

на вказку

200105318P

МПК: G09B 23/28;

G01N 33/00

A61K 31/00

## СПОСІБ ОЦІНКИ ПРОТИАНЕМІЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЛІКАРСЬКИХ ПРЕПАРАТІВ

Даний винахід відноситься до медицини, а саме, до експериментальної медицини і вивченню біологічної активності лікарських препаратів.

Раніше, з метою вивчення механізмів дії бензолу, були створені різноманітні моделі бензольної гемопатії [2,5,16,17,18,19]. Однак, існуючі способи відтворення бензольної анемії мають ряд недоліків і не дозволяють повною мірою оцінити протианемічну активність лікарських препаратів, що спонукало нас до створення нового способу визначення протианемічної активності лікарських речовин.

У доступній нам літературі ми знайшли єдину публікацію, де описаний спосіб оцінки протианемічної активності препаратів на моделі бензольної анемії, що полягає у відтворенні анемії у кролів або мишей шляхом отруєння їх бензолом з наступним введенням досліджуваної лікарської речовини і визначенні складу крові, а саме еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів і тромбоцитів [7]. Загальними суттєвими ознаками прототипу і способу, що заявляється, є: 1) моделювання бензольної анемії здійснюють на лабораторних тваринах; 2) у тварин визначають зміни кількості еритроцитів, гемоглобіну і лейкоцитів. Недоліками прототипу є: 1) у якості піддослідних тварин використовували кролів або мишей, що призводить до значного відсотка загибелі тварин в експерименті через чутливість даних тварин до інтоксикації бензолом [10]; 2) під час введення бензолу не вводили досліджуваний лікарський препарат, що не дозволяє оцінити активність лікарського препарату в гострий період дії бензолу.



В основу винаходу поставлена задача удосконалити спосіб оцінки протианемічної активності лікарських препаратів шляхом заміни лабораторних тварин, зміни схеми введення лікарських препаратів і додаткового визначення лейкоцитарної формули крові, що забезпечить підвищення достовірності оцінки протианемічної активності лікарських препаратів.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі, який включає моделювання бензольної анемії у лабораторних тварин і визначення кількісної зміни складу крові - еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів, новим є те, що бензольну анемію моделюють на щурах при введенні лікарського препарату одночасно з бензолом і додатково визначають лейкоцитарну формулу крові. При відновленні кількості еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів та лейкоцитарної формули крові до вихідних значень оцінюють препарат як ефективний.

Причинно-наслідковий зв'язок між сукупністю ознак, що заявляються, та технічним результатом, що можна досягти, полягає у такому: 1) використання для моделювання бензольної анемії щурів, які мають сильний імунітет і більш стійкі до токсичної дії бензолу, дозволяє зберегти вихідну кількість тварин в експерименті до кінця досліджу; 2) введення лікарського препарату одночасно з введенням бензолу в експериментальній групі тварин дозволяє визначити активність лікарських речовин не тільки після відміни бензолу, але і під час його токсичної дії; 3) додаткове визначення лейкоцитарної формули крові дає можливість визначити вплив лікарського препарату на гранулоцитний і лімфоцитний ряд клітин крові, тому що бензольна інтоксикація супроводжується нейтропенією та лімфопенією.

Спосіб оцінки протианемічної активності лікарського препарату здійснюють таким чином.

Бензольну анемію створюють щоденним підшкірним введенням бензолу щурам у дозі 2 мл/кг протягом 14 днів і визначають склад крові в 1, 15 і 30 день (контрольна група тварин). Лікарський препарат вивчають на іншій групі



тварин аналогічним способом, тільки одночасно з бензолом вводять лікарський препарат (14 днів). Після відміни бензолу продовжують вводити лікарський препарат протягом 2 тижнів.

#### Приклад

А. Відтворення бензольної анемії у щурів (контроль).

