

УДК 616-005.4: 615.217.34:547.756

Н.А. ЦУБАНОВА

Національний фармацевтичний університет

ВИВЧЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ СПІРОЦИКЛІЧНОГО ПОХІДНОГО ОКСІНДОЛУ НА ЩУРАХ ЗА УМОВ ТРИВАЛОГО ВВЕДЕННЯ

Статтю присвячено токсикологічному дослідженню спіроциклічного похідного оксіндолу, за умов тривалого введення у дозах 5 мг/кг та 50 мг/кг. Досліди проведені на щурах обох статей.

З'ясовано, що досліджувана сполука не виявляє токсичного впливу на функції життєво важливих органів та систем організму дослідних тварин при тривалому застосуванні.

Ключові слова: спіроциклічне похідне оксіндолу, токсичність при тривалому введенні

ВСТУП

Найважливішою характеристикою лікарського препарату поряд з високою ефективністю є низька токсичність [5]. Саме особливості токсикологічного профілю є основою перешкодою впровадження нових лікарських засобів та обмеженням у медичному використанні вже зареєстрованих препаратів [6-8].

У зв'язку з цим обов'язковою умовою на етапі доклінічних досліджень є вивчення токсичності перспективних біологічно активних речовин (БАР) за умов тривалого введення [2, 9].

Метою даної роботи було вивчення за умов тривалого введення токсикологічного профілю нової сполуки 4,3'-спіро[(2-аміно-3-ціано-4,5-дигідропірано[3,2-с]хромен-5-он)-5-метил-2-оксіндолу], у подальшому сполуки 77, що була синтезована у НФаУ к.ф.н. Редькіним Р.Г. та проф. Шемчуком Л.А. у рамках створення нової комбінаторної бібліотеки гетероциклів на основі оксіндолу.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

До початку експерименту робили рандомізовану вибірку в популяції тварин, яких набирали в дослідні групи та фіксували усереднені показники вихідного стану організму тварин. Дози для вивчення токсичності сполуки 77 за умов тривалого введення складали 5 мг/кг (ЕД₅₀) – встановлена як найбільш ефективна (за антигіпоксичною активністю) і прийнята як умовнотерапевтична; доза – 50 мг/кг (10 ЕД₅₀) припускає виявлення можливих токсичних ефектів на ор-

ганізм. Сполуку 77 дослідним тваринам вводили внутрішньошлунково у вигляді суспензії, стабілізованої твіном-80. Тривалість дослідження обумовлена вимогами ДФЦ України до вивчення нових лікарських препаратів і передбачуваних термінах застосування препарату в клініці [1, 2]. Передбачається, що сполука 77 буде застосовуватись курсами по 7-14 днів. У зв'язку з цим, термін дослідження склав 1 місяць.

Протягом усього періоду хронічного експерименту тварин було розміщено в однакових умовах віварію на повноцінному раціоні відповідно до встановлених норм [1]. Проводили спостереження за загальним станом і поведінкою тварин, їх виживанням, споживанням їжі і розвитком можливої клінічної симптоматики токсичного впливу досліджуваної сполуки.

Вибір показників для оцінки загальнотоксичної дії сполуки 77 на організм у хронічному експерименті проводили відповідно до поставленої мети: оцінити можливу ушкоджуючу дію сполуки при тривалому надходженні, а також виявити найбільш чутливі до БАР органи і системи.

Дію досліджуваної сполуки оцінювали за зміною показників периферичної крові, функціонального стану печінки і нирок, коефіцієнтів маси внутрішніх органів, стану центральної нервової системи.

По закінченню періоду досліджень тварин декапітували, внутрішні органи (печінка, нирки, серце, легені, селезінка, наднирники, сім'яники) піддавали макроскопічному дослідженню. У ході проведення біохімічних досліджень [3] використовували тест-системи фірми «Lachema»

© Н.А. Цубанова, 2012

(виробництва Чехія). Весь фактичний матеріал оброблений методами варіаційної статистики з використанням коефіцієнта Ст'юдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Тварини, що отримували сполуку 77 у дозі 5 мг/кг та 50 мг/кг за зовнішнім виглядом, поведінкою та відношенням до їжі не відрізнялися від тварин контрольних груп. У ході експерименту не було відзначено пригнічення активності й розвитку агресивності у тварин порівнюваних груп.

