus subtilis* ATCC6633; *Candida albicans* CCM 885.

Опыты проводили путем двукратных разведений препарата в 2 мл мясопептонного бульона (МПБ, среду № 1) (всего 10 пробирок) [69]. Для каждого разведения использовали отдельную пипетку. После этого в каждую пробирку вносили по 0,2 мл микробной взвеси тест-штамма с соответствующим количеством микробных клеток. Дополнительно готовили контроль: 2 пробирки с 2 мл используемой среды в каждой – контроль среды; 2 пробирки с 2 мл используемой среды, в которую также вносили 0,2 мл микробной взвеси тест-штамма – контроль роста тест-микроорганизма.

Посевы помещали в термостат на 18-24 ч. Результаты определяли визуально по наличию или отсутствию мутности среды в пробирках. Концентрация препарата в последней пробирке с прозрачной средой (отсутствие видимого невооруженным глазом роста тест-штамма) соответствует минимальной ингибирующей концентрации (МИК) препарата. В контроле роста тест-микроорганизма должен наблюдаться рост микроорганизмов; контроль среды должен быть стерильным.

Для определения минимальной бактерицидной концентрации (МБК) из 2-3 последних пробирок с прозрачной средой делали высевы по 0,1 мл содержимого каждой пробирки на чашки с плотной питательной средой. Выдерживали в термостате 18-24 часа при 37 °С и отмечали ту минимальную концентрацию, высеив из которой не дал рост на агаре. Это количество препарата соответствует его МБК [69].

Полученные данные анализировали общепринятыми статистическими методами. Принят уровень значимости $p \leq 0,05$ [21-23]. Результаты исследования представлены в таблице 5.1.

Таблица 5.1

**Характеристика антимикробной активности Декасана
методом кратных серийных разведений**

Показатели Микроорганизм	МИК Декасана, мкг/мл	МБК Декасана, мкг/мл
<i>Staphylococcus aureus</i>	1,7±1,2	3,2±2,3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2,2±1,8	4,1±2,4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	166,6±64,5	208,3±64,5
<i>Escherichia coli</i>	10,4±4,0	15,6±8,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,6±0,9	2,7±1,1
<i>Bacillus subtilis</i>	18,2±6,3	26,0±18,9
<i>Candida albicans</i>	9,75±4,7	15,6±8,5

По результатам проведенных исследований выявлено, что Декасан обладает широким спектром антибактериальной активности в отношении грамположительных (*S.aureus*, *B.subtilis*) бактерий, представителей семейства энтеробактерий (*E.coli*) и антифунгальной активностью в отношении грибов рода *Candida*. Наименее активным был Декасан по отношению к синегнойной палочке (*P. aeruginosa*). Установлено, что Декасан характеризует-

ся широким спектром избирательно выраженных антибактериальных свойств в соответствии регламентированным ГФУ1 тест-штаммов. При этом следует отметить, что Декасан характеризуется выраженным бактерицидным и фунгицидным действием.

Обобщая результаты данной серии исследования, можно сделать вывод о том, что Декасан является перспективным антимикробным препаратом для внедрения в медицинскую практику с целью лечения кишечных инфекций.

5.1.2. Изучение антимикробной активности Декасана методом колодцев

Исследование антимикробной активности Декасана *in vitro* проводили методом диффузии в агар (колодцев) с использованием следующих штаммов микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* ATCC25923=NCDC=25923=F-49; *Streptococcus pyogenes* IBC(№1)=ГICK 130001; *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853= NCDC=F-51; *Escherichia coli* ATCC 25922 (F-50) = NCDC=F 50; *Klebsiella pneumoniae* NCTC 5055=SS B 5055; *B.subtilis* ATCC6633; *Candida albicans* ССМ 885 [69]. Опыты проводили методом, основанным на способности лекарственных веществ проникать в толщу агара. Чашки Петри заливали двумя слоями твердой питательной среды. Нижний слой – 10 мл растопленного «голодного» агара АГВ (среда № 3), верхний слой – питательная среда для соответствующего тест-штамма. После охлаждения нижнего слоя агара на нем устанавливали на равном расстоянии друг от друга и от края чашки три стальных цилиндра (внутренний диаметр – $6,0 \pm 0,1$ мм, высота – $10,0 \pm 0,1$ мм). Вокруг цилиндров заливали верхний слой – 13,5 мл растопленного и охлажденного до $45-48^{\circ}\text{C}$ агара, смешанного с посевной дозой тест-микроорганизма (1,5 мл микробной взвеси концентрации, соответствующей виду микроорганизма). После охлаждения верхнего слоя агара цилиндры вынимали стерильным пинцетом и в полученные лунки помеща-

ли 0,25-0,3 мл исследуемого препарата. Учет результатов проводили через 24 ч путем измерения зоны подавления роста, включая диаметр лунок. Измерения проводили с точностью до 1 мм, при этом ориентировались на полное отсутствие видимого роста. Полученные данные анализировали общепринятыми статистическими методами. Принят уровень значимости $p \leq 0,05$ [21-23]. Результаты представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2

Характеристика антимикробной активности Декасана по влиянию на зону роста микроорганизмов методом диффузии в агар (колодцев)

Показатель Микроорганизм	Зона задержки роста микроорганизмов, мм
<i>Staphylococcus aureus</i>	41,16±4,79
<i>Streptococcus pyogenes</i>	38,20±13,70
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	14,60±2,30
<i>Escherichia coli</i>	24,50±2,70
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	34,30±11,70
<i>Bacillus subtilis</i>	23,60±2,80
<i>Candida albicans</i>	29,00±4,50

По результатам проведенных исследований установлено, что Декасан проявил выраженную антимикробную активность как в отношении грамположительных (*S.aureus*, *S.pyogenes*, *B.subtilis*), так и грамотрицательных (*E.coli*, *K.pneumoniae*) микроорганизмов (табл. 5.2). По отношению к *P.aeruginosa* антимикробная активность менее выражена. В отношении грибов рода *Candida* Декасан проявил выраженную фунгистатическую активность.

Таким образом, Декасан проявляет выраженную противомикробную активность в условиях *in vitro* и может быть рекомендован для лечения кишечных инфекций.

5.2. Изучение антимикробной активности Декасана в условиях *in vivo*

5.2.1. Изучение антимикробной активности Декасана на модели инфекционного колопроктита у крыс, вызванного *S.aureus*

Для определения химиотерапевтической активности препарата «Декасана» моделировали колопроктит с помощью внутрикишечного введения взвеси микроорганизмов *S.aureus* ATCC 29213 в дозе 1×10^8 . Колопроктит воспроизводили специально разработанным способом. Под наркозом (тиопентал натрий, 70 мг/кг) зафиксированным на спине крысам, предварительно лишенным пищи в течение 24 часов, в асептических условиях выполняли срединную лапаротомию. Через прямую кишку под визуальным и пальпаторным контролем вводили соединенный со шприцем гибкий катетер (использовали подключичный катетер), заполненный взвесью патогенных микроорганизмов. Конец катетера продвигали до поперечной ободочной кишки, после чего в кишечник осторожно вводили взвесь микроорганизмов в дозе 1×10^8 в объеме 1,5 мл. Катетер осторожно извлекали, избегая вытекания введенной жидкости. Операционную рану послойно ушивали.

Предварительное исследование показало, что после данного воздействия гнойно-некротические изменения в толстой и прямой кишке формировались у животных на 3-4 сутки и характеризовались гиперемией, отеком и образованием эрозивной поверхности. Эти данные подтверждают адекватность использованной модели.

Интakтным контролем служили ложнооперированные крысы, которым выполняли все описанные манипуляции, но кишечник заполняли эквивалентным объемом стерильного 0,9% раствора натрия хлорида.

Дизайн эксперимента представлен в таблице 5.3.

Таблица 5.3

Дизайн изучения антимикробной активности Декасана в условиях модели инфекционного колoproктита у крыс, вызванного *S.aureus*

Экспериментальные группы	Инфицирующая доза микроорганизмов <i>S.aureus</i>	Доза препарата, мл/кг	Количество крыс в группе
Интактный (оперированный) контроль (ИОК)	–	–	8
Контрольная патология (КП)	1×10^8	–	8
Декасан	1×10^8	3,0	8
Нифуроксазид	1×10^8	1,2	8

Для проведения эксперимента было использовано 32 белых беспородных половозрелых крысы массой 130-150 г, распределенных по группам согласно таблице 5.3. Через 1 сутки и в течение 7 дней после моделирования инфекционного колoproктита животным опытных групп вводили исследуемые препараты, а контрольным – эквивалентное количество растворителя.

В качестве референсного был выбран аналог по действию препарат «Нифуроксазид» из фармакотерапевтической группы «Противомикробные средства, применяемые при кишечных инфекциях», в виде суспензии для орального применения.

Для оценки терапевтического антимикробного действия Декасана и референсного препарата Нифуроксазида применяли физиологические, микробиологические, клинические, биохимические и морфологические методы исследования [54-68]. О состоянии трофических процессов в организме под-

опытных крыс судили по динамике массы тела. Степень инфицирования определяли по числу колониобразующих единиц (КОЕ), полученных из собранных непосредственно из прямой кишки испражнений животных на 3-й и 6-й день эксперимента. Для оценки тяжести заболевания и эффективности лечения проводили клинический анализ крови на 6-й день.

По окончании опыта после вывода животных из эксперимента под эфирным наркозом собирали кровь для биохимических исследований и иссекали участок кишечника (ободочная и прямая кишка) для проведения морфологического исследования. Все образцы толстого кишечника (участки поперечной и нисходящей части ободочной кишки, тазового отдела прямой кишки крыс) фиксировали в 10% формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в целлоидин-парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином [53]. Просмотр микропрепаратов проводили под микроскопом Granum, фотографирование изображений выполняли цифровой видеокамерой Granum ДСМ 310. Фотоснимки обрабатывали на компьютере Pentium 2,4GHz с помощью программы Tour View.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica 6.0». Для получения статистических данных использовали параметрические и непараметрические методы: дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кейлса, метод Краскела-Уоллиса, критерий Манна-Уитни и критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони. При сравнении статистических выборок был принят уровень значимости $p \leq 0,05$ [21-23]. Результаты исследований представлены в таблицах 5.4-5.8.

Таблица 5.4

Динамика массы тела крыс в условиях инфекционного колoproктита, вызванного *S.aureus*, под влиянием Декасана и Нифуроксазида

Показатели	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
Исходное состояние	131±4	131±4	131±3	131±3
1 сутки	118±4	119±4	113±2	121±3
4 сутки	127±5	131±4	134±3	129±5
7 сутки	147±4	136±3*	151±5**	133±5

Примечания.

1. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.
2. * – отклонения значимы относительно ИОК, $p < 0,05$.
3. ** – отклонения значимы относительно КП, $p < 0,05$.

Таблица 5.5

Динамика степени инфицирования фекалий крыс в условиях инфекционного колoproктита, вызванного *S.aureus*, под влиянием Декасана и Нифуроксазида

Показатели	Колониеобразующие единицы, КОЕ/мл			
	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
3 сутки	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7$	$8,6 \cdot 10^7$
6 сутки	$2 \cdot 10^4$	$4 \cdot 10^6$	$5,3 \cdot 10^5$	$3,9 \cdot 10^6$

Примечание. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.

Таблица 5.6

**Гематологические показатели крыс в условиях инфекционного
колопроктита, вызванного *S.aureus* , под влиянием Декасана
и Нифуроксазида ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)**

Показатели	ИОК	КП	Декасана	Нифуроксази д
Гемоглобин, г/л	155,58±4,3 9	150,35±2,9 8	156,63±7,00	166,74±2,68
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,02±0,08	5,06±0,10	5,03±0,14	5,46±0,07
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	23,39±2,32	18,61±1,09	22,00±2,36	19,70±1,71
<i>Лейкоцитарная формула, %:</i>				
Нейтрофилы палочкоядерные	1,0 (0,0÷2,0)	5,3 (4,0÷6,0)*	2,7 (0,0÷6,0)	3,8 (1,0÷6,0)*
Нейтрофилы сегментоядерные	12,0 (8,0÷19,0)	26,1 (22,0÷31,0) *	24,4 (21,0÷29,0)*	31,3 (11,0÷58,0)*
Эозинофилы	0,83 (0,0÷2,0)	4,0 (3,0÷6,0)*	1,3 (0,0÷3,0)**/** *	3,5 (2,0÷6,0)*
Лимфоциты	84,5 (77,0÷90,0)	59,5 (54,0÷64,0) *	68,0 (64,0÷75,0)*/* *	59,8 (39,0÷81,0)*
Моноциты	1,7 (1,0÷3,0)	5,0 (3,0÷6,0)*	4,1 (1,0÷6,0)*/**	1,5 (0,0÷3,0)**

Примечания.

1. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.
2. * – отклонения значимы относительно оперированного контроля, $p < 0,05$
3. ** – отклонения значимы относительно контрольной патологии, $p < 0,05$.
4. *** – отклонения значимы относительно препарата сравнения, $p < 0,05$.

Таблица 5.7

Показатели гемостаза крыс в условиях инфекционного колoproктита, вызванного *S.aureus*, под влиянием Декасан и Нифуроксазида

Показатели	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
Время свертывания, с	149,33±10,43	153,29±14,61	164,43±14,03	155,71±7,97
Фибриноген, г/л	3,52±0,77	3,37±0,56	4,12±0,66	3,37±0,56
Протромбиновое время, с	23,98±4,78	28,90±6,36	20,67±3,16	27,78±6,58

Примечание. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.

Таблица 5.8

Биохимические показатели сыворотки крови крыс при инфекционном колoproктите, вызванном *S.aureus*, под влиянием Декасан и Нифуроксазида, ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатели	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
Мочевина, ммоль/л	4,61±0,11	4,14±0,22	4,43±0,30#	5,12±0,24**
АлАТ, ммоль/л·час	0,38±0,02	0,47±0,02*	0,45±0,02*	0,55±0,02*
АсАТ, ммоль/л·час	0,76±0,04	0,85±0,05	0,81±0,04	0,82±0,02
Креатинин, ммоль/л	0,091±0,008	0,082±0,004	0,076±0,005	0,082±0,006
Общий белок, г/л	64,63±1,43	57,71±1,52	56,69±2,74	56,64±2,49
Щелочная фосфатаза, мкмоль/л	7,18±1,27	6,03±0,61	5,26±0,43	8,66±0,85

Примечания.

1. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.
2. * – отклонения значимы относительно ИОК, $p < 0,05$.
3. ** – отклонения значимы относительно КП, $p < 0,05$.
4. # – отклонения значимы относительно препарата сравнения, $p < 0,05$.

Анализ полученных результатов, представленных в таблицах 5.4-5.8, свидетельствует о том, что в условиях инфекционного колопроктита, вызванного *S.aureus*, при пероральном применении Декасан (0,02% раствор декаметоксина) проявляет выраженные антимикробные свойства, превосходящие антимикробную активность Нифуроксазида и способствующие восстановлению функционального состояния организма животных. Так, в отличие от Нифуроксазида Декасан вызывает достоверное по сравнению с группой контрольной патологии увеличение на 11% массы тела животных (табл. 5.4). Выраженная антимикробная активность Декасана подтверждается снижением по сравнению с группой контрольной патологии почти на порядок (в 7,5 раза) числа колониеобразующих единиц возбудителя на 6-й день эксперимента, в то время как под влиянием Нифуроксазида этот показатель остается на уровне группы контрольной патологии (табл. 5.5). По выраженности антимикробного действия Декасан превосходит референсный Нифуроксазид в 7,4 раза (табл. 5.5). О терапевтическом эффекте антимикробного действия Декасана свидетельствует достоверное в сравнении с группой контрольной патологии восстановление показателей лейкоцитарной формулы: эозинофилов, лимфоцитов и моноцитов (табл. 5.8).

Подтверждают вышеназванные показатели антимикробной активности Декасана результаты морфологического исследования (рис. 5.1-5.11). Группа интактного (оперированного) контроля. Слизистая оболочка всех изученных отделов толстого кишечника выстлана однослойным высоким

призматическим эпителием, с включением большого количества бокаловидных клеток. Ядра эпителиальных клеток овальной формы, расположены в базальной части, на одном уровне. Кутикулярная каемка на апикальном полюсе клеток отчетлива. Бокаловидные клетки содержат крупную секреторную вакуоль, ядро оттеснено базально, мелкое, гиперхромное. Кишечные крипты глубокие, расположены вертикально, достаточно близко друг к другу. Они не ветвятся, их закругленные донные отделы находятся вблизи от мышечной пластинки. Число бокаловидных клеток среди клеток криптового эпителия выше, чем в покровном эпителии, они равномерно распределены по всей длине крипт, секреторная вакуоль крупная. Герминативная зона крипт ограничена областью дна. Строма собственной пластинки слизистой оболочки умеренно клеточна, содержит в основном лимфоидные и гистиоцитарные клетки с небольшой примесью тканевых эозинофилов (рис. 5.1).

