

С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, О. Ю. Кошова, І. О. Лебединець

Результати дослідження специфічної токсичності таблеток «Долосан Форте®»

Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Ключові слова: специфічна токсичність, зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієва сіль), пітофенону гідрохлорид, фенпіверинію бромід, комбінований лікарський препарат

Проблема фармакокорекції больового синдрому дотепер залишається однією з найактуальніших, зважаючи на значну поширеність, суттєве зниження якості життя та працездатності. Ефективність впливу на хронічний біль не завжди є достатньою [1, 2], а традиційно вживані аналгетики, наприклад, метамізол натрію, спричиняють гематотоксичний вплив та інші побічні ефекти, їхнє застосування обмежують [3]. Отже, є актуальним створення нових високоактивних знеболювальних препаратів, які мають високий рівень безпечності. У цьому аспекті привертає увагу зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієва сіль), який характеризується вираженою аналгетичною та протизапальною активністю та перевершує за терапевтичним індексом метамізол натрію та диклофенак натрію [4]. Оскільки поряд із запаленням частою причиною болю є спазм, доцільно поєднати зирилон зі спазмолітиками, а саме пітофенону гідрохлоридом (міотропний спазмолітик), фенпіверинію бромідом (М-холінолітик з додатковими міотропними та аналгетичними властивостями). Така комбінація – таблетки «Долосан Форте®» – створена на ПАТ «Червона Зірка», за виразністю фармакологічних ефектів вона не поступається препарату порівняння «Спазмалгон®» і демонструє переваги над останнім за величиною ефективних доз і відсутністю пригнічувального впливу на перистальтику кишечника за умов норми [5]. Відомо, що спазмолітична дія пітофенону активно виявляється за його комбінованого застосування з аналгетика-

ми *in vitro* [6], а синергізм аналгетичної дії пітофенону та фенпіверинію за поєднання з диклофенаком натрію підтверджено клінічно [7]. Водночас підтвердження безпечності є невід'ємною частиною доклінічних досліджень комбінованих препаратів.

Мета дослідження – встановити специфічну токсичність таблеток «Долосан Форте®», а саме: наявність мутагенної, гонадотоксичної, імунотоксичної, сенсibilізувальної, місцевоподразнювальної дії, впливу на секреторну функцію шлунка та ульцерогенних властивостей.

Матеріали та методи. Досліди проведено з дотриманням вимог Європейської конвенції з питань захисту тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей, за схвалення комісії НФаУ з біоетики. Догляд за тваринами та маніпуляції проводили відповідно до стандартних операційних процедур ЦНДЛ НФаУ.

Мутагенну дію таблеток «Долосан Форте®» досліджували на мишах [8] за методом реєстрації хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку [9]. Мишей-самців масою тіла (24 ± 2) г рандомізували на 5 груп по 6 тварин: інтактний контроль (ІК), негативний контроль (НК, отримували носій – дистильовану воду), тварини, яким внутрішньошлунково (в/ш) протягом 5 днів (оскільки передбачається застосування *per os* короткими курсами) вводили досліджуваний препарат (ДП) у дозах 5, 50 та 500 мг/кг за діючою речовиною зирилоном (виходячи з умовнотерапевтичної дози для мишей 5 мг/кг та значного терапевтичного індексу речовини). Тварин виводили з досліду через 24 год після останнього введення препарату (за 2 год до цього доочередовно (д/о) вводили розчин колхіцину в дозі 2,5 мг/кг), розчином Хенкса за темпе-

ратури 37 °C вимивали кістковий мозок з обох стегнових кісток, за стандартними методами проводили обробку клітин та їхню фіксацію, фарбували азур-еозином. Аналіз виконували під імерсійним об'єктивом мікроскопа за збільшення 10 × 90, аналізували 100 метафаз на тварину за загальноприйнятими критеріями [9].

Вплив ДП на репродуктивну функцію визначали в обмеженому обсязі, оскільки не передбачається його тривале застосування в клінічній практиці. Гонадотоксичну дію вивчали на щурах обох статей, розподілених на 4 групи по 8 самок та 10 самців: ІК, НК та тварини, яким в/ш вводили ДП у вигляді водної суспензії в умовнотерапевтичній для щурів дозі 2,3 мг/кг за діючою речовиною зирилоном та десятиразово збільшеній дозі 23,0 мг/кг протягом 15 днів самкам (3–4 естральних цикли), 60 днів – самцям (період сперматогенезу 48 діб плюс період дозрівання сперматозоїдів у епідидимусі 10–14 діб). Після цього вивчали тривалість естрального циклу та виводили самок з експерименту в фазі еструс або проеструс. Яєчники досліджували макроскопічно та гістологічно (5 зразків яєчників від різних тварин з кожної групи), визначали їхні масові коефіцієнти (МК). На серійних зрізах (фарбування – гематоксилін та еозин) проводили кількісну оцінку структурно-функціональних елементів [10]. Після завершення введення ДП самців виводили з експерименту, визначали МК сім'яників, їхній об'єм, МК придатків сім'яників, передміхурової та пухирцевої залози, макроскопічно та гістологічно досліджували сім'яники. У гістопрепаратах (фарбування – гематоксилін та еозин) розраховували індекс сперматогенезу, відносну кількість каналців зі злущеним епітелієм, відносну кількість каналців у метафазі 2 поділу дозрівання, кількість нормальних сперматогоній у звивистих каналцях. Суспензію вмісту придатка сім'яників у 0,9 % розчині натрію хлориду використовували для визначення функціонального стану сперматозоїдів за концентрацією клітин, відотною кількістю нерухомих та патологічних форм, осмотичною

та кислотною резистентністю, тривалістю руху [8].

