



Исследовательский Институт Химического Разнообразия
(ЗАО ИИХР)

"УТВЕРЖДАЮ"

Генеральный директор ЗАО ИИХР

д.х.н, профессор

Д.В. Кравченко



« 16 » мая 2011 г.


ОТЧЕТ

Изучение гепатопротекторных свойств 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на модели D-галактозамин- индуцированного поражения печени

Исследовательское учреждение:

ЗАО «ИИХР», Лаборатория экспериментальной фармакологии
141401 г. Химки, Московская обл., ул.Рабочая, 2-а, кор.1

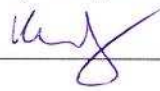
Заведующий лабораторией
экспериментальной фармакологии ЗАО «ИИХР»:


Праскурина О.В.

Дата

16.05.2011

Руководитель исследования:


Карапетян Р.Н.

Дата

16.05.2011

Химки, 2011 г.

Содержание

1.Реферат.....	5
2.Следование нормативным актам.....	6
3.Ответственный персонал.....	7
4.Характеристика веществ.....	8
4.1.Тестируемое соединение.....	8
4.2.Контрольное вещество.....	8
4.3.Растворитель.....	8
5.Основные даты.....	8
6.Цель исследования.....	8
7.Дизайн исследования.....	8
7.1.Описание.....	8
7.2.Группы и дозы веществ.....	9
8.Материалы и методы.....	9
8.1.Тестируемое вещество.....	9
8.1.1.Прием, учет и хранение.....	9
8.1.2.Подготовка веществ для введения.....	9
8.1.3.Образцы веществ.....	9
8.1.4.Действия с остатками вещества.....	9
8.2.Животные.....	9
8.2.1.Источник животных.....	10
8.2.2.Карантин/Адаптация.....	10
8.2.3.Распределение по группам.....	10
8.2.4.Идентификация.....	10
8.2.5.Содержание и уход.....	10
8.2.5.1.Параметры окружающей среды.....	10
8.2.5.2.Клетки.....	10
8.2.5.3.Подстил.....	10
8.2.5.4.Корм и вода.....	11
8.3.Лишение корма и воды.....	11
8.4.Процедура введения соединения.....	11
8.5.Наблюдения и измерения в ходе исследования.....	11
8.5.1.Внешний вид, смертность.....	11
8.5.2.Масса тела.....	11
8.6.Биохимия крови.....	11
8.7.Определение протромбинового индекса.....	11
8.8.Патоморфология и гистология.....	12
8.8.1.Погибшие животные.....	12
8.8.2.Патоморфология и коллекция тканей.....	12
8.8.3.Гистология.....	12
9.Статистический анализ.....	12
10.Архив.....	12
11.Результаты.....	13
11.1.Процедура введения.....	13
11.2.Наблюдения и измерения в ходе исследования.....	13
11.2.1.Смертность.....	13
11.2.2.Масса тела.....	14
11.3.Биохимия крови.....	14
11.4.Протромбиновый индекс.....	17
11.5.Патоморфология.....	19
11.6.Гистология печени.....	22
12. Заключение.....	23

Список таблиц и рисунков в тексте

Таблица 1. Группы и дозы	9
Таблица 2. Смертность животных	13
Рисунок 1. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на динамику изменения массы тела крыс Sprague Dawley (в % по отношению к исходной массе)	14
Таблица 3. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения Гептрал на биохимические показатели сыворотки крови крыс при поражении печени D-галактозамином	15
Таблица 3 (продолжение) Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения Гептрала на биохимические показатели сыворотки крови крыс при поражении печени D-галактозамином.....	16
Рисунок 2. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на протромбиновый индекс крыс Sprague Dawley на 7 день (% от массы тела)	18
Рисунок 3. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на протромбиновый индекс крыс Sprague Dawley на 14 день (% от массы тела)	19
Рисунок 4. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на относительную массу печени крыс Sprague Dawley на 7 день (% от массы тела).....	20
Рисунок 5. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на относительную массу печени крыс Sprague Dawley на 14 день (% от массы тела).....	21

Список приложений

<i>Приложение 1.1. Индивидуальные данные изменений массы тела (% от первого дня, группа Интактные)</i>	24
<i>Приложение 1.2. Индивидуальные данные изменений массы тела (% от первого дня, группа Контроль)</i>	25
<i>Приложение 1.3. Индивидуальные данные изменений массы тела (% от первого дня, группа 1,3-диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг)</i>	26
<i>Приложение 1.4. Индивидуальные данные изменений массы тела (% от первого дня, группа 1,3-диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг)</i>	27
<i>Приложение 1.5. Индивидуальные данные изменений массы тела (% от первого дня, группа Гептрал 500 мг/кг)</i>	28
<i>Приложение 2.1. Сводная таблица биохимических показателей крови исследуемых животных на 7 день эксперимента</i>	29
<i>Приложение 2.2. Сводная таблица биохимических показателей крови исследуемых животных на 14 день эксперимента</i>	30
<i>Приложение 3. Индивидуальные значения протромбинового индекса, %</i>	31
<i>Приложение 4. Индивидуальные данные относительной массы печени (% от массы тела)</i>	32

1. Реферат

Цель исследования – определить наличие гепатопротекторных свойств у 1,3-диэтилбензимидазолия йодида при внутрижелудочном его введении в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг 1 раз в сутки в течение 14-ти дней самцам крыс Sprague Dawley. Аналогичным образом животным из других экспериментальных групп вводили препарат сравнения Гептрал и воду для инъекций (Контроль). В эксперименте также была использована группа интактных животных.

Для проведения исследования у животных из экспериментальных групп моделировали токсический гепатит при помощи однократного внутрибрюшинного введения D-галактозамина в дозе 400 мг/кг через час после первого введения тестируемого соединения.

Ежедневно регистрировали массу тела животных. На 7-е сутки эксперимента часть животных из каждой группы подвергали CO₂-эвтаназии и производили кардиопункцию с целью взятия крови для определения протромбинового индекса и исследования биохимических показателей, проводили патоморфологическое исследование с последующей фиксацией печени в 10 % нейтральном формалине. С оставшимися животными те же манипуляции проводили на 14-е сутки эксперимента.


Применение тестируемого соединения в дозе 50 мг/кг демонстрировало на данной модели выраженное гепатопротекторное действие, превосходящее эффект препарата сравнения Гептрал: отсутствие гибели в группе, прирост массы тела, нормализация активностей АлТ, АсТ и ЩФ, как на 7-й, так и на 14-й день эксперимента.

2. Следование нормативным актам

- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н "Об утверждении Правил лабораторной практики";
- Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Москва 2010);
- Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, D.C. 1996

Все отклонения задокументированы как первичные данные исследования и находятся в общей папке по исследованию. Отклонений, влияющих на качество и целостность данных, не было.

Менеджер группы контроля качества






Косарева А.В. 

ФИО

16.05.2011

Дата

3. Ответственный персонал

Ответственный исполнитель, зав. Лабораторией экспериментальной фармакологии, канд. мед. наук	 16.05.2011 подпись, дата	Проскурина О.В.
Ведущий научный сотрудник, канд. биол. наук	 16.05.2011 подпись, дата	Курская О.В.
Старший научный сотрудник, канд. биол. наук	 16.05.11 подпись, дата	Мочалов С.В.
Старший научный сотрудник, канд. биол. наук	 16.05.11 подпись, дата	Тарасова Н.В.
Научный сотрудник, гистолог	 16.05.11 подпись, дата	Амелина А.Н.
Лаборант	 16.05.11 подпись, дата	Зинурова С.М.
Врач-ветеринар, канд. биол. наук	 16.05.11 подпись, дата	Фатеева Е.И.

4. Характеристика веществ

Данные о характеристике тестируемого вещества (синтеза, очистки, анализа состава, стабильности) находятся у Заказчика.