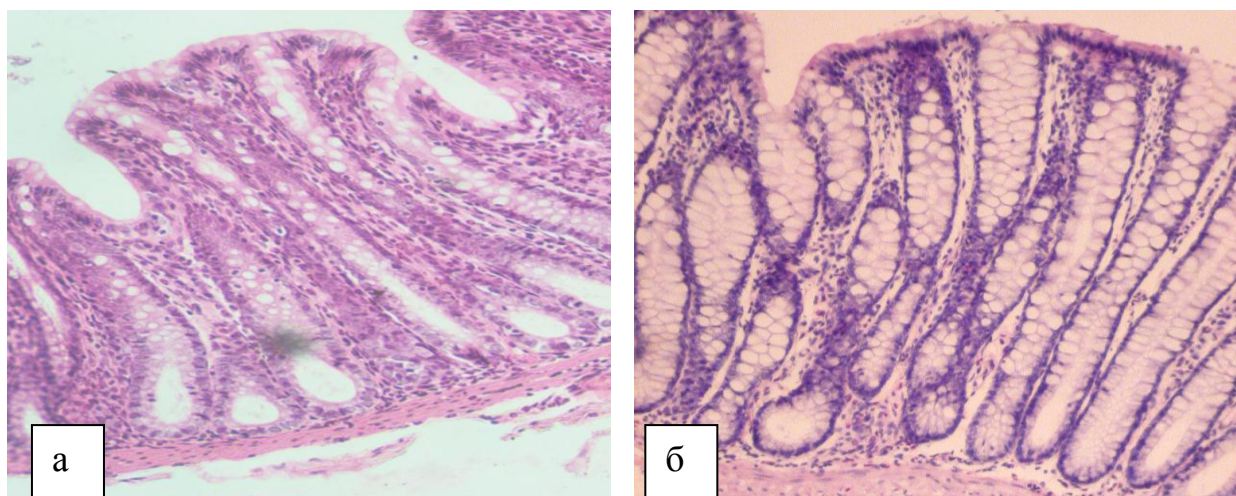


Рис. 5.1. Слизистая оболочка поперечной части ободочной (а) и прямой (б) кишки не инфицированных крыс. Нормальное состояние покровного эпителия, кишечных крипт и собственной пластинки. Гематоксилин-эозин. x200.

Группа контрольной патологии. На поверхности слизистой оболочки всех исследованных отделов толстого кишечника видны как обособленные очаги колонизации микроорганизмов, так и конгломераты слизи, слущенных клеток и микроорганизмов (рис. 5.2).

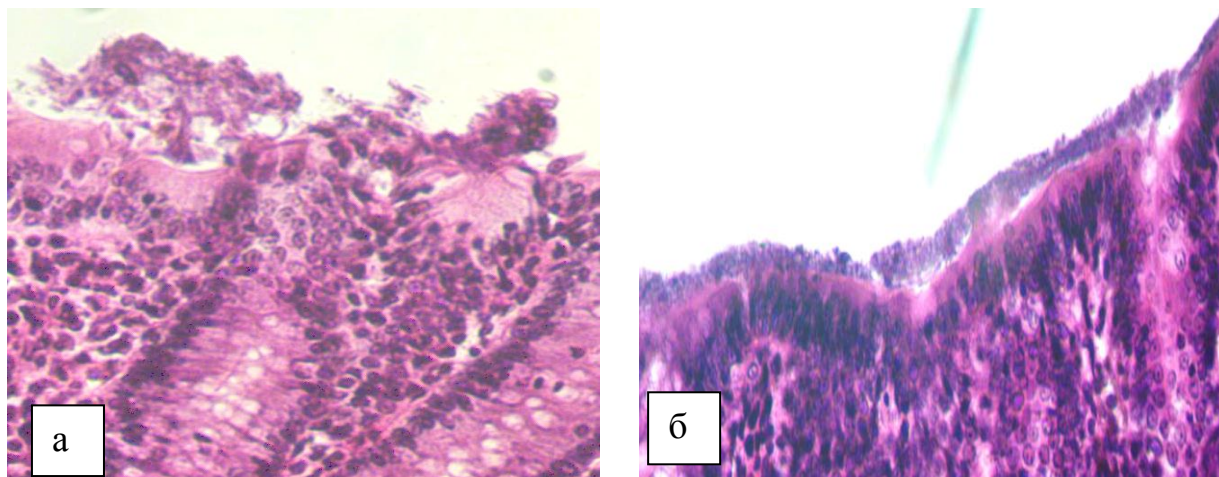


Рис. 5.2. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus*: ободочная кишка – на поверхности слизистой оболочки конгломерат слизи, микроорганизмов и слущенных клеток (а); прямая кишка – очаги колонизации микроорганизмов на поверхности (б). Гематоксилин-эозин. х250.

В поверхностном эпителии обнаруживали признаки «раздражения». Клетки теряли однорядность расположения, четкость кутикулярной каемки. Апикальные отделы части клеток выражено «разрыхлены». Ядра часто смещены в направлении просвета кишки. Прослежен экзоцитоз – проникновение мононуклеарных клеток в эпителий (рис. 5.3).

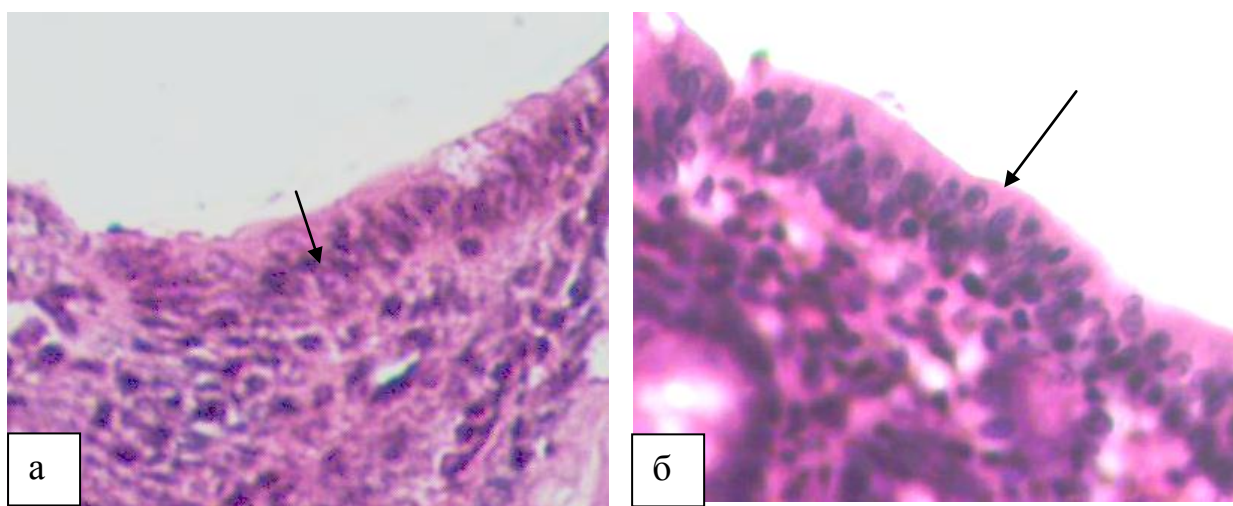


Рис. 5.3. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus*. «Раздражение» эпителия, экзоцитоз: ободочная кишка (а); прямая кишка (б). Гематоксилин-эозин. x400.

Достаточно часто отмечали формирование поверхностных микроэрозий (рис. 5.4).

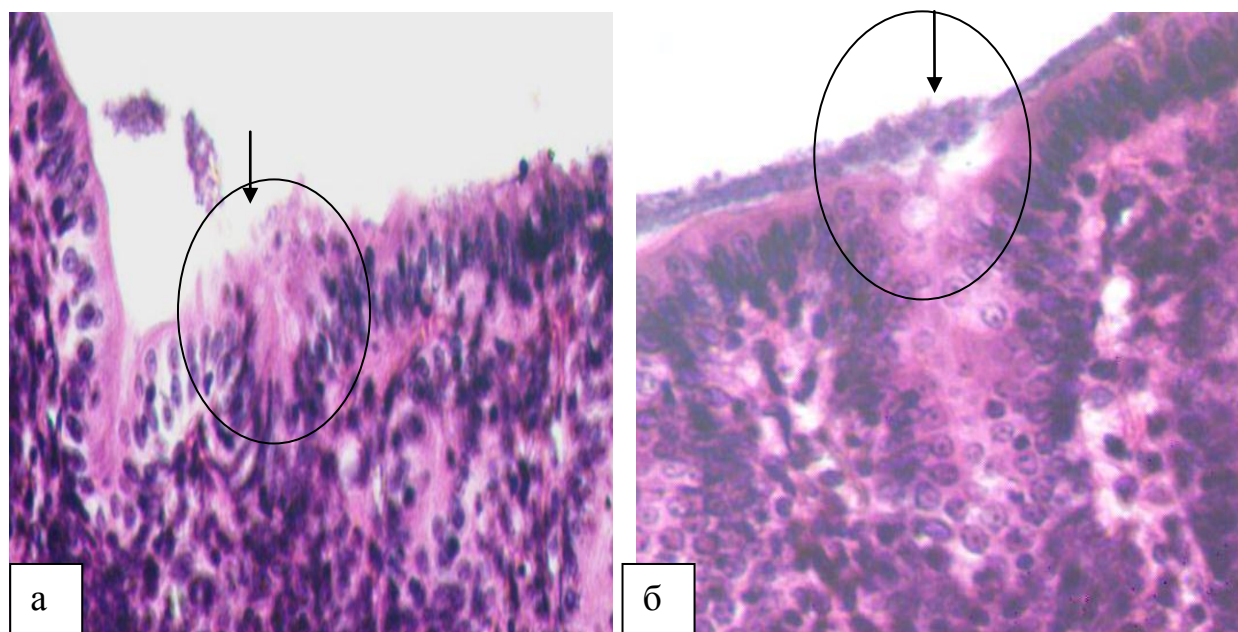


Рис. 5. 4. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus*. Формирование мелких поверхностных эрозий: ободочная кишка (а); прямая кишка (б). Гематоксилин-эозин. x250.

Выраженно снижено содержание бокаловидных клеток, содержащаяся в их цитоплазме секреторная вакуоль резко уменьшена в размере, что свидетельствует о угнетении секреторной активности. В кишечных криптах содержание и секреторная активность бокаловидных клеток также резко снижены, герминативная зона расширена до центральной и верхней трети длины их. Как в поверхностных, так и более глубоких отделах крипт видны разные по степени «сформованности», разные по численности «крипт-абсцессы» – скопление в просвете слущенных клеток, мононуклеаров, нейтрофильных гранулоцитов (рис. 5.5). В некоторых криптах (в эпители-

альной выстилке) отмечены только относительно немногочисленные погибшие или гибнущие клетки, которые приобретали четко очерченную округлую форму, интенсивную базофилию, ядра в основном лизированы.

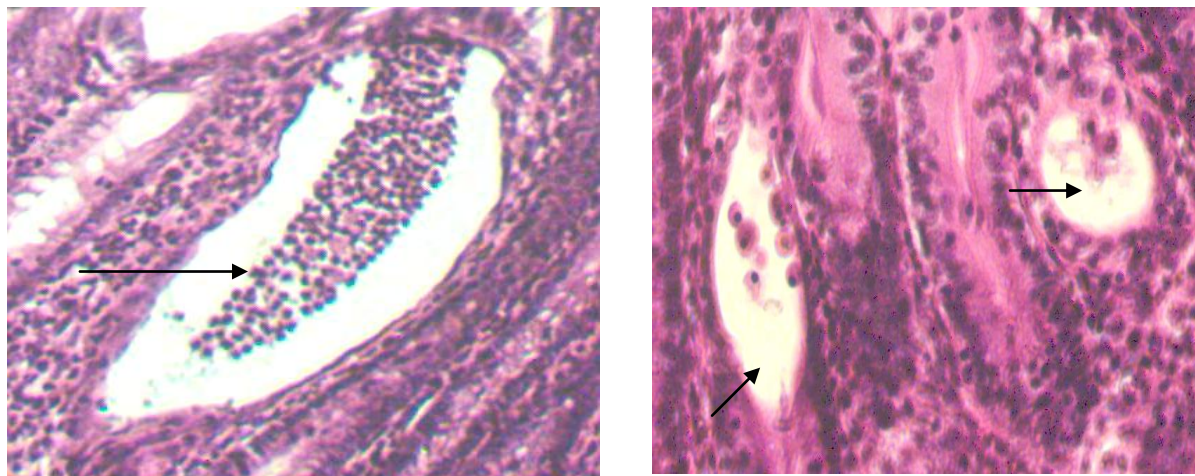


Рис. 5.5. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus*: ободочная кишка – сформировавшийся «крипт-абсцесс» (а, х200); прямая кишка – формирование «крипт-абсцессов» (б, х250). Гематоксилин-эозин.

Строма собственной пластинки слизистой оболочки повышено клеточна. Среди многочисленных мононуклеаров видны и нейтрофильные гранулоциты. Инфильтрация преимущественно диффузного характера, распространялась на различную глубину слизистой оболочки. В ряде случаев мононуклеары «вытесняют – замещают» кишечные крипты (рис. 5.6).

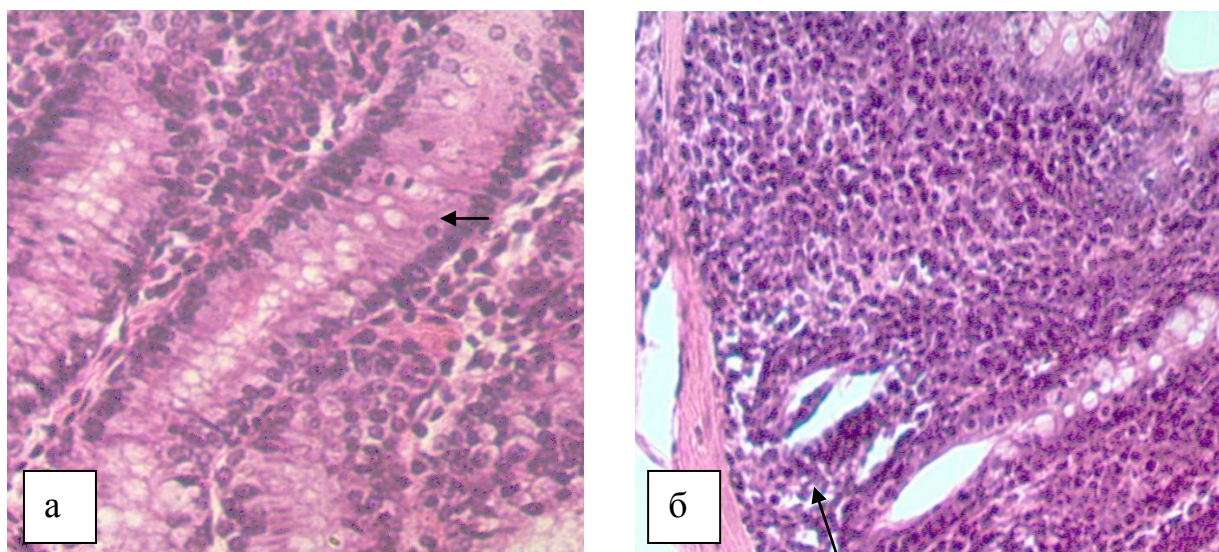


Рис. 5.6. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus*: ободочная кишка – выраженное расширение герминативной зоны крипт – митоз в верхней трети крипты (а, x250); кишечные крипты «замещены» мононуклеарами, «крипт-абсцесс» (б, x250). Гематоксилин-эозин.

В подслизистом слое слизистой оболочки отмечено расширение и тромбоз кровеносных сосудов, гипертрофия лимфоидных фолликулов.

После введения препарата «Декасан» практически вся поверхность слизистой оболочки исследованных отделов толстой кишки чистая, свободная от очагов колонизации микроорганизмов и слизи. Отмечены лишь единичные слущенные клетки (рис. 5.7).

