УДК 615.015.36 + 004.942

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НАТРИЕВОЙ И АЛЮМИНИЕВОЙ СОЛЕЙ ХОНДРОИТИНА СУЛЬФАТА IN SILICO И IN VIVO

Карпова Е.М., Савельева К.Р., Хлябич К.Г.

ФБУ «Государственный институт кровезаменителей и медицинских препаратов», Москва, e-mail: karpova_e_m@mail.ru

Получено новое соединение на основе хондроитина – алюминиевая соль хондроитина сульфата. Натриевая соль хондроитина сульфата длительное время применяется в комплексной терапии артрологических заболеваний, обладает противовоспалительным и хондропротективным действием, имеет хорошую переносимость и высокую степень безопасности даже при длительном курсе лечения. Алюминиевая соль хондроитина сульфата за счет противовоспалительных свойств хондроитина и антацидного эффекта алюминия является перспективным соединением с гастропротектоным действием. Цель исследования состояла в сравнительном изучении острой токсичности натриевой и алюминиевой солей хондроитина по результатам компьютерного моделирования и изучения на экспериментальных животных. Спрогнозирована острая токсичность алюминиевой и натриевой солей хондроитина сульфата по результатам компьютерного моделирования с помощью программного продукта GUSAR. Экспериментально изучена острая токсичность алюминиевой соли хондроитина сульфата в сравнении с натриевой солью хондроитина сульфата на лабораторных животных при различных путях поступления в организм. Показано, что алюминиевая соль хондроитина сульфата является малотоксичным соединением, не обладает местно-раздражающим действием при пероральном применении и является фармакологически перспективным веществом для скрининга гастропротекторных свойств.

Ключевые слова: алюминиевая соль хондроитина сульфата, натриевая соль хондроитина сульфата, острая токсичность, прогнозирование токсичности

COMPARATIVE STUDY OF CHONDROITIN SULFATE SODIUM AND ALUMINIUM SALTS ACUTE TOXICITY IN SILICO AND IN VIVO

Karpova E.M., Saveleva K.R., Khlyabich K.G.

State Institute of Blood Substitutes and Medical Preparations, Moscow, e-mail: karpova_e_m@mail.ru

Chondroitin sulfate aluminium salt – the new chondroitin's derivate had obtained. Chondroitin sulfate sodium salt is using in complex therapy of arthrologic diseases for a long time. This substance possesses anti-inflammatory and chondroprotective properties, have good tolerability and high drug safety even with long-term administration. Due to the anti-inflammatory activity of chondroitin and the antacidic action of aluminium new chondroitin's derivate is appear as promising antiulcer agent. The aim of this study consists in acute toxicity's comparative estimation of chondroitin sulfate aluminium salt and chondroitin sulfate sodium salt based on computer algorithm and experimental investigation. Acute toxicity prediction of chondroitin sulfate aluminium salt and chondroitin sulfate sodium salt had made on computer simulation results using software product GUSAR. Acute toxicity of chondroitin sulfate aluminium salt in comparision with chondroitin sulfate sodium salt had experimentally investigated on laboratory animals by different route of introduction. We have revealed, that chondroitin sulfate aluminium salt is substance with low toxicity, it does not possessed the local irritation action and presented as pharmacological perspective agent for antiulcer activity screening.

Keywords: chondroitin sulfate aluminium salt, chondroitin sulfate sodium salt, acute toxicity, toxicity prediction

Натриевая соль хондроитина сульфата (Na-ХС), представляющая собой полимерный гликозаминогликан (мукополисахарид), является одним из важнейших компонентов хрящевой ткани суставов [3]. Противовоспалительное и хондропротективное действие, а также хорошая переносимость и высокая степень безопасности даже при длительном применении данного соединения продемонстрированы в экспериментальных и клинических исследованиях [5, 10]. Препараты на основе Na-ХС в различных лекарственных формах длительное время применяются в клинической практике и эффективно используются в комплексной терапии артрологических заболеваний [8, 13, 15].

В ФБУ «ГИКиМП» на протяжении длительного времени изучают хондроитина сульфат и получают его соли с различными элементами – натрием, медью, алюминием и т.д. Алюминиевая соль хондроитина сульфата (Al-ХС) является перспективным соединением с гастропротекторным действием за счет противовоспалительного эффекта хондроитина и антацидных свойств алюминия.