4.1. Тестируемое соединение

Название/код: 1,3-диэтилбензимидазолия йодид
Производитель: ООО «Фармпрепарат»

4.2. Контрольное вещество

Название/код: Гептрал
Регистрационный номер: П №011968/01
П №011968/02
Производитель: Хоспира С.П.А., Италия

4.3. Растворитель

Вода для инъекций

5. Основные даты

Дата инициации исследования: 13.01.2011
Дата первого введения вещества: 03.03.2011
Дата эвтанази: 09.03.2011; 16.03.2011

6. Цель исследования

Цель исследования – определить наличие гепатопротекторных свойств 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на модели токсического гепатита у крыс, индуцированного D-галактозамином.

7. Дизайн исследования

7.1. Описание

Исследование проводили на половозрелых самцах крыс линии Sprague Dawley. В эксперименте было использовано 50 животных. Группы и дозы исследуемого соединения см. п. 7.2. Токсический гепатит моделировали у всех животных, за исключением интактных, путем однократного внутрибрюшинного введения D-галактозамина в дозе 400 мг/кг. Исследуемое соединение и препарат сравнения вводили внутривентрикулярно: в 1-й день за 1 час до инъекции D-галактозамина, далее - ежедневно 1 раз в сутки в течение 14 дней согласно техническому заданию, полученному от Заказчика. Животным из контрольной группы в том же режиме вводили растворитель – воду для инъекций.

Ежедневно регистрировали массу тела животных. На 7-е сутки эксперимента часть животных из каждой группы подвергали СО₂-эвтаназии и производили кардиопункцию с целью взятия крови для определения протромбинового индекса и исследования биохимических показателей. Вскрытие производили при помощи метода эвисцерации с целью макроскопического патоморфологического исследования, печень взвешивали и фиксировали в 10 % нейтральном формалине, согласно протоколу Заказчика. С

оставшимися животными те же манипуляции проводили на 14-е сутки эксперимента.

7.2. Группы и дозы веществ

Дозы 1,3-диэтилбензимидазолия йодида указаны в протоколе Заказчика. Данные о количестве животных в каждой группе, а также идентификационные номера приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Группы и дозы

№	Группа	Количество крыс в группе	№№ животных
1	Контроль	12	1-12
2	1,3-диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг	11	13-23
3	1,3-диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг	11	24-34
4	Гептрал 500 мг/кг	11	35, 36, 38-45*
5	Интакт	5	46-50

* - животное № 37 погибло сразу же после внутрибрюшинного введения D-галактозамина.

8. Материалы и методы

8.1. Тестируемое вещество

8.1.1. Прием, учет и хранение

Тестируемое вещество было предоставлено Заказчиком. Получение и расходование вещества задокументированы.

8.1.2. Подготовка веществ для введения

Растворы для введения готовили непосредственно перед введением из исходного сухого вещества в Растворителе согласно протоколу Заказчика в промаркированных флаконах.

8.1.3. Образцы веществ

Взятые резервные образцы тестируемого вещества и контрольного вещества будут храниться при соблюдении условий хранения в лаборатории до истечения срока годности.

8.1.4. Действия с остатками вещества

Остатки веществ во вскрытых флаконах будут переданы на уничтожение или возвращены Заказчику.

8.2. Животные

Исследование проведено на самцах крыс линии Sprague Dawley. В начале эксперимента масса животных составляла 300-400 г.

8.2.1. Источник животных

Животные получены 01 февраля 2011 г. от НПП «Питомник лабораторных животных ФИБХ РАН». Производитель животных предоставил данные последнего контроля здоровья животных, подтверждающие их SPF-статус (животные, свободные от патогенов). При получении был проведен внешний осмотр состояния животных.

8.2.2. Карантин/Адаптация

Прибывшие животные до начала исследования были помещены в отдельную комнату на период адаптации, в течение которого у животных контролировали проявление отклонений в состоянии здоровья согласно Стандартным операционным процедурам (СОП) Лаборатории №№ 4-5 «Прием животных, карантин, адаптация».

8.2.3. Распределение по группам

Животных распределяли по группам случайным образом.

8.2.4. Идентификация

После периода адаптации каждому животному был присвоен индивидуальный номер. Согласно сквозной нумерации животных рассаживали в клетки по 5-6 крыс в каждой. На клетках закрепляли этикетки со следующей информацией: № протокола-заявки в Комиссию по биоэтике ИИХР, вид, пол и количество животных, начало и окончание эксперимента, ответственный сотрудник, название, способ введения и доза вещества, индивидуальные номера животных.

8.2.5. Содержание и уход

Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, данным в руководстве *Guide for the care and use of laboratory animals*. National Academy press. –Washington, D.C. 1996 и Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации №267 от 19.06.2003).

Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории № 16.

Протокол-заявка на эксперимент утверждена Комиссией по биоэтике ИИХР (протокол-заявка № 2, Протокол заседания № 1 от 17.01. 2011).

8.2.5.1. Параметры окружающей среды

В комнате содержания животных поддерживались следующие условия окружающей среды: температура окружающего воздуха $22\pm 1^{\circ}\text{C}$; относительная влажность $50\pm 10\%$; автоматическая смена 12-ти часового светового периода (08:00-20:00 – день, 20:00-08:00 – ночь); 100% вентиляция без рециркуляции со сменой воздуха 7-12 объемов комнаты в час.

8.2.5.2. Клетки

Животных содержали в поликарбонатных клетках на подстиле. Клетки оборудованы стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением, стальными разделителями для корма и стальными держателями этикеток.

8.2.5.3. Подстил

В качестве подстила использовали «Лигноцель» (ООО «Реттенмайер-Рус»).

8.2.5.4. Корм и вода

Комбикорм полнорационный для лабораторных животных «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро», соответствует ГОСТ 50258-92, Р51849-2001). Данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории.

Животных поили фильтрованной водопроводной водой в стандартных автоклавированных питьевых бутылках со стальными крышками-носиками. В лаборатории регулярно проводят анализ питьевой воды на микробиологическую контаминацию. Результаты анализа воды хранятся в документации лаборатории.

Животные имели свободный доступ к корму и воде в течение всего эксперимента.

8.3. Лишение корма и воды

Животных лишали корма за 12 часов до эвтаназии. Доступ к воде не ограничивали.

8.4. Процедура введения соединения

Тестируемое соединение в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг и Гептрал в дозе 500 мг/кг вводили внутривенно в объеме 5 мл/кг при помощи зонда 1 раз в сутки ежедневно до дня запланированной эвтаназии. Животным из группы Контроль (нелеченные животные) вводили растворитель – воду для инъекций. Объем введения (дозу) рассчитывали для каждого животного индивидуально в соответствии с последним измерением массы тела.

8.5. Наблюдения и измерения в ходе исследования

8.5.1. Внешний вид, смертность

Наблюдение за животными для выявления отклонений в состоянии здоровья и регистрации смертности проводили ежедневно 2 раза в день (утром и вечером).

8.5.2. Масса тела

Животных взвешивали ежедневно перед введением соединения.

8.6. Биохимия крови

Для получения проб крови проводили кардиопункцию у животных в терминальной стадии после CO₂-эвтаназии. Полученную кровь помещали в пробирку и центрифугировали в течение 10 мин при скорости 10000 оборотов/мин. Затем при помощи микропипетки отбирали полученную сыворотку, которую использовали для биохимического анализа.

8.7. Определение протромбинового индекса

Пробы крови получали при помощи кардиопункции у животных в терминальной стадии после CO₂-эвтаназии. Кровь собирали в пробирку с 3,8 % (0,11 М) цитратом натрия в соотношении 9:1 и немедленно центрифугировали в течение 10 мин при скорости 3000 оборотов/мин. Затем при помощи микропипетки отбирали полученную плазму и измеряли протромбиновый индекс на двухканальном анализаторе показателей гемостаза АПГ2-02-П.

8.8. Патоморфология и гистология

8.8.1. Погибшие животные

Животных, погибших до окончания эксперимента, по возможности, подвергали вскрытию и патоморфологическому исследованию.

8.8.2. Патоморфология и коллекция тканей

Вскрытие производили при помощи метода эвисцерации с целью макроскопического патоморфологического исследования. Печень взвешивали и фиксировали в 10 % нейтральном формалине, согласно протоколу Заказчика.

