

CERCETĂRI PRECLINICE

EVALUAREA TOXICITĂȚII ACUTE A UNOR NOI COMPUȘI MEDICAMENTOȘI COMBINAȚI

Sergiu Parii¹, Vladimir Valica¹, Vladimir Carauș², Eugeniu Nicolai¹,
Alina Ungureanu¹, Alexandru Cojocari¹

Centrul Științific în Domeniul Medicamentului¹, IP USMF „Nicolae Testemițanu”
SC ”CSK Grup Plus” SRL² Chișinău, Republica Moldova

Rezumat

În cadrul studiului a fost determinată toxicitatea acută a compusului medicamentos combinat ce conține glicină, lecitină și dihidroquercetină (CAF01) și a compusului medicamentos combinat ce conține glicină, lecitină, dihidroquercetină și sanguiritină (CAF02). În urma investigațiilor efectuate conform recomandărilor *TG 423 Acute Toxic Class Method (OECD)* posedă toxicitate redusă fiind clasificate: CAF-01 clasa de toxicitate 5 și DL50/LD50 estimat >5000 mg/kg, iar CAF-02 clasa de toxicitate 5 și DL50/LD50 estimat – 2500 mg/kg. Rezultatele cercetării pot servi ca premiză pentru efectuarea toxicității subacute și cronice a produselor CAF-01 și CAF-02.

Cuvinte cheie: toxicitatea acută, glicină, lecitină, dihidroquercetină, sanguiritină, compuși medicamentoși combinați.

Abstract

Assessment of acute toxicity of new compound drugs

In the study was determined acute toxicity of combined drug compound which contains glycine, lecithin and dinodroguertsetin (CAF01) and acute toxicity of the compound combination product which contains glycine, lecithin, dinodroguertsetin and sanguiritin (CAF02). The studied preparations possess low toxicity: CAF-01 grade 5 of toxicity and LD50/LD50 is estimated at > 5,000 and CAF-02 grade 5 of toxicity and LD50/LD50 is estimated at 2500 according to the method of determining the toxic class *TG 423 Acute Toxic Class Method* recommended by the OECD. The research results can serve as a prerequisite for conducting the chronic toxicity of products.

Keywords: combined drugs, acute toxicity, glycine, lecithin, dihidroquercitine, sanguinarine.

Introducere

Actualmente, în terapia și reabilitarea complexă a pacienților cu maladii cronice sunt valorificați compușii chimici ai bioelementelor sau suplimentele lor ce conțin vitamine, aminoacizi și oligopeptide (1). Numărul de surse vegetale cu proprietăți polivalente, concomitent și stimulente, este însă redus. Interacțiunile concurente dintre microelemente, nivelul scăzut de asimilare a lor în cazul suplimentelor cu conținut de acestea, sunt printre cauzele eficienței reduse a utilizării lor cu succes în ameliorarea diverselor situații clinice (2). Pentru soluționarea problemei în cauză, drept oportună poate fi considerată utilizarea medicamentelor polifuncționale obținute din preparate cu eficiență clinică și inofensivitate bine demonstrate cu efecte polivalente (3, 4).

Preparatele medicamentoase combinate presupun asocierea într-un singur preparat comercial a doi sau mai mulți agenți cu acțiune terapeutică diferită. Ele acționează asupra mecanismelor ce intervin în declanșarea stării patologice, cresc probabilitatea de a obține un răspuns terapeutic sporit datorită mecanismelor farmacodinamice sinergice. Reducerea efectelor secundare rezultată din utilizarea unor doze mai mici de substanțe active cu reacții adverse diferite, crește tolerabilitatea medicației și complianța pacienților la tratament (1, 2)

Aminoacidul **glicina** (metabolit natural) este un neuropeptid de tip inhibitor și reglator al proceselor metabolice în sistemul nervos central, reduce tensiunea psihonoțională, crește capacitatea de muncă intelectuală. Manifestă acțiune neuroprotectoare, antistres, sedativă, ameliorează metabolismul cerebral, normalizează somnul, reduce acțiunea toxică a alcoolului. Nu provoacă dependență (2, 3).