Вплив ДП на гуморальний та клітинний імунітет досліджено на мишах-самцях масою 18–22 г. Стан гуморальної імунної відповіді визначали за кількістю антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці, титрів гемаглютининів (ГА) у сироватці крові імунізованих тварин (одноразове д/о уведення 3 % суспензії еритроцитів барана (ЕБ) у дозі 0,2 мл/20 г). Мишей рандомізували на 3 групи по 10 тварин: імунізований контроль; тварини, яким за 1 год до імунізації та надалі вводили ДП в умовнотерапевтичній та десятиразово збільшеній дозі 5 та 50 мг/кг відповідно. На 5 добу визначали кількість АУК методом локального гемолізу в гелі [11, 12], титри ГА методом серійних розведень [12, 13]. Вплив ДП на клітинну імунну відповідь вивчали в тесті реакції гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) за методом К. Р. Kitamura [14]. Мишей рандомізували на 4 групи по 8 тварин: ІК; імунізований контроль; тварини, яким за 1 год до імунізації та надалі протягом усього її терміну (6 діб) в/ш вводили ДП у дозах 5 та 50 мг/кг. Тварин імунізували одноразовим підшкірним уведенням до міжлопаткової області суспензії свіжовідмитих ЕБ у дозі $2 \cdot 10^5$ клітин у 0,5 мл 0,9 % розчину натрію хлориду на 20 г. На 5 добу під апоневроз задньої кінцівки вводили завершальну дозу антигена (10^8 ЕБ у 0,02 мл), у контрлатеральну кінцівку – аналогічний об'єм 0,9 % розчину натрію хлориду. Через 24 год тварин виводили з дослідів, оцінювали місцеву запальну реакцію за різницею маси кінцівок з розрахунком індексу реакції (ІР).

Здатність ДП викликати сенсibilізацію оцінювали на моделі активної шкірної анафілаксії (АША), моделі «Реакція непрямої дегрануляції мастоцитів» (РНДМ) та в тесті «Кон'юнктивальна проба» (КП). АША відтворювали на мурчаках, рандомізованих на 3 групи по 10 тварин: інтактний контроль та тварини, яким в/ш вводили ДП в умовно терапевтичній дозі 2,1 мг/кг та десятиразово збільшеній дозі 21,0 мг/кг [12]. На 21 добу від початку сенсibilізації

внутрішньошкірно вводили завершальну дозу алергену (ДП, по 40 мкл/тварину в концентрації, що не викликає місцевого подразнення), у контрлатеральну ділянку для контролю розчинника аналогічним чином вводили 0,9 % розчин натрію хлориду, надалі внутрішньовенно – 0,5 мл 1 % розчину синього Еванса. Через 30 хв тварин виводили з досліду, відсепаровували шкіру та визначали діаметр і площу забарвлених плям у місцях ін'єкцій [13].

Спроможність ДП викликати алергічні реакції негайного типу визначали на моделі РНДМ [12]. Щурів-самців масою 250–300 г рандомізували на 3 групи по 10 тварин: ІК та тварини, яких сенсibilізували ДП, який вводили в/ш у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг протягом 2 тижнів. На 21 добу тварин виводили з досліду, одержували сироватку крові. У попередніх експериментах обрано концентрацію ДП, що викликає не більше ніж 10 % неспецифічної дегрануляції. Препарати на предметних скельцях фарбували 0,3 % спиртовим розчином нейтрального червоного. До 0,03 мл мастоцитів, отриманих з перитонеальної рідини інтактних тварин, додавали 0,03 мл сироватки, одержаної від сенсibilізованої або інтактною тварини, і 0,03 мл розчину ДП у 0,9 % розчині натрію хлориду. Враховували контрольні дані, одержані в разі використання сироватки без ДП (контроль сироватки), та контроль спонтанної дегрануляції мастоцитів (без внесення сироватки). Препарати інкубували 15 хв за температури 37 °С. Підраховували відносну кількість дегранульованих мастоцитів (світлова мікроскопія). Реакцію вважали позитивною, якщо кількість дегранульованих клітин перевищувала 10 %. Сенсibilізувальну дію оцінювали за наступною шкалою: слабка – 10–20 % дегранульованих клітин; позитивна – 20–30%; різко позитивна – 30% і більше.

Можливість ініціації ДП алергічної реакції повільного типу досліджували в тесті «Кон'юнктивальна проба» [12] на кролях масою 3,0–3,5 кг. Сенсibilізацію проводили введенням ДП у дозах 1 та 10 мг/кг в/ш протягом 2 тижнів.