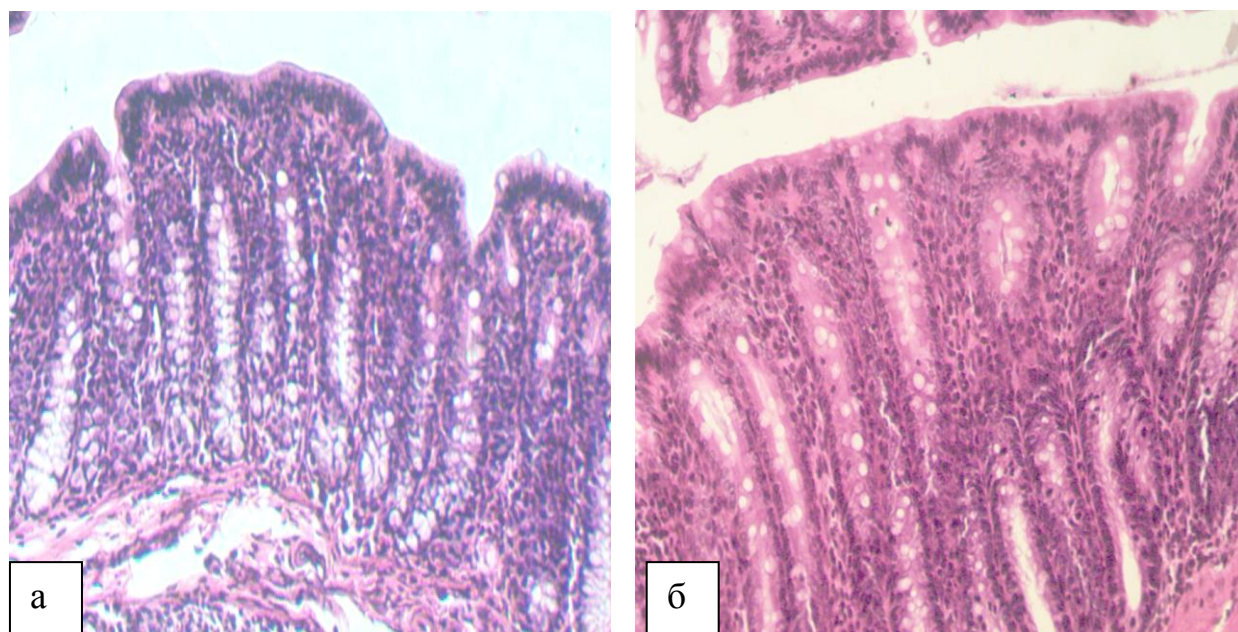


Рис. 5.7. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus* и леченных препаратом «Декасан»: ободочная (а) и прямая (б) кишка. Поверхностный эпителий не поврежден, содержание и секреторная активность бокаловидных клеток увеличены. Гематоксилин-эозин. x200.

Целостность поверхностного эпителия не нарушена, но просматривались признаки раздражения эпителиальных клеток, экзоцитоза. Содержание бокаловидных клеток увеличено, функционально они значительно более полноценны (рис. 5.8).

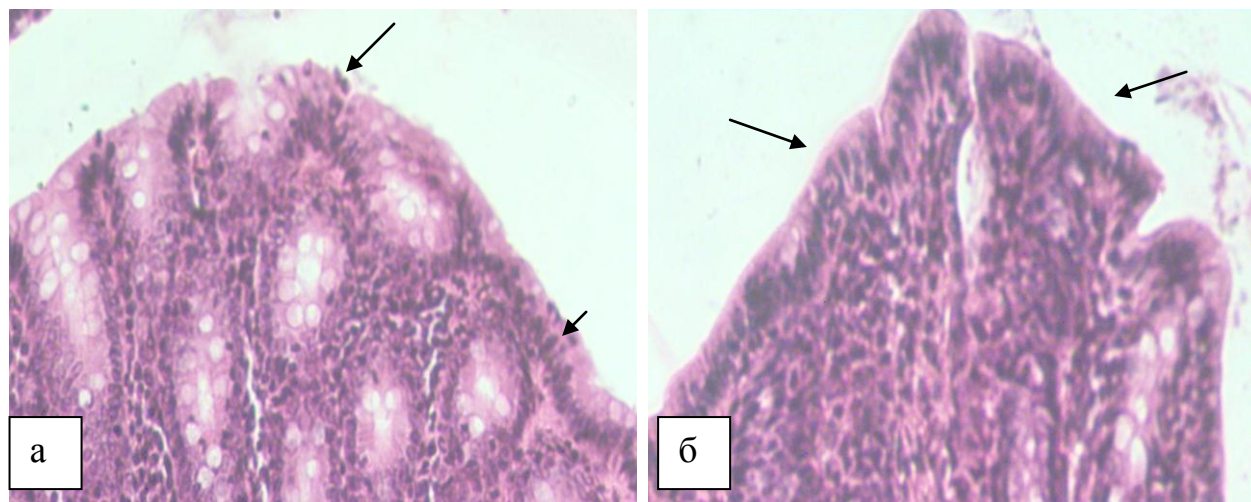


Рис. 5.8. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus* и леченных препаратом «Декасан»: ободочная – очень умеренный экзоцитоз (а) и прямая – смещение ядер эпителиальных клеток в направлении просвета кишки (б). Гематоксилин-эозин. х250.

У большинства животных относительно контрольной патологии заметно уменьшены «крипт-абсцессы» и гибнущие клетки в криптах. Во всех исследованных областях толстой кишки сохранены участки с повышенным содержанием мононуклеаров в строме собственной пластинки слизистой оболочки (рис. 5.9). Нарушений местной гемодинамики не наблюдали.

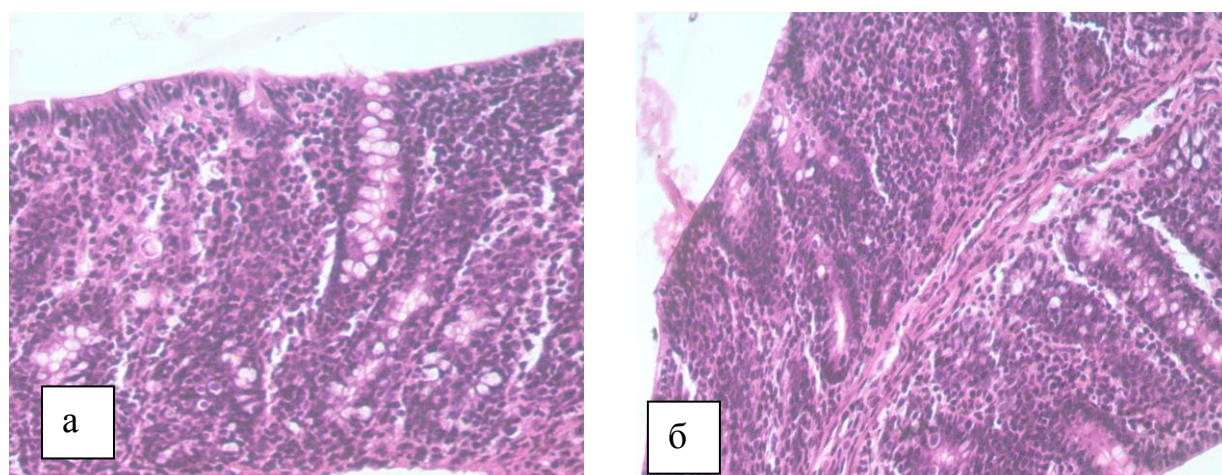


Рис. 5.9. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus* и леченных Декасаном: ободочная (а) и прямая (б) кишка. Насыщенность собственной пластинки мононуклеарами. Гематоксилин-эозин. x200.

Введение крысам препарата «Нифуроксазид» способствовало заметному очищению поверхности слизистой оболочки толстой кишки от очагов колонизации микроорганизмов и слизи. Но сохранялись выраженные признаки «раздражения» эпителия, кое-где повышенного слущивания его. Выявлены и немногочисленные поверхностные микроэрозии (рис. 5.10).

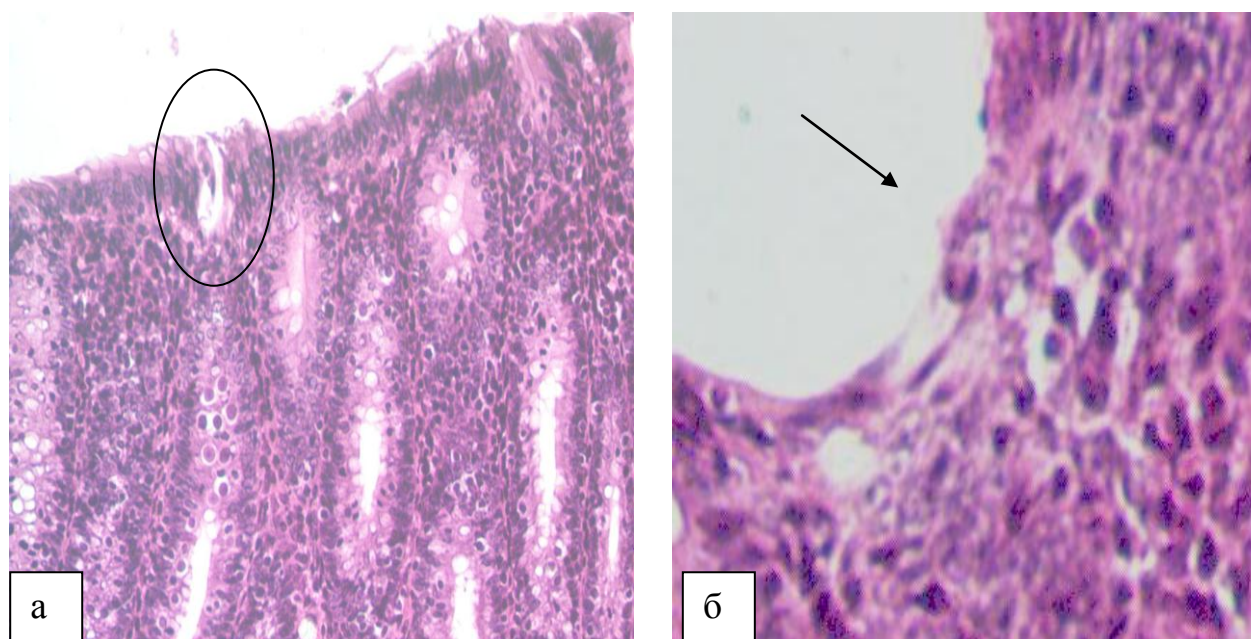


Рис. 5.10. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus* и леченных препаратом «Нифуроксазид»: ободочная кишка – выраженные признаки «раздражения» эпителия, микроэрозия, повышенное содержание гибнущих клеток в криптах (а, x200); прямая кишка – уплощение эпителия, формирование поверхностной микроэрозии (б, x400). Гематоксилин-эозин.

Часто видны довольно многочисленные «крипт-абсцессы», повышенное содержание гибнущих клеток в разных отделах кишечных крипт (в

некоторых местах уже практически выталкиваемых в просвет кишки). Строма собственной пластинки диффузно усилена инфильтрирована мононуклеарами с примесью немногочисленных нейтрофильных гранулоцитов (рис. 5.11)

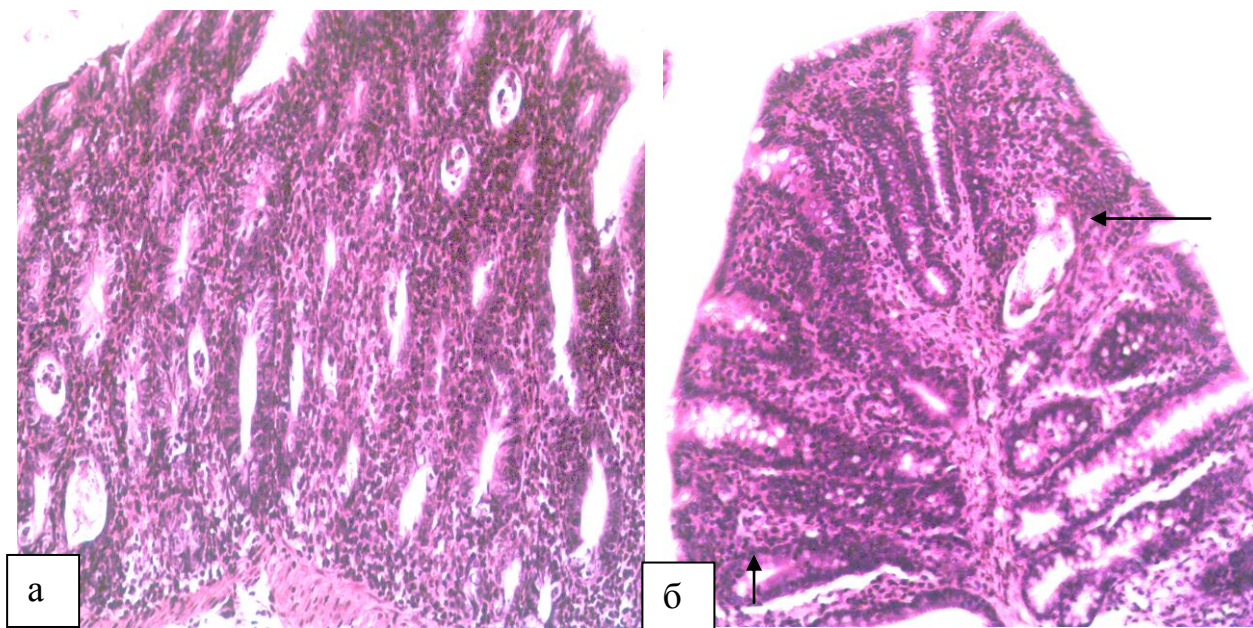


Рис. 5.11. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Staphylococcus aureus* и леченных препаратом «Нифуроксазид»: ободочная (а) и прямая (б) кишка. Многочисленные «крипт-абсцессы», повышенная инфильтрация мононуклеарами собственной пластинки. Гематоксилин-эозин. x200.

Полученные результаты микроскопического анализа позволяют заключить, что ректальное введение музейного штамма *Staphylococcus aureus* вызывает у крыс на 7 сутки после инфицирования воспалительные изменения слизистой оболочки толстой кишки, которые по микроскопической картине близки к неспецифическому неязвенному колопроктиту без атрофии слизистой оболочки у человека [70, 71].

Препарат «Декасан» оказывает заметный положительный эффект на развитие патологического процесса в толстой кишке крыс. Он способствует

очищению поверхности слизистой от очагов колонизации микроорганизмов, препятствует разрушению поверхностного эпителия, уменьшает воспалительную клеточную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки. По лечебному эффекту препарат «Декасан» превосходит препарат сравнения «Нифуроксазид» на данной модели патологии.

5.2.2. Изучение антимикробной активности Декасана на модели инфекционного колопроктита у крыс, вызванного *P.aeruginosa*

Для определения химиотерапевтической способности препарата «Декасан» моделировали колопроктит с помощью внутрикишечного введения взвеси микроорганизмов *P.aeruginosa* ATCC 27853 в дозе 1×10^8 . Колопроктит воспроизводили специально разработанным способом. Под наркозом (тиопентал натрий, 70 мг/кг) зафиксированным на спине крысам, предварительно лишенным пищи в течение 24 часов, в аспетических условиях выполняли срединную лапаротомию. Через прямую кишку под визуальным и пальпаторным контролем вводили соединенный со шприцем гибкий катетер (использовали подключичный катетер), заполненный взвесью патогенных микроорганизмов. Конец катетера продвигали до поперечной ободочной кишки, после чего в кишечник осторожно вводили взвесь микроорганизмов в дозе 1×10^8 в объеме 1,5 мл. Катетер осторожно извлекали, избегая вытекания введенной жидкости. Операционную рану послойно ушивали.

Предварительное исследование показало, что гнойно-некротические изменения в кишечнике формировались у животных на 3-4 сутки и характеризовались гиперемией, отеком и образованием эрозивной поверхности. Эти результаты подтверждают адекватность использованной экспериментальной модели.

Интактным контролем служили ложнооперированные крысы, которым выполняли все описанные манипуляции, но кишечник заполняли эквивалентным объемом стерильного 0,9% раствора натрия хлорида. Дизайн эксперимента представлен в таблице 5.9.

Таблица 5.9

Дизайн изучения антимикробной активности Декасана в условиях модели инфекционного колoproктита у крыс, вызванного *P.aeruginosa*

Экспериментальные группы	Инфицирующая доза микроорганизмов <i>P.aeruginosa</i>	Доза препарата, мл/кг	Количество крыс в группе
Интактный оперированный контроль (ИОК)	–	–	8
Контрольная патология (КП)	1×10^8	–	8
Декасан	1×10^8	3,0	8
Нифуроксазид	1×10^8	1,2	8

Для проведения эксперимента было использовано 32 белых беспородных половозрелых крысы массой 130-150 г, распределенных по группам согласно таблице 5.9.