Lecitina este o fosfolipidă și participă la constituirea membranelor celulare la nivelul creierului și celulelor nervoase. La insuficiența lecitinei scade eficiența acetilcolinei în tesutul nervos. L. favorizează creșterea și dezvoltarea organismului, mărește capacitatea de muncă fizică și intelectuală, accelerează refacerea organismului după eforturi intense (2, 3).

Dihidroquercitina este un flavonoid derivat din tulpina copacilor *Larix sibirica Ledeb. si Larix Larix dahurica*. Posedă următoarele acțiuni farmacologice – antioxidant, capilaroprotector, regenerador, detoxifiant și antiinflamator (4, 5, 6).

Alcaloizii de **sanguinarină** se conțin în planta (*Macleaya cordata Will.*). Ea posedă activitate antimicrobiană împotriva bacteriilor Gram-pozitive și Gram-negative. De asemenea posedă acțiune antifungică și antimicotică (4,5,6).

În cadrul Centrului Științific în Domeniul Medicamentului (CȘDM) al IP USMF „Nicolae Testemițanu” au fost elaborate în colaborare cu SC ”CSK Grup Plus” 2 produse medicamentoase combinate (denumirea de lucru CAF-01 și CAF-02).

Compoziția CAF 01. Forma de prezentare: suspensie. Compoziția la 100 ml: glicină – 1000 mg, lecitină – 1000 mg, dihidroquercetină – 130 mg, apă purificată – q.s. Eventualele indicații – detoxifierea și imunocorecția în sindroame toxice de diferită etiologie, inclusive și cea medicamentoasă (chimioterapie), antiinflamator.

Compoziția CAF 02. Forma de prezentare: gel. Compoziția la 50 ml: glicină – 1500 mg, lecitină – 1200 mg, dihidroquercetină – 150 mg, sanguiritină – 4mg; carbomer – 100 mg, alcool etilic – nu mai mult de 4 %, apă purificată – q.s. Efecte terapeutice: antiinflamator, regenerativ, ameliorează microcirculația. Eventualele indicații – tratamentul combustiilor, ulcerilor trofice, plagilor și traumatismelor.

În ultimii ani au apărut controverse asupra folosirii LD50 clasic. Testul a luat naștere, atunci când alți indicatori de toxicitate nu au fost disponibili sau nu au fost foarte sensibili și când tehnologia de început nu a putut susține cerințele. În plus, numărul de animale necesare pentru validarea protocolului este mare și s-a sugerat că metoda distruge inutil un număr mare de animale. Unele sugestii pentru actualizarea testului include: (7) utilizarea unui număr mai mic de animale în estimarea dozelor de început pentru testările ulterioare, (8) luarea în considerare a mai puține căi de expunere, și (9) obținerea de informații suplimentare în timpul unui studiu care se adaugă la baza cunoștințelor disponibile despre un produs chimic.

Cantitatea extraordinară de date toxicologice acute deja existente despre substanțele chimice și clasele chimice disponibile în prezent nu permit generarea repetată de valori ale LD50 cu introducerea unei noi formulări pentru același compus, un nou derivat al aceleiași clase chimice sau o altă combinație de substanțe chimice cunoscute. Cercetătorii din UE consideră că LD50 clasic trebuie să fie eliminat pentru toate produsele chimice (8, 9).

Obiectivele lucrării

1. Determinarea toxicității acute a compusului medicamentos combinat ce conține glicină, lecitină și dihidroquercetină (CAF01).

2. Determinarea toxicității acute a compusului medicamentos combinat ce conține glicină, lecitină, dihidroquercetină și sanguiritină (CAF02).

Material și metode

Concentrațiile farmaceutice cu corespunderea dozelor respective de 50 mg/kg, 300 mg/kg, 1000 mg/kg și 2000 mg/kg al compusilor CAF 01 și CAF 02 au fost pregătite în cadrul Laboratorului Analiza, standardizarea și controlul medicamentelor al CȘDM. Preparatele au fost diluate în volume constante de soluție fiziologică de 0,9% în funcție de doza substanțelor și cantitatea de lichid maximal admisibilă pentru administrare.

