

**ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ НОВОГО НООТРОПНОГО ПРЕПАРАТА НА
ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНОГО ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ**

Болотова В.Ц.¹, Ивкин Д.Ю.¹, Шустов Е.Б.², Оковитый С.В.¹

¹*ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический
университет» Минздрава России,*

197376, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, лит. А,

Тел. (812)-499-39-00; E-mail: vera.bolotova@pharminnotech.com

²*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт токсикологии*

Федерального медико-биологического агентства»,

192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д. 1,

Тел./факс (812)-365-06-80; E-mail: shustov-msk@mail.ru

Резюме. Проведены исследования по оценке безопасности производного фумарового эфира этаноламина (ФДЭС) при однократном введении различных его доз грызунам. Средние летальные дозы (ЛД₅₀) испытуемой фармацевтической субстанции (ФС) у мышей составили при внутривенном введении 2070±220 мг/кг (самцы) и 1990±250 мг/кг (самки), а при подкожном – 2550±430 мг/кг (самцы) и 2550±240 мг/кг (самки). При однократном пероральном введении ФДЭС в дозах 300 мг/кг и 2000 мг/кг гибели мышей и крыс обоего пола не наблюдали. Кроме того, ФДЭС при однократном внутрижелудочном введении в дозах, превышающих терапевтическую, не вызывал раздражения слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки. ФДЭС, вещество с выраженной ноотропной активностью, является безопасным веществом.

Ключевые слова: безопасность, крысы, мыши, производное фумарового эфира этаноламина, средняя летальная доза, янтарнокислая соль,

**SAFETY STUDY OF A NEW NOOTROPIC DRUG BASED ON A FUMARIC ACID
DERIVATIVE**

Bolotova V.C.¹, Ivkin D. Yu.¹, Shustov E.B.², Okovity S.V.¹

¹*Saint- Petersburg state chemical and pharmaceutical University of the Ministry of health of
Russia, 197376, St. Petersburg*

²*Institute of Toxicology of Federal Medico-Biological Agency, 192019, St. Petersburg*

Abstract. Studies have been conducted to assess the safety of the derivative of the fumaric ethanolamine ester (EFD) with a single administration of its various doses to rodents. The average lethal doses (LD₅₀) of the tested pharmaceutical substance in mice were 2070 ± 220

mg / kg (males) and 1990 ± 250 mg / kg (females) when administered intravenously, and 2550 ± 430 mg / kg (males) and 2550 ± 240 mg / kg (females) after subcutaneous administration. With a single oral administration of EFD at doses of 300 mg / kg and 2000 mg / kg, the death of mice and rats of both sexes was not observed. In addition, EFD with a single intragastric administration in doses exceeding the therapeutic does not cause irritation of the mucous membrane of the stomach and duodenum. EFD, a substance with pronounced nootropic activity, is a safe substance.

Key words: average lethal dose, ethanolamine fumarate derivative, mice, rats, safety, succinic salt.

Введение. Ноотропные препараты широко применяются в медицинской практике для профилактики и лечения различных заболеваний головного мозга. На кафедре органической химии в СПХФУ синтезировано соединение из ряда производных фумаровой кислоты – янтарнокислая соль фумарового эфира диэтилэтаноламина (ФДЭС), химическая структура которого близка к естественным метаболитам головного мозга. В серии экспериментов по изучению специфической активности ФДЭС было установлено, что данное вещество обладает выраженной антигипоксической [1] и нейротропной активностью [2].

Цель. Изучение безопасности однократного введения янтарнокислой соли фумарового эфира диэтилэтиламина (ФДЭС) у белых беспородных мышей и крыс обоего пола.

Материалы, методы

Исследования проведены на 64 (32 самца и 32 самки) белых лабораторных мышей массой тела 18-22 г (острая токсичность) и 24 (12 самцов и 12 самок) крыс массой тела 200-250 г (оценка острой токсичности, класса токсичности и местно-раздражающего действия) в соответствии приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики», согласно утвержденному письменному протоколу. Животные были получены из питомника «Рапполово» (Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде. Группы животных формировали методом рандомизации. Период карантина и акклиматизации длился 7 дней. План эксперимента одобрен этической комиссией СПХФУ, все связанные с гуманным обращением с животными процедуры соблюдены.

Экспериментальные исследования проводилось с целью определения LD50 ФДЭС при однократном внутривенном и подкожном введении в различных экспериментальных дозах самцам и самкам лабораторных мышей и определения класса токсичности испытуемой ФС при однократном внутрижелудочном введении самцам и самкам лабораторных аутбредных крыс.