Через 1 сутки и в течение 7 дней после моделирования инфекционного колoproктита животным опытных групп вводили исследуемые препараты, а контрольным – эквивалентное количество растворителя. В качестве референсного был выбран аналог по действию препарат «Нифуроксазид» из фармакотерапевтической группы «Противомикробные средства, применяемые при кишечных инфекциях», в виде суспензии для орального применения.

Для оценки терапевтического антимикробного действия Декасана и референсного Нифуроксазида применяли физиологические, микробиологи-

ческие, клинические, биохимические и морфологические методы исследования [54-68, 69]. О состоянии трофических процессов в организме подопытных крыс судили по динамике массы тела.

Степень инфицирования определяли по числу колониеобразующих единиц (КОЕ), полученных из собранных непосредственно из прямой кишки испражнений животных на 3-й и 6-й день эксперимента. Для оценки тяжести заболевания и эффективности лечения проводили клинический анализ крови на 6-й день.

По окончании опыта после вывода животных из эксперимента под эфирным наркозом собирали кровь для проведения биохимического анализа и иссекали участок кишечника для проведения морфологического исследования.

Все образцы толстого кишечника (участки поперечной и нисходящей части ободочной кишки, тазового отдела прямой кишки крыс) фиксировали в 10% формалине, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, заливали в целлоидин-парафин. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (1). Просмотр микропрепаратов проводили под микроскопом Granum, микрофотографирование микроскопических изображений выполняли цифровой видеокамерой Granum ДСМ 310. Фотоснимки обрабатывали на компьютере Pentium 2,4GHz с помощью программы Tour View.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами вариационной статистики с помощью стандартного пакета статистических программ «Statistica 6.0». Для получения статистических данных использовали параметрические и непараметрические методы: дисперсионный анализ и критерий Ньюмена-Кейлса, метод Краскела-Уоллиса, критерий Манна-Уитни и критерий Манна-Уитни с поправкой Бонферони. При сравнении статистических выборок был принят уровень значимости $p \leq 0,05$ [21-23].

Результаты исследований представлены в таблицах 5.10-5.14.

Таблица 5.10

Динамика массы тела крыс в условиях инфекционного колопроктита, вызванного *P.aeruginosa*, под влиянием Декасана и Нифуроксазида

Показатели	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
Исходное состояние	131±4	131±4	133±3	135±5
1 сутки	118±4	119±4	119±3	121±5
4 сутки	127±5	131±4	140±4	143±5
7 сутки	147±4	136±3*	155±6**	148±8

Примечания.

1. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.
2. * – отклонения значимы относительно ИОК, $p < 0,05$.
3. ** – отклонения значимы относительно КП, $p < 0,05$.

Таблица 5.11

Динамика степени инфицирования крыс в условиях инфекционного колопроктита, вызванного *P.aeruginosa*, под влиянием Декасана и Нифуроксазида

Показатели	Колониеобразующие единицы, КОЕ/мл			
	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
3 сутки	$4 \cdot 10^3$	$9 \cdot 10^7$	$5,9 \cdot 10^7$	$20,1 \cdot 10^7$
6 сутки	$3 \cdot 10^3$	$6 \cdot 10^6$	$3,3 \cdot 10^6$	$17,8 \cdot 10^7$

Примечание. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.

Таблица 5.12

**Гематологические показатели крыс в условиях инфекционного
колопроктита, вызванного *P.aeruginosa*, под влиянием
Декасана и Нифуроксазида ($\bar{X}(X_{\min} \div X_{\max})$, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)**

Показатели	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
Гемоглобин, г/л	155,58±4,39	144,94±4,65	146,05±3,43	162,51±5,45
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,02±0,08	4,88±0,07	4,96±0,08	5,30±0,13
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	23,39±2,32	21,42±0,94	19,38±1,70	20,25±1,17
<i>Лейкоцитарная формула, %:</i>				
Нейтрофилы палочкоядерные	1,0 (0,0÷2,0)	5,3 (4,0÷7,0) *	1,5 (0,0÷3,0) **/**	4,4 (2,0÷5,0)
Нейтрофилы сегментоядерные	12,0 (8,0÷19,0)	29,0 (22,0÷36,0) *	28,3 (21,0÷37,0) **/**	16,0 (7,0÷26,0) **/**
Эозинофилы	0,83 (0,0÷2,0)	3,5 (2,0÷5,0) *	0,6 (0,0÷2,0) **	2,4 (0,0÷6,0)
Лимфоциты	84,5 (77,0÷90,0)	58,5 (50,0÷78,0) *	64,7 (57,0÷72,0) **/**	74,9 (62,0÷85,0) **/**
Моноциты	1,7 (1,0÷3,0)	3,8 (3,0÷4,5) *	4,8 (2,0÷9,0) **/**	2,4 (1,0÷3,0) **

Примечания.

- 1 ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.
- 2 * – отклонения значимы относительно оперированного контроля, $p < 0,05$.
- 3 ** – отклонения значимы относительно контроля патологии, $p < 0,05$.
- 4 *** – отклонения значимы относительно препарата сравнения, $p < 0,05$.

Таблица 5.13

Показатели гемостаза крыс в условиях инфекционного колoproктита, вызванного *P.aeruginosa*, под влиянием Декасана и Нифуроксазида

Показатели	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
Время свертывания крови, с	149,33±10,43	174,50±8,55	149,33±10,72	149,67±7,95
Фибриноген, г/л	3,52±0,77	4,30±0,70	5,62±0,25*	5,17±0,17*
Протромбиновое время, с	23,98±4,78	23,94±3,62	22,18±2,77	15,93±3,49*

Примечание.

1. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.
2. * – отклонения значимы относительно оперированного контроля, $p < 0,05$.

Таблица 5.14

Биохимические показатели сыворотки крови крыс в условиях инфекционного колoproктита, вызванного *P.aeruginosa*, под влиянием Декасана и Нифуроксазида ($\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$)

Показатели	ИОК	КП	Декасан	Нифуроксазид
Мочевина, ммоль/л	4,61±0,11	6,60±0,36*	5,98±0,74	6,96±0,61*/**
АлАТ, ммоль/л*час	0,38±0,02	0,39±0,03	0,46±0,02*	0,60±0,08*/**
АсАТ, ммоль/л*час	0,76±0,04	0,88±0,06	0,75±0,04	0,88±0,06
Креатинин, ммоль/л	0,091±0,008	0,078±0,005	0,091±0,004	0,083±0,010
Общий белок, г/л	64,63±1,43	60,70±1,62	59,71±2,81	67,49±3,75
Щелочная фосфатаза, мкмоль/л	7,18±1,27	4,70±0,51	5,15±0,61	4,78±0,51

Примечания.

1. ИОК – интактный (оперированный) контроль, КП – контрольная патология.
2. * – отклонения значимы относительно ИОК, $p < 0,05$.
3. ** – отклонения значимы относительно КП, $p < 0,05$.
4. # – отклонения значимы относительно препарата сравнения, $p < 0,05$.

Анализ полученных результатов, представленных в таблицах 5.10-5.14, свидетельствует о том, что в условиях инфекционного колопроктита, вызванного *P.aeruginosa*, при пероральном применении Декасан (0,02% раствор декаметоксина) проявляет выраженные антимикробные свойства, превосходящие антимикробную активность Нифуроксазида и способствующие восстановлению функционального состояния организма животных. Так, в отличие от Нифуроксазида Декасан вызывает достоверное по сравнению с группой контрольной патологии увеличение на 11% массы тела животных (табл. 5.10). Гиперфибриногенемия на фоне как Декасана, так и Нифуроксазида не приводила к повышению свертываемости крови, так как время свертывания не претерпевало изменений (табл.5.13). Выраженная антимикробная активность Декасана подтверждается снижением против группы контрольной патологии в 1,8 раза числа колониеобразующих единиц на 6-й день эксперимента, в то время как под влиянием Нифуроксазида данный показатель остается на уровне группы контрольной патологии (табл. 5.11). По выраженности антимикробного действия Декасан превосходит референсный Нифуроксазид в 54 раза (табл. 5.11). О терапевтическом эффекте Декасана свидетельствует достоверное в сравнении с группой контрольной патологии восстановление показателей лейкоцитарной формулы: нейтрофилов палочкоядерных и эозинофилов (табл. 5.12).

Подтверждают вышеназванные показатели антимикробной активности Декасана результаты морфологического исследования (рис. 5.12-5.22). Группа негативного контроля. Слизистая оболочка всех изученных отделов

толстого кишечника выстлана однослойным высоким призматическим эпителием, с включением большого количества бокаловидных клеток. Ядра эпителиальных клеток овальной формы, расположены в базальной части, на одном уровне. Кутикулярная каемка на апикальном полюсе клеток отчетлива. Бокаловидные клетки содержат крупную секреторную вакуоль, ядро оттеснено базально, мелкое, гиперхромное. Кишечные крипты глубокие, расположены вертикально, достаточно близко друг к другу. Они не ветвятся, их закругленные донные отделы находятся вблизи от мышечной пластинки. Содержание бокаловидных клеток среди клеток криптового эпителия выше, чем в покровном эпителии, они равномерно распределены по всей длине крипт, секреторная вакуоль крупная. Герминативная зона крипт ограничена областью дна. Строма собственной пластинки слизистой оболочки умеренно клеточна, содержит в основном лимфоидные и гистиоцитарные клетки с небольшой примесью тканевых эозинофилов (рис. 5.12).

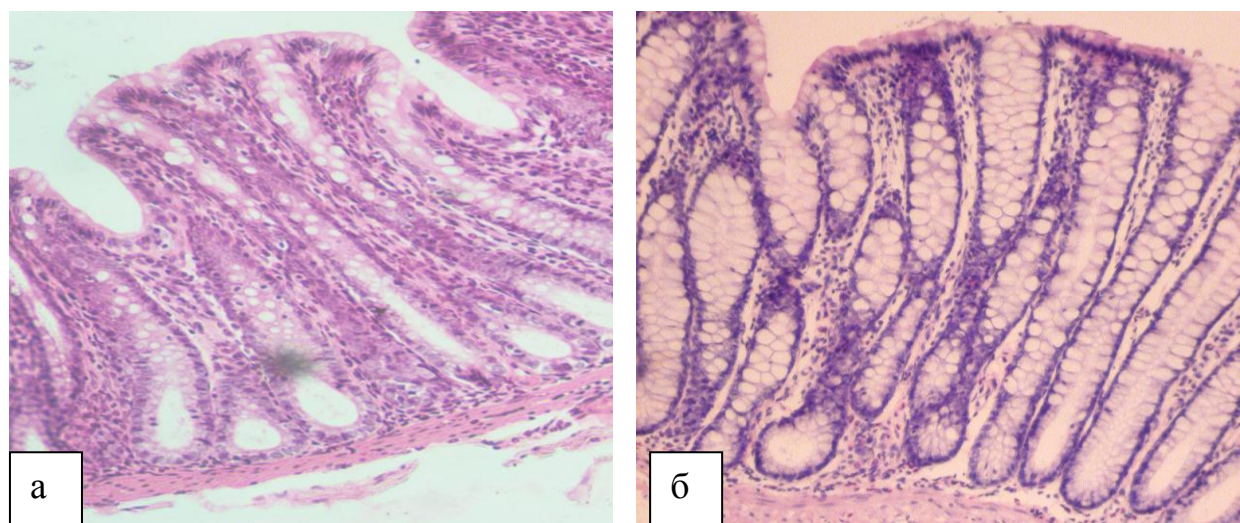


Рис. 5.12. Слизистая оболочка поперечной части ободочной (а) и прямой (б) кишки не инфицированных крыс. Нормальное состояние покровного эпителия, кишечных крипт и собственной пластинки. Гематоксилин-эозин. x200.

Группа контрольной патологии. В слизистой оболочке исследованных отделов толстого кишечника всех крыс выявлены однотипные изменения, которые несколько варьировали по выраженности. На поверхности

оболочки видны слизь и очаги колонизации микроорганизмов, часто плотно прилегающие к эпителиальным клеткам. В самом эпителии видны признаки «раздражения»: ядра клеток смещены в направлении просвета кишки, расположены не в один ряд, кутикулярная каемка теряла четкость. Прослеживался экзоцитоз – проникновение мононуклеарных клеток в эпителий. Местами повышена десквамация эпителиальных клеток. В отдельных местах под смесью слизи и колоний микроорганизмов прослеживались микроэрозии. Заметно снижалось (вплоть до полного исчезновения) содержание бокаловидных клеток. Местами эпителиальные клетки пролиферировали, ядра приобретали палочковидную форму, располагались палисадно. Апикальные отделы части клеток выражено «разрыхлены», иногда подобное «разрыхление-разрушение» распространялось до базальных отделов (рис. 5.13).

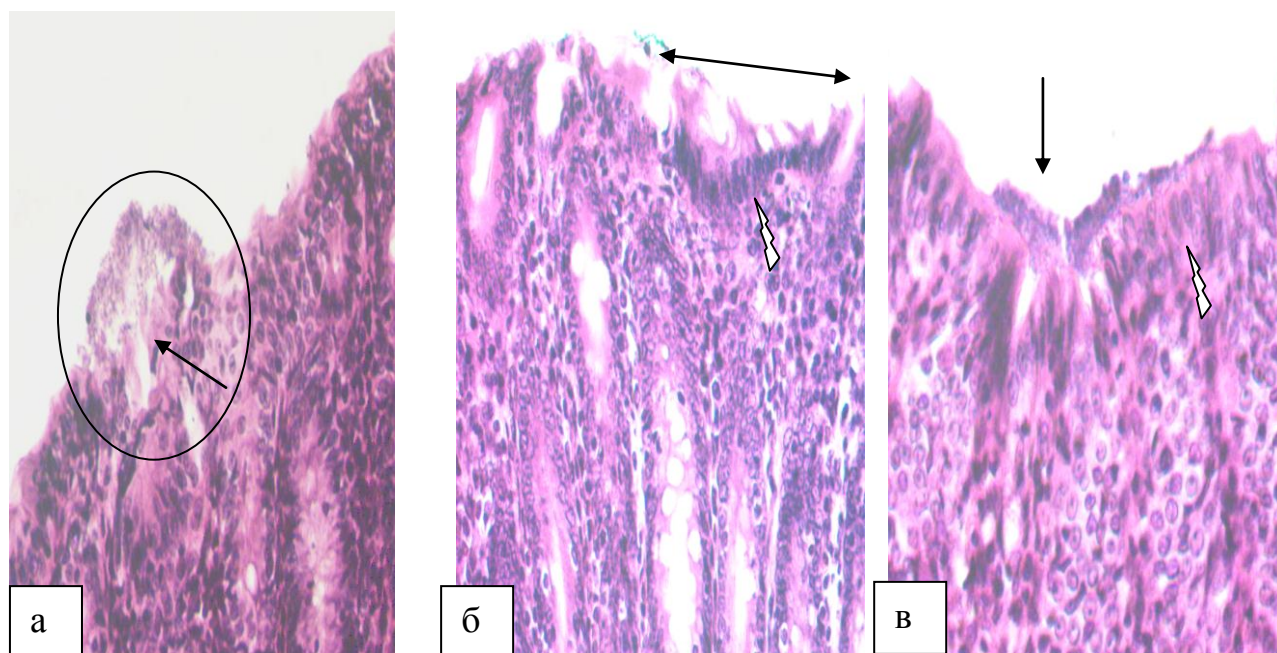


Рис. 5.13. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*: ободочная кишка – микроэрозия под смесью слизи и микроорганизмов (а, x200); пролиферация ядер клеток, разрушение апикально-центральных отделов клеток (б, x200); прямая кишка – сдвиг ядер в направлении просвета кишки, очаг колонизации микроорганизмов на поверхности (в, x250). Гематоксилин-эозин.

В кишечных криптах также очень часто снижено содержание бокаловидных клеток. Содержащаяся в них секреторная вакуоль уменьшена, занимает, как правило, небольшую площадь цитоплазмы, иногда отмечается несколько мелких вакуолей. На разных уровнях глубины крипт видны погибшие или гибнущие клетки, которые слущивались в просвет и вместе с нейтрофильными гранулоцитами и мононуклеарами формировали «крипт-абсцессы» (рис. 5.14). В ряде крипт отмечали деструкцию эпителия. Герминативная зона крипт расширена часто до центральной и верхней трети их длины. Строма собственной пластинки слизистой оболочки повышено клеточна. Среди многочисленных мононуклеаров видны и нейтрофильные гранулоциты. Инфильтрация преимущественно диффузного характера распространяется на различную глубину слизистой оболочки (рис. 5.15). В подслизистом слое слизистой оболочки отмечено расширение и тромбоз кровеносных сосудов (рис. 5.16), умеренная гипертрофия лимфоидных фолликулов.