Для оцінки впливу сполуки 77 на функціональний стан ЦНС використовували загальноприйнятий в експериментальній токсикології інтегральний тест «відкрите поле», який дозволяє визначити ступінь впливу досліджуваної речовини на рухову, орієнтовно-дослідницьку та емоційну активності тварин (табл. 1).

Встановлено, що тривале введення сполуки 77 вірогідно збільшує рухову та дослідниць-

ку активність тварин, при цьому зареєстровано зменшення рівня тривожності, що верифіковане за зниженням кількості дефекацій та умивань.

Отриманні данні свідчать про відсутність токсичного впливу сполуки 77 у дозі 5 мг/кг та 50 мг/кг на поведінкові реакції тварин обох статей.

Для оцінки стану загальтрофічних процесів в організмі тварин у динаміці досліджували приріст маси тіла та відносну масу внутрішніх органів. Аналіз динаміки маси тіла показав, що в дослідних і контрольних групах тварин відзначений ідентичний за рівнем коливань і за темпами приріст маси. До кінця досліду маса тіла тварин усіх груп вірогідно зростала стосовно до вихідних даних, що вказує на відсутність токсичного впливу сполуки 77 на трофічні процеси (табл. 2). Результати дослідження вагових коефіцієнтів органів щурів обох статей свідчать про відсутність токсичного впливу сполуки 77 у дозах 5 та 50 мг/кг (табл. 3).

Таблиця 1

ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ЦНС ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ СПОЛУКИ 77 У ТЕСТІ ВІДКРИТОГО ПОЛЯ (N=8)

Показник	Стать	Контроль	Сполука 77	
			5 мг/кг	50 мг/кг
Кількість перетинань	Самки	29,6±0,90	35,90±2,29*	38,80±1,78*
	Самці	28,0±1,39	36,40±1,94*	37,10±2,32*
Кількість вертикальних стійок	Самки	6,25±0,45	7,37±0,80	8,00±0,57*
	Самці	5,87±0,44	8,37±0,59*	9,50±0,57*
Кількість обстежень отворів	Самки	6,62±0,49	7,75±0,79*	8,25±0,45*
	Самці	5,88±0,29	8,12±0,79*	8,62±0,75*
Грумінг	Самки	3,75±0,62	4,37±0,71	4,87±0,51
	Самці	4,37±0,68	5,00±0,59	4,75±0,59
Кількість дефекацій	Самки	2,25±0,43	0,37±0,18*	0,36±0,18*
	Самці	2,50±0,33	0,25±0,16*	0,37±0,18*
Кількість уринацій	Самки	0,50±0,26 (0÷2)	0,00±0,00	0,00±0,00
	Самці	0,50±0,19 (0÷1)	0,00±0,00	0,00±0,00

Примітка: * – різниця показників вірогідна відносно контролю (p<0,05)

Таблиця 2

ДИНАМІКА МАСИ ТІЛА ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ СПОЛУКИ 77 (N=8)

Група	Стать	Терміни дослідження		
		Вихідні данні	0,5 місяця	1 місяць
Контроль	Самки	180,00±2,31	198,10±2,82*	216,20±3,24*
	Самці	182,50±3,13	208,10±3,39*	219,40±3,05*
Сполука 77 5 мг/кг	Самки	180,00±2,83	198,20±3,89*	214,40±3,33*
	Самці	181,80±2,10	202,20±2,83*	218,70±2,79*
Сполука 77 50 мг/кг	Самки	180,80±2,30	202,50±1,64*	220,60±2,56*
	Самці	179,30±1,75	203,70±2,63*	221,80±3,77*

Примітка: * – відхилення вірогідні по відношенню до вихідних даних, p<0,05.

Для оцінки можливого токсичного впливу сполуки 77 на периферичну кров проводили повний клінічний аналіз крові, досліджуючи в динаміці такі гематологічні показники, як: час згортання, загальний гемоглобін, кількість лейкоцитів, еритроцитів, лейкоцитарна формула.

