

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ ¹³C-МЕЧЕННЫХ ЛИНОЛЕВОЙ И ЛИНОЛЕНОВОЙ КИСЛОТ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ТЕСТОВ

Я. Я. Тыньо¹, Г. В. Морозова², Ю. К. Бирюкова^{3,4}✉, Е. В. Трубникова³, М. В. Зылькова⁴, Д. А. Сивохин⁵, К. П. Иванов⁶, Н. В. Позднякова⁷, Е. А. Казакова⁸, Е. С. Мутных⁹, А. Б. Шевелев^{9,10}

¹ Российский государственный университет физической культуры, спорта, молодежи и туризма, Москва, Россия

² Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К. И. Скрябина, Москва, Россия

³ Курский государственный университет, Курск, Россия

⁴ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунологических препаратов имени М. П. Чумакова, Москва, Россия

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

⁶ Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии имени А. Н. Бакулева, Москва, Россия

⁷ Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва, Россия

⁸ Национальный исследовательский университет Высшая школа экономики, Москва, Россия

⁹ Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова, Москва, Россия

¹⁰ Российский экономический университет имени Г. В. Плеханова, Москва, Россия

Неинвазивные дыхательные тесты с применением изотопно-меченых соединений представляют собой новый высокоточный и безопасный метод функционального исследования печени и билиарной системы. Целью работы было провести биологические испытания острой и субхронической токсичности ¹³C-меченых линолевой и линоленовой кислот, синтезированных по оригинальной методике и предназначенных для проведения диагностических дыхательных тестов. При однократном внутривенном введении изучаемых соединений лабораторным мышам линии BALB/c и крысам Wistar в дозах, превышающих диагностические в 500–2500 раз, образцы соединений не вызвали смертности экспериментальных животных. При проведении субхронического эксперимента на крысах при дозировках испытываемых соединений, в 5 и 25 раз превышающих терапевтическую дозу для человека, в течение 14 суток было выявлено отсутствие достоверных изменений у животных в экспериментальных группах по сравнению с контрольной по массе тела, гематологическим показателям (содержанию эритроцитов, лейкоцитов и тромбоцитов в крови) и биохимическим показателям сыворотки крови (уровню гемоглобина, общего белка, щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы, билирубина). Исследованные меченые кислоты безвредны в дозах, планируемых для перорального введения, и могут быть рекомендованы к доклиническим и клиническим испытаниям.

Ключевые слова: дыхательный тест, линолевая кислота, линоленовая кислота, углерод-13

Финансирование: работа выполнена в рамках тематики Государственного задания № 0112-2019-0001 «Геномные исследования и генетический полиморфизм клетки, организма и популяции» (под руководством Н. К. Янковского).

Информация о вкладе авторов: Я. Я. Тыньо, Г. В. Морозова — наработка образцов меченой линолевой кислоты; Ю. К. Бирюкова — определение биохимических показателей сыворотки крови крыс; Е. В. Трубникова — статистическая обработка результатов; М. В. Зылькова — изготовление гистологических срезов; Д. А. Сивохин — обзор литературы, написание статьи; К. П. Иванов — забой крыс, патоморфологическое исследование внутренних органов и тканей; Н. В. Позднякова, Е. С. Мутных — исследование острой токсичности ¹³C-меченых кислот при однократном введении; Е. А. Казакова — исследование субхронической токсичности ¹³C-меченых кислот; А. Б. Шевелев — постановка проблемы, анализ и обсуждение результатов.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено Региональным этическим комитетом (протокол № 3 от 26 февраля 2018 г.). Экспериментальных животных содержали в соответствии с действующими Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14.

✉ **Для корреспонденции:** Юлия Константиновна Бирюкова
ул. Косыгина, д. 4, г. Москва, 119334; biriukova-ula@mail.ru

Статья получена: 24.06.2019 **Статья принята к печати:** 28.06.2019 **Опубликована онлайн:** 30.06.2019

DOI: 10.24075/vrgmu.2019.044

TOXICITY OF ¹³C-LABELED LINOLEIC AND LINOLENIC ACIDS FOR DIAGNOSTIC BREATH TESTS

Tynio YaYa¹, Morozova GV², Biryukova YuK^{3,4}✉, Trubnikova EV³, Zylkova MV⁴, Sivokhin DA⁵, Ivanov KP⁶, Pozdniakova NV⁷, Kazakova EA⁸, Mutnykh ES⁹, Shevelev AB^{9,10}