Исследования острой токсичности веществ при внутривенном, подкожном и внутрижелудочном введении, проведены в соответствии со стандартом [3] и руководством по проведению доклинических исследований [4] и включало определение LD50 ФДЭС при однократном внутривенном и подкожном введении в различных экспериментальных дозах самцам и самкам лабораторных мышей и определения класса токсичности испытуемой ФС при однократном внутрижелудочном введении самцам и самкам лабораторных аутбредных крыс.

Определение LD50 нового вещества осуществляли с использованием экспресс-метода Прозоровского [5]. ФДЭС вводили в дозах 1260 мг/кг, 1580 мг/кг, 2000 мг/кг и 2500 мг/кг (внутривенное введение у мышей), 1580 мг/кг, 2000 мг/кг, 2500 мг/кг и 3160 мг/кг (подкожное введение у мышей) при испытании 4 соседних доз воздействия по 4 наблюдения. Нахождение дозы и ее ошибки проводилось по таблицам и не требовало расчетов. Сразу после гибели мышей или вывода последних из эксперимента проводили вскрытие с последующим визуальным определением размеров, окраски, взаимного расположения органов и других признаков, которые могли указывать на токсическое воздействие исследуемого вещества. В течение эксперимента осуществляли регистрацию и подсчет погибших животных в каждом из уровней доз.

Оценка класса токсичности при пероральном введении ФДЭС была изучена по методике ОЭСР Тест № 423 [6]. В качестве тест-системы для проведения исследования использовались лабораторные аутбредные крысы самцы и самки. В течение 12 ч, перед введением исследуемого вещества, животных содержали без корма со свободным доступом к воде. В день введения утром крысы обоего пола были взвешены, ФДЭС вводили однократно перорально в дозах 300 мг/кг и 2000 мг/кг. Крысы контрольной группы получали 0,9% NaCl в эквивалентных количествах. В течение 14 суток осуществляли ежедневное наблюдение за состоянием животных, особенностями поведения, положением тела и двигательной активностью, потреблением корма и воды. Регистрировали сроки развития и характер симптомов интоксикации, случаи смерти. Массу животных определяли перед введением веществ и на 3-и, 7-е и 14-е (перед эвтаназией) сутки наблюдения. На 15 сутки после вывода животных из эксперимента проводили их вскрытие с последующим визуальным определением размеров, окраски,

взаимного расположения органов. На лабораторных весах BM24001 взвешивали внутренние органы (тимус, сердце, поджелудочную железу, печень, селезенку, лёгкие, почки, надпочечники, семенники и простату (яичники)) и рассчитывали их среднюю абсолютную ($M \pm m$) и относительную массы (O_m) органов.

Критерии оценки острой токсичности - число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина интоксикации, изменения поведенческих реакций, патологические изменения во внутренних органах и тканях, выявленные при аутопсии, павших и выживших животных, умерщвлённых в конце эксперимента (макроскопическая оценка).

Местно-раздражающее действие ФС при однократном введении самцам и самкам лабораторных крыс было изучено при исследовании острой токсичности методом фиксированной дозы [7].

В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD), которые вместе со значением n (количество животных в группе) представлены в итоговых таблицах.

Межгрупповые различия анализировали непараметрическими методами для множественного сравнения – критерий Крускала-Уоллиса, с последующим применением критерия Данна, в случае необходимости. Различия определяли при 0,05 уровне значимости. Использовалось программное обеспечение «Statistica 6.1».

Результаты и их обсуждение

При внутривенном и подкожном введении ФДЭС в диапазоне доз от 2000 мг/кг до 3000 мг/кг наблюдали гибель мышей, происходившую в течение первых суток от введения вещества (табл. 1). В течение первых 6 часов наблюдения были отмечены отдельные признаки острого отравления – угнетение дыхания, бледность конечностей и ретропульсия (заторможенная походка). Отмечалось снижение реакции на взятие на руки. Все перечисленные признаки были проходящими и у выживших животных регистрируемые показатели пришли в норму, животные чувствовали себя нормально, охотно поедали корм, равномерно прибавляли в весе. При внутрижелудочным введением ФДЭС в диапазоне доз от 2000 мг/кг до 3000 мг/кг не наблюдали гибели мышей обоего пола в течение 14 дней (табл.1).

Таблица 1. Острая токсичность ФДЭС у мышей и крыс (экспресс-метод Прозоровского)

Вид животных	Путь введения	Доза LD ₁₆ , мг/кг	Доза LD ₅₀ , мг/кг	Доза LD ₈₄ , мг/кг
Мыши самцы	внутривенный	1900	2070±220	2210

Мыши самки	внутривенный	1850	1990±250	2130
Мыши самцы	подкожный	2400	2550±430	2800
Мыши самки	подкожный	2400	2550±240	2800

При внутривенном и подкожном введении по экспресс-методу Прозоровского были определены дозы LD50 испытуемой ФС, которые составили при внутривенном введении 2070±220 мг/кг для самцов и 1990±250 мг/кг для самок, а при подкожном – 2550±430 мг/кг для самцов и 2550±240 мг/кг для самок. Статистически значимых отличий в группах самцов и самок выявлено не было.