8.8.3. Гистология

Образцы печени фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 4-х дней. После фиксации образцы обезживали и пропитывали парафином в гистологической станции Tissue-Tek VIP 5Jr (Sakura, Japan). Затем образцы заливали в среду BioPlast Extra (температура плавления 56-58 °С) при помощи станции Tissue TEC (Sakura, Japan). Из полученных парафиновых блоков изготавливали срезы толщиной 5 мкм на микротоме Assu-Cut SRM (Sakura, Japan), которые монтировали на предметные стекла и окрашивали гематоксилином Майера и водно-спиртовым эозином-У. Окрашенные срезы заключали в консервирующую среду Bio Mount и высушивали в вытяжном шкафу. Микроскопическое исследование органов экспериментальных животных выполняли при помощи микроскопа Olympus BX51 (объектив x20, x40 и x100).

9. Статистический анализ

Межгрупповое сравнение проводили при помощи непараметрического критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney U-test). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка среднего.

10. Архив

Вся документация по исследованию будет храниться в архиве лаборатории в течение одного года после подписания отчета. Спустя указанное время все материалы по исследованию будут возвращены Заказчику или уничтожены с его письменного согласия.

11. Результаты

11.1. Процедура введения

Отклонений в процедуре введения исследуемых соединений не было. При введении D-галактозамина погибло 1 животное.

11.2. Наблюдения и измерения в ходе исследования

11.2.1. Смертность

Данные о смертности в течение эксперимента приведены в Таблице 2.

Таблица 2. Смертность животных

Группа	Количество животных в группе	Гибель		% гибели животных в группе
		Количество	Дата	
Контроль	12	0	-	0
1,3-диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг	11	1	09.03.2011	18,2
		1	11.03.2011	
1,3-диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг	11	0	-	0
Гептрал 500 мг/кг	11	1	09.03.2011	10,0
Интактные животные	5	0	-	0

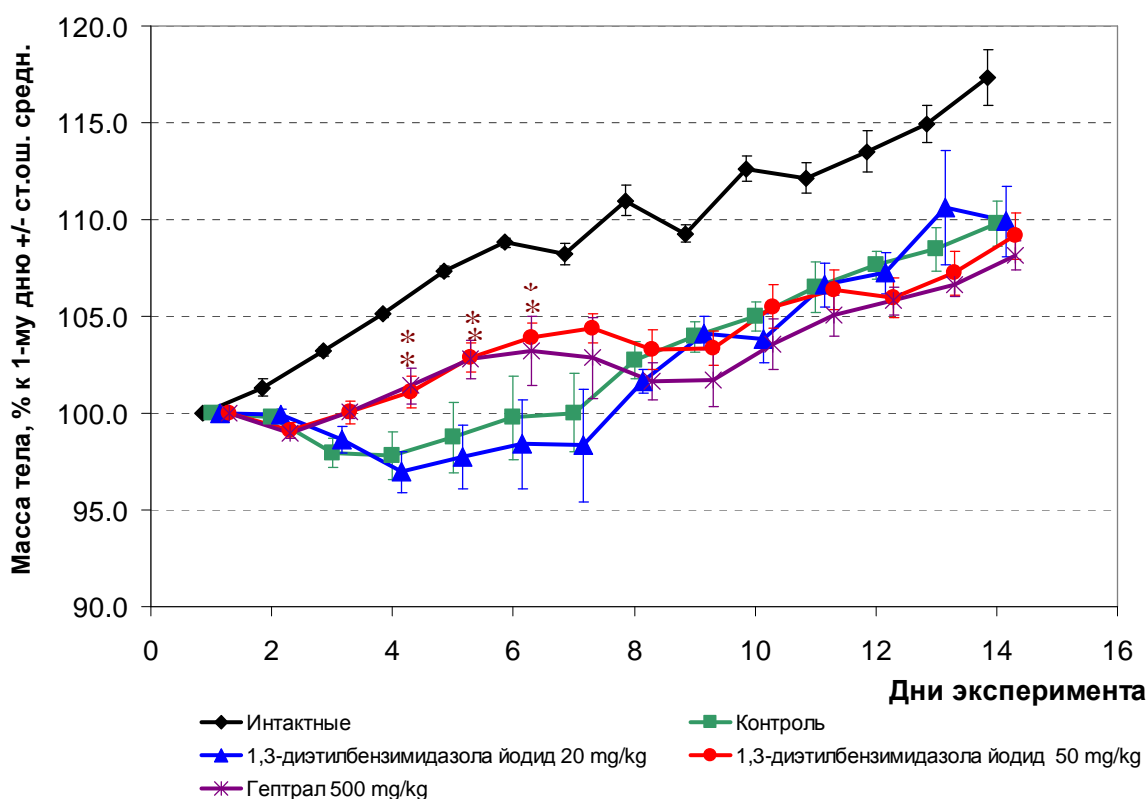
В группе, получавшей 1,3-диэтилбензимидазолия йодид в дозе 20 мг/кг, была отмечена гибель 2 животных, что составило 18,2 % от общего числа животных в группе. Случаи гибели были зарегистрированы на 7-й и 9-й дни эксперимента. В группе Гептрал была отмечена гибель 1 животного на 7-й день эксперимента. Перед гибелью крысы существенно снижали в весе (см. Приложение 1).

11.2.2. Масса тела

Результаты, полученные при мониторинге массы тела животных в период введения, представлены на рис. 1. Приведены значения массы тела, выраженные в % по отношению к весу в 1-й день эксперимента.

Индивидуальные значения массы тела животных с 1-го по 14-й дни эксперимента представлены в Приложении 1.

С 1-го по 14-й день эксперимента во всех экспериментальных группах прирост массы тела крыс был статистически значимо меньше по сравнению с группой Интактных животных. С 3-го по 5-й дни эксперимента в группах животных, которым вводили воду для инъекций (Контроль) и 1,3-диэтилбензимидазолия йодид в дозе 20 мг/кг наблюдали снижение массы тела относительно исходных значений. В этот же период в группах крыс, получавших 1,3-диэтилбензимидазолия йодид в дозе 50 мг/кг и Гептрал регистрировали прирост массы тела. Причем, отличие указанных групп по данному показателю от группы Контроль, было достоверным.



* - $p < 0,05$ по сравнению с группой Контроль (по критерию Манна-Уитни)

Рисунок 1. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на динамику изменения массы тела крыс Sprague Dawley (в % по отношению к исходной массе)

11.3. Биохимия крови

Результаты исследования влияния 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения Гептрал на биохимические показатели сыворотки крови крыс при поражении печени D-галактозамином приведены в Таблице 3. Индивидуальные значения биохимических показателей сыворотки крови крыс представлены в Приложении 2.

Таблица 3. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения Гептрал на биохимические показатели сыворотки крови крыс при поражении печени D-галактозамином

	Глюкоза, ммоль/л	АсТ, ммоль/(ч*л)	АлТ, ммоль/(ч*л)	Общий белок, г/л	Щелочная фосфатаза, ед/л
<i>Интактные</i>	13,77±0,98	0,54±0,08	0,42±0,03	71,31±1,36	87,83±2,59
7 день					
<i>Контроль</i>	12,63±1,11	0,71±0,06	0,56±0,09	35,02±4,10*	121,83±7,03*
<i>1,3- диэтилбензимидазолия йодида 20 мг/кг</i>	13,29±1,12	0,90±0,15	1,08±0,06*	53,74±3,29*	144,72±4,08*
<i>1,3- диэтилбензимидазолия йодида 50 мг/кг</i>	13,35±1,24	0,61±0,09	0,39±0,05	62,95±6,76*	134,20±7,46*
<i>Гептрал 500 мг/кг</i>	11,69±0,78	0,59±0,08	0,46±0,06	47,01±3,45*	119,65±9,82*
14 день					
<i>Контроль</i>	13,07±1,76	0,70±0,03*	0,61±0,04*	69,01±2,59	157,22±10,12*
<i>1,3- диэтилбензимидазолия йодида 20 мг/кг</i>	12,90±1,22	0,70±0,12	0,39±0,12	63,70±1,73*	123,09±7,36*
<i>1,3- диэтилбензимидазолия йодида 50 мг/кг</i>	15,51±2,07	0,58±0,06	0,39±0,08*	65,90±4,16	111,11±12,26
<i>Гептрал 500 мг/кг</i>	12,57±1,26	0,51±0,09	0,35±0,01*	52,95±1,08*	136,21±12,71*