На 21 добу після початку сенсibilізації під верхнє повікo закапували 1 краплю водної суспензії ДП, у контрлатеральне око – 1 краплю води (контроль). Через 15 хв та 24 год за шкалою оцінювали офтальмореакцію: 0 – відсутність реакції; 1 – слабке почервоніння слъозної протоки; 2 – почервоніння слъозної протоки та склери в напрямку до рогівки; 3 – почервоніння всієї кон'юнктиви та склери.

Вивчення секреторної активності шлунка проводили за методом [15] на щурах-самках масою 250–300 г. Після 48-год голодування за вільного доступу до питної води тваринам в/ш вводили ДП у дозі 2,3 мг/кг або референс-препарат – таблетки «Спазмалгон®» у дозі 23,0 мг/кг, контрольним тваринам – еквівалентну кількість дистильованої води. Через 1 год тварин наркотизували, після лапаротомії накладали лігатуру на пілоричний сфінктер шлунка. Через 4 год накладали лігатуру на кардіальний сфінктер, вилучали шлунок і вимірювали об'єм шлункового соку. Визначали його загальну кислотність титруванням 0,1 N розчином натрію гідроксиду в присутності фенолфталеїну й бромтимолового синього. Загальну та вільну кислотність виражали як об'єм 0,1 N розчину натрію гідроксиду, необхідний для нейтралізації 100 мл шлункового соку. Зв'язану кислотність визначали за різницею між загальною та вільною кислотністю. Оскільки збір шлункового соку та тривале знаходження його надмірної кількості в шлунку є стресуючими чинниками, які створюють умови для ураження слизової оболонки, визначали ульцерогенну дію ДП згідно з [16]. Стан слизової оболонки оцінювали в балах: 0 – відсутність ушкоджень, 0,5 – набряк, гіперемія, краплинні крововиливи; 1 – 2–3 невеликих виразки; 2 – понад 3 невеликих виразок; 3 – виразка значних розмірів, 4 – декілька великих виразок, 5 – перфорація виразки.

Результати проаналізовано за допомогою програми Statistica-6. Використано непараметричні методи Крускала-Уолліса та критерій Манна-Уїтні, критерій χ^2 , у деяких випадках – параметричні методи (однофакторний диспер-

сійний аналіз ANOVA, критерій Ньюмена-Кейлса).

Результати та їх обговорення. *Результати вивчення мутагенного потенціалу таблеток «Долосан Форте®».* Аналіз хромосомних аберацій клітин кісткового мозку мишей (загалом вивчено 3000 метафазних пластин) показав, що сумарна кількість метафаз з абераціями в групах ІК та НК не перевищувала спонтанної частоти хромосомних пошкоджень – 1,0–2,5 % [17]. Аберації переважно були представлені поодинокими та парними фрагментами. Аналогічні результати без достовірних відмінностей показників відносно груп ІК та НК отримано на тлі «Долосану Форте®» у терапевтичній дозі 5 мг/кг. У препаратах мишей, яким вводили ДП у дозах 50 та 500 мг/кг, значно збільшувалась кількість парних фрагментів метафазних пластинок, однак ці зміни не зростали з підвищенням дози. Також підвищувалась кількість поодиноких фрагментів, переважно в групі тварин, яким вводили ДП у дозі 50 мг/кг, однак відмінності не сягали рівня статистичної значущості. Кількість аберацій, представлених обмінами, не відрізнялася в різних групах, але метафазні пластинки з хромосомними обмінами зустрічались частіше в мишей, які одержували ДП у дозах 50 та 500 мг/кг. Клітини з поліплоїдним набором хромосом зустрічались рідко і не були асоційовані з введенням препарату. Клітини з множинними абераціями та хроматидними обмінами – відсутні в усіх групах. Загальна кількість метафаз з абераціями в групах тварин, яким вводили ДП у дозах 50 та 500 мг/кг, відрізнялась від даних груп ІК та НК і дещо перевищувала спонтанну частоту клітин з хромосомними пошкодженнями (1,0–2,5%), становлячи 3,5 % на тлі дози 50 мг/кг та 2,5 % – на тлі дози 500 мг/кг. Отже, таблетки «Долосан Форте®» у терапевтичній дозі 5 мг/кг не чинять мутагенної дії в мишей. За 10- та 100-разового збільшення дози зростає кількість аберантних метафазних пластинок, однак цей показник лише на 1 % перевищує спонтанну частоту хромосомних пошкоджень. Клітини з множинними абераціями, які є

характерною ознакою впливу активних мутагенів, на тлі ДП відсутні.

За даними літератури [18] відомо, що 2,4-дихлорбензойна кислота (калієвою сіллю якої є зирилон) не виявляє мутагенної дії в тесті Еймса на *Salmonella typhimurium* різних штамів, а також *E. coli*, з використанням метаболічної активації та без неї. Важливо, що в разі поєднаного застосування зирилону, пітофенону гідрохлориду, фенпіверинію броміду не спостерігається зростання мутагенного потенціалу.