Оценка класса токсичности была проведена по методике ОЭСР Тест № 423 у крыс обоего пола [7]. ФДЭС вводили в дозах 300 мг/кг и 2000 мг/кг. Согласно методике ОЭСР Тест № 423 на каждом этапе использовалось три животных. Первым трем животным вводилась тестируемая доза 300 мг/кг. В течение 24 часов после введения все животные выжили, поэтому эта же доза была введена повторно еще трем животным. На данном этапе никто не погиб. Дозу увеличили до 2000 мг/кг и ввели её трем животным, из которых ни одно не погибло. При повторном введении данной дозы трем крысам гибели животных не было отмечено. Данные результаты были получены у крыс обоих полов.

По методике ОЭСР Тест № 423 «Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности» доза 2000 мг/кг ФДЭС не вызвала летального исхода при применении у животных обоих полов, что позволяет отнести исследуемое вещество к классу токсичности «5 класс токсичности или не классифицируется».

При внутрижелудочном введении ФДЭС (дозы 300 мг/кг и 2000 мг/кг) не вызывает изменения внешнего вида крыс. У животных величина зрачка и ширина глазной щели не менялись в течение всего периода наблюдения. Отечности или гиперемии слизистых глаз не отмечалось. Нос был умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у кого отмечено не было. Зубы у всех сохранены. Дыхание в целом было нормальным у всех экспериментальных животных. Слезотечения и нарушений слюноотделения не наблюдали.

Шерсть у всех животных опрятная, блестящая, без очагов облысения. Тонус мускулатуры у всех животных был нормальным. Видимые слизистые оболочки бледно-розовой окраски, блестящие. Деформации или отека конечностей нет. Кожа без признаков раздражения или воспаления. Молочные железы самок без уплотнений на ощупь. Половые органы самцов правильно выражены.

Все животные нормального телосложения, удовлетворительного питания. Двигательная активность была в норме. В целом поведение было стандартным. Кровотечений у животных не наблюдали, все выделения были в норме.

На протяжении 14 дневного исследования была проведена оценка динамики массы тела крыс самцов и самок. Однократное внутрижелудочное введение раствора ФДЭС (дозы 300 мг/кг и 2000 мг/кг) не оказывало статистически значимого влияния на динамику массы тела аутбредных крыс самцов и самок. Масса тела крыс самцов и самок равномерно увеличивалась в течение всего периода наблюдения. В период наблюдения животные охотно потребляли корм и воду.

Все крысы перенесли внутрижелудочное введение хорошо: процедура не сопровождалась какими-либо признаками недовольства, болезненности. На всех испытанных дозах клинические симптомы отравления животных отсутствовали. Отличий, в величинах показателей потребления корма и воды, между группами подопытных животных установлено не было.

Патоморфологическое исследование, проведенное после вывода животных из эксперимента на 15-е сутки, не выявило отклонений внешнего вида органов (печень, селезёнка, почки, надпочечники, мочевого пузыря, яичники самок и яички самцов) от нормы и различий по данному параметру между контрольной и опытными группами (критерий Стьюдента, $p < 0,05$). В ходе проведенного исследования установлено, что однократное введение ФДЭС не вызывает нарушений со стороны внутренних органов или тканей животных, которые потребовали бы более углублённого гистологического исследования, изменений показателей относительной и абсолютной массы внутренних органов и не приводит к гибели животных в течение 14 дней эксперимента.

Кроме того, изучено влияние однократного внутрижелудочного введения ФДЭС на ткани желудка (рис.1) и 12-перстной кишки (рис.2) в сравнении с контролем, которые непосредственно контактируют с исследуемым веществом.

Установлено, что слизистая оболочка безжелезистой части желудка выстлана многослойным плоским эпителием, клетки которого изменений не представляют. Покровный эпителий слизистой тела желудка образован слизистыми цилиндрическими клетками, дефектов эпителиальной выстилки нет. Главные и обкладочные клетки желез тела желудка не изменены.

Слизистая оболочка двенадцатиперстной кишки представлена ворсинками различной длины без воспалительных изменений.