* - p<0,05 по сравнению с группой Интактные животные (по критерию Манна-Уитни)

• - p<0,05 по сравнению с группой Контроль (нелеченные животные) (по критерию Манна-Уитни)

Таблица 3 (продолжение) Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения Гептрала на биохимические показатели сыворотки крови крыс при поражении печени D-галактозамином

	Общие липиды, г/л	Холестерин, ммоль/л	ЛПВП, г/л	ЛДГ, ед/л	Триглицериды, ммоль/л
<i>Интактные</i>	4,38±0,56	1,52±0,14	68,04±9,60	81,00±4,36	1,63±0,22
7 день					
<i>Контроль</i>	4,48±0,80	1,75±0,27	62,61±8,81	73,72±5,34	2,23±0,19
<i>1,3-диэтилбензимидазолия йодида 20 мг/кг</i>	4,20±0,17	2,00±0,30	78,58±8,66	93,63±8,27	1,45±0,16
<i>1,3-диэтилбензимидазолия йодида 50 мг/кг</i>	4,40±0,55	1,95±0,14	68,46±2,45	90,12±3,35	1,05±0,32
<i>Гептрал 500 мг/кг</i>	4,14±0,16	1,53±0,03	57,38±5,57	81,54±2,36	1,49±0,49
14 день					
<i>Контроль</i>	4,03±0,48	1,87±0,24	78,18±4,92	72,00±4,72	1,34±0,35
<i>1,3-диэтилбензимидазолия йодида 20 мг/кг</i>	4,20±0,17	2,03±0,08*	62,28±7,36	72,38±6,65	1,03±0,17*
<i>1,3-диэтилбензимидазолия йодида 50 мг/кг</i>	4,09±0,28	2,27±0,16*	101,37±13,51	74,16±7,72	1,38±0,19
<i>Гептрал 500 мг/кг</i>	3,99±0,31	2,03±0,10*	94,58±14,51	70,22±1,90	1,18±0,27

* – p<0,05 по сравнению с группой Интактные животные (по критерию Манна-Уитни)

• - p<0,05 по сравнению с группой Контроль (нелеченные животные) (по критерию Манна-Уитни)

У животных на фоне интоксикации, вызванной введением D-галактозамина (группа Контроль), по сравнению с Интактными животными, была обнаружена повышенная активность маркеров синдрома цитолиза гепатоцитов – трансаминаз АлТ и АсТ - и маркера синдрома холестаза – ЩФ, что обусловлено нарушением проницаемости плазматических мембран гепатоцитов. На 7-й день эксперимента активность АлТ и АсТ в группе Контроль по сравнению с Интактной группой была выше в 1,33 раза, а активность ЩФ – в 1,39 раза. Еще через 7 дней (14 сутки) различия между указанными группами были уже достоверными: активность АлТ увеличилась до 0,61 ммоль/(ч*л) (у интактных животных 0,42 ммоль/(ч*л)), а активность ЩФ - до 157,2 ед/л (у интактных крыс 87,8 ед/л). Активность АсТ не изменилась по сравнению с 7-м днем эксперимента. Кроме того, на 7-й день у животных из группы Контроль наблюдали существенное (в 2 раза) снижение уровня общего белка по сравнению с интактными крысами. Исследуемые показатели липидного обмена оставались на уровне физиологической нормы.

На фоне введения 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозе 20 мг/кг у животных на 7-й день эксперимента наблюдалось усиление холестаза и цитолиза гепатоцитов, о чем говорят более высокие показатели активности маркеров данных синдромов – активность АсТ, АлТ и ЩФ была выше, чем в группе контрольных (нелеченных) животных. На 14-й день в данной группе активность АсТ не отличалась от таковой в группе контрольных животных, а активность ЩФ была статистически значимо ниже, чем в группе нелеченных крыс, но оставалась достоверно выше, чем активность этого фермента у интактных животных; активность АлТ снизилась до уровня, обнаруженного у интактных животных. Надо отметить, что содержание общего белка в сыворотке крови этих животных на 7-й день статистически значимо больше, чем в группе контрольных (нелеченных) животных.

Введение 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозе 50 мг/кг способствовало нормализации активностей ферментов АсТ и АлТ: как на 7-й, так и на 14-й день эксперимента активность этих ферментов достоверно не отличалась от показателей у интактных животных. Активность ЩФ на 7-й день в 1,5 раза превышала активность данного фермента в группе интактных животных, однако, на 14-й день наблюдалось снижение активности с 134,2 ед/л (7-й день) до 111,1 ед/л (14-й день) при активности в группе контрольных животных 157,2 ед/л. Содержание общего белка в этой группе статистически значимо не отличалось от данного показателя в группе интактных животных.

При введении Гептрала в дозе 500 мг/кг наблюдалось снижение активностей ферментов АсТ и АлТ до уровня интактных животных. Однако, активность маркера синдрома холестаза – ЩФ была достоверно выше, чем у интактных животных, как на 7-й, так и на 14-й день эксперимента. Наблюдалось снижение содержания общего белка.

На 14 день эксперимента у животных во всех экспериментальных группах наблюдалось повышение содержания холестерина, наиболее выраженное в группе крыс, которым вводили 1,3-диэтилбензимидазолия йодид в дозе 50 мг/кг.

Таким образом, анализ биохимических показателей крови показал, что 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозе 20 мг/кг после 6-тикратного введения сопровождается усилением токсического действия D-галактозамина. В дозе 50 мг/кг 1,3-диэтилбензимидазолия йодид проявил гепатопротекторную активность на данной модели токсического поражения печени, и на 7-й и на 14-й день эксперимента. Кроме того, можно говорить, что действие тестируемого соединения превосходит активность Гептрала в дозе 500 мг/кг, так как не только уменьшает синдром цитолиза гепатоцитов, но и, в отличие от препарата сравнения, после 13-тикратного устраняет синдром холестаза.

11.4. Протромбиновый индекс

Результаты исследования влияния 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и препарата сравнения Гептрал на протромбиновый индекс крови крыс при поражении печени D-

галактозамином показаны на Рис. 2 и 3. Индивидуальные значения протромбинового индекса крови крыс представлены в Приложении 3.

На Рис. 2 видно, что на 7-й день эксперимента у животных в контрольной (нелеченной) группе по сравнению с интактными крысами протромбиновый индекс был статистически значимо меньше, что является одним из признаков поражения печени. В группах, получавших 1,3-диэтилбензимидазолия йодид в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг статистически не отличался от такового в группе Интакт, что свидетельствует о том, что тестируемое соединение оказывает гепатопротекторное влияние. Важно подчеркнуть, что препарат сравнения Гептрал в дозе 500 мг/кг не оказывал подобного действия: исследуемый показатель в данной группе крыс, как и в случае нелеченных животных, был достоверно ниже, чем у Интакта.

К 14-му дню протромбиновый индекс крови, как контрольных (нелеченных) животных, так и крыс, получавших тестируемое соединение, не отличался от такового у интактных крыс.