В настоящее время для всесторонней оценки новых соединений достаточно широко применяют методы компьютерного моделирования, получивших общее название *in silico* (от in silicon, т.е. «в кремнии») [14]. Подход *in silico* является многоуровневым, с его использованием исследователь, основываясь только на структуре соединения, имеет возможность смоделировать разнообразные характеристики и взаимодействие отдельных молекул, биохимические

процессы и функционирование отдельных физиологических систем.

В Институте биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН разработаны алгоритмы прогнозирования спектра активности и предсказания токсичности, на основе которых созданы веб-сервисы, доступные в онлайн-режиме [1, 2]. Данные специализированные программные продукты предсказывают более 4300 видов биологической активности, механизмов действия и специфической токсичности потенциально перспективных соединений, основываясь на их структурных формулах со средней точностью прогноза около 95 %, [6, 12].

Целью настоящего исследования явилось сравнительное изучение острой токсичности натриевой и алюминиевой солей хондроитина сульфата на основании компьютерного прогнозирования (*in silico*) и экспериментального исследования на животных (*in vivo*).

Материалы и методы исследования

Прогноз острой токсичности исследуемых соединений – натриевой и алюминиевой солей хондроитина сульфата (Na-ХС и Al-ХС) – осуществляли с использованием программного продукта GUSAR (General Unrestricted Structure-Activity Relationships) [1, 12].

Экспериментальная работа по изучению острой токсичности выполнена на беспородных крысах-самцах (массой 180–200 г) по 6 особей в группе сравнения.

Для исследования острой токсичности использовали субстанцию хондроитина сульфата натрия (производства Bioiberica, Испания) и алюминиевую соль хондроитина сульфата, полученную в лаборатории мукополисахаридов ФБУ «ГИКиМП».

Острую токсичность Na-ХС и Al-ХС оценивали при внутрибрюшинном, подкожном и внутрижелудочном введении. Исследуемые соединения вводили в виде суспензий, приготовленных на физиологическом растворе, контрольные животные получали физиологический раствор. Исследуемые вещества в дозах более 2 000 мг/кг вводили дробно за период времени (не более 6 часов) [7]. Продолжительность наблюдения за состоянием животных после введения веществ составляла 14 суток.

Значение показателя LD_{50} рассчитывали при помощи специализированной программы Probit Analysis V 0.2 (НПП «Наука Плюс», Украина), разработанной на основе метода максимального правдоподобия [11]. Величину стандартной ошибки показателя LD_{50} вычисляли общепринятым способом [4].

Результаты исследований и их обсуждение

Ориентируясь на данные литературы об острой токсичности Na-ХС [9] и результаты прогнозирования острой токсичности Al-ХС, исследуемые соединения вводили в диапазонах доз, значения которых приведены в табл. 1. Интервал между дозами обоих соединений являлся постоянным и подбирался индивидуально при каждом способе введения.

Таблица 1

Диапазон доз исследуемых веществ в зависимости от способа введения

Путь введения	Диапазон доз, мг/кг	
	Na-ХС	Al-ХС
Внутрибрюшинный	1 750–3 000 (250)	200–1 200 (200)
Подкожный	3 000–4250 (250)	600–1 600 (200)
Внутрижелудочный	7 500–10 000 (500)	2 000–3 500 (300)

Примечание. В скобках приведены интервалы доз (шаг дозы) для каждого исследуемого диапазона.

При внутрибрюшинном введении симптомы интоксикации в виде угнетения, отека и затруднения дыхания появлялись через 5–10 минут и достигали максимума через 2 часа после инъекции. Выраженность симптомов отравления нарастала с увеличением дозы исследуемых веществ.

Летальность животных в экспериментальных группах наступала в течение первых суток. При вскрытии погибших животных зафиксированы обширные кровоизлияния в брюшной полости. Существенных различий в проявлении симптомов отравления и времени наступления летального исхода между Na-ХС и Al-ХС не отмечено.

После подкожного введения наблюдали картину интоксикации, сходную с таковой при внутрибрюшинном введении исследуемых веществ. Через 2 часа после подкожного введения препарата во всех дозах у экспериментальных животных также наблюдали угнетение, отек и затрудненное дыхание. Через 24 часа после инъекции состояние всех выживших животных нормализовалось. После подкожных инъекций в участке введения отмечены местные реакции в виде инфильтратов.

