Исследование острой токсичности Тропоксина

Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А.

Лаборатория лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Определялись переносимые, токсические и летальные дозы нового оригинального противомигреневого лекарственного средства Тропоксина в таблетированной форме при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам и крысам. Регистрировались сроки развития интоксикации и гибели животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины. Были определены среднелетальные дозы: LD_{50} = 759 (645–893) мг/кг у самок мышей, LD_{50} = 864 (764–977) мг/кг у самцов мышей при внутрибрюшинном введении; LD_{50} = 1152 (686–1932) мг/кг у самок мышей, LD_{50} = 1006 (605–1673) мг/кг у самцов мышей при пероральном введении; LD_{50} = 490 (400–601) мг/кг у самок крыс, LD_{50} = 515 (507–524) мг/кг у самцов крыс при внутрибрюшинном введении. Тропоксин при пероральном введении крысам вплоть до дозы 5 г/кг не вызывал гибели животных. Установлено, что Тропоксин в таблетированной форме при пероральном и внутрибрюшинном введении является малотоксичным и по классификации *Сидорова К.К.* (1973 г.) относится к 4 классу токсичности.

Ключевые слова: Тропоксин, острая токсичность, мыши, крысы

Study of acute toxicity of the drug Tropoxin

Sorokina A.V., Alekseeva S.V., Miroshkina I.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. It was determined endurable, toxic and fatal doses of a new original anti-migraine medicine Tropoxin in tablet form at unitary oral and intraperitoneal introduction to outbreeding white mice and rats. Periods of intoxication and death of animals with a detailed description of the observed clinical picture were registered. The median fatal doses were identified: LD_{50} = 759 (645 – 893) mg/kg in female mice, LD_{50} = 864 (764 – 977) mg/kg in male mice at intraperitoneal introduction; LD_{50} = 1152 (686 – 1932) mg/kg in female mice, LD_{50} = 1006 (605 – 1673) mg/kg in male mice at oral introduction; LD_{50} = 490 (400 – 601) mg/kg in female rats, LD_{50} = 515 (507 – 524) mg/kg in male rats at intraperitoneal introduction. Tropoxin did not cause death of rats at oral introduction in a dose of up to 5 g/kg. It was determined that Tropoxin in tablet form at oral and intraperitoneal introduction concerns to low-toxic substances. According to classification Sidorov K.K. Tropoxin in tablet form may be related to 4th toxicity class.

Keywords: Tropoxin, acute toxicity, mice, rats

Автор, ответственный за переписку:

Мирошкина Ирина Александровна — научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: iris10.81@mail.ru

Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезировано новое оригинальное фармакологически активное соединение Тропоксин (3-(3,4,5-триметоксибензоилоксиимино)-8-метил-8-азабицикло [1, 2, 3] октана гидрохлорид).

Тропоксин является антагонистом серотонина и перспективным лекарственным средством для клинического использования при лечении мигрени. В ходе доклинических исследований данное соединение проявляло антисеротониновую активность в дозах 10 мг/кг при внутривенном введении и 20 мг/кг при пероральном введении [2, 3]. Оценка острой токсичности является необходимым этапом доклинического исследования безопасности таблетированной формы Тропоксина.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось изучение острой токсичности Тропоксина. В ходе работы было необходимо определить переносимые, токсические и летальные дозы Тропоксина, а также установить выраженность его токсического действия и переносимость при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении, зарегистрировать сроки развития интоксикации и гибели животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины [6].

Материалы и методы

В исследовании использовали таблеточную массу (ТРН), предназначенную для формирования таблеток Тропоксина 50 мг. Каждые 100 г массы содержали Тропоксин 62,5 г; крахмал картофельный 25,25 г; кальция фосфат двузамещённый 11,25 г; магния стеарат 1 г.

ТРН был произведён в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (серия 040914).

