

Экспериментальная оценка влияния препарата Кагоцел на генеративную функцию животных

В эксперименте на белых крысах изучено влияние противовирусного препарата Кагоцел на генеративную функцию. Установлено, что Кагоцел в условиях длительного ежедневного перорального введения подопытным животным не оказывает отрицательного действия на гонады животных и их плодовитость, что подтверждается результатами морфологического анализа семенников и

Введение. Кагоцел является отечественным противовирусным препаратом для лечения и профилактики гриппа, ОРВИ и герпеса. Механизм противовирусного действия Кагоцела заключается в способности вызывать образование в организме человека так называемого «позднего» интерферона (ИФН), являющегося смесью α -ИФН и β -ИФН, обладающих высокой противовирусной и иммуномодулирующей активностью. При этом Кагоцел стимулирует продукцию ИФН практически во всех популяциях клеток, принимающих активное участие в противовирусном ответе организма: Т- и В-лимфоцитах, макрофагах, гранулоцитах, фибробластах, эндотелиальных клетках. Препарат в настоящее время широко применяется в медицинской практике [4–5].

Действующее вещество препарата Кагоцел является продуктом химического синтеза, в ко-

*С.П. Рыбалкин¹, Е.В. Ковалева¹,
Т.А. Гуськова², Т.Б. Савинова²*

¹ФГБУН «Научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации биопрепаратов Федерального медико-биологического агентства», п. Большевик, Серпуховский р-н, Московская обл.

²ФГБУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» РАМН, г. Москва

функционального состояния сперматозоидов у самцов, а также результатами оценки воздействия препарата на эмбриогенез и на потомство крыс, длительно получавших препарат перед спариванием.

Ключевые слова: *Кагоцел, госсиполуксусная кислота, генеративная функция, морфологический метод, метод спаривания.*

тором к полимерной полисахаридной матрице (карбоксиметилцеллюлозе) ковалентно присоединяются молекулы госсипола – природного полифенольного пигмента, обладающего целым рядом полезных биологических свойств, включая противовирусную активность [10]. Из литературы известно, что сам госсипол в определенных дозах способен подавлять сперматогенез у разных видов животных (антифертильный эффект) [7]. Но при ковалентном связывании различных молекул с альдегидными группами госсипола значительно снижается как общая токсичность последнего, так и его антифертильное действие [6, 8]. В то же время другие биологические свойства госсипола, включая противовирусную активность, сохраняются [2, 9]. Учитывая вышеизложенное, для оценки безопасности применения Кагоцела в медицинской практике необходимо было ис-

следовать его влияние на генеративную функцию животных.

Материалы и методы исследования. Влияние Кагоцела на генеративную функцию самцов изучали морфологическим методом на самцах крыс линии Вистар (источник – ГУ НЦБТ РАМН, филиал «Столбовая»), а также методом спаривания самцов с самками. Животных содержали в стандартных условиях, рекомендуемых для грызунов [1].

Кагоцел вводили самцам крыс перорально в 1%-ном крахмальном геле в двух дозах – 9 мг/кг (в расчете на содержание активной субстанции), что соответствовало максимальной суточной терапевтической дозе для человека, и 225 мг/кг. Крысам одной контрольной группы давали плацебо – смесь вспомогательных веществ лекарственной формы исследуемого препарата в дозе 225 мг/кг, а второй – госсиполуксусную кислоту (далее – ГУК) в дозе 6,75 мг/кг, что соответствовало максимально возможному содержанию ковалентно связанного госсипола в субстанции Кагоцела (3% от 225 мг/кг). Препарат вводили самцам в течение 70 дней, что соответствует продолжительности цикла сперматогенеза у крыс. Через сутки после последнего введения препарата животных подвергали эвтаназии ингаляцией углекислого газа и готовили суспензию эпидидимисов в изотоническом растворе хлорида натрия для определения функционального состояния сперматозоидов по показателям: среднее количество сперматозоидов (млн./мл), относительное количество неподвижных сперматозоидов (%), время подвижности сперматозоидов (мин), относительное количество патологических форм сперматозоидов (%). При анализе гистопрепаратов семенника подсчитывали среднее количество нормальных сперматогоний в 1 канальце и относительное число канальцев с 12-й стадией мейоза, а также рассчитывали индекс сперматогенеза [3].

При анализе числовых данных применена описательная статистика: подсчитаны средние значения выборок и стандартное отклонение ($M \pm SD$). Определение значимости межгрупповых различий проводили при изучении влияния препаратов на развитие потомства и генеративную способность с использованием критерия Стьюдента для двух выборок, а в экспериментах по оценке влияния препаратов на сперматогенез – с использованием непараметрического критерия Краскела-Уоллеса с поправкой Бонферони для нескольких групп. Различия определяли при уровне доверительной вероятности 95%. Статистическая обработка результатов проводилась с применением компьютерной программы Statistica 8.

