

2.2 Визначення гострої токсичності габальгіну за внутрішньочеревного введення у мишей

У 21 столітті стає все важче впроваджувати нові синтетичні сполуки в медичну практику. Хвороби, від яких шукають ліки або принаймні задля їх лікування, є складними, оскільки мають значну кількість потенційних дефектів у структурі, функції або регуляторних процесів відповідних клітин. Успіх розробки ліків для лікування таких захворювань залежить від міждисциплінарного та спільного підходу, а також від вчених і клініцистів, які спілкуються та працюють разом. Традиційно ліки розробляли з метою націлювання на одну біологічну мішень, зазвичай білок, з високою вибірковістю, щоб уникнути будь-яких побічних ефектів. На цій підставі концепція лікарських засобів, що взаємодіють з кількома мішенями, протягом тривалого часу вважалася небажаною. Проте складність сучасних невиліковних патологій чітко продемонструвала, що такі одноцільові препарати недостатні для досягнення терапевтичного ефекту [137]. Окрім того, молекули, які вражають більше ніж одну мішень, можуть мати в принципі більш безпечний профіль порівняно з одноцільовими [138]. Грунтуючись на таких накопичених доказах, концепція багатоцільових ліків зробила швидкий і вражаючий прогрес від нової парадигми, коли вона вперше була проголошена на початку 2000 року [139,140], до однієї з найгарячіших тем у відкритті ліків у 2017 році. Дійсно, протягом багатьох років ці концепції викликали інтерес спільноти дослідників ліків як у наукових колах, так і у фармацевтичних компаніях до такого рівня, що на ринку вже доступна велика кількість мультицільових препаратів [141].

У зв'язку з цим особливий інтерес представляють краун-етери з фармакофорними групами (амінокислоти, пептиди та ін.), оскільки дія традиційних біологічно активних речовин, що входять до цих груп, може бути посилена внаслідок полегшення їхнього транспорту через гематоенцефалічний бар'єр та клітинні мембрани. Синтез численних краун-етерів та їх аналогів, а

також вивчення їх фармакологічних властивостей показали, що ці сполуки мають низку фізіологічних активностей [142]. Встановлено, що власне макрогетероцикли не мають психотропної активності, а для прояву сполукою специфічної дії значну роль відіграє характер фармакофорного фрагмента ковалентно зв'язаного з краун-етером. Такі сполуки мають високу біодоступність, а також здатні надавати і пряму дію на структурно-функціональні перебудови мембран. На підставі дослідження [143,144] закономірностей залежності між хімічною структурою похідних краун-етерів та проявами біологічної активності, відібрано найбільш активну сполуку - N-(γ -амінобутирил)-1-аза-4, 7, 10, 13 - тетраоксациклопентадекан хлоргідрат (габальгін), що володіє ноотропною та імунотропною дією.

Проблема безпеки лікарських засобів стає все більш актуальною у всьому світі. Це пов'язано, насамперед з тим, що в медичній практиці зростає впровадження лікарських засобів з високою біологічною активністю, застосування яких може супроводжуватися виникненням побічних реакцій різних за проявом та ступенем тяжкості. Звідси, ще на доклінічному випробуванні нової сполуки необхідним є визначення токсикологічних властивостей майбутнього лікарського засобу. у даному випадку габальгіну.

Експерименти виконані на 77 білих нелінійних мишах обох статей масою 22-23 г. Дослідження гострої токсичності тест-зразка габальгіну було проведене з дотриманням біоетичних принципів відповідно до Директиви 2010/63/EU Європейського Парламенту та Ради ЄС «Про охорону тварин, які використовуються з науковою метою» [145]..

Габальгін вводили тваринам внутрішньочеревно в дозах 450, 500, 562, 630, 668, 708 та 750 мг/кг. Спостереження за тваринами вели протягом 14 днів: перший день – кожну годину, в подальшому щоденно. Оцінювали виживаність тварин, а також їх зовнішній вигляд, стан шкірних покривів, поведінку, споживання їжі тощо. Визначали динаміку маси тіла тварин. Спостерігали за симптомами інтоксикації.