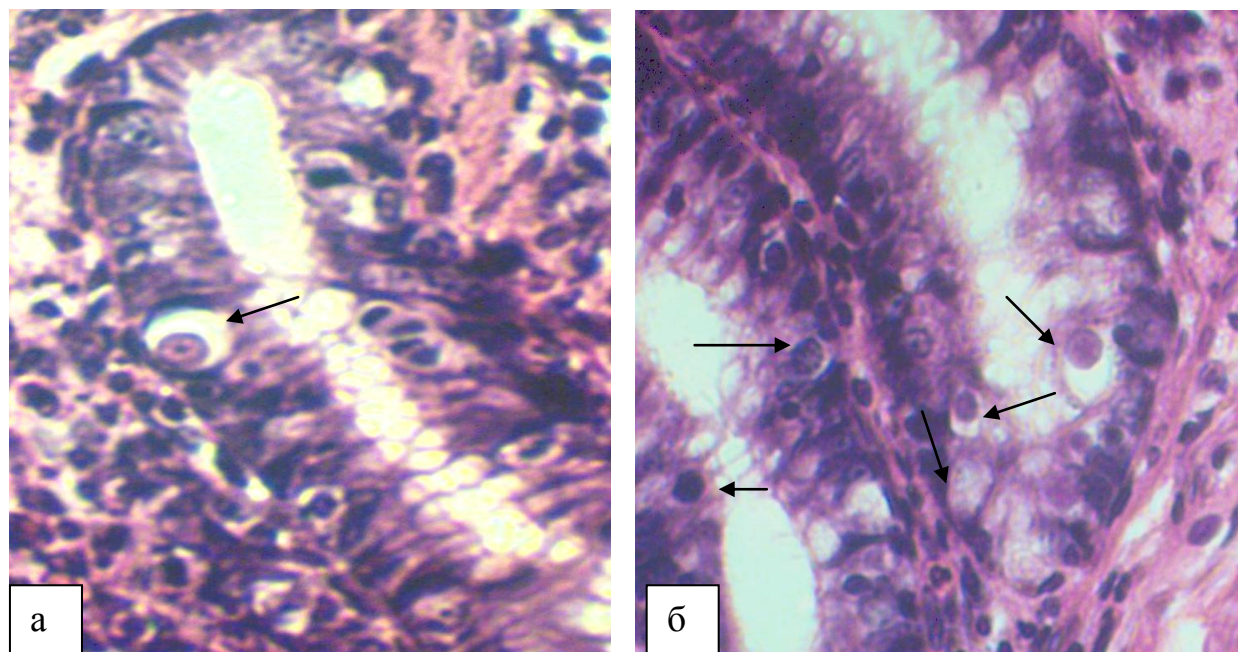


Рис. 5.14. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*: ободочная (а) и прямая (б) кишка. Эпителиальные клетки крипт на разной стадии гибели. Гематоксилин-эозин. х400.

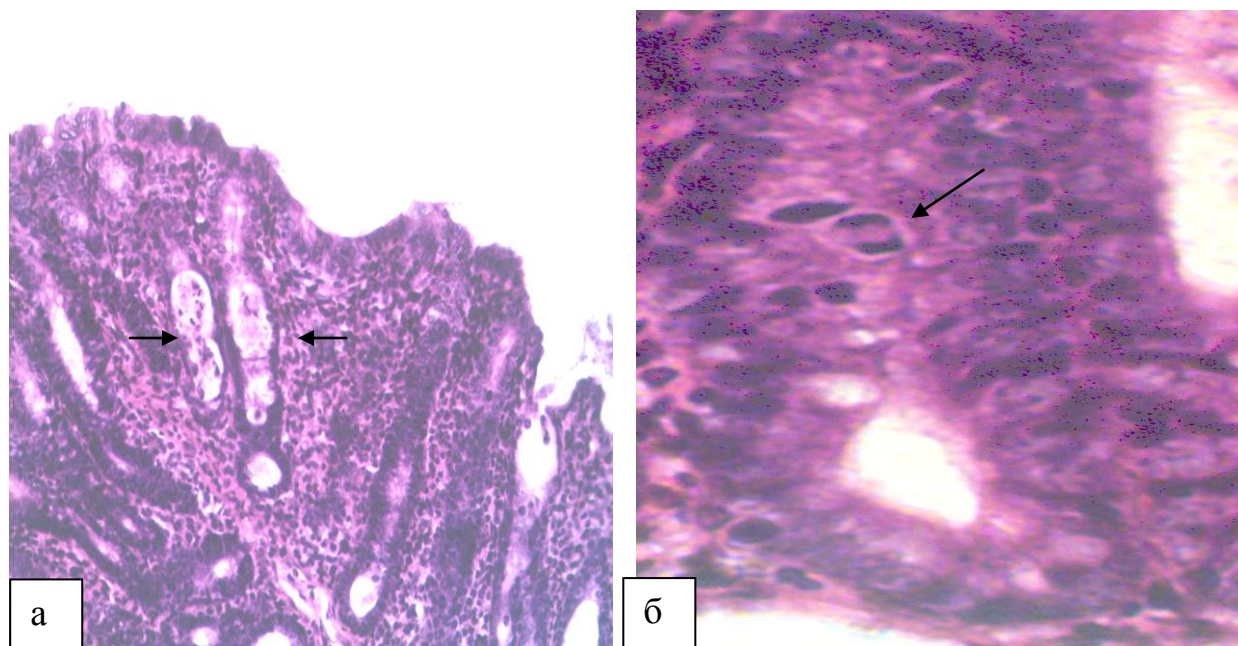


Рис. 5.15. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*: ободочная кишка – формирование «крипт-абсцессов», диффузная клеточная инфильтрация стромы собственной пластинки (а, x200); прямая кишка – расширение герминативной зоны крипт (митоз в верхней половине крипты) (б, x400). Гематоксилин-эозин.

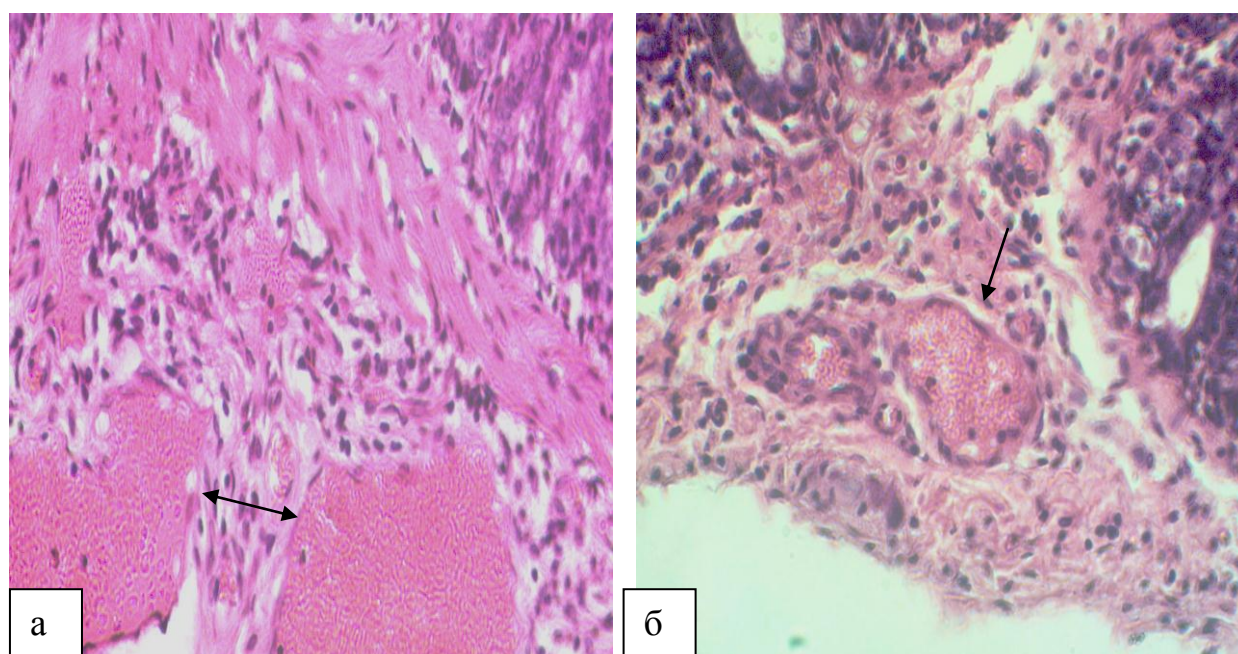


Рис. 5.16. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*: ободочная (а) и прямая (б) кишка. Тромбоз кровеносных сосудов в подслизистом слое. Гематоксилин-эозин. x250.

Лечение препаратом «Декасан» отчетливо улучшило микроскопическую картину слизистой оболочки всего толстого кишечника 60% инфицированных животных. Очаги колонизации микроорганизмов на поверхности эпителии отсутствовали. Слизь на поверхности эпителия или отсутствовала, или видна была в небольших количествах в просвете кишки. Морфологическая полноценность клеток поверхностного эпителия, содержание бокаловидных клеток, уровень их секреторной активности (наличие в них крупной секреторной вакуоли), клеточная насыщенность стромы собственной пластинки были практически сопоставимы с таковыми у неинфицированных крыс. В кишечных криптах также восстановлено содержание бокаловидных клеток, их секреторная активность, герминативная зона ограничена зоной дна. Отсутствовали «крипт-абсцессы», деструкция эпителия, встречались лишь единичные гибнущие клетки. Нарушения гемодинамики не отмечались (рис. 5.17).

У 40% крыс сохранялось повышенная клеточная инфильтрация стромы собственной пластинки слизистой оболочки, снижение содержания бокаловидных клеток в поверхностном и криптовом эпителии. Однако, несмотря на это, имеющиеся слизистые клетки характеризовались достаточно выраженной функциональной активностью (содержали крупную секреторную вакуоль). Отмечены единичные участки с отеком подэпителиальной стромы (рис. 5.18).

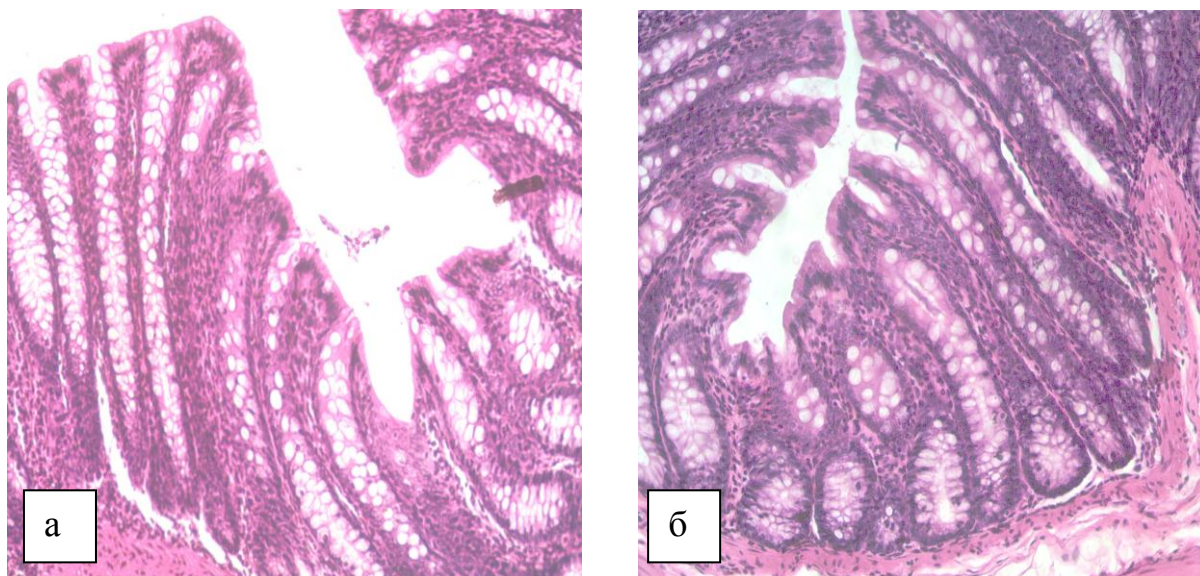


Рис. 5.17. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* и леченных препаратом «Декасан»: ободочная (а) и прямая (б) кишка. Восстановление морфологической полноценности поверхностного эпителия и кишечных крипт, числа бокаловидных клеток. Снижение клеточной инфильтрации стромы собственной пластинки. Гематоксилин-эозин. x200.

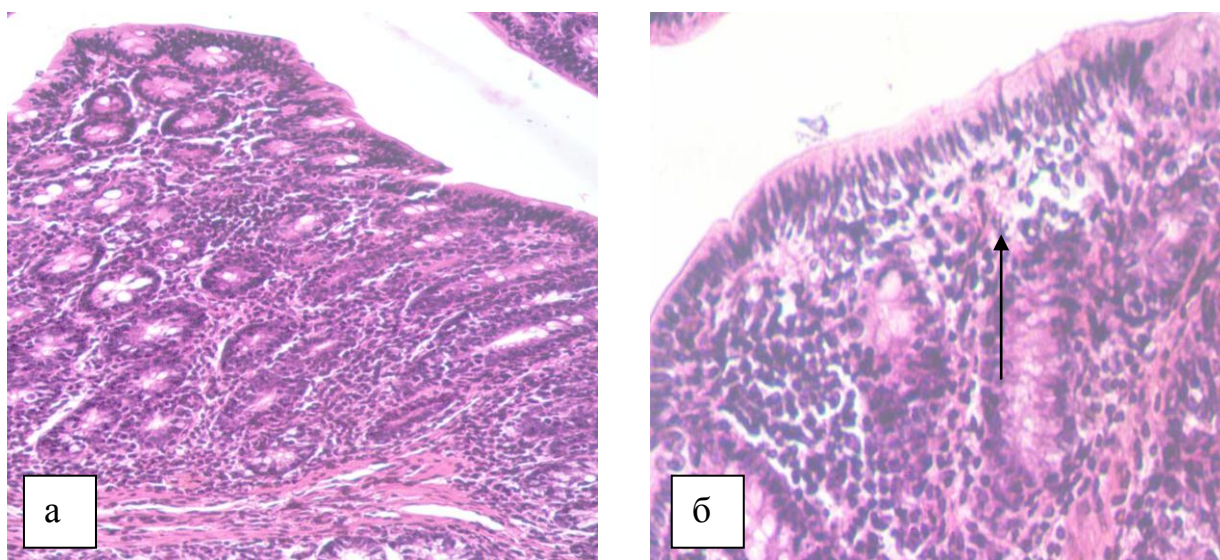


Рис. 5.18. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* и леченных препаратом «Декасан»: ободочная (а, x200) и прямая (б, x250) кишка. Повышенная клеточность стромы собственной пластинки, снижение числа бокаловидных клеток без выраженного уменьшения их функциональной активности, подэпителиальный отек. Гематоксилин-эозин.

Лечение препаратом сравнения «Нифуроксазид» мало способствовало улучшению микроскопической картины слизистой оболочки толстого кишечника у подавляющего большинства инфицированных крыс. На поверхности слизистой оболочки часто много слизи, в которой видны слущенные клетки и очаги колонизации микроорганизмов. Эти конгломераты местами тесно спаяны с апикальными отделами эпителиальных клеток. Встречались единичные поверхностные эрозии, участки «раздражения» эпителия. В криптах имели место гибель и слущивание клеток эпителия, «крипт-абсцессы». Содержание бокаловидных клеток в поверхностном эпителии и кишечных криптах снижено, но секреторная активность ряда бокаловидных клеток достаточно выражена. Повсеместно сохранялась повышенная диффузная клеточная инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки (рис.5.19, рис. 5.20а).