Из таблеточной массы готовили суспензию *ex tempore* дисперсионным методом на 1% растворе крахмала. Эксперименты проводили на белых беспородных мышах (n = 132, масса 18–20 г) и белых беспородных крысах (n = 90, масса 180–200 г) обоего пола. Животные содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Мышей и крыс случайным образом распределяли в опытные и контрольные группы после предварительного 5-дневного карантина и осмотра, исключающего использование в эксперименте больных

и травмированных животных [1, 6, 7]). ТРН вводили однократно в максимально возможных объёмах перорально с помощью металлического атравматического зонда и внутрибрюшинно с помощью одноразовых шприцов. ТРН вводили в дозах: 500, 1 000, 1 500, 2 000 и 3 000 мг/кг (пероральное введение мышам); 500, 800, 900 и 1 000 мг/кг (внутрибрюшинное введение мышам); 5 г/кг (пероральное введение крысам); 400, 500, 600, 700 и 800 мг/кг (внутрибрюшинное введение крысам). В качестве контроля вводили 1% раствор крахмала однократно в максимально возможном объёме для каждого из способов введения и для каждого из видов животных [4]. Далее наблюдали за опытными и контрольными группами в течение 14 дней. В первые 8 ч после введения препарата каждая особь находилась в индивидуальной камере для непрерывного наблюдения, затем животных помещали в клетки группового содержания и осматривали ежедневно утром и вечером с целью выявления их возможной гибели, а также описания их общего состояния и особенностей поведения [5]. Массу тела животных определяли перед введением препаратов, далее в первую неделю эксперимента ежедневно, со второй недели наблюдения и до окончания эксперимента – еженедельно. Суточное потребление корма и воды фиксировали до введения препаратов, а также в первые, седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента. Животных, павших в ходе эксперимента, вскрывали. По окончании эксперимента проводили эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие всех выживших мышей и крыс [1].

Среднелетальные дозы LD_{50}, LD_{16}, LD_{84} определяли по методу Литчфилда и Уилкоксона [1] Статистическую обработку полученных данных по динамике массы тела и её прироста проводили следующим образом. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий проверяли с помощью критерия Левена для множественных сравнений. Так как распределение изучаемых данных значимо не отличалось от нормального, а дисперсии были гомогенны, то для определения статистической значимости изменений использовали параметрические методы. Для сравнения нескольких выборок применяли однофакторный дисперсионный анализ или дисперсионный анализ для повторного измерения с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. В случае сравнения двух выборок использовали *t*-критерий Стьюдента. Полученные результаты описывали с помощью средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \le 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение

При внутрибрюшинном введении ТРН мышам регистрировали гибель части животных (табл. 1). Например, ТРН в дозе 500 мг/кг не вызывал гибели мышей. В дозе 1 000 мг/кг ТРН приводил к гибели 6 из 6 животных в группе у самок и 5 из 6 животных в группе у самцов. Были рассчитаны среднелетальные дозы: у самок LD_{50} составила 759 (645–893) мг/кг, LD_{16} – 658 (648–668) мг/кг, LD_{84} – 877 (863–891) мг/кг. У самцов LD_{50} составила 864 (764–977) мг/кг, LD_{16} – 716 (709–727) мг/кг, LD_{84} – 1043 (1032–1054) мг/кг.

Таблица 1

Острая токсичность ТРН при внутрибрюшинном введении беспородным белым мышам

Мыши самки			Мыши самцы		
доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе	доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе
500	0	6	500	0	6
800	3	6	800	1	6
900	5	6	900	4	6
1 000	6	6	1 000	5	6

Таблица 2

Острая токсичность ТРН при пероральном введении беспородным белым мышам

Мыши самки			Мыши самцы		
доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе	доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе
500	1	6	500	0	6
1 000	3	6	1 000	4	6
1 500	3	6	1 500	4	6
2 000	4	6	2 000	5	6
3 000	6	6	3 000	6	6

Таблица 3

Острая токсичность ТРН при внутрибрюшинном введении беспородным белым крысам

Крысы самки			Крысы самцы		
доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе	доза мг/кг	число погибших животных	число животных в группе
400	0	6	400	0	6
500	4	6	500	1	6
600	5	6	600	2	6
700	6	6	700	4	6
–	–	–	800	6	6

При пероральном введении ТРН мышам в указанных дозах также регистрировали гибель части животных (табл. 2). Например, ТРН в дозе 500 мг/кг вызвал смерть только 1 из 6 животных в группе самок, и не вызывал гибели в группе самцов. В дозе 3 000 мг/кг ТРН

приводил к 100% смертности у самок и у самцов. Были определены среднелетальные дозы: у самок LD_{50} составила 1152 (686–1932) мг/кг, LD_{16} – 521 (369–737) мг/кг, LD_{84} – 2545 (1800–3598) мг/кг. У самцов LD_{50} составила 1006 (605–1673) мг/кг, LD_{16} – 533 (413–688) мг/кг, LD_{84} – 1901 (1473–2453) мг/кг.