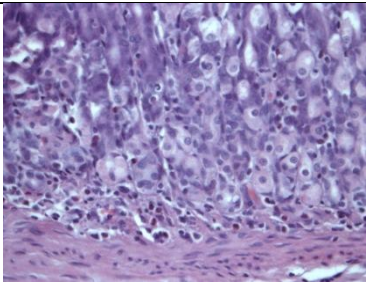
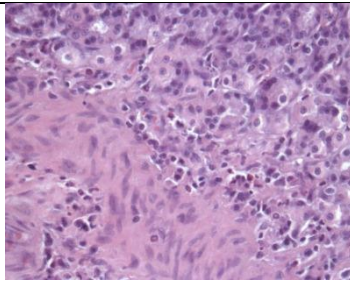
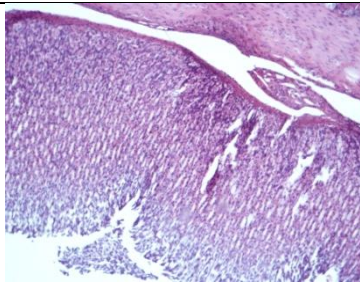
Орган/ Режим, доза	Контроль	1-кратное введение (300 мг/кг)	1-кратное введение (2000 мг/кг)
Желудок			

Рисунок 1. – Местно-раздражающее действие. Орган-мишень – желудок. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

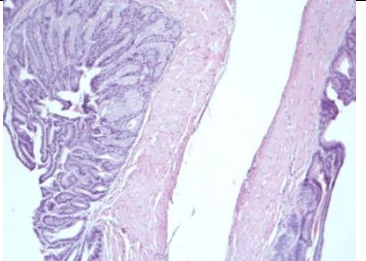
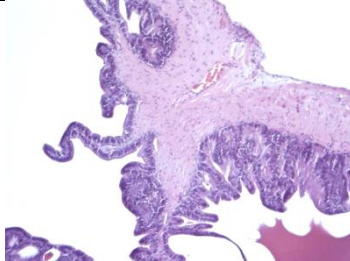
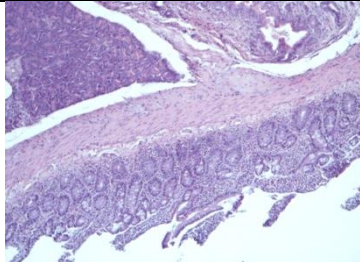
Орган/ Режим, доза	Контроль	1-кратное введение (300 мг/кг)	1-кратное введение (2000 мг/кг)
12- перстная кишка			

Рисунок 1. – Местно-раздражающее действие. Орган-мишень – 12-перстная кишка. Окраска гематоксилином и эозином, х200.

На основании проведённого исследования по изучению местно-раздражающего действия исследуемого вещества на отделы желудочно-кишечного тракта (желудок, 12-перстная кишка) крыс обоего пола показано, что при однократном внутрижелудочном введении ФДЭС (дозы 300 мг/кг и 2000 мг/кг) в дозах, превышающих терапевтическую, не раздражает слизистую желудка и двенадцатиперстной кишки.

Производные этаноламина традиционно считаются препаратами с хорошей переносимостью и высокой безопасностью [8]. В настоящем исследовании производное этаноламина ФДЭС продемонстрировало высокую безопасность при его однократном применении у грызунов [8].

Заключение. В ходе проведённого исследования установлено, что новое соединение – янтарнокислая соль фумарового эфира диэтилэтанолamina при однократном применении, не зависимо от пути введения, не оказывает токсического действия на

организм белых беспородных мышей и крыс. Также не было получено статистически значимых гендерных различий по средней летальной дозе ФДЭС.

Литература

1. Титович И. А., Болотова В. Ц. Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминоэтанола // Биомедицина. – 2016. – №. 1. – С. 77 – 83.
2. Болотова, В.Ц. Титович И.А., Шустов Е.Б. Изучение нейропротекторной активности производного фумаровой кислоты у ишемизированных крыс. // Мат. межд. конф., посвященной 60-летию фармацевтического факультета «Витебский ГОДНМУ» «Современные достижения фармацевтической науки и практики», Витебск, Республика Беларусь, 31 октября 2019 года. - С. 235-236.
3. ГОСТ Р 56700-2015 Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности. Утвержден приказом от 11 ноября 2015 года № 1761 - ст. 2015. - 18 с.
4. Руководство по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов. Евразийская экономическая коллегия. 2019 (2020). - 36 с.
5. Прозоровский В.Б., Прозоровская М.П., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и её ошибки // Фармакол. и токсикол. – 1978. – №4. – С. 497-502.
6. Organization for Economic Co-operation and Development OECD guideline for testing of chemicals. Guideline 423: Acute oral toxicity – Acute toxic class method, Paris: Organization for Economic Co-operation and Development. 2001. 14 p.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
8. Karen, E., Haneke M.S. Dimethylethanolamine (DMAE)[108-01-0] and Selected Salts and Esters: Review of Toxicological Literature (Update). Report on National Institute of Environmental Health Sciences Contract №. N01-ES-65402, 2002 [Electronic resource]. National Toxicology Program, 2018 Access mode: https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_back-ground/exsumpdf/dmct_508.pdf (circulation date: 15.06.2017).