¹ Russian State University of Physical Education, Sport, Youth and Tourism, Moscow, Russia

² Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology, Moscow, Russia

³ Kursk State University, Kursk, Russia

⁴ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune and Biological Products, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁵ Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

⁶ Bakulev Center for Cardiovascular Surgery Moscow, Russia

⁷ Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, Russia

⁸ National Research University Higher School of Economics, Moscow, Russia

⁹ Vavilov Institute of General Genetics, Moscow, Russia

¹⁰ Plekhanov Russian University of Economics, Moscow, Russia

Noninvasive stable isotope breath tests allow highly accurate and safe estimation of liver and biliary tract function. The aim of this study was to test ¹³C-labeled linoleic and linolenic acids intended for diagnostic use for acute and subchronic toxicity. The acids were synthesized using the patented method. A single intragastric administration of the tested compounds to experimental BALB/c mice and Wistar rats in the amounts exceeding clinical doses 500 to 2500-fold did not cause animal death. In the subchronic toxicity test, the rats received 5 to 25 times higher doses than recommended for clinical use in humans. In a 14-day follow-up period, no significant differences were observed between the main and the control groups in terms of weight, blood count (red blood cells, white blood cells, platelets), and blood biochemistry (hemoglobin, total protein, alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, lactate dehydrogenase, bilirubin). The studied compounds are safe at doses intended for oral administration and are recommended for further preclinical and clinical trials.

Keywords: breath test, linoleic acid, linolenic acid, carbon-13

Funding: this study was part of the State Project 0112-2019-0001 on *Genomic studies and genetic polymorphism of the cell, organism and population* headed by Yankovsky NK.

Author contribution: Tynio YaYa, Morozova GV — synthesis of ¹³C-labeled linoleic acid; Biryukova YuK — blood biochemistry tests; Trubnikova EV — statistical analysis; Zylkova MV — preparation of histological slides; Sivokhin DA — literature analysis, manuscript draft; Ivanov KP — animal sacrifice and necropsy; Pozdniakova NV, Mutnykh ES — acute toxicity tests of ¹³C-labeled acids following their single administration; Kazakova EA — subchronic toxicity tests of ¹³C-labeled acids; Shevelev AB — study conception, analysis and discussion of its results.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the regional Ethics Committee (Protocol № 3 dated February 26, 2018). Animal housing met the *Sanitary and Epidemiological Requirements for Laboratory Animal Facilities* (Guidelines 2.2.1.3218-14).

✉ **Correspondence should be addressed:** Yulia K. Biryukova
Kosygina 4, Moscow, 119334; biriukova-ula@mail.ru

Received: 24.06.2019 **Accepted:** 28.06.2019 **Published online:** 30.06.2019

DOI: 10.24075/brsmu.2019.044

Дыхательные тесты являются одним из наиболее эффективных и безопасных методов оценки состояния внутренних органов человека. В конце XX в. для диагностики заболеваний желудочно-кишечного тракта в клиническую практику был введен уреазный дыхательный тест на основе использования мочевины, меченой стабильным изотопом ^{13}C [1] или радиоактивным аналогом ^{14}C [2], являющийся в настоящее время «золотым стандартом» в обнаружении бактерии *Helicobacter pylori* [3]. В присутствии этого патогена, обладающего высокой уреазной активностью, происходит гидролиз мочевины на изотопно-меченый CO_2 и аммиак, которые затем попадают в кровь и выводятся через легкие [4]. Диагностический потенциал дыхательных тестов реализуется на основе регистрации количества выдыхаемого пациентом CO_2 с мечеными изотопами углерода с помощью масс-спектрометрии или счетчика Гейгера–Мюллера [5]. В отсутствие *Helicobacter pylori* у обследуемого пациента описанная реакция не идет, и полученные значения содержания изотопно-меченого CO_2 в выдыхаемом воздухе не отличаются от контрольных.

Неинвазивные дыхательные тесты характеризуются высокой точностью, экономической доступностью, низкой трудоемкостью и безопасностью, как для самого пациента, так и для врача. Они позволяют определить целый ряд показателей, необходимых для выбора правильного лечения [6].