При внутрибрюшинном введении ТРН крысам также регистрировали гибель части животных (табл. 3). Например, ТРН в дозе 400 мг/кг не вызывал гибели крыс. Гибель 100% животных регистрировали при введении ТРН в дозе 700 мг/кг (самки крыс) и 800 мг/кг (самцы крыс). Были определены среднелетальные дозы: у самок LD_{50} составила 490 (400–601) мг/кг, LD_{16} – 410 (396–424) мг/кг, LD_{84} – 587 (567–608) мг/кг. У самцов LD_{50} составила 515 (507 – 524) мг/кг, LD_{16} – 621 (535 – 721) мг/кг, LD_{84} – 749 (736–761) мг/кг.

В ходе эксперимента у животных, подвергнутых обработке, развивалась сходная клиническая картина: после введения ТРН наблюдалось снижение двигательной активности, дыхание становилось сначала частым

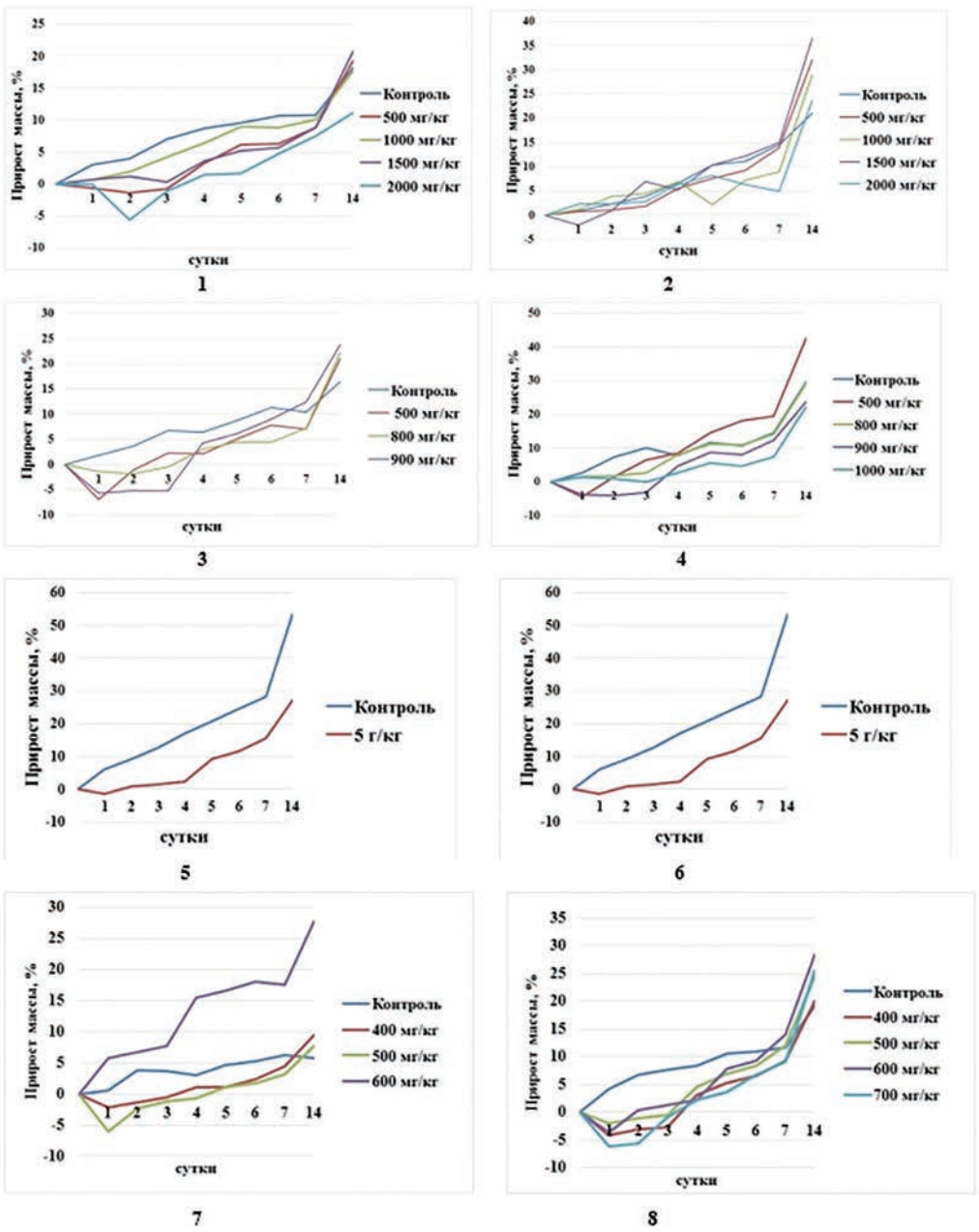


Рис. 1. Динамика прироста массы тела (%) у экспериментальных животных при исследовании острой токсичности ТРН

Примечание: 1 – мыши самки после перорального введения; 2 – мыши самцы после перорального введения; 3 – мыши самки после внутрибрюшинного введения; 4 – мыши самцы после внутрибрюшинного введения; 5 – крысы самки после перорального введения; 6 – крысы самцы после перорального введения; 7 – крысы самки после внутрибрюшинного введения; 8 – крысы самцы после внутрибрюшинного введения

и поверхностным, далее глубоким и судорожным. У большинства особей отмечали тремор, нетипичное вынужденное положение, наличие рефлекса Штрауба. При внутрибрюшинном способе введения для обоих видов животных было характерно втягивание живота. Гибель мышей наступала через 4–14 мин от начала эксперимента после приступа тонико-клонических судорог.

Гибель крыс наступала через 10–40 мин от начала эксперимента после приступа тонических судорог.

При пероральном введении крысам в максимально возможном объёме и максимально возможной концентрации для данного способа введения в дозе 5 г/кг ТРН не вызывал гибели животных, вследствие чего определение средней смертельной дозы не представлялось возможным. После введения препарата наблюдалось снижение двигательной активности, повышенная реакция на звуковые раздражители (вздрагивание, подпрыгивание на месте), частое и поверхностное дыхание (у одной самки в группе – глубокое и судорожное), тремор. Клиническая картина была менее тяжёлой, чем у животных других групп (мыши после перорального введения, мыши и крысы после внутрибрюшиного введения), рефлекса Штрауба не было выявлено.