Встановлено відсутність токсичного впливу сполуки 77 на периферичну кров (табл. 4). Особливістю нової сполуки є здатність збільшувати час згортання крові, що узгоджується із отриманими раніше результатами досліджень, щодо вияв-

Таблиця 3

ДИНАМІКА ВАГОВИХ КОЕФІЦІЄНТІВ ВНУТРІШНІХ ОРГАНІВ ЩУРІВ
ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ СПОЛУКИ 77 (N=8)

Показник	Стать	Контроль	Сполука 77	
			5 мг/кг	50 мг/кг
Печінка	Самки	3,77±0,08	3,66±0,08	3,54±0,07
	Самці	3,64±0,06	3,63±0,06	3,64±0,08
Нирки	Самки	0,76±0,03	0,77±0,01	0,74±0,01
	Самці	0,75±0,01	0,78±0,02	0,79±0,01
Легені	Самки	0,91±0,04	0,90±0,03	0,85±0,02
	Самці	0,84±0,02	0,85±0,01	0,86±0,02
Наднирники	Самки	0,02±0,001	0,020±0,001	0,019±0,001
	Самці	0,019±0,001	0,020±0,001	0,019±0,001
Серце	Самки	0,43±0,02	0,41±0,02	0,43±0,01
	Самці	0,40±0,01	0,44±0,01	0,44±0,02
Селезінка	Самки	0,47±0,02	0,46±0,01	0,44±0,02
	Самці	0,42±0,04	0,45±0,01	0,48±0,03
Сім'яники	Самці	1,49±0,02	1,53±0,09	1,49±0,07

Таблиця 4

ГЕМАТОЛОГІЧНІ ПОКАЗНИКИ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ
ЗАСТОСУВАННІ СПОЛУКИ 77 (N=8)

Показник	Стать	Контроль	Сполука 77	
			5 мг/кг	50 мг/кг
Час згортання, сек.	Самки	83,20±5,46	119,00±7,01*	125,00±6,69*
	Самці	88,10±6,63	126,00 ±6,98*	131,00±5,83*
Гемоглобін, г/л	Самки	148,00±8,82	145,00±7,80	139,00±7,83
	Самці	137,00±9,58	142,00±10,20	136,00±7,67
Еритроцити, 10 ¹² /л	Самки	5,09±0,34	5,14±0,21	4,88±0,27
	Самці	4,92±0,26	4,82±0,31	4,68±0,21
Лейкоцити, 10 ⁹ /л	Самки	10,90±1,16	9,25±0,88	11,20±1,19
	Самці	9,75±1,24	10,40±0,68	10,10±1,20
Лейкоцитарна формула:				
Нейтрофіли паличкоядерні	Самки	6,87±0,64	7,75±0,75	7,75±0,59
	Самці	7,50±0,57	7,87±0,61	7,37±0,56
Нейтрофіли сегментоядерні	Самки	13,90±1,38	13,70±1,45	13,30±1,15
	Самці	12,70±1,22	13,50±1,05	12,20±0,92
Еозинофіли	Самки	3,25±0,31	2,37±0,37	2,25±0,37
	Самці	2,50±0,42	2,87±0,29	2,62±0,32
Базофіли	Самки	0,50±0,26	0,50±0,18	0,37±0,18
	Самці	0,50±0,19	0,25±0,16	0,37±0,18
Лімфоцити	Самки	72,10±1,43	71,60±1,36	71,10±0,85
	Самці	72,60±1,37	73,20±0,99	71,60±0,78
Моноцити	Самки	3,37±0,59	4,12±0,51	3,50±0,42
	Самці	3,75±0,65	3,50±0,46	4,25±0,59
Ваговий коефіцієнт селезінки	Самки	0,47±0,02	0,46±0,01	0,44±0,02
	Самці	0,42±0,04	0,45±0,01	0,48±0,03

Примітка: * – відхилення вірогідні по відношенню до контролю, P<0,01

ленної антикоагуляційної дії у деяких спіроциклічних похідних оксіндолу [4].