При внутрижелудочном введении Na-ХС во всем диапазоне исследуемых доз реакция на введение вещества отсутствовала. Смертность в экспериментальных группах не зарегистрирована. После перорального введения Al-ХС у животных отмечены гиподинамия, нарушения коорди-

нации движений, учащенное дыхание. При введении больших доз вещества животные слабо реагировали на внешние раздражители. Данные симптомы возникали через 10–15 минут с момента введения и достигали максимальной выраженности проявлений через 1,5–2 часа после поступления в организм Al-ХС. Случаи летального исхода фиксировались в первые 18–20 часов. Через сутки состояние выживших животных не отличалось от физиологической нормы. Местно-раздражающего действия при данном пути поступления в организм не обнаружено.

Результаты предсказания острой токсичности Na-ХС и Al-ХС для крыс с использованием программного продукта GUSAR и значения показателей острой токсичности, полученные экспериментально, сведены в табл. 2.

Таблица 2

Значения показателей острой токсичности Na-ХС и Al-ХС по результатам исследований *in vivo* и *in silico* [1, 12] в зависимости от способа введения

Путь введения	LD_{50}, мг/кг	
	Na-ХС	Al-ХС
in silico		
Внутрибрюшинный	2612	609
Подкожный	3856	1084
Внутрижелудочный	7453	3250
In vivo		
Внутрибрюшинный	2708±315	700±161
Подкожный	3625±201	1035±112
Внутрижелудочный	> 10000	2802±224

Результаты компьютерного моделирования острой токсичности Na-ХС близки к значениям острой токсичности данного соединения по данным литературы: LD_{50} при внутрибрюшинном введении составляет 2 900 мг/кг, при внутрижелудочном введении – более 10 000 мг/кг, при подкожном введении 3 700 мг/кг.

Значения показателей LD_{50} как для Na-ХС, так и для Al-ХС, при внутрибрюшинном и подкожном способах введения по результатам прогнозирования и на основании экспериментальных данных существенно не отличаются. Разница для каждого соединения в зависимости от пути поступления в организм находится в пределах величины стандартной ошибки показателя.

При внутрижелудочном введении значение LD_{50} для Na-ХС по прогнозу оказалось на 25 % ниже, чем его величины, полученные *in vivo* и приведенные в литературе. По результатам исследования *in vivo* Na-ХС является менее токсичным соединением, чем на основании результатов компьютерного моделирования.

Для Al-ХС при пероральном введении наблюдался противоположный эффект – экспериментально установленная величина LD_{50} на 14 % меньше, чем по результатам компьютерного моделирования. На основании оценок *in vivo* Al-ХС обладает более высокой токсичностью, чем по данным прогноза *in silico*.

Заключение

Значения показателей острой токсичности Na-ХС и Al-ХС, полученные на основании компьютерного моделирования и в эксперименте на животных, являются достаточно близкими для каждого из изученных веществ при соответствующем пути введения. Таким образом, результаты предсказания острой токсичности новых соединений могут служить ориентиром при скрининге фармакологически перспективных соединений.

Установлено, что Al-ХС является малотоксичным соединением. При внутрижелудочном введении Al-ХС не оказывает местно-раздражающего действия, значение LD_{50} при данном пути поступления значительно превышает терапевтические пероральные дозы для препаратов с антацидным и гастропротекторным действием. Алюминиевая соль хондроитина сульфата является перспективным соединением для дальнейших исследований специфической фармакологической активности с целью создания нового лекарственного препарата.

Список литературы

1. Веб-сервис для прогнозирования острой токсичности химических веществ для млекопитающих [Электронный ресурс]. – URL: http://www.pharmaexpert.ru/GUSAR / acutoxpredict.html (дата обращения 05.03.2012).

2. Веб-сервис для прогнозирования спектра активности новых веществ [Электронный ресурс]. – URL: http:// pharmaexpert.ru/passonline (дата обращения 05.03.2012).

3. Иванкин А.Н., Васюков С.Е., Панов В.П. Получение, свойства и применение хондроитинсульфатов // Химико-фармацевтический журнал. – 1985. – Т.19, № 3. – С. 192–202.

4. Иванов Ю.И., Погорелюк О.Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. – М.: Медицина, 1990. – 224 с.

5. Насонова В.А., Алексеева Л.И., Архангельская Г.С. и др. Итоги многоцентрового клинического исследования препарата структум в России // Новые возможности в лечении остеоартроза и остеохондроза. – М., 2006. – С. 5–7.

6. Компьютерное предсказание биологической активности химических веществ: Виртуальная хемогеномика / В.В. Поройков, Д.А. Филимонов, Т.А. Глориозова и др. // Вестник ВОГиС. – 2009. – Т. 13, № 1. – С. 137–143.