На сегодняшний день разработаны дыхательные тесты для определения чувствительности к инсулину на основе ^{13}C -глюкозы [7], ^{13}C -метацетина [8], ^{13}C -галактозы и ^{13}C -аминофеназона [9], а также для диагностики хронических заболеваний печени, таких как вирусные гепатиты В и С, цирроз, токсический и алкогольный гепатит, и др. ^{13}C -октановая кислота находит применение при измерении скорости опорожнения желудка [10], (^{13}C -карбонил)триоктаноин служит для диагностики недостаточной секреции ферментов поджелудочной железы [4].

Работы, проводимые по увеличению производства изотопов углерода и созданию специализированной и недорогой аппаратуры для измерения изотопного состава выдыхаемого воздуха, позволяют надеяться на скорое внедрение этой методики в повседневную клиническую практику.

В разработке дыхательного теста для диагностики функциональной активности гепатобилиарной системы в роли основных компонентов лекарственных форм используют линолевую и линоленовую кислоты — жирные кислоты, углеродная цепочка которых состоит из 18 атомов углерода. Данные кислоты являются ненасыщенными: первая из них имеет две двойные углерод–углеродные связи, а вторая — три таких связи [11].

Формообразующий компонент данных лекарственных форм разрабатываемых дыхательных тестов представлен пирофосфатом натрия. Его широко используют в отечественных и зарубежных радиофармацевтических препаратах. Так, в России его применяют в виде основного вещества радиофармпрепарата «Пирфотех, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ », который разрешен к медицинскому применению приказом Министра здравоохранения РФ № 507 от 14 апреля 1985 г. (регистрационный № 85/507/13) [12]. Препарат эффективен для сцинтиграфии скелета, визуализации острого инфаркта миокарда и кровеносного русла сосудистой оболочки глаза, ангиокардиографии и др. [12, 13].

В патенте РФ № 2630691 «Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C

и ^{14}C » [14] описан оригинальный способ синтеза изотопно-меченых жирных кислот, предназначенных к использованию в диагностических дыхательных тестах для выявления патологии гепатобилиарной системы. Необходимым этапом разработки лекарственных и диагностических средств для внутреннего введения являются исследования их безопасности. Целью настоящей работы было исследовать острую и субхроническую токсичность изотопно-меченых линолевой и линоленовой кислот.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение острой токсичности линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопом ^{13}C в положении 1, выполнено в соответствии с «Методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [15]. Исследование проводили на 95 мышах линии BALB/C (самцы и самки, масса тела 18–20 г) и 45 крысах линии Вистар (самцы и самки, масса тела 180–210 г).

Изучаемые ^{13}C -меченые кислоты синтезировали, как описано в патенте РФ № 2630691 «Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C и ^{14}C » [14]. Структуру и чистоту полученных промежуточных и конечных продуктов контролировали спектроскопией ядерного магнитного резонанса на приборе AM-300, 300 МГц (Bruker; Германия) и DRX-500, 500 МГц (Bruker; Германия). Масс-спектрометрический анализ выполняли на установке Finnigan MAT Model Incos 50 (70 эВ) (Finnigan MAT; Англия) с прямым вводом и масс-спектрометре высокого разрешения MicrOTOFII (BrukerDaltonics; Германия) (ESI).

Экспериментальных животных, участвовавших в эксперименте, содержали в клетках типа Т-3, в условиях, соответствующих действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Животные получали в неограниченном количестве водопроводную питьевую воду. Для питья использовали поилки (500-мл стеклянные бутылки с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Кормление проводили в фиксированное время и только специализированными брикетированными кормами, сбалансированными по аминокислотному составу, минеральным веществам и витаминам. В течение всего эксперимента фиксировали общее состояние и поведение животных (двигательную активность, динамику массы тела, аппетит и состояние шерстяного покрова).

При испытаниях острой токсичности образцы испытываемых соединений растворяли в оливковом масле и принудительно с помощью зонда однократно вводили свежеприготовленные растворы в желудок в следующем диапазоне доз: для крыс 100–500 мг, для мышей — 10–50 мг. Длительность наблюдения за животными с начала эксперимента составляла 3 суток. Для выявления результатов испытания острой токсичности исследуемых соединений при однократном внутрижелудочном способе введения мышам BALB/c и крысам Wistar определяли значения летальной дозы (LD_{50}) по методу Дейхмана и Лебланка [15].