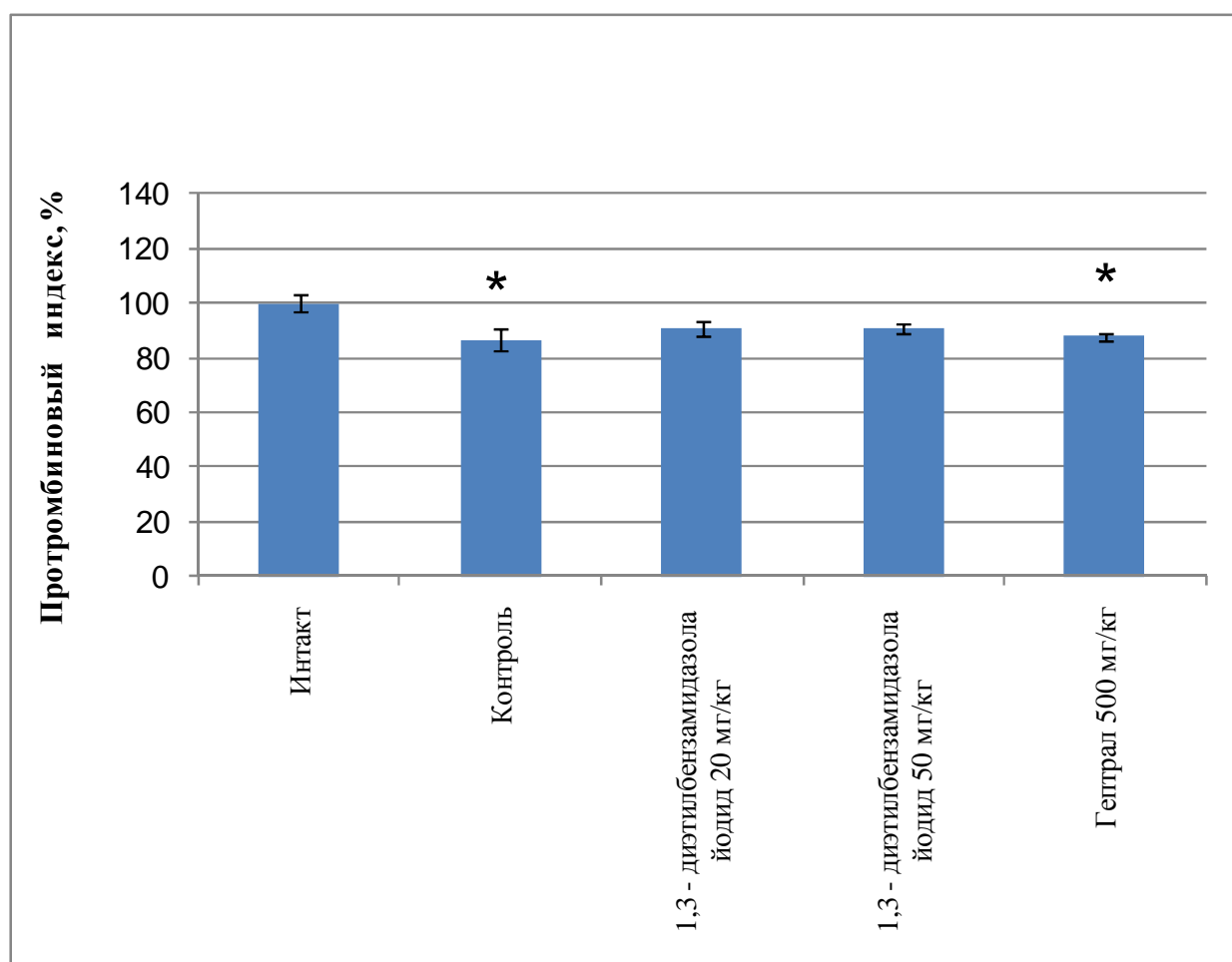


Рисунок 2. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на протромбиновый индекс крыс Sprague Dawley на 7 день (% от массы тела)

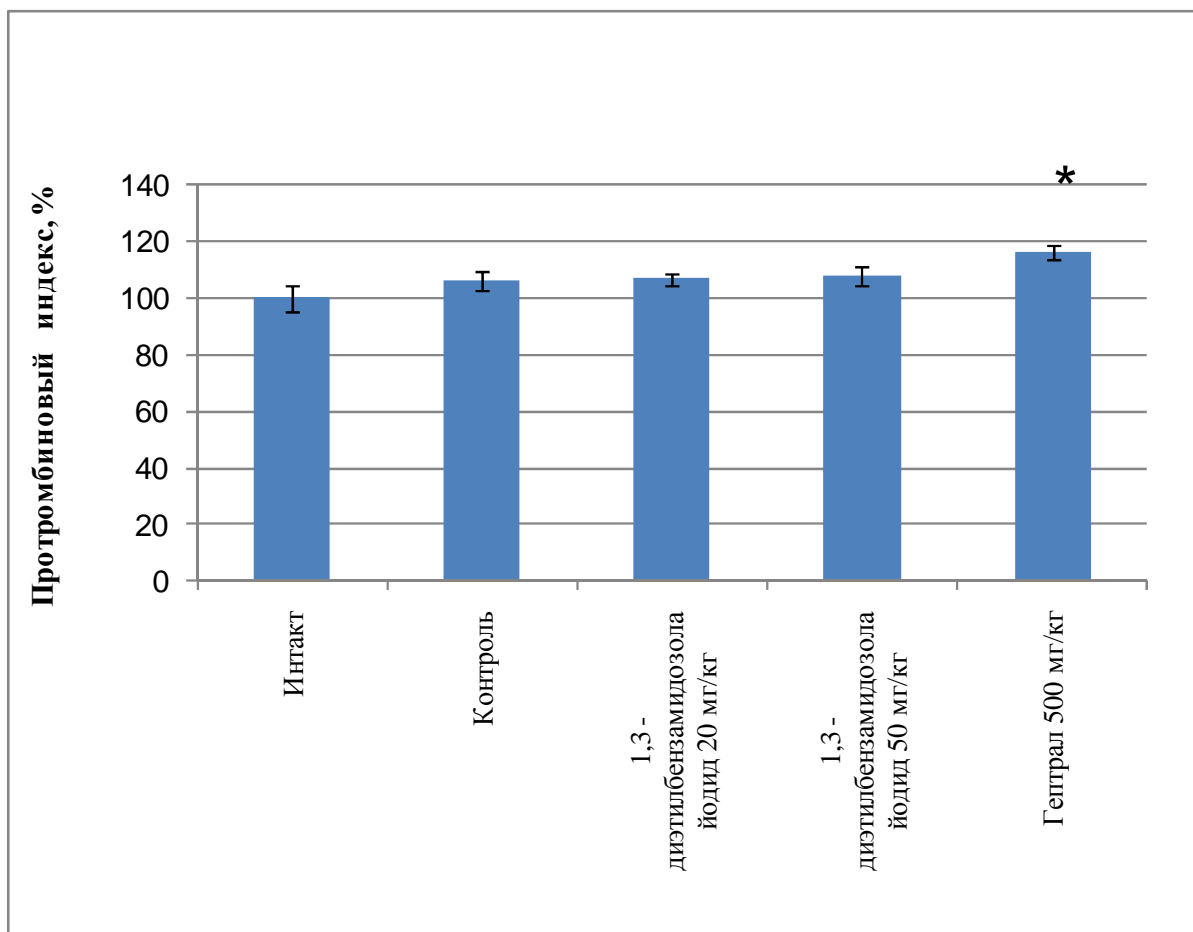


Рисунок 3. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на протромбиновый индекс крыс Sprague Dawley на 14 день (% от массы тела)

11.5. Патоморфология

Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида и Гептрала на относительную массу печени крыс на модели D-галактозамин-индуцированного токсического поражения представлены на рис. 4 и 5.

Статистически значимых различий в относительной массе печени крыс из экспериментальных групп и группами интактных животных и Контроль (нелеченные) ни на 7-й, ни на 14-й день эксперимента не выявлено.