Виживання та клінічні спостереження. Після однократного введення сполуки мишам обох статей в дозах 450 та 500 мг/кг протягом усього періоду спостережень не зареєстровано загибелі дослідних тварин. До кінця терміну спостережень не спостерігалось жодних відхилень у зовнішньому вигляді та токсичних. Усі тварини були активні, мали гладеньку шерсть та чисту шкіру, харчова поведінка не відрізнялась від контролю.

Після введення сполуки в дозах 562-708 мг/кг піддослідні тварини були млявими, малорухомими, відмовлялись від споживання їжі та води. В найбільшій мірі ці ознаки були виражені впродовж перших двох діб спостереження. Частина тварин загинула (табл. 1), переважно смертність фіксується в перші 4 доби після введення сполуки, що відповідає гострій токсичній фазі. У решти мишей в наступні дні, у субгострий період, загальмованість ставала менш виразною, однак тварини залишались малорухомими із зниженим споживанням їжі та води.

Після введення піддослідним тваринам сполуки в дозі 750-794 мг/кг спостерігались судоми та загибель всіх тварин протягом перших 2 днів. На розтині загиблих мишей виявлялись гепатомегалія, поодинокі виразкові дефекти шлунка та кишечника, візуальні ознаки набряку легень. Результати виживаності тварин наведені в таблиці 1.

Загалом, при співставленні даних динаміки летальності самців та самок не відмічається пов'язаної із статтю різниці у токсичній дії. Це дозволяє припустити, що токсичність сполуки, ймовірно, реалізується через загальні механізми, які є спільними для самців та самок.

Таблиця 1.

Кількість загиблих мишей обох статей після одноразового
внутрішньочеревного введення габальгіну.

Експеримен- тальні групи	Дні спостереження							Загальна кількість тварин в групі	Кількість летальних випадків, %
	1	2	3	4	7	10	14		
Контроль самці (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	6	0
Контроль самки (n=4)	0	0	0	0	0	0	0		
Доза 450 мг/кг									
Самці (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	8	0
Самки (n=4)	0	0	0	0	0	0	0		
Доза 500 мг/кг									
Самці (n=4)	0	0	0	0	0	0	0	8	0
Самки (n=4)	0	0	0	0	0	0	0		
Доза 562 мг/кг									
Самці (n=4)	0	1	0	0	0	0	0	8	2 (25%)
Самки (n=4)	0	0	1	0	0	0	0		
Доза 630 мг/кг									
Самці (n=5)	1	1	1	0	0	0	0	9	6 (67%)
Самки (n=4)	1	1	0	1	0	0	0		
Доза 668 мг/кг									
Самці (n=4)	0	1	1	1	0	0	0	8	6 (75%)
Самки (n=4)	0	0	1	2	0	0	0		
Доза 708 мг/кг									
Самці (n=5)	2	1	1	0	0	0	0	10	9 (90%)
Самки (n=5)	2	2	0	1	0	0	0		

Продовження таблиці 1

Доза 750 мг/кг									
Самці (n=5)	3	2	-	-	-	-	-	10	10 (100%)
Самки (n=5)	2	3	-	-	-	-	-		
Доза 794 мг/кг									
Самці (n=4)	5	-	-	-	-	-	-	10	10 (100%)
Самки (n=4)	4	1	-	-	-	-	-		
Розрахункові значення	LD ₁₆ = 515,72 LD ₅₀ = 605,93							LD ₈₄ = 696,14 LD ₁₀₀ = 741,25	

Проведені за допомогою пробіт-аналізу (рис. 1.) [146] розрахунки показали, що середньосмертельна доза сполуки за її внутрішньочеревного одноразового введення складає 605,9 мг/кг, а перегиб кривої “доза-токсичність” має місце у досить широкому інтервалі доз - від 515,72 мг/кг до 696,14 мг/кг, що зазвичай є показником неспецифічності механізмів токсичності.