Изучение субхронической токсичности испытываемых соединений проводили в соответствии с «Методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [15]. Исследование выполняли на 150 крысах линии Вистар с массой тела 180–200 г. Изучаемые соединения в виде

свежеприготовленных растворов в указанных дозах вводили ежедневно внутривенно в течение 2 недель. Животные были разделены на несколько групп по 30 животных в каждой (15 самцов и 15 самок): I группа — контроль (масляный растворитель без действующего вещества); II группа — ^{13}C -линолевая кислота, доза 5 мг/кг (в 5 раз больше диагностической дозы для человека); III группа — ^{13}C -линолевая кислота, доза 25 мг/кг (в 25 раз больше диагностической дозы для человека); IV группа — ^{13}C -линоленовая кислота, доза 5 мг/кг (в 5 раз больше диагностической дозы для человека); V группа — ^{13}C -линоленовая кислота, доза 25 мг/кг (в 25 раз больше диагностической дозы для человека).

Забор крови у крыс производили из хвостовой вены в объеме 2,0–2,5 мл перед началом субхронического эксперимента, через неделю после начала эксперимента и по окончании 2-недельного наблюдения. Гематологический анализ образцов крови проводили с помощью автоматического счетчика крови «ПИКОСКЕЛЬ ПС-4М» («Медикор-Электромедика»; Венгрия).

Определение биохимических показателей сыворотки крови (глюкозы, общего белка, креатинина, холестерина и общего билирубина), а также активности ферментов сыворотки (щелочной фосфатазы, аланинаминотрансферазы, аспартатаминотрансферазы и лактатдегидрогеназы) проводили с помощью полуавтоматического биохимического анализатора FP 901 (Labsystems; Финляндия).

По окончании субхронического эксперимента на 14-й день проводили забой крыс для патоморфологического исследования внутренних органов и тканей животных. Животных вскрывали сразу же после забоя, чтобы исключить возможный аутолиз тканей и клеток внутриклеточными ферментами. На каждое животное составляли полный патологоанатомический протокол вскрытия.

Образцы органов и тканей фиксировали в 10%-м нейтрализованном растворе формалина, после чего проводили обезвоживание, обезжиривание и проводку тканей с их заливкой вручную в парафин с воском. Гистологические срезы получали с помощью санного микротомы МС-1 («Амбимед»; Россия), что позволило сделать серийные срезы. После депарафинирования срезы окрашивали гематоксилин-эозином, заключали в канадский балласт под покровные стекла, и полученные таким образом гистологические препараты микроскопировали. Микроскопирование и микрофото съемку проводили с помощью оптической системы, состоявшей из микроскопа Leica CM E (Leica Microsystems; Германия) и окуляр-камеры «Микромед DCM-510 SCOPE» («Наблюдательные приборы»; Россия) при увеличении $\times 40$, $\times 100$, $\times 200$ и $\times 400$ с документированием снимков в программе Future Win Joe (Future Optics; Китай), входящей в комплект поставки окуляр-камеры. Данные патоморфологического обследования крыс экспериментальных групп, которым вводили ^{13}C -линолевую и ^{13}C -линоленовую кислоты, сравнивали с данными обследования животных контрольной группы.

Проверку гипотезы об отсутствии статистически значимых различий между контрольной и каждой из экспериментальных групп проводили с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни и точного критерия Фишера, реализованного в виде пакета программ *Statistica 8.0 for Windows* (Dell; США). Проводили расчет медианы признака, интерквартильных интервалов, минимального и максимального значений [16]. При обработке качественных показателей вычисляли размер

выборочной доли в процентах и ошибку выборочной доли. В случае отклонения нулевой гипотезы и принятия альтернативной ($p < 0,05$) проводили попарное сравнение групп с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни, применяя поправку Бонферони при оценке значения p .

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование острой токсичности ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот при однократном введении

При введении препаратов в желудок в максимально вводимых дозах для мышей — 2,632 мг/кг, для крыс — 2,564 мг/кг картины интоксикации указанных животных, а также симптомов раздражения желудочно-кишечного тракта не наблюдали. Не было отмечено также гибели мышей и крыс. Не установлено видовых и половых различий в чувствительности животных к токсическому действию изученных соединений.

Таким образом, при введении в желудок двум видам мелких лабораторных животных ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот в дозах, превышающих диагностическую в 2500 раз, на протяжении 3 суток наблюдения не было обнаружено явлений интоксикации и гибели животных. В спецификации на ^{13}C -меченую линолевую кислоту (Science Lab; США) указана LD_{50} , равная 3,2 г/кг. Этот показатель получен при введении животным значительно большего количества жирной кислоты. Таким образом, можно сделать вывод о том, что при испытаниях острой токсичности различия между коммерчески доступным аналогом и испытуемыми соединениями, синтезированными по оригинальной методике, различий в токсичности не обнаружено.