Гостру токсичність ( $LD_{50}$ ) визначали на щурах по методу Прозоровського В.Б. [12].  $LD_{50}$  бензолу при підшкірному уведенні становить - 14,1 ( $9,1 \div 20,9$ ) мг/кг. Відповідно до класифікації К.К.Сидорова [15], бензол (при підшкірному уведенні) відносять до групи високотоксичних речовин.

Дослідження проводять на безпородних білих щурах масою 200-230 г. Групі з 10 щурів підшкірно щодня вводять бензол у кількості 2 мл/кг ( $1/7 LD_{50}$ ) протягом 14 днів. Кров беруть із кінчика хвоста в 1 день (до уведення бензолу), у 15 день (після уведення бензолу) і в 30 день (через 2 тижні після уведення бензолу). Визначають кількість еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів і лейкоцитарну формулу крові [14].

Статистичну обробку даних, отриманих при виконанні фармакологічних досліджень, проводили за допомогою комп'ютерної програми Microsoft Excel. Результати досліджень наведені в таблицях 1 і 2.

Як видно з таблиці 1, кількість еритроцитів і зміст гемоглобіну в крові після уведення бензолу достовірно зменшується на 17% і 15% відповідно. Крім того, кількість лейкоцитів у крові зменшується на 65% до значення  $3,6 \cdot 10^9$ /л. Склад крові через 2 тижні після відміни бензолу не відновляється до вихідного рівня. У лейкоцитарній формулі крові щурів (таблиця 2) після уведення бензолу спостерігається зниження кількості лімфоцитів у 5,4 рази, які після відміни бензолу не відновляються до вихідного рівня. Кількість нейтрофілів після уведення бензолу також зменшується, але за 2 тижні після відміни бензолу кількість юних нейтрофілів збільшується майже в 3 рази, а кількість паличкоядерних нейтрофілів збільшується в 6 разів. У тварин на другий-третій день уведення бензолу в місці уведення бензолу спостерігається набряк, а до



кінця другого тижня уведення бензолу з'являються виразково-некротичні поразки шкіри. Вага тварин за час уведення бензолу зменшується в середньому на 10%. Таким чином, даний спосіб уведення бензолу приводить до виникнення у щурів анемії з ознаками лейкопенії [3,4,6,8,13], яка не зникає через 2 тижні після відміни бензолу.

#### Б. Визначення протианемічної активності метилурацилу.

Метилурацил - лікарський препарат, який є стимулятором еритро- і лейкопоезу. Його використовують для лікування різноманітних видів лейкопеній [11].

Дослід проводять на безпородних білих щурах масою 200-230 г. Групі з 10 щурів підшкірно щодня уводять бензол у кількості 2 мл/кг ( $1/7$  ЛД<sub>50</sub>) протягом 14 днів і одночасно внутрішньочеревно уводять метилурацил ("Фармак", Україна, таблетки по 0,5 г) щодня один раз у добу у вигляді тонкої водної суспензії, стабілізованої твіном-80, у дозі 50 мг/кг [9]. Метилурацил продовжують уводити і після відміни бензолу. Кров беруть із кінчика хвоста в 1 день (до уведення бензолу), у 15 день (після уведення бензолу) і в 30 день (через 2 тижні після уведення бензолу). Визначають кількість еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів і лейкоцитарну формулу крові.

Результати досліджень наведені в таблицях 1 і 2.

За даними, приведеними у таблиці 1, можна зробити висновок, що у тварин, яким уводили бензол і метилурацил, виникає анемія, тому, що кількість еритроцитів і гемоглобіну в крові після уведення бензолу зменшуються на 21% і 11% відповідно. Причому, ці значення через 2 тижні після відміни бензолу не відновляються, тобто метилурацил не ефективний у лікуванні анемії. Кількість лейкоцитів після уведення бензолу знижується на 58% і відновляється через 2 тижні після відміни бензолу майже до вихідного рівня. У лейкоцитарній формулі крові щурів після уведення бензолу кількість лімфоцитів знижується в меншому ступені, чим у контролі, і відновлення їх відбувається швидше. Динаміка змін кількості нейтрофілів при лікуванні щурів метилурацилом