Большинство выживших после внутрибрюшинного введения ТРН мышей и крыс при перемещении в клетки группового содержания активны, возбудимы, на тактильный контакт реагировали вокализацией. Оставшиеся в живых после перорального введения препарата мыши и крысы были гиперактивны и агрессивны не только при перемещении их в клетки группового содержания, но и в течение всех последующих 14 дней наблюдения. Следует подчеркнуть, что все выжившие животные активно потребляли корм и воду. Если в течение 1–3 суток после введения препарата в некоторых группах отмечали снижение массы тела у животных, то с 2–4 суток все животные прибавляли в массе тела (рис. 1).

Морфологическая картина, обнаруженная при патологоанатомическом вскрытии всех павших животных, которым перорально и внутрибрюшинно вводили ТРН в указанных дозах, была сходной и характеризовалась ярко выраженным нарушением кровообращения. Других патологических изменений органов и их систем не было обнаружено. Важно, что морфологическая картина внутренних органов при патологоанатомическом вскрытии выживших экспериментальных животных не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

Таким образом, в результате проведённых экспериментов удалось установить, что ТРН при пероральном и внутрибрюшинном введении является малотоксичным лекарственным средством и по классификации *Сидорова К.К.* (1973 г.) может быть отнесён, соответственно, к 4 классу токсичности (101–1000 мг/кг).

Литература

1. *Беленький М.Б.* Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. М.: 1963.
2. *Ганьшина Т.С.* Разработка методологии поиска новых противомигреневых средств. Создание оригинального препарата – тропоксин. Автореферат дисс. докт. биол. наук. М.: 2004.
3. *Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.* Оценка взаимосвязи между фармакокинетикой и фармакодинамикой тропоксина у крыс. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 3: 21–25.
4. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (РД 64-126-91). М.: МЗ России, ФК, 1992; 45.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Медицина. М.: 2005; 41–47.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Часть первая. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. Гриф и К. М: 2012; 15–17.
7. Guide for care and use of laboratory animals. National Academy press. Washington, D.C. 1996.