Исследование субхронической токсичности ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот на крысах

При ежедневном 2-недельном внутривенном введении ^{13}C -меченых линолевой и линоленовой кислот крысам в дозах 5 и 25 мг/кг не выявлено существенных изменений в поведении и внешнем виде животных. Они имели гладкий шерстный покров, охотно поедали корм, сохраняли обычную двигательную активность.

Результаты исследования массы тела крыс во всех экспериментальных группах, получавших исследуемые препараты, в течение всего эксперимента представлены в табл. 1 и табл. 2.

Отсутствовали значимые различия между группами контроля и экспериментальными группами во всех случаях, кроме групп самцов, получавших ^{13}C -линоленовую кислоту в дозах 5 и 25 мг/кг. В этом случае привесы животных в экспериментальных группах оказались выше, чем в контроле, что свидетельствует о стимулирующем влиянии испытуемого соединения на рост животных. Негативного влияния соединений на рост и состояние животных не выявлено.

Результаты исследований гематологических показателей экспериментальных животных по сравнению с контролем представлены в табл. 3.

В условиях субхронического опыта при введении ^{13}C -линолевой кислоты крысам в дозе 5 мг/кг достоверные, хотя и небольшие отличия (по 1-му порогу достоверности) были выявлены в группе самцов по гемоглобину, а в группе

Таблица 1. Динамика массы тела самцов в ходе 2-недельного внутривенного введения ¹³C-линолевой и ¹³C-линоленовой кислот

До начала эксперимента	Контроль, г	Опыт, г	<i>p</i>
Линолевая кислота, 5 мг/кг	113,3	115,7	> 0,05
Линолевая кислота, 25 мг/кг	113,3	114,0	> 0,05
Через 14 суток			
Линолевая кислота, 5 мг/кг	132,1	135,3	> 0,05
Линолевая кислота, 25 мг/кг	132,1	133,6	> 0,05
До начала эксперимента			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	116,4	114,2	> 0,05
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	116,4	117,5	> 0,05
Через 14 суток			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	130,6	136,3	> 0,001
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	130,6	138,2	< 0,001

Таблица 2. Динамика массы тела самок в ходе 2-недельного внутривенного введения ¹³C-линолевой и ¹³C-линоленовой кислот

До начала эксперимента	Контроль, г	Опыт, г	<i>p</i>
Линолевая кислота, 5 мг/кг	111,9	112,2	> 0,05
Линолевая кислота, 25 мг/кг	111,9	112,9	> 0,05
Через 14 суток			
Линолевая кислота, 5 мг/кг	129,3	132,1	> 0,05
Линолевая кислота, 25 мг/кг	129,3	131,5	> 0,05
До начала эксперимента			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	113,8	115,4	> 0,05
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	113,8	114,6	> 0,05
Через 14 суток			
Линоленовая кислота, 5 мг/кг	127,2	134,1	> 0,05
Линоленовая кислота, 25 мг/кг	127,2	130,3	> 0,05

самок — по лейкоцитам и тромбоцитам. Однако после 14 суток наблюдения эти отличия исчезали, что может свидетельствовать о случайном характере наблюдаемых колебаний.

Напротив, при дозировке ¹³C-линолевой кислоты 25 мг/кг через неделю наблюдений различий между группами не наблюдалось, но через 14 суток эксперимента было выявлено существенное снижение содержания лейкоцитов в группе самок (3-й порог достоверности) и слабо

выраженное снижение уровня тромбоцитов в группах самок и самцов (1-й порог достоверности). Несмотря на наличие различий между группами, абсолютные значения этих показателей оставались в пределах нормы, что позволяет сделать вывод о безопасности испытываемого соединения.

Сведения о результатах определения уровня общего белка в сыворотке крови представлены в табл. 4.