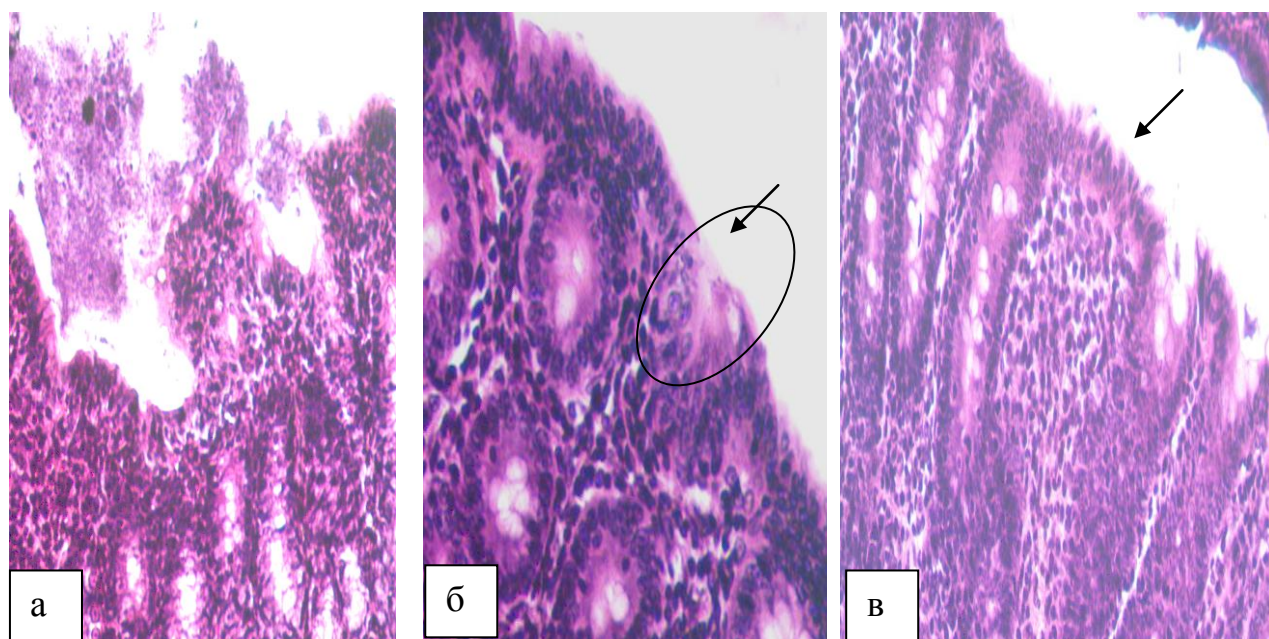


Рис. 5.19. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* и леченных препаратом «Нифуроксазид». Ободочная кишка: а – конгломерат слизи, слущенных клеток и колоний микроорганизмов на поверхности (x200); б – микроэрозия эпителия (x250). Прямая кишка: в – сдвиг ядер клеток поверхностного эпителия в направлении просвета кишки, снижение содержания бокаловидных клеток (x250). Повышенная клеточная диффузная инфильтрация собственной пластинки. Гематоксилин-эозин.

Лишь у одной крысы из этой группы поверхностный и криптовый эпителий по морфологическим характеристикам, содержанию и уровню секреторной активности бокаловидных клеток в исследованных отделах толстой кишки были приближены к физиологической норме, однако клеточная насыщенность стромы собственной пластинки оставалась повышенной (рис. 5.20б).

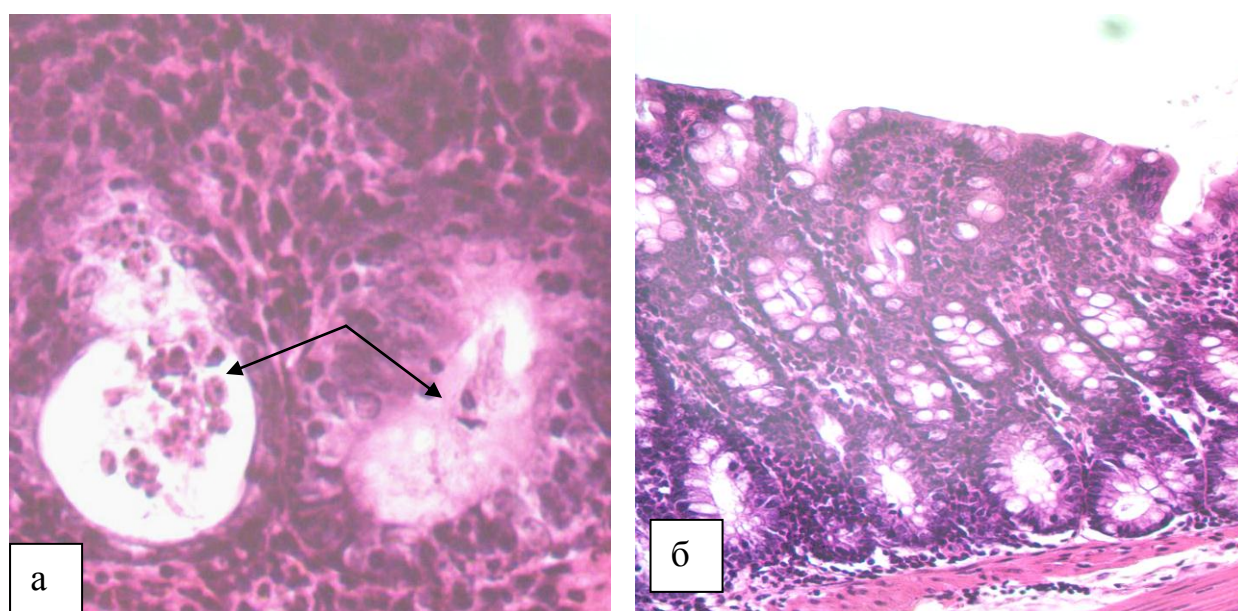


Рис. 5.20. Слизистая оболочка толстой кишки крыс, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa* и леченных препаратом «Нифуроксазид»: а – «крипт-абсцесс» в ободочной кишке (x400); б – поверхностный и криптовый эпителий, содержание и функциональная активность бокаловидных клеток мало изменены. Клеточная насыщенность собственной пластинки повышена (x200). Гематоксилин-эозин.

Полученные микроскопические данные позволяют заключить, что ректальное введение музейного штамма *Pseudomonas aeruginosa* вызывает у крыс на 7 сутки после инфицирования воспалительные изменения слизистой оболочки толстой кишки. Наблюдаемая микроскопическая картина, в целом,

соответствует картине неспецифического неязвенного колопроктита без атрофии слизистой оболочки у человека [70, 71].

Препарат «Декасан» оказывает выраженный лечебный эффект на развитие патологического процесса в толстой кишке крыс. Способствует очищению поверхности слизистой оболочки от очагов колонизации микроорганизмов, уменьшает воспалительную клеточную инфильтрацию собственной пластинки слизистой оболочки, препятствует разрушению поверхностного эпителия.

Препарат «Декасан» превосходит препарат сравнения «Нифуроксазид» по благоприятному влиянию на развившуюся экспериментальную патологию – колопроктит, вызванный *Pseudomonas aeruginosa*.

6. ИЗУЧЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ДЕКАСАНА

Исследовална способность препарата «Декасан» всасываться в кишечнике в опытах на белых рандомбредных крысах-самцах и беспородных кроликах-самках.

6.1. Результаты изучения способности препарата «Декасан» всасываться в кишечнике у крыс

Белых рандомбредных крыс-самцов за 18 ч до начала эксперимента ограничивали в еде, но оставляли свободный доступ к воде. Использовано 5 крыс. Животных наркотизировали (тиопентал-натрий в дозе 60 мг/кг внутривенно), выполняли срединную лапаротомию. В 5 см и 20 см дистальнее двенадцатиперстной кишки накладывали две лигатуры так, чтобы изолировать 15 см тонкого отдела кишечника с сохраненным кровоснабжением и иннервацией. В изолированный участок кишки вводили два катетера, обеспечивающие возможность перфузии. Брюшную полость ушивали. Изолированный участок кишки перфузировали раствором «Декасан», содержащим 0,02% декаметоксина, с помощью инфузионного насоса NE-300 на протяжении 30 мин. Скорость инфузии составляла 0,1 мл/мин. В перфузате определяли содержание декаметоксина по реакции ингибирования ацетилхолинэстеразы методом Блажеевского Н. Е. [72-81]. Для определения количественного содержания декаметоксина в перфузате использован высокочувствительный энзимо-кинетический метод, основанный на способности этого соединения ингибировать реакцию ферментативного гидролиза ацетилхолина холинэстеразой [78,80,81,84]. Сравнение между собой степени ингибирования реакции в присутствии пробы и раствора «Декасан», содержащего известное количество декаметоксина (0,02%), позволяет определить содержание последнего в перфузате. Снижение концентрации декаметокси-

на в перфузате по сравнению с таковым в перфузионном растворе, может свидетельствовать о всасывании этого соединения в кишечнике крыс. В качестве индикаторной реакции на ацетилхолин использована реакция окисления *n*-фенетидина перуксусной кислотой, образованной во вспомогательной реакции пергидролиза ацетилхолина – субстрата ферментативной реакции [73,74]. Используются раствор холинэстеразы 200 АО/мл (ацилгидролаза сыворотки крови коня К.Ф.3.1.1.8 НВО «Биомед», Россия VI кл., флакон по 80 мг с активностью 25АО/мг) и раствор субстрата – ацетилхолин. Определение проводили при 358 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Скорость данной реакции характеризует тангенс угла наклона прямолинейного начального участка кинетической кривой в координатах «оптическая плотность продукта окисления *n*-фенетидина – время».

Проводили следующие опыты:

1. Контрольный опыт, который позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления индикаторного вещества *n*-фенетидина перекисью водорода в присутствии не подвергшегося гидролизу ацетилхолина. В опыте отсутствуют холинэстераза и ее ингибитор декаметоксин. Кривая контрольного опыта характеризуется максимальным значением тангенса угла наклона, поскольку весь внесенный в пробу ацетилхолин не подвергается ферментативному гидролизу и полностью расходуется на реакцию пергидролиза, а также последующего окисления образованной перуксусной кислотой индикаторного вещества *n*-фенетидина. Значение тангенса угла наклона соответствует 100% ингибированию холинэстеразы.

2. Холостой опыт, который позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *n*-фенетидина перекисью водорода в присутствии субстрата ферментативной реакции (ацетилхолина) и фермента холинэстеразы. Он отражает активность неингибированной холинэстеразы (активность 100%) и характеризуется минимальным значением тангенса угла наклона, поскольку в реакции окисления *n*-фенетидина принимает участие лишь та часть ацетил-

холина, которая не подвергалась гидролизу ферментом (остатки субстрата).

3. Испытуемая проба, которая позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *n*-фенетидина перекисью водорода в присутствии ацетилхолина и холинэстеразы после инкубирования последней с декаметоксином, содержащемся в перфузате кишечника крыс. Значение тангенс угла наклона кинетической кривой находится в диапазоне между такими контрольного и холостого опытов в зависимости от концентрации декаметоксина в пробе.

3. Калибровочная проба с заведомо известным содержанием декаметоксина, которая позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *n*-фенетидина перекисью водорода в присутствии ацетилхолина и холинэстеразы после инкубирования последней с раствором «Декасан» с концентрацией декаметоксина 0,02%. Значение тангенс угла наклона кинетической кривой находится в диапазоне между значениями тангенсов угла наклона кривых контрольного и холостого опыта.

На рис. 6.1 приведены кинетические кривые, полученные в опыте.

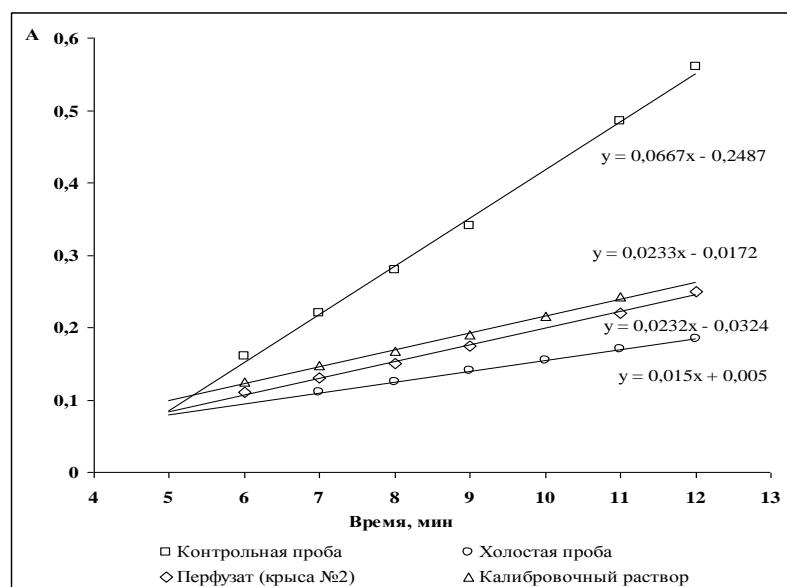


Рис. 6.1. Кинетические кривые сопряженного окисления *n*-фенетидина перекисью водорода в присутствии АХ (контрольная проба), АХ+ХЭ (холостая проба), смеси (ХЭ+Декасан)+АХ (калибровочная проба), смеси (ХЭ+перфузат)+АХ (испытуемая проба).

Примечание: АХ – ацетилхолин, ХЭ – холинэстераза.

Количественное содержание декаметоксина в испытуемой пробе рассчитывают по формуле:

$$C_x = (C_{ст} / \operatorname{tg}\alpha_x) \times \operatorname{tg}\alpha_{ст},$$

где:

- C_x – концентрация декаметоксина в испытуемой пробе (перфузате), %;
- $C_{ст}$ – концентрация декаметоксина в растворе «Декасан», %;
- $\operatorname{tg}\alpha_x$ – тангенс угла наклона кинетической кривой испытуемой пробы;
- $\operatorname{tg}\alpha_{ст}$ – тангенс угла наклона кинетической кривой калибровочной пробы (раствора «Декасан»);

Значения тангенса угла наклона испытуемых проб и результаты количественного определения содержания декаметоксина в перфузате представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1

**Изучение количественного содержания декаметоксина
в перфузате кишечника крыс**

Исследуемые растворы	№ п/п животного	tgα	Содержание декаметоксина в пробе		Среднее значение содержания декаметоксина, мг/мл
			%	мг/мл	
Аликвота перфузата кишечника крыс	1	0,0215	0,019	0,185	0,195±0,003
	2	0,0232	0,020	0,199	
	3	0,0229	0,020	0,197	
	4	0,0234	0,020	0,201	
	5	0,0225	0,019	0,193	
Раствор «Декасан»	–	0,0233	0,020	0,200	0,200

Примечание. tgα – тангенс угла наклона кинетической кривой.

Содержание декаметоксина в растворе «Декасан» составляет 0,200 мг/мл в перфузате – 0,195±0,003 мг/мл. Данные о содержании декаме-

токсина в готовой лекаственной форме взяты из сертификата качества № 1724 на используемый в опыте раствор «Декасан» серии 490913. Статистическая обработка результатов проведена с использованием парного критерия \hat{W} Вилкоксона. Статистически значимые различия между содержанием декаметоксина в исходном растворе «Декасан» и перфузате кишечника крыс отсутствуют. Это свидетельствует о том, что декаметоксин не всасывается в кишечнике.

6.2. Изучение способности препарата «Декасан» всасываться в кровь после перорального введения у кроликов

Эксперимент выполнен на 8 кроликах, которых за 18 ч до начала эксперимента ограничивали в еде, оставляя свободный доступ к воде. Животных разделили на контрольную и экспериментальную группы (по 4 кролика). У животных экспериментальной группы способность препарата «Декасан» (0,02% раствор декаметоксина) всасываться в кровь определяли через 30 и 60 мин после однократного перорального введения в дозе 6 мл/кг. Забор крови производили из краевой вены уха до, через 30 и 60 мин после введения раствора «Декасан». С животными контрольной группы проводили аналогичные процедуры, но вместо раствора «Декасан» вводили 0,9% раствор натрия хлорида. О всасывании Декасана в системный кровоток судили по изменению активности холинэстеразы плазмы крови [72-79], поскольку декаметоксин, входящий в состав препарата является ингибитором данного фермента [80].

Для определения активности холинэстеразы использовали описанный выше энзимо-кинетический метод Блажеевского Н. Е., основанный на использовании в качестве индикаторной реакции на ацетилхолин окисление *n*-фенетидина (*Chromogen*) перуксусной кислотой, образованной в начальной реакции пергидролиза (реакция с перокисью водорода), что позволяет

контролировать активность фермента холинэстеразы в энзиматической реакции в присутствии экзогенного ингибитора – декаметоксина (*Inh*) [72-77, 80]. Изменение активности холинэстеразы через 30 и 60 мин после введения животным раствора «Декасан» позволяет установить факт всасывания декаметоксина, и, соответственно, определить его количество по описанной выше по методике. Снижение активности холинэстеразы в плазме крови кроликов после введения декаметоксина по сравнению с исходной и таковой у животных контрольной группы, может свидетельствовать о всасывании этого соединения в желудочно-кишечном тракте.