Вивчення гепатотоксичності при тривалому пероральному застосуванні сполуки 77 здійснювали з використанням набору функціональних тестів, що дозволяють судити, у першу чергу, про стан білковоутворювальної здатності печінки (показник загальний білок), а також окремих сторін ферментосинтетичної функції (АлАТ, АсАТ). Для визначення стану монооксигеназної системи печінки використовували медикаментозний сон, зміна тривалості якого вказує на зміну активності мікосомальних оксигеназ.

Встановлено, що тривале введення сполуки 77 не виявляє гепатотоксичного ефекту, всі досліджувані показники відображають варіабельність норми і знаходяться в межах фізіологічних коливань (табл. 5). Результати досліджень по-

казників ліпідного обміну вказують на відсутність токсичного впливу сполуки 77 у виучуваних дозах.

Для оцінки можливого несприятливого впливу сполуки 77 на нирки визначали діурез мл/100 г, рН сечі та показники азотвидільної функції нирок (рівень сечовини й креатиніну в крові та сечі) (табл. 6). Підтверджена діуретична активність нової сполуки, яка супроводжується алкалізацією сечі, що було встановлено у попередніх дослідженнях. Необхідно відзначити тенденцію до посилення азотовидільної функції нирок на тлі введення сполуки 77, що характеризується збільшенням вмісту креатиніну та сечовини у сечі та зменшенням у сироватці крові. Отримані данні свідчать про відсутність токсичної дії сполуки 77 у виучуваних дозах на функціональний стан нирок.

Таблиця 5

ПОКАЗНИКИ ЛІПІДНОГО ОБМІНУ ТА ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ СПОЛУКИ 77 (N=8)

Показник	Стать	Контроль	Сполука 77	
			5 мг/кг	50 мг/кг
Загальний білок, г/л	Самки	65,90±4,73	67,90±6,11	62,10±3,94
	Самці	59,80±5,79	63,50±4,25	65,70±4,86
АсАТ, ммоль/г/л	Самки	0,65±0,05	0,63±0,02	0,66±0,02
	Самці	0,61±0,04	0,62±0,03	0,64±0,05
АлАТ, ммоль/г/л	Самки	0,62±0,05	0,60±0,03	0,67±0,05
	Самці	0,58±0,05	0,61±0,02	0,62±0,04
Медикаментозний сон, хв.	Самки	77,90±5,85	69,20±4,75	70,00±6,26
	Самці	81,10±6,12	67,70±5,94	71,40±5,96
Холестерин, ммоль/л	Самки	1,62±0,14	1,59±0,11	1,56±0,12
	Самці	1,85±0,13	1,80±0,12	1,78±0,16
Загальні ліпіди, г/л	Самки	2,60±0,10	2,54±0,08	2,64±0,12
	Самці	2,48±0,12	2,39±0,11	2,45±0,12

Таблиця 6

ПОКАЗНИКИ ФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ НИРОК ЩУРІВ ПРИ ТРИВАЛОМУ ЗАСТОСУВАННІ СПОЛУКИ 77 (N=8)

Показник	Стать	Контроль	Сполука 77	
			5 мг/кг	50 мг/кг
Діурез, мл/100г массы	Самки	2,31±0,11	3,34±0,19*	3,40±0,22*
	Самці	2,24±0,13	3,69±0,19*	3,74±0,32*
рН сечі	Самки	7,02±0,24	7,71±0,13*	7,80±0,13*
	Самці	6,92±0,21	7,70±0,20*	7,75±0,15*
Сечовина сечі, ммоль/л	Самки	31,70±1,87	36,6±2,67	35,70±3,09
	Самці	30,60±2,65	34,6±1,94	36,00±2,19
Креатинін у сечі, ммоль/л	Самки	5,76±0,40	6,40±0,41	6,27±0,39
	Самці	5,69±0,42	6,36±0,37	6,47±0,38
Креатинін у сироватці, ммоль/л	Самки	0,214±0,012	0,181±0,021	0,188±0,016
	Самці	0,227±0,017	0,205±0,027	0,192±0,021

Примітка * – різниця показників вірогідна відносно контролю (p<0,05)

ВИСНОВКИ

Встановлена позитивна дія сполуки 77 на показники ЦНС, збільшення часу згортання крові та діуретична активність, що обумовлено специфікою дії нової речовини.