При дозировке испытываемого соединения, равной 5 мг/кг, уровень общего белка в группах самок через

Таблица 3. Гематологические показатели крыс при введении ¹³C-линолевой кислоты в течение 2 недель

	5 мг/кг		25 мг/кг		
	Самцы	Самки	Самцы	Самки	
Эритроциты					
Первая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	Первая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,05
Вторая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	Вторая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,05
Лейкоциты					
Первая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,05	Первая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
Вторая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	Вторая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> = 0,001
Тромбоциты					
Первая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> < 0,05	Первая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
Вторая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	Вторая неделя	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> < 0,05
Гемоглобин					
Первая неделя	<i>p</i> < 0,05	<i>p</i> > 0,05	Первая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05
Вторая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05	Вторая неделя	<i>p</i> > 0,05	<i>p</i> > 0,05

Таблица 4. Содержание общего белка (г/л) в сыворотке крови крыс, получавших ¹³C-линолеовую кислоту в течение 2 недель

	5 мг/кг		25 мг/кг		
	Самцы	Самки		Самцы	Самки
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Вторая неделя	$p < 0,05$	$p < 0,05$	Вторая неделя	$p < 0,05$	$p > 0,05$

Таблица 5. Содержание общего белка (г/л) в сыворотке крови крыс, получавших ¹³C-линолеовую кислоту в течение 2 недель

	5 мг/кг		25 мг/кг		
	Самцы	Самки		Самцы	Самки
Щелочная фосфатаза					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p < 0,01$	$p < 0,01$
Вторая неделя	$p < 0,05$	$p < 0,05$	Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,01$
Аланинаминотрансфераза, Ед./л					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,05$	Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Вторая неделя	$p < 0,05$	$p < 0,05$	Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Аспаратаминотрансфераза, Ед./л					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$	Первая неделя	$p < 0,05$	$p > 0,05$
Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,01$	Вторая неделя	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Лактатдегидрогеназа, Ед./л					
Первая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,001$	Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$	Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Билирубин общий, мкМ					
Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,01$	Первая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Вторая неделя	$p > 0,05$	$p < 0,001$	Вторая неделя	$p < 0,001$	$p < 0,001$

неделю эксперимента, самок и самцов после 2 недель эксперимента достоверно выше, чем в контроле. Такие же результаты выявлены для группы самок через неделю и группы самцов через 2 недели при дозировке 25 мг/кг. Это свидетельствует о стимуляции синтеза белка испытуемым соединением, что не может быть рассмотрено в качестве признака токсического действия ¹³C-линолеовой кислоты.

Гепатотоксичность кандидатных лекарственных средств традиционно оценивают по возрастанию уровня активности аспарат- и аланинаминотрансфераз, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы в сыворотке крови, а также уровню общего билирубина (табл. 5).

Произошло небольшое снижение уровня печеночных ферментов в сыворотке крови на первой неделе эксперимента при дозировке испытуемого соединения 5 мг/кг, тогда как на второй неделе эксперимента это снижение становится достоверным во всех группах. В случае щелочной фосфатазы еще большее падение активности в крови наблюдали при дозировке испытуемого соединения 25 мг/кг, однако в случае аминотрансфераз, напротив, наблюдается восстановление показателей активности на второй неделе эксперимента, сниженное на первой неделе.

Введение испытуемого соединения в обеих дозировках достоверно снижает уровень общего билирубина в крови как на первой, так и на второй неделе эксперимента (кроме группы самцов на второй неделе). Это наблюдение показывает, что испытуемое соединение не только не обладает гепатотоксичностью, но и может быть рассмотрено в качестве гепатопротектора.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение функциональной пригодности разрабатываемых дыхательных тестов на мелких лабораторных животных осложнено тем, что отбор образцов выдыхаемого воздуха в строго заданных объемах у этих животных технически сложен. Поэтому испытания клинической эффективности дыхательных тестов с применением разрабатываемых соединений планируется проводить непосредственно на больших по окончании развернутых токсикологических испытаний. Аналогичный прецедент имел место при разработке уреазного дыхательного теста для выявления *H. pylori* с помощью ¹⁴C-мочевины [2].

Исследования острой токсичности ¹³C-линолеовой и ¹³C-линолеовой кислот при однократном внутривенном способе введения мышам линии BALB/c и крысам линии Wistar в дозах, в 500–2500 раз превышающих диагностическую, не выявили признаков общей интоксикации, симптомов раздражения желудочно-кишечного тракта в обоих случаях. Полностью отсутствовали случаи гибели мышей и крыс.