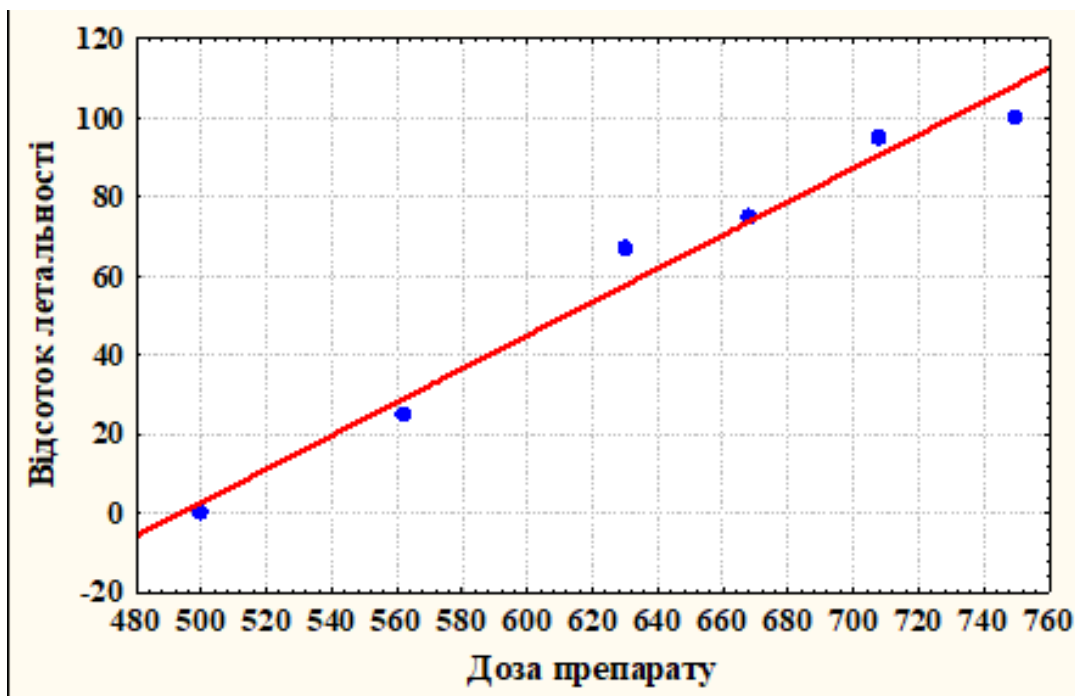


Рис. 1. Графічне визначення середньої середньо-смертельної дози (LD_{50}) за сполуки С-003 за її внутрішньочеревного введення у мишей.

Згідно класифікації біологічних речовин [147] за ступенем токсичності, габальгін є малотоксичною речовиною IV класу.

Для подальших досліджень було обрано дозу 500 мг/кг, як максимальної, що не викликала смертельних випадків у піддослідних тварин. У тварин цієї групи контролювали масу тіла перед введенням сполуки, а також на 7-му та 14-ту добу експерименту. Можна відмітити, що приріст маси тіла знаходились в межах фізіологічної норми та не відрізнявся від такого у тварин контрольної групи, які отримували розчинники (дистильовану воду) (табл. 2).

Дослідні та контрольні тварини набирали вагу у відповідності до фізіологічної норми. При зовнішньому огляді тварин ознак патологічних змін їх стану не виявлено, шерсть та покрови шкіри чисті, підшкірний шар жирової тканини виражений помірно, на слизових оболонках та шкірі ушкоджень та запальних уражень не спостерігалось. Візуальна оцінка стану внутрішніх органів також не виявила ознак патологічних змін.

Таблиця 2.

Динаміка маси тіла мишей (г) після однократного внутрішньочеревного введення габальгіну у дозі 500 мг/кг маси тіла ($M \pm m$; $n=4$)

Експериментальна група	Доза, мг/кг маси тіла	Термін зважування		
		Вихідні дані	7 доба	14 доба
Контроль				
Самці	-	20,50±0,29	21,98±0,37	23,50±0,31
Самки	-	20,75±0,25	21,38±0,35	23,03±0,65
Дослід				
Самці	500	21,25±0,25	21,58±0,28	21,95±0,32
Самки	500	21,00±0,41	21,98±0,46	22,73±0,24

При макроскопічному огляді більшості внутрішніх органів тварин не виявлено ознак інтоксикації або інших проявів патологічних процесів. За макроскопічними ознаками - розміром, консистенцією та розташуванням внутрішні органи тварин не виходили за межі норми і суттєво не відрізнялися від внутрішніх органів групи мишей контрольної групи. В місці введення тест-зразка патологічних змін не виявлено.