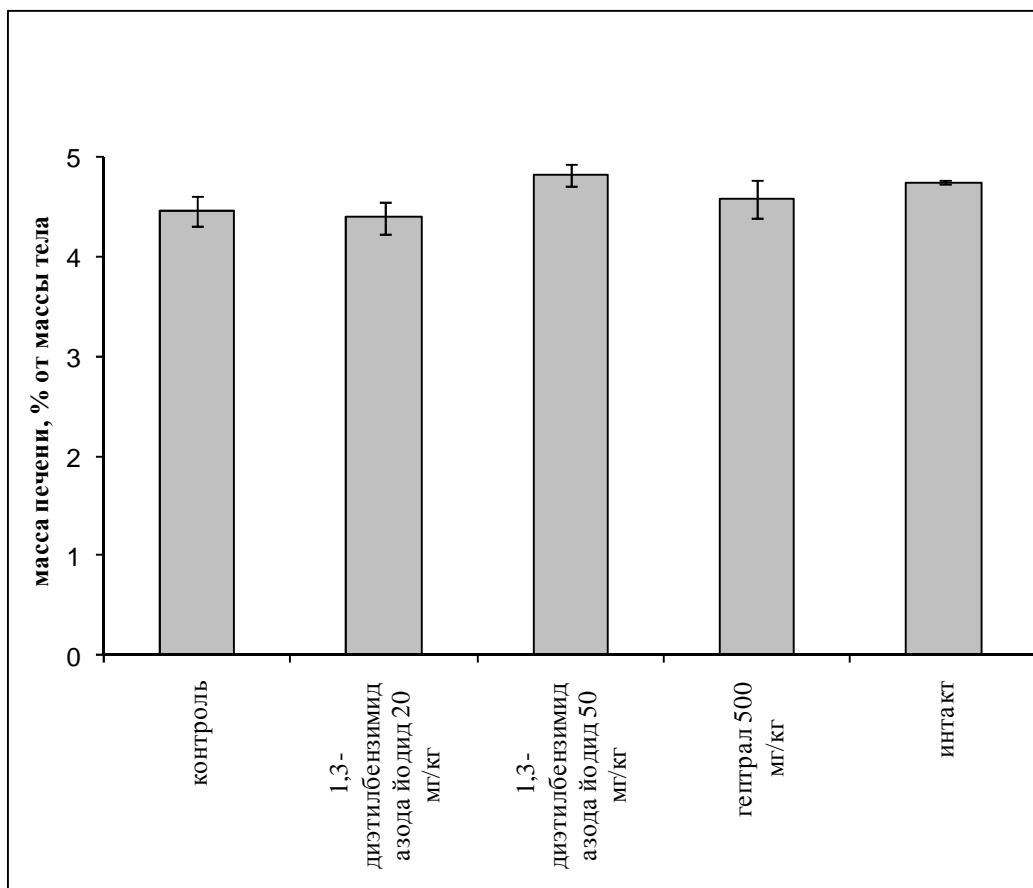


Рисунок 4. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на относительную массу печени крыс Sprague Dawley на 7 день (% от массы тела)

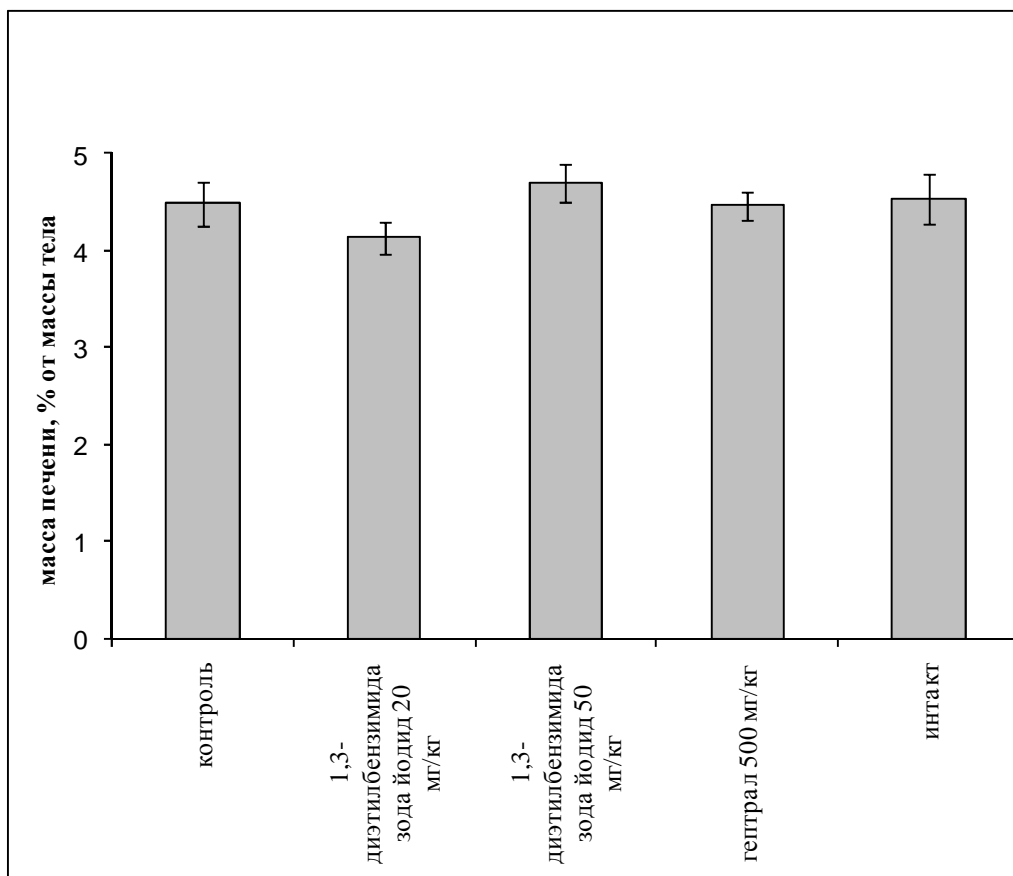


Рисунок 5. Влияние 1,3-диэтилбензимидазолия йодида на относительную массу печени крыс Sprague Dawley на 14 день (% от массы тела)

11.6. Гистология печени

Сравнительное исследование печени животных показало отсутствие внутригрупповых гистологических отличий в органах, фиксированных в разные сроки эксперимента (7-е и 14-е сутки).

При гистологическом анализе печени интактных животных признаков гепатита не обнаружено.

На срезах печени крыс из группы Контроль (нелеченные животные) наблюдали умеренную гиперплазию желчных протоков и средне выраженную инфильтрацию портальных триад мононуклеарными клетками, что свидетельствовало о наличии воспаления. Эти признаки сопровождались наличием диффузной, у части крыс – фокальной, жировой крупновакуольной дистрофии.

На фоне применения 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозе 20 мг/кг в печени крыс были обнаружены слабовыраженная гиперплазия желчных протоков, слабовыраженная инфильтрация мононуклеарами и эозинофилами в области портальных триад, а так же мононуклеарные инфильтраты в области центральных дольковых вен.

Гистологическая картина печени животных, которым тестируемое соединение вводили в дозе 50 мг/кг, позволяет сделать заключение о наличии у них слабо выраженного лимфоцитарного перипортального гепатита. Об этом свидетельствуют слабовыраженная гиперплазия желчных протоков, слабая (в отдельных случаях – умеренная) мононуклеарная, местами, эозинофильная, инфильтрация портальных триад и незначительная жировая дистрофия гепатоцитов. Нормальная балочная структура печени была сохранена.

На препаратах печени животных из группы Гептрал балочная структура печени была в норме. Так же, как и у животных, получавших 1,3-диэтилбензимидазолия йодид, в печени крыс из этой группы наблюдали инфильтрацию мононуклеарными клетками и эозинофилами в области портальных триад. Это сопровождалось наличием незначительной жировой дистрофии гепатоцитов и слабовыраженной билиарной гиперплазии.

Таким образом, результаты гистологического исследования свидетельствуют о том, что однократное внутрибрюшинное введение D-галактозамина в дозе 400 мг/кг приводило к развитию перипортального лимфоцитарного гепатита умеренной степени. Применение 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг, а также, препарата сравнения Гептрала, в течение 7 – 14 дней приводило к уменьшению степени выраженности данной патологии. Однако, на фоне введения тестируемого соединения в дозе 20 мг/кг, слабо выраженный перипортальный лимфоцитарный гепатит сопровождался эозинофильной инфильтрацией.