незначно відрізняється від динаміки змін їх у контролі. набряк у місці введення бензолу менше виражений і з'являється в кінці першого тижня введення бензолу. Виразково-некротичних поразок шкіри не спостерігали. Таким чином, при лікуванні тварин метилурацилом під час введення бензолу розвиваються ознаки анемії і лейкопенії, у майже такій же мірі як і в контролі. За відновний період анемія не виліковується, а лейкопенія виліковується повністю.

В. Визначення протианемічної активності преднізолону.

Преднізолон - лікарський препарат, що має протизапальну і протиалергічну дію. Може використовуватися для лікування гемолітичної анемії [11].

Дослід проводять на безпородних білих щурах масою 200-230 г. Групі з 10 щурів підшкірно щодня вводять бензол у кількості 2 мл/кг (1/7 ЛД<sub>50</sub>) протягом 14 днів і одночасно внутрішньочеревно вводять преднізолон («Хафслунд Нікомед Фарма АГ», Австрія, 25 мг у 1 мл - ампули) щодня один раз у добу у вигляді водного розчину в дозі 10 мг/кг [1]. Преднізолон продовжують вводити і після відміни бензолу. Кров беруть із кінчика хвоста в 1 день (до введення бензолу), у 15 день (після введення бензолу) і в 30 день (через 2 тижні після введення бензолу). Визначають кількість еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів і лейкоцитарну формулу крові.

Результати досліджень наведені в таблицях 1 і 2.

Преднізолон, на відміну від метилурацила, є гарним препаратом для лікування анемії. Це очевидно з таблиці 1. Кількість еритроцитів і гемоглобіну в крові після введення бензолу зменшується на 12% і 9% відповідно (менше, ніж у контролі), і кількість еритроцитів відновляється через 2 тижні після відміни бензолу майже до вихідного рівня. Кількість лейкоцитів зменшується на 40%, що менше, ніж у контролі та при лікуванні метилурацилом. Але через 2 тижні після відміни бензолу кількість лейкоцитів не відновляється до вихідного значення. Причому в лейкоцитарній формулі крові щурів після відміни бензолу спостерігається збільшення кількості нейтрофілів, особливо сегментоядерних.



Лімфоцити зменшуються після уведення бензолу майже так само, як і при лікуванні щурів метилурацилом, але практично не відновляються за 2 тижні лікування преднізолоном. Кількість еозинофілів після відміни бензолу в контролі і при лікуванні метилурацилом збільшується, а при лікуванні щурів преднізолоном зменшується. набряк у місці уведення бензолу менше виражений і з'являється в кінці першого тижня уведення бензолу. Виразково-некротичні поразки шкіри спостерігали у деяких тварин. Таким чином, при лікуванні тварин преднізолоном під час уведення бензолу розвиваються ознаки анемії, але в меншому ступені, ніж у контролі. За відновний період анемія виліковується, а відновлення кількості лейкоцитів не відбувається. Зменшення кількості еозинофілів підтверджує протиалергічні властивості даного лікарського препарату.



Таблиця 1

Склад крові щурів при бензольній інтоксикації

Показники крові	Етапи досліджу	Групи тварин		
		Контроль	Метилурацил	Преднізолон
1	2	3	4	5
Еритроцити 10 <sup>12</sup> /л	До введення бензолу (1)	6,63±0,07	6,59±0,05	6,32±0,06
	Після введення бензолу (2)	5,49±0,06	5,24±0,10	5,56±0,10
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	5,05±0,05	5,70±0,07	6,34±0,05
	Різниця між 2 і 1	-17%*	-21%*	-12%*
	Різниця між 3 і 1	-9%*	-14%*	0%*
	Різниця між 3 і 2	+10%*	+9%*	+14%*
Гемоглобін г%	До введення бензолу (1)	18,73±0,18	18,74±0,11	18,27±0,06
	Після введення бензолу (2)	15,92±0,19	16,71±0,23	16,66±0,16
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	17,43±0,16	16,70±0,35	17,07±0,33
	Різниця між 2 і 1	-15%*	-11%*	-9%*