Результати дослідження гонадотоксичної дії таблеток «Долосан Форте®». Дослідження впливу таблеток «Долосан Форте®» на репродуктивну функцію проводили в обмеженому обсязі, оскільки тривале застосування препарату в клінічній практиці не передбачається, а також виходячи з того, що, згідно з методичними рекомендаціями, поглиблені дослідження цих аспектів не є доцільними для препаратів, які за механізмом дії чинять заздалегідь відомі негативні наслідки для плода. Водночас НПЗЗ притаманна ембріотоксична дія [19], широко обговорюються асоційовані з пригніченням ЦОГ-2 порушення запліднення та імплантації, а також овуляції [20], тератогенна дія, асоційована з пригніченням ЦОГ-1 [21], фетотоксична дія (у тому числі передчасне закриття артеріальної протоки [22]), збільшення ризику невиношування внаслідок прийому НПЗЗ у ранні терміни вагітності [23] та ослаблення пологової діяльності – у пізні строки [24]. Тому вивчення впливу ДП на репродуктивну функцію було обмежено оцінкою стану репродуктивної системи самців та самок щурів після курсового застосування ДП. Встановлено, що таблетки «Долосан Форте®» у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг у разі введення протягом 3–4 естральних циклів не впливали на тривалість естрального циклу та якісний клітинний склад вагінального епітелію, в усіх самок спостерігали послідовну зміну чотирьох фаз циклу, тривалість якого в більшості тварин становила 4–5 днів. Макроскопічно не виявлено змін органів малого таза, а також МК яєчників, мікроскопічно не зареєстровано помітних змін у їхній гістоструктурі

(кистозоподібних фолікулів, крововиливів, збільшення стромальної складової). За кількісного аналізу структурно-функціональних елементів встановлено відсутність статистично значущих відмінностей кількості примордіальних фолікулів (резерву фолікулогенезу), зростаючих фолікулів та атрезії фолікулів у самок, які одержували «Долосан Форте®» в обох дозах порівняно з даними груп ІК та НК (табл. 1). Кількість жовтих тіл достовірно збільшувалась у самок обох груп. Однак ці зміни відбувалися на тлі збільшення кількості примордіальних фолікулів (хоча й статистично недостовірного) та тенденційного зменшення атретичних фолікулів, тобто, імовірно, що більша кількість фолікулів досягала стадії овуляції з наступним утворенням жовтих тіл. Крім того, морфометрична оцінка серединних зрізів яєчників передбачає підрахунок як цойно утворених, так і раніше сформованих жовтих тіл, – фолікулів декількох останніх естральних циклів. Отже, можна вважати, що «Долосан Форте®» у

досліджених дозах не створював умов пригнічення дозрівання фолікулів. Ці дані збігаються з результатами токсикологічних досліджень класичного НПЗЗ індометацину [25], який не спричиняв грубих зсувів репродуктивної функції в щурів. Однак у цитованій роботі спостерігали виникнення лютеїнізованих кист, що асоціюють з відомим ефектом НПЗЗ – пригніченням апікального вивільнення фолікулів [20], у цьому разі також вказують на складність інтерпретації даних (диференціації лютеїнізованих кист та кистоподібних жовтих тіл, утворених за фізіологічної овуляції). Отже, отримані результати узгоджуються з наявними даними щодо репродуктивної токсичності НПЗЗ та непрямо підтверджують відсутність її різкого зростання за поєднання зирило-ну зі спазмолітиками.

Досліди на самцях щурів показали відсутність впливу ДП в обох дозах на МК та об'єм сім'яників, МК сім'яних пухирців, додатків сім'яників та передміхурової залози, а також на

Таблиця 1

Склад структурно-функціональних елементів яєчників самок щурів, яким уводили таблетки «Долосан Форте®», (n = 5), Ме (LQ;UQ)

Показник	Експериментальна група				p
	Інтактний контроль	Нега- тивний контроль	Таблетки «Долосан Форте®»		
			2,3 мг/кг	23,0 мг/кг	
Примордіальні фолікули	620 (580; 640)	690 (690; 720)	750 (690; 760)	720 (680; 760)	p = 0,4893
Фолікули з 2 та більше шарами гранульозних клітин	75 (70; 75)	70 (60; 75)	70 (60; 70)	70 (60; 75)	p = 0,7040
Порожнинні фолікули	5 (5; 5)	5 (0; 10)	5 (0; 5)	0 (0; 5)	p = 0,5048
Атретичні фолікули	1115 (1055; 1215)	925 (860; 1190)	1025 (985; 1060)	850 (800; 950)	p = 0,2090
Жовті тіла	14 (8; 15)	12 (10; 12)	18 (15; 18) p1 = 0,0954 p2 = 0,0952	18 (16; 21) p1 = 0,0317 p2 = 0,0159	p = 0,0322
Сумарна кількість фолікулів	1845 (1740; 1929)	1687 (1637; 1985)	1831 (1813; 1878)	1636 (1570; 1666)	p = 0,4059

Примітка. p – рівень статистичної значущості в разі порівняння вибірок за допомогою критерію Крускала-Уолліса, p1 та p2 – статистично значущі відмінності відносно групи інтактного (1) та негативного (2) контролю відповідно (за критерієм Манна-Уїтні), n – кількість тварин у групі.