Відсутність токсичного впливу сполуки 77 у дозах 5 мг/кг (ЕД₅₀) та 50 мг/кг (10 ЕД₅₀) при тривалому застосуванні на функції життєво важливих органів та систем організму дослідних тварин поряд із встановленою раніше антигіпоксичною, церебропротекторною, нефропротекторною та іншими видами специфічної активності є підставою для проведення поглиблених доклінічних досліджень з метою створення нового лікарського препарату органопротекторної дії.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ ІНФОРМАЦІЇ

1. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Метод. рекомендації за редакцією О.В. Стефанова – К.: Авіцена. – 2001. – 528 с.
2. Наказ МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. «Порядок проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів»
3. Клінічна біохімія/[Д.П. Бойків, Т.І. Бондарчук, О.Л. Іванкув та ін.]; за ред. О.Я. Скляр-ова. – К.: Медицина. – 2006. – 432 с.

Синтез 4,3'-спіро-[(2-аміно-4,5-дигідропірано [3,2-с]хромен-5-он)-2'-оксіндолів] та їх антикоагулянтна активність / [Р.Г. Редькін, Л.А. Шемчук, В.П. Черних та ін.]// Журнал орган. та фарм. хім. – 2008. – Т.6, вип. 2 (22). – С.24-29.

4. Eligibility criteria of randomized controlled trials published in high-impact general medical journals: a systematic sampling review/Van Spall H.G., Toren A., Kiss A., Fowler R.A.// JAMA. – 2007. – № 297 (11). – P. 1233 – 40.
5. Ethical and Scientific Issues in Studying the Safety of Approved Drugs/[Committee on Ethical and Scientific Issues in Studying the Safety of Approved Drugs; Board of Population Health and Public Health Practice; Institute of Medicine] // Washington: The National Academies Press. – 2012. – 276 p.
6. Helene S. EU Compassionate Use Programmes (CUPs): Regulatory Framework and Points to Consider before CUP Implementation// Pharm Med. – 2010. – № 24 (4). – P. 223-229.
7. Liu J.J. Achieving Ethnic Diversity in Trial Recruitment/ J.J. Liu, E. Davidson, A. Sheikh // Pharm Med. – 2011. – № 25 (4). – P. 215-222.
8. Phase 0 trials: a platform for drug development. // Lancet. – 2009. – № 374 (9685). – P. 176.

УДК 616-005.4: 615.217.34:547.756

Н.А. Цубанова

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ СПИРОЦИКЛИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДНОГО ОКСИНДОЛА НА КРЫСАХ ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

Статья посвящена токсикологическому изучению спироциклического производного оксиндола при длительном введении в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг. Опыты проведены на крысах самцах и самках. Установлено, что изучаемое соединение не проявляет токсического действия на функции жизненно-важных органов и систем организма опытных животных при длительном введении.

Ключевые слова: спироциклическое производное оксиндола, токсичность при длительном введении

UDK 616-005.4: 615.217.34:547.756

N.A. Tsubanova

THE INVESTIGATION TOXICAL PROPERTIES OF SPIROCICLIC OXINDOLIC DERIVATIVE AT THE PROTRACTED INTRODUCTION

The article describes the toxicological study of spirocyclic oxindolic derivative at the protracted introduction in doses 5 mgs/kg and 50 mgs/kg. Experiments are conducted on rats males and females. It is established that the studied connection does not show the toxic operating on the function of vitals and systems of the organism experimental animals at the protracted introduction.

Key words: spirocyclic oxindolic derivative, toxicity at the protracted introduction.

Адреса для листування:
61099, м. Харків, вул. Рибалко, 23, кв. 60.
Тел. моб. (057) 700-36-34.
E-mail: tsubanova@ramdler.ru

Надійшла до редакції:
15.09.2012