Studiul toxico-farmacologic a fost efectuat în Laboratorul Evaluare preclinică și clinică a medicamentelor al CȘDM pe:

116 de șoricei de laborator (masculi, femele), vârsta 2 – 3 luni, masa 18-26 gr (92 șoricei în grupurile experimentale, 24 de șoricei în grupul de control) și 30 de șobolani (femele) vârsta 3-4 luni, masa 180-250 gr (24 în grupurile experimentale și 6 în grupul de control). Animalele au fost obținute din aceeași sursă și menținute în condițiile de viață a laboratorului (cutii standarde de masă plastică) pentru aclimatizare. Condițiile de trai și alimentare au corespuns cerințelor sanitare și normelor de alimentare. Pentru utilizarea apei au fost stabilite autoape ducte. Animalele nu au primit hrană cu 12 ore înainte de inițierea experienței și pe parcursul ei. În dimineața zilei destinate experimentării șoricei au fost cântăriți și repartizați în loturi omogene câte 6 masculi și 6 femele conform masei corporale. Șobolanii au fost repartizați în lot a câte 6 femele.

Investigațiile preclinice au fost aprobate de Comitetul de Etică al Cercetării al IP USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 1 din 23.09.2014

Pentru stabilirea TOXICITĂȚII ACUTE substanțele CAF01 și CAF02 au fost administrate șoriceilor enteral prin gavaj și intraperitoneal și șobolanilor enteral prin gavaj. Cantitatea de lichid administrată a fost calculată în dependență de masa individuală a animalelor de laborator, cântărite înainte de experiment.

Toxicitatea acută și estimarea DL50/LD 50% a fost determinată prin metoda dozelor fixe cu stabilirea clasei toxice acute conform TG 423: Acute Toxic Class Method (8,9), recomandat de Organizația Economică pentru Cooperare și Dezvoltare.

Pentru stabilirea TOXICITĂȚII ACUTE substanțele au fost inițial administrate șoriceilor enteral prin gavaj și intraperitoneal, doze-test de 50, 300, 1000, 2000 mg/kg. Dozele mai mari de 2000 mg/kg nu au fost folosite din cauza necesității unui volum mai mare de soluție fiziologică, fapt ce nu corespundea recomandărilor metodice. Ulterior substanțele testate au fost administrate șobolanilor (femele) în dozele test de 50, 300, 2000 mg/kg. Dozele mai mari de 2000 mg/kg nu au fost folosite din cauza necesității unui volum mai mare de soluție fiziologică, fapt ce nu corespundea recomandărilor [7, 10]. Animalelor din grup de control sa administrat volum similar de soluție fiziologică (NaCl 0,9%).

Animalele au fost supravegheate timp de 14 zile. În timpul observațiilor a fost înregistrat comportamentul animalelor, consumul alimentelor și apei, activitatea motorie, coordonarea mișcărilor, reacția la excitanți fizici (lumină, zgomot), funcția respiratorie, starea pielii și a mucoaselor. De asemenea a fost înregistrat timpul apariției fenomenelor de intoxicație și decesul animalelor. Vizual s-a determinat tabloul clinic al intoxicației. Animalele au fost cântărite la 2, 7, 14 zi (înainte de eutanasiere).

După finisarea experimentului animalele au fost disecate în mod separat, pentru efectuarea studiului organe-

Tab. I. Mortalitatea Toxicitatea acută CAF 01 (șoricei)

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	deces	N animale	deces	N animale	Deces, %
50 mg/kg	6	-	6	-	6	0
300 mg/kg	6	-	6	-	6	0
1000 mg/kg	6	-	6	-	6	0
2000 mg/kg	6	-	6	-	6	0

Tab. II. Mortalitatea Toxicitatea acută CAF 02 (șoricei)

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	deces	N animale	deces	N animale	Deces, %
50 mg/kg	6	-	6	-	6	0
300 mg/kg	6	-	6	-	6	0
1000 mg/kg	6	-	6	-	6	0
2000 mg/kg	6	-	6	-	6	0

lor interne și confirmarea modificărilor obținute în experiență.