показники спермограми. Гістоструктура сім'яників у тварин усіх груп відповідала нормі, відмічено нормальну структуру, кількість та розташування клітин Сертолі та Лейдига. У сім'яних каналцях самців груп ІК та НК, самців, які отримували «Долосан Форте®» у дозі 2,3 мг/кг і в більшості самців, які отримували препарат у дозі 23,0 мг/кг, спостерігали 3–4 генерації сперматогенних клітин на різних стадіях розвитку. Морфометричні показники сперматогенезу щурів, що одержували ДП у меншій дозі, були на рівні показників групи ІК, а в щурів, яким «Долосан Форте®» вводили в дозі 23,0 мг/кг, у 37,5 % випадків на тлі масиву неушкоджених сім'яних каналців виявлені нечисленні каналці з редукцією рядів статевих клітин або повним спустошенням сперматогенного епітелію, внаслідок чого тенденційно зменшувався індекс сперматогенезу. Отже, «Долосан Форте®» в умовнотерапевтичній дозі не чинить гонадотоксичної дії в самців щурів, але вона можлива за збільшення дози. Комбінація зирилоу зі спазмолітиками не спричиняє різкого зростання репродуктивної токсичності в самців.

Результати вивчення імунотоксичної дії «Долосану Форте®». Як видно з даних таблиці 2, ДП у дозі 5 мг/кг (але не 50 мг/кг) помірно активує гуморальні реакції на тимусзалежний антиген, достовірно збільшуючи титр ГА у сироватці крові імунізованих тварин порів-

няно з імунізованим контролем. Кількість АУК під впливом ДП в обох дозах не змінювалася.

Водночас ДП в обох дозах (5 та 50 мг/кг) не впливав на розвиток реакції ГПТ: у всіх групах імунізованих мишей введення завершальної дози антигена (ЕБ) призводило до локального набряку, без достовірних міжгрупових відмінностей його виразності. Оскільки інфільтрація тканин клітинними елементами та локальний набряк у тесті ГПТ опосередковані звільненням медіаторів з лімфоцитів-ефекторів, можна стверджувати, що «Долосан Форте®» у досліджених дозах не сенсibilізує ці клітини.

Результати дослідження алергізувальних властивостей «Долосану Форте®». Інтегральним показником у тесті АША є площа забарвленої плями, яка визначається реакцією каплярів на місці введення антигена (ДП) [12]. Виходячи з відсутності збільшення площі плями відносно показника ІК, ДП не спричиняв реакцію активної шкірної анафілаксії в мурчаків, сенсibilізованих дозами 2,1 і 21,0 мг/кг.

Внутрішньошлункове введення «Долосану Форте®» не призводило до посилення дегрануляції мастоцитів, що свідчить про відсутність утворення гомоцитотропних антитіл (IgE) під впливом препарату.

У тесті «Кон'юнктивальна проба» ДП також не чинив сенсibilізувальної

Таблиця 2

Кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці та титрів гемаглютинінів у сироватці крові імунізованих мишей за впливу таблеток «Долосан Форте®»

Група тварин	Доза, мг/кг	Кількість антитілоутворюючих клітин на селезінку		Титри гемаглютинінів, Log ₂	
		n	M ± m	n	Me (LQ; UQ)
Імунізований контроль (Еритроцити барана)	–	9	12260 ± 1599	10	12 (9; 13)
Еритроцити барана + таблетки «Долосан Форте®»	5	10	13030 ± 1815 p1 = 0,7984	10	13 (13; 15) p1 = 0,0379 [#]
Еритроцити барана + таблетки «Долосан Форте®»	50	9	10460 ± 1950 p1 = 0,3823	10	10 (7; 12) p1 = 0,4418 [#]
P		24	0,5298	10	0,0208 [#]

Примітка. p – рівень статистичної значущості в разі порівняння вибірок за допомогою дисперсійного аналізу ANOVA або критерію Крускала-Уолліса ([#]), p1 – рівень статистичної значущості за порівняння з групою імунізованого контролю, критерій Ньюмена-Кейлса або Манна-Уїтні ([#]); n – кількість тварин у кожній групі.

дії, оскільки в усіх кролів спостерігали відсутність ознак алергічної запальної реакції слизової оболонки ока.

Результати дослідження впливу «Долосану Форте®» на секреторну активність шлунка. Виходячи з фармакологічних властивостей інгібіторів ЦОГ-1, загальновідомим своєю гастро-токсичністю [19], принципово важливо оцінити вираженість цієї побічної дії. Виявилося, що в умовнотерапевтичній дозі «Долосан Форте®» не посилює ураження слизової оболонки шлунка: гіперемію, геморагії та набряк спостерігали як у групі НК, так і в групах тварин, які одержували ДП та референс-препарат «Спазмалгон®», достовірних міжгрупових відмінностей інтенсивності ураження не виявлено, як і змін секреторної функції шлунка – за показниками об'єму шлункового соку та його кислотності. Ці дані узгоджуються з результатами попередніх досліджень хронічної токсичності ДП [26], згідно з якими не виявлено змін гістоструктури ШКТ, ознак подразнювальної дії на слизову оболонку стравоходу та шлунка.