12. Заключение

При исследовании 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг в сравнении с референтным препаратом Гептралом в дозе 500 мг/кг на модели D-галактозамин-индуцированного токсического поражения печени было выявлено:

1. При применении 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозе 50 мг/кг выявлена выраженная гепатопротекторная активность на данной модели. Животные в течение всего эксперимента прибавляли в массе. По результатам биохимического анализа исследуемое соединение в дозе 50 мг/кг способствовало нормализации активностей трансаминаз АлТ и АсТ, как на 7-й, так и на 14-й день эксперимента. Причем активность этих ферментов достоверно не отличалась от данных показателей у интактных животных. После 13-тикратного введения было отмечено снижение активности и маркера синдрома холестаза – ЩФ.
2. Референтный препарат Гептрал в дозе 500 мг/кг оказал умеренно выраженное гепатопротекторное действие при поражении печени D-галактозамином. Наблюдалась гибель 1 животного на 7-е сутки эксперимента. Однако у остальных крыс масса тела на протяжении всего эксперимента увеличивалась. В сыворотке крови наблюдалось снижение активностей таких ферментов как АсТ и АлТ до уровня, отмеченного у интактных животных, но признаки синдрома холестаза остались – активность ЩФ была значительно выше, чем у интактных животных.
3. Результаты гистологического исследования свидетельствуют о том, применение 1,3-диэтилбензимидазолия йодида в дозах 20 мг/кг и 50 мг/кг, а также, препарата сравнения Гептрала, в течение 7 – 14 дней приводило к уменьшению степени выраженности перипортального лимфоцитарного гепатита по сравнению с группой контрольных (нелеченых) животных. Однако, на фоне введения тестируемого соединения в дозе 20 мг/кг, слабо выраженный перипортальный лимфоцитарный гепатит сопровождался эозинофильной инфильтрацией.

Проведенное исследование позволяет заключить, что 1,3-диэтилбензимидазолия йодид в дозе 50 мг/кг при внутрижелудочном введении на модели токсического поражения печени, вызванного внутрибрюшинной инъекцией D-галактозамина в дозе 400 мг/кг, оказывает гепатопротекторный эффект, превосходящий действие референтного препарата Гептрала в дозе 500 мг/кг.

**Приложение 1.1. Индивидуальные данные изменений массы тела
(% от первого дня, группа Интактные)**

№№ крыс	46	47	48	49	50
Дни эксперимента					
1	0	0	0	0	0
2	2,9	1,7	1,4	1,2	1,1
3	3,9	3,4	3,4	3,5	2,7
4	5,0	5,5	5,3	5,8	4,6
5	6,3	7,8	7,0	8,1	7,4
6	8,4	9,2	7,8	9,0	9,5
7	7,1	7,2	9,2	9,6	6,8
8				12,2	11,2
9				9,6	9,8
10				12,8	13,6
11				12,5	13,4
12				13,1	15,5
13				14,8	16,6
14				16,3	20,2

**Приложение 1.2. Индивидуальные данные изменений массы тела
(% от первого дня, группа Контроль)**

№№ крыс Дни эксперимента	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	-2,1	-0,3	-0,6	-0,8	0	3,1	-1,1	-0,6	0	-1,0	-0,8	1,3
3	-4,6	-2,7	-1,7	0,3	0	2,3	-5,1	-4,8	-6,1	-0,3	0,3	-1,9
4	-1,5	-8,0	-1,9	-4,1	1,9	3,9	-1,1	-6,7	-10,3	1,9	0,8	-1,3
5	0,5	-13,4	0	-8,1	1,4	7,0	3,2	-4,8	-9,7	4,8	1,6	2,4
6	2,3	-15,0	1,4	-12,2	3,3	9,3	6,2	-1,3	-7,5	5,4	2,9	2,4
7	1,3	-11,3	0,8	-15,1	3,5	9,3	5,6	1,0	-3,1	4,5	2,1	1,6
8							5,6	1,9	-1,4	3,8	3,5	2,9
9							6,7	2,2	1,4	4,8	4,8	3,8
10							7,5	3,5	3,1	6,7	5,4	3,8
11							11,5	6,1	3,6	9,2	4,3	4,3
12							9,9	7,4	6,7	9,6	5,4	7,0
13							12,3	8,0	8,1	11,1	5,6	5,6
14							14,2	8,3	7,2	12,4	7,5	9,1

Приложение 1.3. Индивидуальные данные изменений массы тела (% от первого дня, группа 1,3-диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг)

№№ крыс Дни эксперимента	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	-1,5	-2,0	0	-1,1	-0,3	0,8	0,3	1,2	0,9	1,2	-0,6
3	-2,4	-2,5	1,9	-3,6	-2,9	3,1	-0,8	-4,2	-1,9	0	-1,4
4	-3,5	1,1	3,0	-4,7	-4,5	-6,3	-1,1	-5,2	-4,7	0,6	-8,2
5	-2,4	2,5	4,4	-2,8	-1,9	-12,5	0,8	-2,4	-0,6	1,8	-11,9
6	-0,3	2,8	5,5	1,7	1,6	-16,9	2,2	-1,8	1,6	2,4	-16,4
7	0,9	4,2	7,1	2,8	3,2	-20,6	0	-0,3	3,1	1,8	-20,6
8						-25,5	1,4	0	2,5	2,8	
9						-29,7	3,9	1,8	5,6	5,2	
10							2,5	0,9	5,9	6,1	
11							5,3	5,2	9,9	6,1	
12							5,0	6,1	9,6	8,3	
13							6,4	7,9	19,3	8,9	
14							6,1	8,2	14,6	10,7	

Приложение 1.4. Индивидуальные данные изменений массы тела (% от первого дня, группа 1,3-диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг)

№№ крыс Дни эксперимента	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	-2,2	-1,7	1,1	-2,7	0,9	-1,6	-0,3	-1,9	-0,7	-1,6	0,8
3	-3,0	1,2	0,3	-0,8	2,2	-2,2	1,9	0	-0,7	-1,4	3,3
4	0	3,4	-3,6	1,1	3,4	2,5	2,5	1,7	0,2	-3,6	4,3
5	2,5	6,7	-0,8	3,5	3,4	3,8	3,6	1,1	3,5	-1,6	6,0
6	3,3	8,7	2,2	4,6	2,2	4,7	3,3	2,5	5,9	-0,8	6,3
7	3,8	9,6	5,8	3,3	1,2	5,5	4,4	2,8	4,2	0,5	7,1
8						3,6	-0,6	2,2	6,1	2,7	5,7
9						5,8	0,6	1,7	4,5	2,2	5,4
10						8,2	3,0	1,9	9,0	5,8	5,2
11						8,2	4,7	2,5	9,2	6,3	7,3
12						6,8	3,0	3,3	8,5	8,8	5,2
13						8,2	5,3	3,6	11,1	9,0	6,3
14						9,6	7,5	4,4	11,3	12,9	9,2

**Приложение 1.5. Индивидуальные данные изменений массы тела
(% от первого дня, группа Гентрал 500 мг/кг)**

№№ крыс Дни эксперимента	35	36	38	39	40	41	42	43	44	45
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	-1,3	-0,2	0	-0,8	0,3	-2,8	-1,3	-2,0	-0,9	-1,1
3	0,5	1,2	0,3	1,7	-0,8	-1,7	-0,5	-0,3	-0,6	0,8
4	2,7	3,0	3,5	3,9	2,6	-5,7	1,3	3,0	-0,6	0,6
5	5,6	5,0	5,6	5,8	3,7	-3,1	1,8	3,3	-1,5	1,7
6	8,5	5,5	6,4	7,2	5,8	-10,5	3,3	4,9	3,0	-2,0
7	8,5	4,7	6,4	7,2	6,3	-14,0	3,0	5,6	2,1	-1,4
8							2,0	2,3	3,3	-1,1
9							3,3	2,0	3,9	-2,3
10							3,3	3,9	6,7	0,3
11							5,3	6,2	6,7	2,0
12							5,3	4,6	7,9	5,4
13							6,3	5,6	8,5	6,2
14							7,6	6,6	10,0	8,5

Приложение 2.1. Сводная таблица биохимических показателей крови исследуемых животных на 7 день эксперимента