Таблиця 1 (продовження)

1	2	3	4	5
Лейкоцити 10 <sup>9</sup> /л	Різниця між 3 і 1	-7%*	-11%*	-7%*
	Різниця між 3 і 2	+9%*	0%*	+2%*
	До введення бензолу (1)	10,44±0,54	10,81±0,43	10,65±0,64
	Після введення бензолу (2)	3,62±0,16	4,55±0,29	6,39±0,28
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	7,72±0,38	10,33±0,81	7,78±0,35
	Різниця між 2 і 1	-65%*	-58%*	-40%*
	Різниця між 3 і 1	-26%*	-4%*	-27%*
	Різниця між 3 і 2	+113%*	+127%*	+22%*

\* -  $p \leq 0,05$



Таблиця 2

Лейкоцитарна формула крові щурів при бензольній інтоксикації

Лейкоцити 10 <sup>9</sup> /л	Етапи досліджу	Групи тварин		
		Контроль	Метилурацил	Преднізолон
1	2	3	4	5
Нейтрофіли	Юні	0,05±0,01	0,03±0,01	-
		0,01±0,01	0,01±0,01	-
		0,14±0,01	0,12±0,02	-
		-82%	-79%	-
		+162%	+332%	-
		+1323%*	+1958%*	-
Паличко- ядерні	До введення бензолу (1) Після введення бензолу (2) Через 2 тижні після введення бензолу (3) Різниця між 2 і 1 Різниця між 3 і 1 Різниця між 3 і 2	0,24±0,02	0,26±0,02	0,25±0,02
		0,18±0,02	0,21±0,02	0,70±0,04
		1,52±0,10	1,51±0,11	1,71±0,11
		-27%*	-21%*	+180%*
		+528%*	+482%*	+578%*
		+766%*	+632%*	+142%*



Таблиця 2 (продовження)

1	2	3	4	5
Сегментно-ядерні	До введення бензолу (1)	2,10±0,09	1,85±0,07	1,88±0,13
	Після введення бензолу (2)	1,92±0,15	1,60±0,11	3,43±0,15
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	1,71±0,17	1,60±0,10	2,96±0,17
	Різниця між 2 і 1	-9%*	-14%*	+82%*
	Різниця між 3 і 1	-19%*	-13%*	+58%*
	Різниця між 3 і 2	-11%*	0%*	-14%*
	До введення бензолу (1)	7,84±0,44	8,38±0,34	8,20±0,58
	Після введення бензолу (2)	1,45±0,10	2,60±0,17	2,14±0,12
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	3,66±0,32	6,18±0,49	3,10±0,17
Лімфоцити	Різниця між 2 і 1	-82%*	-69%*	-74%*
	Різниця між 3 і 1	-53%*	-26%*	-62%*
	Різниця між 3 і 2	+153%*	+137%*	+45%*
	До введення бензолу (1)	0,07±0,02	0,01±0,01	0,02±0,01
	Після введення бензолу (2)	0,02±0,01	0,06±0,01	0,04±0,01
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	0,05±0,01	0,04±0,01	-
	Різниця між 2 і 1	-69%	+481%	+156%
	Різниця між 3 і 1	-26%	+280%	-100%
	Різниця між 3 і 2	+139%	-35%	-100%
Моноцити	До введення бензолу (1)			
	Після введення бензолу (2)			
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)			
	Різниця між 2 і 1			
	Різниця між 3 і 1			
	Різниця між 3 і 2			
	До введення бензолу (1)			
	Після введення бензолу (2)			
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)			



Таблиця 2 (продовження)