Крім того, результати досліджень хронічної токсичності «Долосану Форте®» [26] вказують на відсутність у препарату вираженої здатності до кумуляції. Оскільки визначення коефіцієнта кумуляції утруднено для малотоксичних речовин, здатність до кумуляції оцінювали за впливом препарату за 30-денного введення на фізіологічні, біохімічні, гістологічні показники. Суттєві зсуви останніх відсутні.

Отже, доклінічні дослідження таблеток «Долосан Форте®» підтверджують їхню безпечність в умовнотерапевтичних дозах. При цьому ефективні дози «Долосан Форте®» у 10 разів нижчі, ніж у референс-препарату «Спазмалгон®» [5], що підтверджує перспективність цього лікарського препарату з вираженими анальгетичними, спазмолітичними

та протизапальними властивостями.

Висновки

1. Аналіз хромосомних аберацій клітин кісткового мозку мишей показав, що оригінальний спазмоаналгетик «Долосан Форте®» не чинить мутагенної дії в умовнотерапевтичній дозі 5 мг/кг (5-разове введення). На тлі 10- та 100-разового підвищення дози зростає кількість поодиноких та парних фрагментів (частота хромосомних пошкоджень лише на 1 % перевищує рівень їхньої допустимої спонтанної частоти (1,0–2,5 %), повністю відсутні клітини з множинними абераціями).
2. За 60-денного введення щурам «Долосан Форте®» (2,3 та 23,0 мг/кг) не чинить токсичний вплив на гонади самців, у самок після 15-денного введення в цих дозах дещо збільшується кількість жовтих тіл за збереження інших показників функції яєчників, а також тривалості естрального циклу, складу вагінального епітелію.
3. «Долосан Форте®» у дозах 5 і 50 мг/кг не впливає на перебіг реакції гіперчутливості сповільненого типу, не змінює кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці імунізованих мишей. У дозі 5 мг/кг (але не 50 мг/кг) він помірно збільшує титр гемоглобінів у сироватці крові імунізованих мишей.
4. «Долосан Форте®» не провокує алергічні реакції негайного та повільного типу в тесті «Активна шкірна анафілаксія» у мурчаків (у дозах 2,1 і 21,0 мг/кг), «Кон'юнктивальна проба» у кролів (у дозах 1 і 10 мг/кг), не посилює дегрануляцію мастоцитів у щурів (у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг).
5. За одноразового введення щурам в умовнотерапевтичній дозі 2,3 мг/кг «Долосан Форте®» не чинить суттєво-

го впливу на стан слизової оболонки та секреторну функцію шлунка.

1. Turk D. C. Treatment of chronic non-cancer pain / D. C. Turk, H. D. Wilson, A. Cahana // Lancet. – 2011. – V. 377. – P. 2226.
2. Hand-book of pain assessment; Eds D. Turk, R. Melzack. – 3-rd edn. – New York : Guilford Press. – P. 542.
3. Hedenmalm K. Agranulocytosis and other blood dyscrasias associated with dipyrone (metamizole) / K. Hedenmalm, O. Spigset // Eur. J. Clin. Pharmacol. – 2002. – V. 58, № 4. – P. 265–274.