Изучение влияния субстанции Кагоцела на генеративную функцию крыс методом спари-

вания проведено на беспородных белых крысах. Количество крыс в группе – 14 самок и 10 самцов. До спаривания подопытные животные получали перорально Кагоцел в дозах 100 мг/кг и 10 мг/кг, а контрольные – воду: самцы в течение 60 дней, самки – в течение 15 дней. Контролируемое спаривание проводили в течение двух эстральных циклов. Для оценки способности крыс к воспроизводству рассчитывали в процентах индекс плодовитости (ИП) по соотношению числа оплодотворенных самок к числу самок, подсаженных к самцам, и индекс беременности (ИБ) по соотношению числа беременных самок к числу оплодотворенных.

Половину беременных самок подвергали эвтаназии на 21-й день беременности для изучения показателей антенатального развития потомства (рассчитывали ИБ). Остальных беременных самок оставляли до естественных родов и вели наблюдение за выживаемостью и физическим развитием потомства в течение трех недель после рождения. При этом фиксировали количество крысят в помете, сроки покрытия шерстью, «отлипания» ушной раковины, открытия глаз. В период вскармливания оценивали скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов по следующим тестам: переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис и избегание обрыва, реакция на акустический стимул, обонятельная реакция, удержание на сетке при подвешивании передними лапами.

Результаты и обсуждение

Изучение влияния препарата Кагоцел на генеративную функцию самцов морфологическим методом. При анализе показателей функционального состояния сперматозоидов, выделенных из придатков семенников крыс, не было установлено статистически значимых различий в подопытных и контрольных группах (табл. 1). Однако средний показатель общего количества сперматозоидов у крыс, получавших Кагоцел в обеих дозах, несколько превышал таковой у животных контрольных групп, хотя зависимость «доза–эффект» отсутствовала. При гистологическом исследовании семенника не было установлено изменений морфологической структуры органа и повреждения сперматогенного эпителия ни в одной из подопытных или контрольных групп крыс: число канальцев с завершённым сперматогенезом было преобладающим, количество сперматогониев в канальцах соответствовало показателям нормы, канальцы с 12-й стадией мейоза встречались в единичных случаях (табл. 2).

Некоторое статистически незначимое уменьшение относительной массы семенников крыс, получавших Кагоцел в дозе 225 мг/кг, при гистологическом анализе не нашло морфологического обоснования.

Таблица 1

Показатели состояния семенников крыс после 70 дней перорального введения Кагоцела

Показатель	Кагоцел, 9 мг/кг	Кагоцел, 225 мг/кг	Плацебо, 225 мг/кг	ГУК, 6,75 мг/кг
Среднее кол-во сперматозоидов, млн./мл	187,9±68,4	163,4±75,1	132,6±43,2	124,1±28,7
Относительное кол-во неподвижных сперматозоидов, %	11,7 ± 3,0	11,5 ± 1,8	12,5 ± 1,8	11,2 ± 2,9
Относительное кол-во патологических форм сперматозоидов, %	2,3 ± 1,5	3,1 ± 2,7	2,8 ± 1,7	3,4 ± 3,0
Время подвижности сперматозоидов, мин	294,0± 31,0	294,0±23,7	288,0± 45,2	291,0± 28,5

Таблица 2

Морфологические показатели состояния семенников крыс после 70 дней перорального введения препарата Кагоцел

Показатель	Кагоцел, 9 мг/кг	Кагоцел, 225 мг/кг	Плацебо, 225 мг/кг	ГУК, 6,75 мг/кг
Массовый коэффициент семенников, г/кг	9,9±1,7	8,9±0,8	9,8±0,7	9,9±1,6
Массовый коэффициент придатков, г/кг	3,8±0,6	3,4±0,4	3,8±0,4	3,5±0,6
Индекс сперматогенеза	3,7±0,2	3,6±0,2	3,7±0,1	3,7±0,1
Относительное кол-во канальцев с 12-й стадией мейоза, %	0,3±0,2	0,2±0,1	0,3±0,2	0,3±0,2
Среднее кол-во сперматогониев в 1 канальце	64,5±2,8	61,1±5,2	60,4±3,6	63,1±5,1

Таблица 3

Динамика массы тела крыс в течение срока введения Кагоцела до спаривания с интактными крысами

Пол животного		Самки			Самцы		
Доза препарата, мг/кг		100	10	контр.	100	10	контр.
Количество животных		14	14	14	10	10	10
Исходная масса, М±m (г)		167,85±4,15	173,9±3,3	170,0±3,1	173,0± 3,1	192,0± 6,2	183,0±6,2
Длительность введения, дни	7	180,6±4,15	181,8±4,9	179,3±1,7	195,0±6,2	215,5±6,7	189,5 ±6,2
	15	184,6±1,15	185,7±4,6	186,1±1,7	201,5±6,7	220,5±6,3	205,5±8,2
	30	-	-	-	257,5± 6,2	264,0± 7,2	298,0±6,7
	45	-	-	-	271,0± 7,2	273,0±8,2	307,0± 7,2
	60	-	-	-	289,0±7,2	286,0±7,2	311,0±6,2