Проводили следующие опыты:

1. Контрольный опыт, который позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *n*-фенетидина перекисью водорода в присутствии субстрата ферментативной реакции ацетилхолина. В опыте отсутствуют холинэстераза и ее ингибитор декаметоксин. Кривая контрольного опыта характеризуется максимальным значение тангенса угла наклона, поскольку весь внесенный в пробу ацетилхолин не подвергается ферментативному гидролизу и полностью расходуется в реакции окисления *n*-фенетидина. Значение тангенса угла наклона кривой, полученной в контрольном опыте, соответствует 100% ингибированию холинэстеразы.

2. Холостой опыт, который позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *n*-фенетидина перекисью водорода в присутствии ацетилхолина и холинэстеразы плазмы крови кролика до введения раствора «Декасан» (или 0,9% раствора натрия хлорида). Он отражает активность неингибированной холинэстеразы (активность 100%) и характеризуется минимальным значением тангенса угла наклона, поскольку в реакцию окисления *n*-фенетидина вступает лишь та часть ацетилхолина, который не подверглась гидролизу ферментом.

3. Испытуемая проба, которая позволяет построить кинетические кривые сопряженного окисления *n*-фенетидина перекисью водорода в присут-

ствии ацетилхолина и холинэстеразы плазмы крови кролика через 30 и 60 мин после введения препарата «Декасан» (или 0,9% раствора натрия хлорида). Значение тангенса угла наклона кинетической кривой равно значению тангенса угла наклона кривой холостого опыта (в случае отсутствия ингибирования холинэстеразы) или находится в диапазоне между значениями тангенсов угла наклона кривой контрольного и холостого опыта (в случае её полного ингибирования). Его значение зависит от концентрации декаметоксина в пробе.

Схема определения антихолинэстеразной активности ингибиторов по реакции с *p*-фенетидином приведена на рис. 6.2.

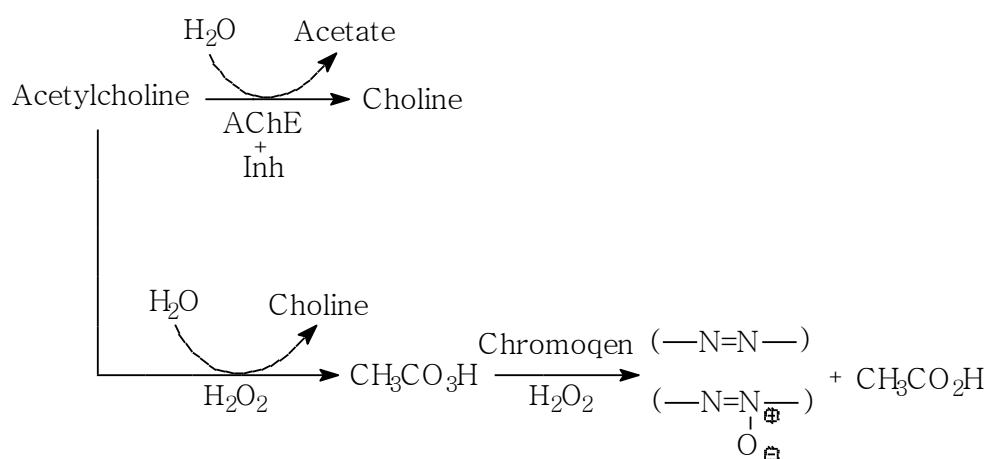


Рис. 6.2. Схема определения антихолинэстеразной активности ингибиторов по реакции с *p*-фенетидином (метод Блажеевского Н.Е.)

На рисунках 6.3 и 6.4 соответственно приведены кинетические кривые, полученные в контрольной и опытной группах животных.

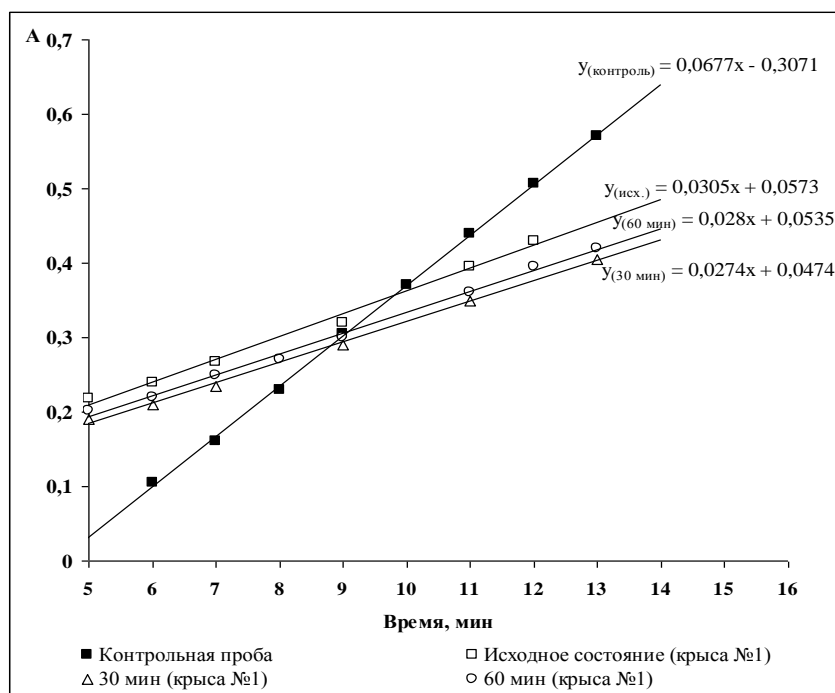


Рис. 6.3. Кинетические кривые сопряженного окисления п-фенетидина перекисью водорода в присутствии ацетилхолина (контрольная проба), смеси ацетилхолина и плазмы крови кроликов контрольной группы до, через 30 и 60 мин после введения 0,9% раствора натрия хлорида.

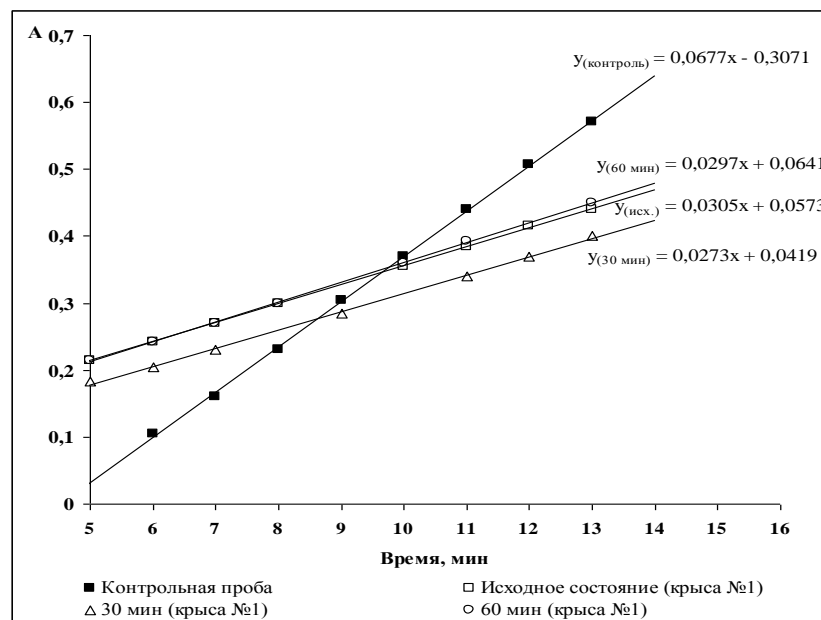


Рис. 6.4. Кинетические кривые сопряженного окисления п-фенетидина перекисью водорода в присутствии ацетилхолина (контрольная проба), смеси ацетилхолина и плазмы крови кроликов опытной группы до, через 30 и 60 мин после введения раствора «Декасан».

Разница значений тангенсов угла наклона кривой контрольной и холостой пробы – это диапазон, который отражает изменение активности холинэстеразы от 100% (холостая проба) до 0% (контрольная проба). Изменение активности фермента на 1% равно изменению тангенса угла наклона кривой на величину, рассчитанную по формуле:

$$\Delta tg_{1\%} = (tg\alpha_k - tg\alpha_0) / 100, \text{ где:}$$

$\Delta tg_{1\%}$ – изменение тангенса угла наклона кинетической кривой, соответствующее изменению активности холинэстеразы на 1%;

$tg\alpha_k$ – тангенс угла наклона кинетической кривой контрольной пробы;

$tg\alpha_0$ – тангенс угла наклона кинетической кривой холостой пробы.

В таблице 6.2 приведены полученные в опыте значения тангенсов угла наклона кинетических кривых.

Таблица 6.2

Значения тангенсов угла наклона кинетических кривых проб и изменения тангенса угла наклона кинетической кривой, соответствующее изменению активности холинэстеразы на 1%, под влиянием препарата «Декасан», 0,02% раствор

№ п/п	Значение $tg\alpha$				$\Delta tg_{1\%}$
	Контрольная проба, $tg\alpha_k$	Исходное состояние (холостая проба), $tg\alpha_0$	Через 30 мин после введения препарата, $tg\alpha_{30}$	Через 60 мин после введения препарата, $tg\alpha_{60}$	
	0,0677	–	–	–	–
Контрольная группа (животные, получавшие 0,9% раствор натрия хлорида)					
1	–	0,0305	0,0274	0,0280	0,000372
2	–	0,0307	0,0278	0,0303	0,000370
3	–	0,0305	0,0281	0,0317	0,000372
4	–	0,0306	0,0273	0,0301	0,000371
Опытная группа (животные, получавшие раствор «Декасан»)					
1	–	0,0284	0,0273	0,0297	0,000393
2	–	0,0313	0,0237	0,0299	0,000364
3	–	0,0316	0,0313	0,0276	0,000361
4	–	0,0273	0,0237	0,0316	0,000404

Исходная активность холинэстеразы, определенная в плазме крови кроликов до введения Декасана, принята за 100%. Изменение активности холинэстеразы после введения Декасана рассчитывали по формуле:

$$\Delta U_{x3} = (tg\alpha_0 - tg\alpha_x) / \Delta tg_{1\%},$$

где:

- ΔU_{x3} – изменение активности холинэстеразы по сравнению с исходным состоянием, %;
- $tg\alpha_0$ – тангенс угла наклона кинетической кривой холостой пробы;
- $tg\alpha_x$ – тангенс угла наклона кинетической кривой испытуемой пробы через 30 или 60 мин после введения раствора «Декасана» или 0,9% раствора натрия хлорида;
- $\Delta tg_{1\%}$ – изменение тангенса угла наклона кинетической кривой, соответствующее изменению активности холинэстеразы на 1%;

При этом активность холинэстеразы в процентах составляет:

$$U_{x3} = \Delta U_{x3} + 100,$$

где:

- ΔU_{x3} – изменение активности холинэстеразы по сравнению с исходным состоянием, %;
- 100 – исходная активность холинэстеразы, равная 100%.

Результаты определения активности холинэстеразы приведены в таблице 6.3.

Таблица 6.3

**Изменение активности холинэстеразы плазмы кроликов
в эксперименте под влиянием препарата «Декасан», 0,02% раствор**

Условия опыта, препараты	№ п/п	Изменение активности холинэстеразы относительно исходного состояния после введения препарата, %		Активности холинэстеразы плазмы кроликов до и после введения препарата, %		
		через 30 мин	через 60 мин	исходная	через 30 мин	через 60 мин
0,9% раствор натрия хлорида	1	8,33	6,72	100	108,3	106,7
	2	7,84	1,08	100	107,8	101,1
	3	6,45	-3,23	100	106,5	96,8
	4	8,89	1,35	100	108,9	101,3
	Среднее	7,88±1,48	1,48±2,04	100	107,8±0,5	101,5±2,0
Раствор «Декасан»	1	2,80	-3,31	100	102,8	96,7
	2	20,88	3,85	100	120,9	103,8
	3	0,83	11,08	100	100,8	111,1
	4	8,91	-0,64	100	108,9	89,4
	Среднее	8,36±4,52	0,24±4,67	100	108,4±4,5	100,2±4,7

Статистическую обработку результатов проводили с использованием критерия U Манна-Уитни. Статистически значимых различий изменения активности холинэстеразы плазмы кроликов после введения раствора «Декасан» между контрольной и опытной группами не обнаружено. Эти результаты свидетельствуют об отсутствии всасывания декаметоксина из желудочно-кишечного тракта кроликов, что подтверждает приведенные выше данные об отсутствии всасывания декаметоксина из тонкой кишки крыс.

Полученные результаты согласуются с данными о зависимости фармакокинетики лекарственных веществ от их физико-химических свойств. Декаметоксин является четвертичным аммониевым основанием, а, как известно, полярные соединения плохо проникают через кожу и слизистые оболочки [81]. Незначительное относительное увеличение активности холинэстеразы у кроликов как контрольной, так и опытной групп через 30 мин после введения препарата может быть обусловлено влиянием стресса, вызванного принудительным пероральным введением препаратов. На момент окончания эксперимента (через 60 мин после введения препаратов) в обеих группах активность холинэстеразы возвращается к исходному уровню. Это, вероятно, связано с адаптацией животных к условиям опыта.

ВЫВОДЫ

1. Анализ источников литературы, описывающих научные данные о кишечных инфекциях, принципах и методах их лечения, позволяет сделать выводы о целесообразности внедрения в медицинскую практику и производство препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декамтоксина для орального применения с целью лечения кишечных инфекций.
2. В процессе изучения острой токсичности Декасана при однократном внутрижелудочном введении крысам обоего пола установлено, что значение ЛД₅₀ субстанции Декасана составляет 586 (484÷588) мг/кг, что позволяет отнести ее к IV классу малотоксичных веществ (500 мг/кг < ЛД₅₀ < 5000 мг/кг). Результаты однократного внутрижелудочного введения крысам обоего пола токсической дозы субстанции Декасана 400 мг/кг, которая не вызывает гибели, позволили установить, что в ранние сроки наблюдения (через 2 дня) отмечены признаки раздражения слизистой оболочки желудка, реактивные сдвиги в тимусе, некоторое напряжение адренокортикоцитов пучковой зоны коры и хромафинных клеток мозгового слоя надпочечников, незначительное снижение защитных возможностей слизистой оболочки тонкой кишки. Эти изменения носят преходящий характер и через 14 дней после внутрижелудочного введения субстанции Декасана в дозе 400 мг/кг морфологические нарушения в перечисленных выше тканевых структурах не регистрируются. Со стороны других органов и систем видимых изменений не выявлено.
3. Анализ результатов изучения потенциального аллергизирующего действия препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декамтоксина для орального применения свидетельствует об отсутствии аллергизирующих свойств.

4. В процессе изучения иммуотропного действия препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения установлено, что препарат не обладает иммуотоксическим действием на гуморальный и клеточный иммунный ответ.
5. Изучение потенциальных кумулятивных свойств препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения позволило сделать выводы об отсутствии у препарата кумулятивного потенциала.
6. По результатам изучения влияния препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения на мутагенез установлено, что Декасан не проявляет мутагенных свойств.
7. Изучено потенциальное гонадотоксическое действие препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения. Установлено, что внутрижелудочное введение Декасана самкам в терапевтической дозе 3 мг/кг не оказывает негативного влияния на структурную организацию яичников, не снижает резерв фолликулогенеза, не влияет на темпы развития яйцевых фолликулов, не повышает уровень атрезии фолликулов. Но в дозе 30 мг/кг, в 10 раз превышающей условно-терапевтическую, Декасан способствует снижению численности примордиальных и растущих фолликулов, что можно расценить как проявление гонадотоксического действия у самок. При введении Декасана самцам в аналогичных дозах не установлено негативное влияние как на функциональное состояние сперматозоидов, так и на структуру тестикулярной ткани и процесс сперматогенеза, т.е. Декасан не обладает гонадотоксическим действием на мужские гонады.
8. В процессе изучения эмбриотоксичности и тератогенности препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения показано отсутствие эмбриотоксического действия препарата в терапевтической дозе 3 мг/кг. Введение токсической дозы Декасана 30 мг/кг, в 10 раз превышающей терапевтическую, оказало негативное влияние на

эмбрионы в первом триместре гестации. Установлено тератогенное действие Декасана при введении его в обеих дозах в период имплантации и органогенеза, что дает основание не рекомендовать применение препарата для лечения кишечных инфекций у беременных.