Исследования субхронической токсичности при пероральном введении ¹³C-линолеовой кислоты крысам линии Wistar обоего пола в дозах 5 и 25 мг/кг (5- и 25-кратные диагностические дозы) ежедневно в течение 2 недель также не показали явного влияния на общее состояние и поведение животных и их функционального состояния.

Более того, испытуемые соединения в указанных дозировках, превышающих терапевтические дозы,

рекомендованные для человека, оказывали благотворное действие, что отражалось на уровне гематологических и биохимических показателей крови: происходило более или менее кратковременное снижение уровня лейкоцитов и тромбоцитов крови, не выходящее за пределы нормальных значений, а также снижение активности щелочной фосфатазы, аминотрансфераз, лактатдегидрогеназы и билирубина. Указанные эффекты имели дозозависимость, позволяя предположить, что в случае применения испытываемых соединений в терапевтических дозах отмеченные эффекты будут сведены к нулю. Аналогичные эффекты для немеченных

изотопами линолевой и линоленовой кислот описаны в литературе [17].

Выводы

Синтезированные согласно способу, описанному в патенте РФ № 2630691 «Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C и ^{14}C », ^{13}C -линолевая и ^{13}C -линоленовая кислоты оказались безвредными для животных в дозах, планируемых для перорального введения, и могут быть рекомендованы к доклиническим и клиническим испытаниям.

Литература

- Savarino V, Vigneri S, Celle G. The ^{13}C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1999; 45 (suppl. 1): 18–23.
- Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med*. 2016; 39 (11): 2012–14.
- Zhou Q, Li L, Ai Y, Pan Z, Guo M, Han J. Diagnostic accuracy of the ^{14}C -urea breath test in *Helicobacter pylori* infections: a meta-analysis. *Wien Klin Wochenschr*. 2017; 129 (1–2): 38–45.
- Эльман А. Р., Рапопорт С. И. Стабильно-изотопная диагностика в России: итоги и перспективы. ^{13}C -препараты, приборы, методы. *Клин. мед.* 2014; 92 (7): 5–11.
- Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res*. 2007; 1 (1): R1–R13.
- Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. $^{13}\text{CO}_2$ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol*. 2015; 10 (1): 1–6.
- Mizrahi M, Lalazar G, Adar T, Raz I, Ilan Y. Assessment of insulin resistance by a ^{13}C glucose breath test: A new tool for early diagnosis and follow-up of high-risk patients. *Nutr J*. 2010; (9): 25. DOI:10.1186/1475-2891-9-25.
- Эльман А. Р., Корнеева Г. А., Носков Ю. Г., Хан В. Н., Шишкина Е. Ю., Негримовски В. М. и др. Синтез продуктов, меченных изотопом ^{13}C , для медицинской диагностики. *Российский химический журнал*. 2013; LVII (5-2): 3–24.
- Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M. ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3 (3): 279–85.
- Horowitz M, O'Donovan D, Jones KL, Feinle C, Rayner CK, Samsom M. Gastric emptying in diabetes: Clinical significance and treatment. *Diabet Med*. 2002; 19 (3): 177–94.
- Титов В. Н. Клиническая биохимия жирных кислот, липидов и липопротеинов. Гиполипидемическая терапия и профилактика атеросклероза. Клинико-лабораторный консилуим. 2014; (1): 4–29.
- Мальшева А. О., Кодина Г. Е., Вороницкая Н. Н., Графскова Т. А., Семоненко Н. П. Определение качества радиофармацевтического препарата «Пирфотех, 99m Tc» в медицинских учреждениях. МОБИ-ХимФарма. 2017; с. 103. Доступно по ссылке: <http://mobi-chem.org/arihiv.html>.
- Сазонова С. И., Ильюшенкова Ю. Н., Лишманов Ю. Б. Методика радионуклидного исследования воспалительных процессов в сердце. *Сибирский медицинский журнал*. 2015; 30 (4): 32–5.
- Поздеев В. В., Тынько Я. Я., Морозова Г. В., Быченко А. Б., Бирюкова Ю. К., Шевелев А. Б., авторы; ООО «ГК НАШ МИР» (RU), патентообладатель. Способ синтеза линолевой и линоленовой кислот, меченных изотопами углерода ^{13}C и ^{14}C . Патент РФ № 2630691. 12.09.2017.
- Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005; 832 с.
- Реброва О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA. М.: МедиаСфера, 2003; 312 с.
- Teng H, Lin Q, Li K, Yuan B, Song H, Peng H, et al. Hepatoprotective effects of raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) seed oil and its major constituents. *Food Chem Toxicol*. 2017; (110): 418–24.