4. Яковлева Л. В. Порівняльна характеристика фармакологічної дії в ряді похідних бензойної кислоти / Л. В. Яковлева, О. М. Шаповал, Є. Я. Левітін // Вісник фармації. – 2001. – № 3 (27). – С. 172–173.
5. Експериментальне вивчення анальгетичної, протизапальної та спазмолітичної активності таблеток «Долосан Форте» / С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, Є. О. Ковальова, Ю. Ю. Штриголь // Фармаком. – 2016. – № 2. – С. 50–54.
6. Modulatory effect of diclofenac on antispasmodic effect of pitofenone in cholinergic spasm / S. K. Kul-karni, C. S. Patil, N. K. Jain, A. Singh // Indian J. Exp. Biol. – 2004. – V. 42, № 6. – P. 567–569.
7. Golhar K. B. Open labelled evaluation of injection Manyana (a combination of diclofenac + pitofenone + fempiverinium) in ureteric, biliary and intestinal spasm – a preliminary report / K. B. Golhar, R. L. Gupta // J. Indian Med. Assoc. – 1999. – V. 97, № 9. – P. 398–400.
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів; за ред. чл.-кор. АМН України О. В. Стефанова. – Київ : ВД «Авіцена», 2001. – 528 с.
9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ; под общ. ред. чл.-кор. РАМН, проф. Р. У. Хабриева – Москва : ОАО «Изд-во «Медицина», 2005. – 832 с.
10. Вивчення гонадотоксичної дії нових лікарських засобів та їх впливу на репродуктивну функцію тварин (метод. рекомендації). – Київ, 2000. – 24 с.
11. Ierne K. N. Plaque formation by single antibody-producing cells / K. N. Ierne, A. A. Nordin // Science. – 1963. – V. 140. – P. 405–406.
12. Доклінічне вивчення сенсibiliзуючої дії лікарських засобів (методичні рекомендації). – Київ, 2002. – 27 с.
13. Иммунологические методы; под ред. Х. Фримеля. – Москва : Мед., 1987. – 472 с.
14. Kitamura K. A. Foodpad weigh assay method to evaluate delayed-type hypersensitivity in the mouse / K. A. Kitamura // J. Immunol. Methods. – 1980. – V. 39. – P. 277–283.
15. Андреева Н. И. Некоторые показатели влияния пирозидола на желудочно-кишечный тракт / Н. И. Андреева, С. А. Шарова // Фармакол. и токсикол. – 1978. – № 4. – С. 428–432.
16. Marrazzi-Uberti E. The experimental gastric ulcer from histamine in guinea pigs. Rept. II. Methodology for biologically controlling the antiulcer activity of drugs / E. Marrazzi-Uberti, C. Turda // Med. Expt. – 1961. – V. 7, № 1. – P. 9–14.
17. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств. Метод. рекомендации. – Москва, 1998. – 30 с.
18. Mutagenicity test data of existing chemical substances based on the toxicity investigation system of the industrial safety and health law / Japan Chemical Industry Ecology-Toxicology And Information Center. – 2008. – Suppl. 4. [Електронний ресурс]. – Режим доступу: <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~YQGQuY:4>
19. Побочное действие лекарств / С. М. Дрогатов, А. П. Гудзенко, Я. А. Бутко [и др.] – Харьков : СИМ, 2010. – 480 с.
20. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and ovulation: lessons from morphology / M. Gay-tán, C. Morales, C. Bellido [et al.] // Histol. Histopathol. – 2006. – V. 21, № 5. – P. 541–556.
21. Teratogenic mechanisms of medical drugs / M. M. van Gelder, I. A. van Rooij, R. K. Miller [et al.] // Hum. Reprod. Upd. – 2010. – V. 16, № 4. – P. 378–394.
22. Prediction of fetal ductus arteriosus constriction by systemic and local dermatological formulations of NSAIDs based on PK/PD analysis / S. Tanaka, S. Hori, H. Satoh, Y. Sawada // Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. – 2016. – V. 54, № 10. – P. 782–794.
23. Use of nonaspirin nonsteroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and the risk of spontaneous abortion / H. R. Nakhai-Pour, P. Broy, O. Sheehy, A. Bérard // CMAJ – 2011. – V. 183, № 15. – P. 1713–1720.
24. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs in pregnancy: impact on the fetus and newborn / R. Antonucci, M. Zaffanello, E. Puxeddu [et al.] // Curr. Drug Metab. – 2012. – V. 13, № 4. – P. 474–490.
25. Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 12. Effects of 2- or 4-week repeated dose studies and fertility study of indomethacin in female rats / K. Tsubota, K. Kushima, K. Yamauchi [et al.] // J. Toxicol. Sci. – 2009. – V. 34, Suppl. 1. – P. SP129–SP136.
26. Трутаєв С. І. Результати визначення хронічної токсичності таблеток «Долосан Форте®» / С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, Ю. Б. Лар'яновська // Фармацевтичний часопис. – 2017. – № 1. – С. 54–61.

С. І. Трутаєв, С. Ю. Штриголь, О. Ю. Кошова, І. О. Лебединець

Результати дослідження специфічної токсичності таблеток «Долосан форте®»

Досліджено специфічну токсичність таблеток «Долосан Форте®», розроблених ПАТ «Червона Зірка», які містять зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієву сіль), пітофенону гідрохлорид, фенпіверинію бромід.

Встановлено, що цей препарат в умовно-терапевтичній дозі для мишей 5 мг/кг не збільшує частоту хромосомних аберацій у клітинах кісткового мозку, за 10- та 100-разового підвищення дози помірно зростає загальна кількість метафаз із абераціями (за рахунок збільшення кількості поодиноких та парних фрагментів за повної відсутності клітин з множинними абераціями). «Долосан Форте®» (в умовно-

терапевтичній дозі для щурів 2,3 мг/кг та в дозі 23,0 мг/кг) не чинить токсичний вплив на гонади самців, у самок дещо збільшується кількість жовтих тіл за збереження інших показників функції яєчників, тривалості естрального циклу, складу вагінального епітелію. В імунізованих мишей препарат (5 і 50 мг/кг) не впливає на перебіг реакції гіперчутливості сповільненого типу, не змінює кількість антитілоутворюючих клітин у селезінці, але помірно підвищує титр гемаглютининів у сироватці крові (у дозі 5 мг/кг, але не 50 мг/кг). «Долосан Форте®» не провокує алергічні реакції негайного та повільного типу в тестах «Активна шкірна анафілаксія» (в умовнотерапевтичній дозі для мурчаків 2,1 мг/кг та дозі 21,0 мг/кг) і «Кон'юнктивальна проба» (в умовнотерапевтичній дозі для кролів 1 мг/кг та дозі 10 мг/кг), не посилює дегрануляцію мастоцитів у щурів (у дозах 2,3 та 23,0 мг/кг). «Долосан Форте®» (2,3 мг/кг одноразово) не впливає на стан слизової оболонки шлунка щурів та його секреторну функцію.