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

8. Чичасова Н.В. Хондроитин сульфат (Структум) в лечении остеоартроза: патогенетическое действие и клиническая эффективность // РМЖ. – 2009. – Т.17, № 3. – С. 3–7.

9. Chondroitin Sulfate Sodium Salt. Material Safety Data Sheet. – CHEMWATCH, 2010. – 6 p.

10. Jordan K.M., Arden N. K., Doberty M. et al. Eular recommendations 2003 // Ann. Rheum. dis. – 2003. – Vol. 62. – P. 1145–1155.

11. Finney D.J. Probit Analysis (3rd ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK. – 1971. – 318 p.

12. Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction // Molecular Informatics. – 2011. – Vol. 30. – P. 241–250.

13. Mazières B., Loyau G., Menkès C.J. Chondroitin sulfate in the treatment of gonarthrosis and coxarthrosis. 5-months result of a multicenter double-blind controlled prospective study using placebo // Rev. Rhum. Mal. Osteoartic. – 1992. – Vol. 59. – P. 466–472.

14. Sieburg H.B. Physiological Studies in silico // Studies in the Sciences of Complexity. – 1990. – Vol. 12. – P. 321–342.

15. Schneider H., Maheu E., Cucherat M. Symptom-modifying effect of chondroitin sulfate in knee osteoarthritis: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials performed with structum(®) // Open Rheumatol. J. – 2012. – Vol. 6. – P. 183–189.

References

1. Veb-servis dlja prognozirovanija ostroj toksichnosti himicheskih veshhestv dlja mlekopitajushhih (Acute toxicity prediction GUSAR Online) Available at: http://www.pharmaexpert.ru / GUSAR/acutoxpredict.html (accessed 05.03.2012).

2. Veb-servis dlja prognozirovanija spektra aktivnosti novyh veshhestv. (Predictive service PASS Online) Available at: http://pharmaexpert.ru/passonline (accessed 05.03.2012).

3. Ivankin A.N., Vasjukov S.E., Panov V.P. *Himiko-farmacevticheskij zhurnal*, 1985. Vol.19, no 3. pp. 192–202.

4. Ivanov Ju.I., Pogoreljuk O.N. *Statisticheskaja obrabotka rezul'tatov mediko-biologicheskih issledovanij na mikrokal'kuljatorah po programmam*. Moscow, 1990. 224 p.

5. Nasonova V.A., Alekseeva L.I., Arhangel'skaja G.S. *Novye vozmozhnosti v lechenii osteoartroza i osteohondroza*. Moscow, 2006. pp. 5–7.

6. Porojkov V.V., Filimonov D.A., Gloriozova T.A. *Vestnik VOGiS*, 2009. Vol. 13, No. 1. P. 137-143.

7 *Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv* (Guidance on preclinical trials realization of new medicines). Moscow, 2012. 944 p.

8. Chichasova N.V. *RMJ*., 2009. Vol.17, no 3. pp. 3–7.

9. Chondroitin Sulfate Sodium Salt. Material Safety Data Sheet. CHEMWATCH, 2010. 6 p.

10. Jordan K.M., Arden N. K., Doberty M. *Ann. Rheum. dis.*, 2003. Vol. 62. pp. 1145–1155.

11. Finney D.J. Probit Analysis (3rd ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1971. 318 p.

12. Lagunin A., Zakharov A., Filimonov D., Poroikov V. *Molecular Informatics*, 2011. Vol. 30. pp. 241–250.

13. Mazières B., Loyau G., Menkès C.J. *Rev. Rhum. Mal. Osteoartic*., 1992. Vol. 59. pp. 466–472.

14. Sieburg H.B. *Studies in the Sciences of Complexity*,1990. Vol. 12. pp. 321–342.

15. Schneider H., Maheu E., Cucherat M. *Open Rheumatol. J*., 2012. Vol. 6. pp. 183–189.

Рецензенты:

Рожнов Г.И., д.м.н., профессор, консультант лаборатории биомоделей, ФБУ «Государственный институт кровезаменителей и медицинских препаратов» Министерства промышленности и торговли РФ, г. Москва;

Суханов Ю.С., д.м.н., профессор, зав. лабораторией технологии кровезаменителей, ФБУ «Государственный институт кровезаменителей и медицинских препаратов» Министерства промышленности и торговли РФ, г. Москва.

Работа поступила в редакцию 20.08.2013.