Группа	№№	Глюкоза, ммоль/л	Аспаргатаминотрансфераза, ммоль/(ч*л)	Аланинаминотрансфераза, ммоль/(ч*л)	Общий белок, г/л	Щелочная фосфатаза, ед/л	Общие липиды, г/л	Холестерин, ммоль/л	Холестерин HDL, г/л	Лактатдегидрогеназа, ед/л	Триглицериды, ммоль/л
Интакт	46	13,6	0,33	0,35	75,2	85,4	5,4	1,3	95,5	73,9	1,59
	47	12,4	0,77	0,41	72,3	89,4	6,1	1,8	81,3	69,3	1,24
	48	12,3	0,55	0,43	67,6	80,0	3,7	1,4	68,2	83,4	1,14
Контроль	1	11,7	0,79	0,29	37,5	131,1	4,9	1,8	65,2	69,9	1,81
	3	15,8	0,70	0,79	45,0	136,1	3,1	2,0	92,8	63,1	2,09
	4	11,8	0,89	0,49	21,4	125,4	3,1	1,0	38,6	88,2	1,88
	5	9,5	0,68	0,67	30,9	95,7	7,4	1,4	55,0	84,5	2,74
	6	14,3	0,52	0,57	40,3	120,8	3,9	2,6	61,4	62,9	2,61
1,3 - диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг	13	11,7	0,59	1,01	43,4	156,4	4,2	2,3	65,4	73,9	1,22
	14	16,5	1,07	1,21	56,9	139,2	4,8	1,3	81,8	82,3	1,57
	15	15,5	0,90	0,89	58,8	151,2	4,2	1,6	53,3	122,8	2,00
	16	11,9	0,59	1,04	48,9	133,7	3,7	3,0	90,7	95,5	1,36
	17	10,9	1,37	1,23	60,8	143,2	4,2	1,8	101,7	93,6	1,12
1,3 - диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг	24	16,6	0,57	0,31	67,2	147,2	4,1	2,4	72,6	92,0	1,48
	25	12,9	0,97	0,37	85,3	126,6	5,3	1,9	64,6	81,0	2,03
	26	9,4	0,43	0,58	60,7	152,0	4,5	2,1	67,0	92,3	0,91
	27	12,6	0,56	0,35	43,8	110,3	5,6	1,9	75,6	100,4	0,52
	28	15,3	0,49	0,37	57,8	134,9	2,5	1,5	62,6	85,0	0,30
Гептрал 500 мг/кг	35	12,1	0,52	0,54	53,0	93,2	4,4	1,6	67,5	84,7	1,15
	36	8,9	0,42	0,46	46,1	124,9	4,3	1,6	36,3	85,5	3,43
	38	13,4	0,86	0,60	49,0	108,0	4,4	1,5	65,6	73,7	0,81
	39	11,2	0,50	0,23	34,2	152,3	3,6	1,4	57,4	85,3	1,00
	40	12,7	0,64	0,45	52,8	119,8	3,9	1,5	60,1	78,5	1,08

Приложение 2.2. Сводная таблица биохимических показателей крови исследуемых животных на 14 день эксперимента

Группа	№№	Глюкоза, ммоль/л	Аспаратаминотрансфераза, ммоль/(ч*л)	Аланинаминотрансфераза, ммоль/(ч*л)	Общий белок, г/л	Щелочная фосфатаза, ед/л	Общие липиды, г/л	Холестерин, ммоль/л	Холестерин HDL, г/л	Лактатдегидрогеназа, ед/л	Триглицериды, ммоль/л
Интакт	49	13,0	0,52	0,49	68,9	88,5	3,4	1,9	54,0	83,9	1,84
	50	17,6	0,44	0,49	72,5	95,8	3,4	1,2	41,2	94,4	2,34
Контроль	7	8,6	0,73	0,76	71,2	155,0	5,3	2,8	71,1	69,6	2,94
	8	14,4	0,79	0,60	75,1	114,3	3,6	2,2	96,4	73,4	0,84
	9	9,1	0,72	0,66	77,1	155,0	3,2	1,4	68,3	75,3	0,94
	10	19,2	0,75	0,52	62,5	161,3	5,7	1,1	66,3	81,0	1,69
	11	10,7	0,62	0,52	63,1	167,2	2,8	2,0	88,6	82,3	0,64
	12	16,4	0,61	0,62	65,1	190,5	3,8	1,7	78,4	50,5	1,00
1,3 - диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг	19	9,8	1,06	0,43	64,6	107,5	4,5	2,2	43,1	84,5	1,52
	20	13,5	0,57	0,22	61,0	128,2	3,5	1,9	60,1	55,9	1,00
	21	12,6	0,59	0,21	61,0	115,5	3,1	2,1	78,0	67,5	0,81
	22	15,7	0,59	0,71	68,2	141,1	3,4	1,9	67,8	81,8	0,77
1,3 - диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг	29	10,6	0,34	0,35	72,1	87,2	3,1	2,8	112,1	75,8	1,28
	30	16,3	0,70	0,20	70,5	104,5	4,7	1,8	99,0	64,0	0,79
	31	11,9	0,64	0,50	47,8	124,7	3,4	2,1	56,7	92,3	1,87
	32	24,6	0,46	0,13	59,6	119,6	4,6	2,7	121,7	62,6	1,04
	33	13,2	0,68	0,57	72,7	157,8	4,7	2,2	71,9	99,8	2,01
	34	16,5	0,68	0,57	72,6	72,9	4,1	2,1	146,9	50,5	1,28
Гептрал 500 мг/кг	42	10,8	0,41	0,39	53,4	107,2	4,8	2,0	117,2	70,2	1,57
	43	14,4	0,78	0,33	49,9	148,9	3,3	2,3	80,4	75,3	0,46
	44	10,0	0,51	0,34	54,9	164,4	4,0	2,1	60,5	66,1	1,06
	45	15,0	0,35	0,35	53,6	124,3	3,9	1,8	120,2	69,3	1,64

Приложение 3. Индивидуальные значения протромбинового индекса, %

Группа	№№	Дни эксперимента	
		7	14
Интакт	46	94,7	
	47	104,7	
	48	100,7	
	49		107,0
	50		91,6
Контроль	1	88,6	
	2		
	3	87,4	
	4	72,3	
	5	90,7	
	6	94,0	
	7		120,4
	8		103,8
	9		109,4
	10		103,8
	11		101,5
	12		96,8
1,3 - диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг	13	86,7	
	14	97,7	
	15	96,7	
	16	88,4	
	17	84,9	
	18		
	19		109,3
	20		110,7
	21		104,8
	22		102,3
	23		
1,3 - диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг	24	97,7	
	25	88,5	
	26	90,6	
	27	87,0	
	28	88,5	
	29		123,9
	30		107,0
	31		103,8
	32		103,5
	33		109,3
	34		99,1
	Гептрал 500 мг/кг	35	84,4
36		88,9	
37			
38		90,6	
39		86,6	
40		88,1	
41			
42			119,1
43			119,7
44			116,1
45			110,1

Приложение 4. Индивидуальные данные относительной массы печени (% от массы тела)

Группа \ День эксперимента	7		14	
	№ крысы	Масса печени, %	№ крысы	Масса печени, %
Интактные	46	4,7	49	5,0
	47	4,8	50	4,3
	48	4,8		
Контроль	1	4,7	7	5,4
	2	3,8	8	3,7
	3	4,2	9	4,2
	4	4,8	10	4,5
	5	4,6	11	4,5
	6	4,7	12	4,5
1,3-диэтилбензимидазолия йодид 20 мг/кг	13	4,2	19	3,8
	14	4,2	20	4,1
	15	4,0	21	4,6
	16	4,9	22	4,1
	17	4,7		
1,3-диэтилбензимидазолия йодид 50 мг/кг	24	4,7	29	5,2
	25	5,1	30	4,3
	26	4,9	31	4,1
	27	4,9	32	5,2
	28	4,5	33	5,0
			34	4,4
Гептрал 500 мг/кг	35	4,4	42	4,8
	36	5,4	43	4,1
	38	4,3	44	4,3
	39	4,5	45	4,6
	40	4,3		