Проведено дослідження абсолютної маси (табл. 3) та обчислення масових коефіцієнтів внутрішніх органів тварин (в г) на 100 г маси тіла (табл. 4). Як свідчать дані маса більшості внутрішніх органів у мишей дослідних груп не зазнала фактичних змін порівняно до маси внутрішніх органів у мишей контрольних груп. Статистично вірогідні зміни зафіксовано щодо печінки у самців та самок мишей, яким вводили габальгін, абсолютна маса якої перевищували середній показник групи контролю ($p < 0.05$).

Таблиця 3.

Абсолютна маса внутрішніх органів (г) мишей через 14 днів після одноразового внутрішньочеревного введення сполуки (500 мг/кг маси тіла) ($M \pm m$; $n = 4$).

Органи	Контроль		Дослід	
	Самці	Самки	Самці	Самки
Серце	0,110±0,018	0,111±0,002	0,114±0,002	0,113±0,001
Легені	0,203±0,001	0,201±0,002	0,208±0,001	0,206±0,002
Печінка	1,300±0,002	1,258±0,003	1,340±0,009*	1,362±0,017*
Нирки	0,222±0,009	0,218±0,003	0,235±0,010	0,264±0,036
Селезінка	0,174±0,019	0,207±0,002	0,168±0,015	0,176±0,030
Головний мозок	0,400±0,005	0,377±0,008	0,412±0,004	0,403±0,009

Примітка: * - статистично вірогідні відмінності ($p < 0,05$) між контрольними та дослідними тваринами однієї статі

Таблиця 4.

Відносна маса внутрішніх органів (г/100 г маси тіла) білих мишей через 14 днів після внутрішньочеревного введення сполуки в дозі 500 мг/кг ($M \pm m$; $n=4$)

Органи	Контроль		Дослід	
	Самці	Самки	Самці	Самки
Серце	0,47±0,018	0,48±0,020	0,53±0,016	0,50±0,007
Легені	0,86±0,015	0,87±0,025	0,95±0,016*	0,91±0,014
Печінка	5,54±0,105	5,46±0,055	5,95±0,087*	5,74±0,051*
Нирки	0,94±0,040	0,95±0,020	1,07±0,040*	1,16±0,07
Селезінка	0,74±0,082	0,90±0,081	0,77±0,030	0,78±0,014
Головний мозок	1,70±0,063	1,65±0,091	1,89±0,048*	1,77±0,032

Примітка: * - статистично вірогідні відмінності ($p<0,05$) між контрольними та дослідними тваринами однієї статі

При дослідженні відносної маси внутрішніх органів мишей було визначено, що під впливом габальгину у самців зареєстровано статистичне збільшення масових коефіцієнтів головного мозку, легень, печінки та нирок, тоді як у самок лише відносний коефіцієнт печінки статистично перевищував такий показник самок групи контролю, тоді як такі паренхіматозні органи, як селезінка та легені, не зазнавали вірогідно значущих змін. Можна припустити, що це вказує на розвиток у цих органах патологічних змін (наприклад, набрякових та деструктивних процесів, первинної гіперплазії), однак ці зміни не відобразились на макроскопічному стані органів і не призвели до загибелі мишей.

Загалом досліджувана сполука габальгин може бути охарактеризована, як така, що має низьку токсичність (належить до IV класу), а механізм її реалізації не є вузькоспецифічною. Ймовірно, це пояснюється тим, що ця молекула є комбінацією малотоксичного краун-естеру та амінокислоти, що є природним ендогенним компонентом внутрішнього середовища. Саме це обумовлює й низький нахил кривої “доза - токсичність”, який пов’язаний з неспецифічністю

механізмів релізації токсичності сполуки, а також з її очікуваною поліафінність до різних типів рецепторів (багатоцільовість). Сполука є низькотоксичною, що підтверджується як визначеною величиною середньосмертельної дози ($LD_{50} = 605,93$ мг/кг), так й відсутністю суттєвого впливу на масу внутрішніх органів після тривалого (до 14 діб) внутрішньоочеревинного ведення. Зміна у відносних коефіцієнтах внутрішніх органів здебільшого відмічалась для самців (печінка, легені, нирки та головний мозок), у той час як для самок це було мало виразно (збільшення лише печінки), та у обох статей зовнішня морфологія органів не змінювалась.