1	2	3	4	5
Базофіли	До введення бензолу (1)	-	-	-
	Після введення бензолу (2)			
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	-	-	-
	Різниця між 2 і 1	-	-	-
	Різниця між 3 і 1	-	-	-
	Різниця між 3 і 2	-	-	-
Еозинофіли	До введення бензолу (1)	0,14±0,03	0,28±0,02	0,30±0,05
	Після введення бензолу (2)	0,03±0,01	0,06±0,01	0,07±0,02
	Через 2 тижні після введення бензолу (3)	0,59±0,08	0,88±0,11	0,02±0,01
	Різниця між 2 і 1	-77%*	-76%*	-75%*
	Різниця між 3 і 1	+325%*	+216%*	-93%*
	Різниця між 3 і 2	+1715%*	+1202%*	-73%*

\* -  $p \leq 0,05$



## ЛІТЕРАТУРА

1. Абсава Г.И., Авруцкий М.Я., Вайсберг Л.А. и др. // Хим.-фармац. журн. – 1986. – Т. 20, № 11. – с. 1385-1391.
2. Воспроизведение заболеваний у животных для экспериментально-терапевтических исследований. / Под ред. И.В.Лазарева. – Л.: Медгиз, 1954. – 395 с.
3. Гаврилов О.К., Файнштейн Ф.Э., Турбина Н.С. Депрессии кроветворения. – М.: Медицина, 1987. – 256 с.
4. Гематология детского возраста: Руководство для врачей. / Под ред. Н.А.Алексеева. – СПб.: Гиппократ, 1998. – 544 с.
5. Доброхотов В.Б. // Гиг. и сан.: – 1972. – № 10. – С. 36-39.
6. Довідник з гематології / А.Ф.Романова, Я.І.Виговська, В.Є.Логинський та ін.; За ред. А.Ф.Романової. – К.: Здоров'я, 1997. – 324 с.
7. Захарія К.А., Сакун Т.Л. // Фармац. журн. – 1978. – № 1. – С. 89-91.
8. Захаров В.Н., Караулов А.В., Соколов В.В., Фраш В.Н. Изменения системы крови при воздействии радиации и бензола. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние, 1990. – 241 с.
9. Лазарева Д.Н. // Фармакол. и токсикол. – 1975. – Т. 38, № 3. – С. 311-313.
10. Маняшин Ю.А., Савченков М.Ф., Сиднев Г.В. // Фармакол. и токсикол. – 1968. – Т. 31, № 2. – С. 250-253.
11. Машковский М.Д. Лекарственные средства: В 2 т. – 14-е изд., перераб., испр. И доп. – М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2000. – Т.2. – 608 с.
12. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. // Фармакол. и токсикол. – 1978. – Т. 41, № 4. – С. 497-502.
13. Романова А.Ф. Гипопластическая и апластическая анемия. – Киев: Здоров'я, 1982. – 152 с.



14. Руководство по клинической лабораторной диагностике. В 2-х ч. / Под ред. Проф Базарновой М.А. – Киев.: Вища школа. Головное изд-во, 1982. - Ч. 2. – 175 с.
15. Сидоров К.К. // Токсикология новых промышленных химических веществ. – 1973. – Вып. 13. – С. 43-51.
16. Тихачек Е.С., Фраш В.Н. // Гиг. труда. – 1973. - № 8. – С. 30-33.
17. Фраш В.Н., Юшков Б.Г., Караулов А.В., Скуратов В.Л. // Бюл. exper. биол. и медицины. – 1976.- Т. LXXXII, № 7. – С. 797-799.
18. Barrera Escorcía E., Velasco Lezama R., Munoz Torres A. et al.// Sangre (Barc) – 1997. – V. 12, № 5. – P. 357-362.
- 19 Dempster AM, Evans HL, Snyder CA. // Toxicol Appl Pharmacol. – 1984. – V. 76, № 1. – P. 195-203.