References

- Savarino V, Vigneri S, Celle G. The ^{13}C urea breath test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Gut*. 1999; 45 (suppl. 1): 18–23.
- Balán H, Gold CA, Dworkin HJ, McCormick VA, Freitas JE. Procedure Guideline for Carbon-14-Urea Breath Test. *J Nucl Med*. 2016; 39 (11): 2012–14.
- Zhou Q, Li L, Ai Y, Pan Z, Guo M, Han J. Diagnostic accuracy of the ^{14}C -urea breath test in *Helicobacter pylori* infections: a meta-analysis. *Wien Klin Wochenschr*. 2017; 129 (1–2): 38–45.
- Eman AR, Rapoport SI. Stabil'no-izotopnaja diagnostika v Rossii: itogi i perspektivy. ^{13}S -preparaty, pribory, metody. *Klin med*. 2014; 92 (7): 5–11. Russian.
- Modak AS. Stable isotope breath tests in clinical medicine: A review. *J Breath Res*. 2007; 1 (1): R1–R13.
- Musialik J, Jonderko K, Kasicka-Jonderko A, Buschhaus M. $^{13}\text{CO}_2$ breath tests in non-invasive hepatological diagnosis. *Prz Gastroenterol*. 2015; 10 (1): 1–6.
- Mizrahi M, Lalazar G, Adar T, Raz I, Ilan Y. Assessment of insulin resistance by a ^{13}C glucose breath test: A new tool for early diagnosis and follow-up of high-risk patients. *Nutr J*. 2010; (9): 25. DOI:10.1186/1475-2891-9-25.
- Elman AR, Korneeva GA, Noskov YuG, Khan VN, Shishkina EYu, Negrimovski VM, i dr. Sintez produktov, mechennyh izotopom ^{13}S , dlja medicinskoj diagnostiki. *Rossijskij himicheskij zhurnal*. 2013; LVII (5-2): 3–24. Russian.
- Giannini EG, Alberto F, Paolo B, Federica B, Federica M. ^{13}C -galactose breath test and ^{13}C -aminopyrine breath test for the study of liver function in chronic liver disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2005; 3 (3): 279–85.
- Horowitz M, O'Donovan D, Jones KL, Feinle C, Rayner CK, Samsom M. Gastric emptying in diabetes: Clinical significance and treatment. *Diabet Med*. 2002; 19 (3): 177–94.
- Titov VN. Klinicheskaja bihimija zhirnyh kislot, lipidov i lipoproteinov. Gipolipidemicheskaja terapija i profilaktika ateroskleroza. *Kliniko-laboratornyj konsilium*. 2014; (1): 4–29. Russian.
- Malysheva AO, Kodina GE, Voronitskaya NN, Grafskova TA, Semonenko NP. Opredelenie kachestva radiofarmaceuticheskogo preparata «Pirfoteh, 99m Tc» v medicinskih uchrezhdenijah. *MOBI-HimFarma*. 2017; s. 103. Available from: <http://mobi-chem>.

- org/arhiv.html. Russian.
13. Sazonova SI, Ilyushenkova YuN, Lishmanov YuB. Metodika radionuklidnogo issledovanija vospalitel'nyh processov v serdce. *Sibirskij medicinskij zhurnal*. 2015; 30 (4): 32–5. Russian.
 14. Pozdeev VV, Tyno YYa, Morozova GV, Bychenko AB, Biryukova YuK, Shevelev AB, avtory; OOO «GK NASH MIR» (RU), patentoobladatel'. Synthesis method of linoleum and linolenic acids, marked by carbon compounds ^{13}C and ^{14}C . Patent RF № 2630691. 12.09.2017.
 15. Habriev RU. Rukovodstvo po jeksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniju novyh farmakologicheskikh veshhestv. M.: Medicina, 2005; 832 s. Russian
 16. Rebrova OYu. Statisticheskij analiz medicinskih dannyh. Primenenie paketa prikladnyh programm STATISTICA. M.: MediaSfera, 2003; 312 s. Russian
 17. Teng H, Lin Q, Li K, Yuan B, Song H, Peng H, et al. Hepatoprotective effects of raspberry (*Rubus coreanus* Miq.) seed oil and its major constituents. *Food Chem Toxicol*. 2017; (110): 418–24.