Таблица 4

Показатели генеративной функции самцов и самок крыс, получавших Кагоцел до спаривания

Показатели	Подопытные самцы × интактные самки		Контрольные самцы × интактные самки	Подопытные самки × интактные самцы		Контрольные самки × интактные самцы
	Доза (мг/кг)			Доза (мг/кг)		
	100	10		100	10	
Индекс плодовитости (%)	90,0	90,0	85,0	92,8	85,7	92,85
Индекс беременности (%)	83,3	77,8	80,0	84,6	100,0	92,3

Таблица 5

Показатели эмбриогенеза у крыс при введении Кагоцела самцам и самкам в период до спаривания

Показатели		Подопытные самки × интактные самцы		Контрольные самки × интактные самцы	Подопытные самцы × интактные самки		Контрольные самцы × интактные самки
		доза, мг/кг			доза, мг/кг		
		100	10		100	10	
Количество беременных самок	общее	5	6	6	7	7	8
Количество желтых тел	общее на 1 самку (M±m)	55 10,6±0,57	54 9,2±1,4	60 10,0±0,42	77 11,0±0,41	71 10,8±0,4	85 10,6±0,4
Количество живых плодов	общее на 1 самку (M±m)	48 9,6±0,19	48 8,2±0,42	55 9,4±0,42	70 10,2±0,42	66 9,4±0,6	77 9,6±0,2
Количество резорбций	общее на 1 самку (M±m)	1 0,19	2 0,33±0,16	2 0,33±0,16	4 0,57±0,19	3 0,43±0,14	5 0,62±0,19
Доимплантационная смертность	%	5,8	7,7	5,2	3,8	4,2	3,7
Постимплантационная смертность	%	1,8	3,6	3,2	5,3	4,5	5,6
Масса тела плодов	г (M±m)	2,54±0,19	2,64±0,14	2,65±0,05	3,3±0,09	3,3±0,03	3,1±0,08
Масса тела плацент	г (M±m)	0,7±0,04	0,6±0,08	0,7±0,05	0,7±0,01	0,8±0,02	0,7±0,02

Таким образом, в результате анализа морфофункциональных показателей гонад самцов, получавших в течение 70 дней препарат Кагоцел в дозах 9 мг/кг и 225 мг/кг или госсиполуксусную кислоту в дозе 6,75 мг/кг, не установлено отрицательного влияния на сперматогенез, показатели которого у всех животных соответствовали физиологической норме.

Изучение влияния препарата Кагоцел на генеративную функцию методом спаривания.

Динамика массы тела подопытных самцов и самок, получавших препарат в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг до спаривания, находилась в пределах физиологической нормы (табл. 3).

При анализе показателей генеративной функции самцов и самок крыс, получавших Кагоцел в период до спаривания с интактными животными, не было выявлено значимых различий в показателях индекса плодовитости и индекса беременности подопытных и контроль-

Таблица 6

**Показатели развития потомства крыс самцов и самок, получавших Кагоцел
в период до спаривания с интактными крысами**

ПОКАЗАТЕЛИ			Подопытные самцы × интактные самки			Подопытные самки × интактные самцы		
			Доза (мг/кг)					
			100	10	контроль	100	10	контроль
Количество пометов			6	6	7	8	7	8
Количество новорожденных (на 1 самку) (M±m)			9,5±0,97	9,5±0,48	9,3±0,61	10,4±0,95	10,6±0,81	9,2±0,84
Индекс выживаемости, %			100	97,9	94,6	100	98,1	100
Количество крысят, оставленных к 4-му дню (на 1 самку) (M±m)			8,8 ±0,32	9,0±0,6	7,8 ±0,16	7,8±0,19	7,8±0,14	7,6±0,28
Количество живых крысят (M±m)		7	8,8 ±0,32	9,0±0,16	7,8±0,16	7,8±0,19	7,8±0,14	7,6±0,28
		14	8,8 ±0,32	9,0±0,16	7,5±0,16	7,8±0,19	7,8±0,14	7,0±0,42
		21	8,8 ±0,32	9,0±0,16	7,3±0,16	7,6±0,19	7,8±0,14	6,8±0,42
Масса тела крысят, г (M±m)	Возраст крысят (дни)	1	6,7± 0,3	6,2±0,2	6,2±0,3	7,2 ± 0,3	7,1 ±0,2	6, 9± 0,2
		4	8,5± 0,6	9,2±0,53	8,3±0,3	11,3±0,7	9,9± 0,3	11,6±0,9
		7	11,5±0,5	11,6±0,2	12,1±0,6	15,8±0,8	14,5±0,5	16,9±1,3
		14	20,8±1,4	19,1±0,7	19,2±1,2	24,2±2,5	26,7±1,6	25,9±2,2
		21	32,2±2,89	31,8±0,75	34,3±1,3	30,8±1,9	31,3±0,8	32,9±2,7

ных групп (табл. 4). Показатели эмбриогенеза, представленные в таблице 5, свидетельствуют об отсутствии различий между подопытными и контрольными животными. Не было отмечено существенных различий в физическом развитии потомства у родивших самок (табл. 6).