9. Изучено влияние препарата «Декасан» на репродуктивную функцию самцов и самок крыс. Установлено, что препарат «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения не оказывает негативного действия в отношении репродуктивной функции самцов и самок крыс.
10. Установлено, что препарат «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения не оказывает местнораздражающего действия на слизистые оболочки лабораторных животных при местном и пероральном применении в терапевтической дозе.
11. По результатам изучения хронической токсичности препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения при его длительном (в течение 28 дней) введении самцам и самкам крыс в терапевтической дозе 3 мл/кг и в дозе 30 мл/кг, в 10 раз ее превышающую, установлено отсутствие патологических изменений в функционировании органов и систем животных.
12. Изучение антимикробной активности препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения в условиях *in vitro* показало, что Декасан обладает широким спектром антибактериальной активности в отношении грамположительных (особенно *S.aureus*, *B.subtilis*) бактерий, представителей семейства энтеробактерий (*E.coli*) и антифунгальной активностью в отношении грибов рода *Candida*, проявляя бактерицидное и фунгицидное действие.

13. В процессе изучения влияния препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения на течение инфекционного колопроктита у крыс, вызванного *S.aureus*, и инфекционного колопроктита у крыс, вызванного *P.aeruginosa*, с помощью физиологических, микробиологических, клинических, биохимических и морфологических методов исследования установлено, что Декасан за счет антимикробной активности, превышающей таковую препарата сравнения Нифуроксазида в 1,7-7,5 раза, проявляет выраженное терапевтическое действие на течение инфекционного поражения кишечника.
14. Результаты исследования фармакокинетических параметров препарата «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения свидетельствуют, что всасывание декаметоксина из исследуемого раствора в желудочно-кишечном тракте крыс и кроликов при однократном введении практически отсутствует.
15. Таким образом, вышеприведенное убедительно свидетельствует о том, что препарат «Декасан» в виде 0,02% раствора декаметоксина для орального применения является высокоэффективным, относительно безопасным и перспективным для внедрения в медицинскую практику в качестве лекарственного средства для лечения кишечных инфекций.

УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анастасий И.А. Острые инфекционные диареи: алгоритмы ведения пациентов // Электронный ресурс. – Режим доступа: <http://www.health-ua.org/archives/immuno/41.html>
2. Андрейчин М.А., Ивахив О.Л. Бактериальные диареи. – К.: Здоров'я. – 1998. – 411 с.
3. Возианова Ж.И. Инфекционные и паразитарные болезни. – К.: Здоров'я. – 2000. – Т. 1. – 904 с.
4. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А. Синдром диареи. – М.: ГЭОТАР Медицина. – 2000. – 320 с.
5. Ивашкин В.Т. Инфекционная диарея в практике гастроэнтеролога // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 1997. – Т.7, № 5. – С.51-57.
6. Лобзин Ю.В., Якушин С.Б., Захаренко С.М. Практические рекомендации по ведению пациентов с инфекционной диареей (по материалам рекомендаций Американского общества инфекционных болезней – R.L. Guerrant, T.V. et al. Practice guidelines for the management of infectious diarrhea. Clin Infect Dis 2001; 32: 331-50) // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2001. – Т. 3. – № 2. – С. 163-182.
7. Практическое руководство по антиинфекционной химиотерапии / Под ред. Л.С. Страчунского, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова. – М.: Боргес, 2002. – 381 с.
8. Секачева М.И. Роль бактериальных токсинов и инвазивных бактерий в патогенезе болезней желудочно-кишечного тракта // РЖГГК.– 2000.– № 5. – С 16-21.
9. Шептулин Ф.Ф. Алгоритм диагностики и лечения при синдроме острой диареи // РЖГГК.– 2002. – № 1. – С. 18-22.

- 10.Шувалова Е.П., Белякова Т.В., Осипова Г.И. Клиника, диагностика и терапия дизентерии // РЖГГК. – 1997. – № 5. – С. 60-66.
- 11.Ющук Н.Д., Бродов Л.Е. Дифференциальная диагностика и лечение острых кишечных инфекций // РЖГГК. – 2000. – № 5. – С. 13-16.
- 12.Ющук Н.Д., Еремушкина Я.М. Основные принципы лечения острых кишечных инфекций //Фармацевтический вестник.– 2004. – № 8. – С. 23-26.
- 13.Ющук Н.Д., Бродов Л.Е. Инфекционные диареи //РМЖ.– 2001.–Т. 9,№ 16-17. – С. 679-683.
- 14.Ющук Н.Д., Матвеев И.В., Гуревич К.Г., Бродов Л.Е. Современные принципы лечения диареи //Терапевтический архив.–2002.–№ 2.- С.73-78.
- 15.World Health Organization. The Rational Use of Drugs in the Management of Acute Diarrhoea in Children. –World Health Organization, Geneva, 1990// Электронный ресурс. – Режим доступа: <http://www.who.int/iris/handle/10665/38525>
- 16.Демьяненко Д. Применение нифуроксазида для лечения острых кишечных инфекций бактериальной этиологии // Здоров'я України. – 2008. – № 11. – Режим доступа: <http://health-ua.com/articles/2762.html>
- 17.Палій В.Г. Антисептична активність, властивості та застосування нових антимікробних препаратів // Автореф. дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Харківський науково-дослідний інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова МОЗ України. Харків, 1999. – 23 с.
- 18.Декасан: инструкция по применению // Электронный ресурс. – Режим доступа: <http://tabletki.ua/Декасан>
- 19.Коваленко В.М. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рек.] / В.М. Коваленко, О.В. Стефанов, Ю.М. Максимов, І.М. Трахтенберг [за ред.: член-кор. АМН України О. В. Стефанова] – К.: Авіцена, 2001. – С. 74–97.

20. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г. А.]. – К.: Авіцена, 2002. – 156 с.
21. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов.: [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ] / Под общ. ред. член-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 763-826.
22. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: Меди-аСфера, 2006 – 312 с.
23. Халафян А.А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных: учебник. – 3-е изд. – М.: ООО «Бином-Пресс», 2007. – 512 с.
24. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.
25. Доклінічне вивчення сенсibiliзуючої дії лікарських засобів. Методичні рекомендації. – К., 2002. – С.5-27.
26. Уланова И.П., Сидоров К.К., Халепо А.И. К вопросу об учете поверхности тела экспериментальных животных при токсикологическом исследовании / Под ред. А.А. Летавета и И.В. Саноцкого. – Л.: Изд. «Медицина», 1968. – Вып. 10. – С. 18-25.
27. Директива Совета ЕС о сближении законов, постановлений и администрирование положений государств ЕС по вопросам защиты животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (86/609/ЕС) // В кн.: Этическая экспертиза биомедицинских исследований / Под ред. Белоусова Ю.Б. – М.: Media Medica, 2005. – 156 с.
28. Адо А.Д., Ишимова Л.М. Патологическая физиология. – М.: Медицина, 1980. – 520 с.

- 29.Алиева Т.Р. Определение уровня серотонина и иммуноглобулинов Е и G в крови и лимфе при экспериментальных анафилактическом шоке и феномене Овери // Международный мед. журн. – 2011. – № 2. – С. 72-75.
- 30.Иммунологические методы / Под ред. Х.Фримеля. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.
- 31.Kitamura K. A foodpad weigh assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse // J. Immunol. Methods. – 1980. – V. 39. – P. 277-283.
- 32.Ierne K.N., Nordin A.A. Plaque formation by single antibody - producing cells // Science. – 1963. – V. 140. – P.405-406.
33. Трахтенберг І.М., Кокшарьова Н.В., Шушуріна Н.О. Вивчення кумулятивних властивостей лікарських засобів при доклінічних дослідженнях. У кн. “Доклінічні дослідження лікарських засобів (Методичні рекомендації)” / За редакцією чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С.98-101.
34. Lim R.K.S., Rink K.C. et al. A method for the evaluation of cumulation and by the determination of acute and subchronic median effective doses // Arch. Int. Pharmacol. – 1961. – Vol.130, №3/ 4. – P.336-353.
35. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 41-46.
- 36.Бочков Н.П., Дурнев А.Д., Журков В.С. и др. Система поиска и изучения соединений с антимуtagenными свойствами (Методические рекомендации) // Хим.-фарм. журн. – 1992, № 9-10. – С.42- 46.
- 37.Бочков Н.П., Демин Ю.С., Лучник Н.В. Классификация и методы учета хромосомных aberrаций в соматических клетках // Генетика. – 1972. – Т.8, № 5. – С.133-141.
- 38.Захаров А.Ф., Бенюш В.А., Кулешов Н.П., Барановская Л.И. Хромосомы человека. Атлас. – М.: Медицина, 1982. – 263 с.
- 39.Колбай И.С., Бегимбетов А.Д., Джакимбаева Г.Т. Оценка мутагенных свойств препарата метилиодида диметиламиногроссгемина //Электронный ресурс. – Режим доступа: http://www.rusnauka.com/7_NITSB_2012/Biologia/8_102660.doc.htm

40. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Г. А. Преснова, А. Н. Чистяков, В. В. Балакшин. Изучение антимуутагенного действия экстракта корня березы // Электронный ресурс. – Режим доступа: http://www.gratavita.ru/page_25.html
41. Biswas SJ, Khuda-Bukhsh AR. Effect of a homeopathic drug, Chelidonium, in amelioration of p-DAB induced hepatocarcinogenesis in mice // BMC Complement Altern Med. – 2002. – Vol.2, № 4. P. 1–16.
42. Барияк І.Р., Неумержицька Л.В., Бишовець Т.Ф., Даниленко В.С. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин // В кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). За редакцією О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – с. 139-152.
43. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. – М.: Медицина, Ленингр. отд-ние. – 1969. – 424 с.
44. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию. – М.: Медицина, 1980. – С.216.
45. Бишовець Т.Ф., Даниленко В.С., Матвієнко А.В. та ін. Експериментальне вивчення ембріотоксичної дії лікарських засобів. // В кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації). За редакцією О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – с. 115-138.
46. Дыбан А.П., Баранов В.С., Акимова И.М. Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ. // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1970. – Т.59, №10. – с. 89-100.
47. Токин Б.П., Общая эмбриология. – М.: Высшая школа, 1977. – 423 с.
48. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. – М.: Изд-во Московского университета, 1968. – 275 с.
49. Доклінічні дослідження лікарських засобів (методичні рекомендації) // За редакцією: член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – 528 с.
50. Бутенко Г.М., Терезина О.П., Максимов Ю.М., Аркадьев В.Г., Дранік Г.М., Владкова Л.В. Доклінічне вивчення сенсibiliзуючої дії лікарських засобів (методичні рекомендації). – Київ. – 2002. – 27 с.

51. Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская И.В., Любимов Б.И., Либерман С.С., Верстакова О.Л. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ / В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. проф. Р.У.Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 47-54.
52. Западнюк М.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Использование в эксперименте. – Киев: Высшая школа, 1983. – 382 с.
53. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. – М. – 1982. – С. 304.
54. Кокунин В.А. Статистическая обработка данных при малом числе опытов // Украинский біохімічний журнал. – 1975. – Т. 47, № 6. – С. 776-790.
55. Методические рекомендации по использованию поведенческих реакций животных в токсикологических исследованиях / Е.Н.Буркацкая, В.Ф.Бейер и др. – К., 1980. – 47 с.
56. Тихонов В.Н. К оценке изменений массы внутренних органов животных в токсико-гигиенических исследованиях // Гигиена и санитария. – 1981. – № 7. – С. 58-59.
57. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В.Меньшикова. – М.: Медицина. – 1987. – С. 111,122, 179-180.
58. Подымова С.Д. Современная лабораторная диагностика заболеваний печени // Клинич. медицина. – 1981. – Т. 59, № 4. – С. 104-109.
59. Кудряшов Б.А. Биологические проблемы регуляции жидкого состояния крови и ее свертывания. – М.: Медицина, 1979. – С. 488.
60. Филатов А.Н., Котовшиков М.К. Свертывающая система крови в клинической практике. – Л.: Медгиз., 1963. – С. 196.
61. Ена Я.М., Виноградова Г.Н., Светальская Л.А. и др. Определение содержания фибриногена в плазме крови // Лаб. дело. – 1986. – № 8. – С. 31-34.
62. Колб В.Г., Камышников В.С. Справочник по клинической химии. – Минск: Беларусь, 1982. – 366 с.
63. Гижларян М.С. Исследование функций печени методом "гексеналового сна" // Фармакология и токсикология. – 1976. – №3. – С. 13-14.

- 64.Шумская Н.И., Карамзина Н.Н. К оценке функционального состояния почек у крыс при отравлении промышленными веществами // Токсикология новых промышленных химических веществ. – Л.: Медицина, 1966. – В. 8. – С. 14-27.
- 65.Сумароков А.Б., Михайлов А.А. Клиническая электрокардиология. – М.: Медицина, 1975. – 224 с.
- 66.Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с., Т. 2. – 463 с.
- 67.Андрушкевич В. В. Биохимические показатели крови, их референсные значения, причины изменения уровня в сыворотке крови. – 2006, Новосибирск // Электронный ресурс. – Режим доступа: http://www.labdiagnostic.ru/docs/specialists/bioxim_poказat.shtml
- 68.Трахтенберг И.М., Сова Р.В., Шефтель В.О. Проблема нормы в токсикологии. – М.: Медицина. – 1991. – 204 с.
- 69.Волянський Ю.Л., Гриценко І.С., Ширококов В.П. та ін. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів. Методичні рекомендації ДФЦ МОЗ України. – К, 2004. – 38 с.
- 70.Василенко И. В. Морфологическая диагностика неспецифического язвенного колита» / Газета «Новости медицины и фармации», Гастроэнтерология (313). – 2010 (тематический номер) // Электронный ресурс. – Режим доступа: <http://www.mif-ua.com/archive/article/11922>
- 71.Аруин Л. И. Капуллер Л. Л., Исаков В. А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника – М.: Триада-Х – 1998. – 496 с.
- 72.Блажеєвський М.Є. Кінетичне визначення активності ферменту холінестерази за реакцією пероксикислотного окиснення та його застосування у біохімічному методі визначення інгібіторів // Вопросы химии и химической технологии. – 2003. – № 6. – С. 11-18.
- 73.Блажеєвський М.Є., Баталов А.І., Петров С.І., Сахаров Г.В., Новиков О.І. Технічні засоби індикації отруйних речовин (Навчальний посібник). – Харків: ХІТВ, 2003. – 160 с.
- 74.Блажеєвський М.Є. Визначення сполук антихолінестеразної дії біохімічним методом на основі реакції окиснення п-фенетидину як

- індикаторної / М.Є. Блажеєвський, В.В. Дядченко // Вестн. нац. техн. ун-т "ХПИ". – 2003. – Т.1, № 11. – С. 7-14.
- 75.Блажеєвський М.Є. Кінетичне визначення інгібіторів холінестераз біохімічним методом із застосуванням реакції окиснення *p*-фенетидину як індикаторної / М.Є. Блажеєвський, В.В. Дядченко // Фармац. журн. – 2004. – № 2. – С. 52-58.
- 76.Блажеєвський М.Є. Кінетичні методи визначення отруйних речовин за реакціями пергідролізу та пероксикислотного окиснення / М.Є. Блажеєвський // Праці НТШ. – Львів, 2008. – Т. 21. Хемія і біохемія. – С.150-157.
- 77.Blazheyevski M.Ye. The application of kinetic methods in pharmaceutical analysis // Methods and objects of chemical analysis. – 2011. – Т. 6, № 1. – С. 4-15.
- 78.Баталов А.І. Технічні засоби індикації отруйних речовин: Навчальний посібник / А.І. Баталов, С.І. Петров, М.Є. Блажеєвський та ін. (всього 6). – Харків: ХІТВ, 2006. – 280 с.
- 79.Бовтюшко В.Г., Маркин Б.А., Фельд В.Э. Оценка медико-биологического контроля активности холинэстераз крови // Рос. хим. журн. – 1994.- Т. 38, № 2. – С. 96-100.
- 80.Кількісне визначення декаметоксину у лікарських формах ензимно-кінетичним методом / М. Є. Блажеєвський, С. А. Карпушина, В. І. Степаненко, С. В. Баюрка // Вісник фармації. – 2007. – №4 (52). – С. 13–15.
- 81.Фармакологія в допомогу студенту, провизору и врачу: Учебник-справочник // С. М. Дроговоз, С. Ю. Штрыголь, Е. Г. Щекина. – Х. : Титул, 2013. – 900 с.