Ключові слова: специфічна токсичність, зирилон (2,4-дихлорбензойної кислоти калієва сіль), пітофенону гідрохлорид, фенпіверинію бромід, комбінований лікарський препарат

С. И. Трутаев, С. Ю. Штрыголь, Е. Ю. Кошечая, И. А. Лебединец

Результаты исследования специфической токсичности таблеток «Долосан форте®»

Изучена специфическая токсичность таблеток «Долосан Форте®», разработанных ПАО «Красная Звезда», содержащих зирилон (2,4-дихлорбензойной кислоты калиевая соль), питофенону гидрохлорид, фенпивериния бромид.

Установлено, что этот препарат в условнотерапевтической дозе для мышей 5 мг/кг не увеличивает частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга, при 10- и 100-кратном повышении дозы умеренно возрастает общее количество метафаз с aberrациями (за счет увеличения числа одиночных и парных фрагментов при полном отсутствии клеток с множественными aberrациями). «Долосан Форте®» (в условнотерапевтической дозе для крыс 2,3 мг/кг и в дозе 23,0 мг/кг) не оказывает токсического влияние на гонады самцов, у самок несколько возрастает количество желтых тел при сохранении других показателей функции яичников, длительности эстрального цикла, состава вагинального эпителия. У иммунизированных мышей препарат (5 и 50 мг/кг) не влияет на течение реакции гиперчувствительности замедленного типа, не изменяет количество антителообразующих клеток в селезенке, но умеренно повышает титр гемагглютининов в сыворотке крови (в дозе 5 мг/кг, но не 50 мг/кг). «Долосан Форте®» не провоцирует аллергические реакции немедленного и замедленного типа в тестах «Активная кожная анафилаксия» (в условнотерапевтической дозе для морских свинок 2,1 мг/кг и дозе 21,0 мг/кг) и «Конъюнктивальная проба» (в условно-терапевтической дозе для кролей 1 мг/кг и дозе 10 мг/кг), не усиливает дегрануляцию мастоцитов у крыс (в дозах 2,3 и 23,0 мг/кг). «Долосан Форте®» (2,3 мг/кг однократно) не изменяет состояние слизистой оболочки желудка крыс и его секреторную функцию.

Ключевые слова: специфическая токсичность, зирилон (2,4-дихлорбензойной кислоты калиевая соль), питофенону гидрохлорид, фенпивериния бромид, комбинированный лекарственный препарат

S. I. Trutaev, S. Yu. Shtrygol', E. Y. Koshevaya, I. A. Lebedinetz

The results of the specific toxicity studies of «Dolosan Forte®» tablets

This study addressed the specific toxicity of the tablets «Dolosan Forte®» containing zirilon (2,4-dichlorobenzoic acid potassium salt), pitofenone hydrochloride, and fenpiverinium bromide, worked out by PJSC «Red Star».

It has been shown that this drug at a conventional therapeutic dose for mice 5 mg/kg does not increase the frequency of the spontaneous chromosome aberrations in bone marrow cells, when the dose is increased tenfold and hundredfold, the total number of metaphases with aberrations is moderately elevated (due to the increase in the quantity of single and paired fragments, while the cells with multitude aberrations are completely absent). «Dolosan Forte®» (at a conventional therapeutic dose for rats 2,3 mg/kg and at a dose of 23,0 mg/kg) does not exert gonadotoxic action in males, in females there is a slight elevation of the corpora lutea number, while the other markers of the ovarian function are unchanged, as well as estrous cycle length and vaginal epithelium structure. The drug (5 and 50 mg/kg) does not influence on the course of the reactions of the immediate and delayed hypersensitivity, does not change the quantity of antibody-producing cells in the spleen, still moderately increases titre of hemagglutinins in blood serum (at a dose of 5 mg/kg, but not 50 mg/kg). «Dolosan Forte®» does not provoke the immediate- and delayed-type allergic reactions in the tests «Active skin anaphylaxis» (at a conventional therapeutic dose for guinea pigs 2,1 mg/kg and at a dose of 21,0 mg/kg) and «Conjunctive test» (at a conventional therapeutic dose for rabbits 1 mg/kg and at a dose of 10 mg/kg), it does not enhance mast cells degranulation in rats (at doses of 2,3 and 23,0 mg/kg). «Dolosan Forte®» (2,3 mg/kg at a single administration) does not influence on the state of the gastric mucosa and the secretion function of the stomach.

Key words: specific toxicity, zirilon (2,4-dichlorobenzoic acid potassium salt), pitofenone hydrochloride, fenpiverinium bromide, combined drugs

Надійшла: 5 вересня 2017 р.

Контактна особа: Штрыголь Сергій Юрійович, доктор медичних наук, професор, кафедра фармакології, Національний фармацевтичний університет, буд. 53, вул. Пушкінська, м. Харків, 61002. Тел.: + 38 0 57 706 30 69. Електронна пошта: shtrygol@mail.ru