Таким образом, Кагоцел при длительном пероральном введении крысам (как самцам, так и самкам) в период, непосредственно предшествующий спариванию, в дозах до 100 мг/кг не повлиял на показатели генеративной функции животных и показатели физического развития потомства.

Заключение. В результате проведенного экспериментального исследования не установлено токсического действия лекарственного препарата Кагоцел на морфологию гонад самцов крыс и показатели сперматогенеза при длительном ежедневном пероральном введении в дозе, в пе-

речете более чем в 20 раз превышающей максимальную рекомендованную инструкцией по применению суточную дозу для человека. Госсиполуксусная кислота, которую крысы получали в дозе, соответствующей максимально возможному содержанию химически модифицированного связанного госсипола в составе субстанции Кагоцела, также не проявила гонадотоксического эффекта.

Кагоцел при длительном пероральном введении крысам в период до спаривания в дозе, превышающей максимальную суточную дозу, рекомендованную для человека, не оказал негативного воздействия на показатели генеративной функции животных и не повлиял на показатели физического развития потомства в антенатальном и постнатальном периодах развития.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М.: НП «ТЭМП», 2008.
2. Ильябаев К. З., Камаев Ф. Г., Выпова Н. Л., Юлдашев А. М., Ибрагимов Б. Т., Талипов С. А. Синтез, структура и «острая» токсичность несимметричных альдегидных производных госсипола. / Биоорганическая химия, 2010. – Т. 36. – № 3. – С. 423–428.
3. Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств. /Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. – М.: Изд. «ФГБУ НЦЭСМП», 2012. – С. 80–93.
4. Нестеренко В.Г., Сергеева Э.М. Профилактика гриппа и других ОРВИ среди групп населения высокой степени риска инфицирования. Интерферон – 2011. // Сборник научных статей. М., 2012. – С. 225–231.
5. Оспельникова Т.П., Полонский В.О., Наровлянский А.Н. и др. Эффективность Кагоцела при хроническом рецидивирующем генитальном герпесе. // Клиническая фармакология и терапия, 2004. – № 2. – С. 74–76.
6. An T, Ouyang W., Pan W., Guo D., Li J, Li L, Chen G, Yang J, Wu S, Tien P. Amino acid derivatives of the (-) enantiomer of gossypol are effective fusion inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 / Antiviral Res. 2012 Jun; 94(3):276-87.
7. European Food Safety Authority. Scientific opinion. Gossypol as undesirable substance in animal feed. Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain (Question No EFSA-Q-2005-222). Adopted on 4 December 2008 // The EFSA Journal. – 2008. – Vol. 908. – P. 1–55.
8. Huang J.X., Zhao S.X., Gu Z.P., Zhu Y.Q., Ji R.Y. Studies on the synthesis of gossypol derivatives and their anti-fertility action // Shengzhi Yu Biyun. 1986. – Vol. 6. – № 1. – P. 48–52.
9. Juanjuan Yin. Chemical modification and biological activity exploration of the natural product-gossypol / A Dissertation for the Degree of Doctor of Philosophy The Graduate School of Clemson University. – August 2010.
10. Kalliopi D. Investigations on gossypol: past and present developments / Expert Opin. Investig. Drugs. – 2005. – Vol.14. – № 11. – P.1419–1434.

S.P. Rybalkin¹, Ye.V. Kovalyova¹, T.A. Guskova², T.B. Savinova²

Experimental evaluation of the Kagocel preparation effect on the animals generative function

¹Research Center for Toxicology and Hygiene Regulation of Biopreparations, Federal Medico-Biological Agency, settlement Bolshevik, Moscow Region

² Institute of General Pathology and Pathophysiology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

In experiments on white rats, the influence of the anti-virus preparation Kagocel on the generative function was studied. It was found out that a long-lasting daily peroral administration of this preparation to experimental animals did not produce an adverse effect on animals gonads and their fertility which is proved out by results of morphological analysis of testicles and spermatozoons functional status in males, as well as by results of the evaluation of the preparations exposure on embryogenesis and on the offspring of rats to which the preparation was long administrated during the preming period.

Материал поступил в редакцию 24.07.2012 г.