REZULTATE

Rezultatele investigațiilor pe șoricei

Pe parcursul studiului nu s-au constatat modificări în comportamentul și activitatea motorie spontană a animalelor din grupul de control. Animalele erau în mișcare activă, întrebunțau adecvat hrană și apă. Starea mucoaselor și invelisului cutanat era în normă, fără schimbări patologice. Culoarea urinei era galbenă deschisă. Blana animalelor avea un aspect îngrijit, lucios, fără focare de alopecie. Dinții păstrați. Mucoasele vizibile erau palide, lucioase, netede. Glandele mamare ale femelelor la palpare fără indurații și fără eliminări. Organele genitale masculine normal exprimate. Deformări sau edeme a extremităților nu s-a remarcat.

La administrarea atât enterală cât și intraperitoneală dozei de 50 mg/kg și supravegherea timp de 7 zile nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor și nici decesul lor.

Administrarea substanțelor cercetate în doze de 300, 1000, 2000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducere a reacției la stimulii exogeni. Alte simptome patologice anatomice și fiziologice nu au fost constatate. Toate animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a primelor 24 ore (300 mg/kg) și 24–48 ore (pentru 2000 mg). La lotul care a primit CAF 02 s-a constatat inapetență și diaree pe parcursul primelor 24-48 ore. Doza Maximă Tolerantă (DMT) – 2000 mg/kg.

Mortalitate în loturile de studiu și de control nu sa constatat. Rezultatele detaliate a investigațiilor sunt prezentate în tabelele I-II.

Monitorizarea folosirii alimentelor și apei nu a constatat modificări statistic semnificative între grupurile cercetate și cel de control. În a doua zi a studiului a remarcat o oarecare pierdere a greutateii corporale la animalele din toate grupurile, inclusiv de control. Pentru a elimina acest efect (cauzate, probabil, stresul legat de plasarea animalelor în cercetarea de mediu), modificarea greutateii în comparație cu cea ale valorilor de fon.

Analiza datelor nu a evidențiat diferențe semnificative în dinamica de greutate corporală între animalele experimentale și de control. O creștere ceva mai semnificativă în greutate la animalele de control, comparativ cu cele experimentale. Explorarea nu a purtat un caracter semnificativ.

La necropsie, în loturile experimentale și de control, modificări patologice vizibile nu au fost constatate.

Tab. III. Mortalitatea Toxicitatea acută (șobolani)

Doze	CAF 01		CAF 02	
	N animale	deces	N animale	deces
50 mg/kg	6	-	6	-
300 mg/kg	6	-	6	-
2000 mg/kg	6	-	6	1

Tab. IV. DETERMINAREA CLASEI DE TOXICITATE conform TG 423: *Acute Toxic Class Method (OECD)*

Denumirea	Clasa de toxicitate	DL50/LD50 estimat mg/kg
CAF-01	5	≥ 5000
CAF-02	5	2000– 5000 (2500)

Rezultatele investigațiilor pe șobolani

La administrarea atât enterală a dozei de 50 mg/kg și supravegherea timp de 7 zile nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor și nici decesul lor.

Administrarea substantelor testate în doze de 300, 2000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducerea reacției la stimulii exogeni. Toate animalele au revenit la starea inițială pe parcursul a primelor 24 ore (300 mg/kg) și 24 -48 ore (pentru 2000 mg). La lotul care a primit CAF 02 s-a constatat inapetență și diaree pe parcursul primelor 48-72 ore. La lotul CAF-01 – diaree care a revenit la normal pe parcursul 24 ore). La 1 femelă care a primit CAF-02 doza 2000 mg/kg s-a constatat diaree, o diminuare a activității motorii, cu reacție redusă, apoi din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni, cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul în decurs de 48 ore (la 2 zi). Rezultatele investigațiilor sunt prezentate în tabelul III.

În perioada de 1-3 zile după administrarea preparatelor studiate ocazional la doza de 300 și 2000 mg/kg (CAF 01 și CAF 02) au fost constatate la animale: somnolență, adina-

mie, inapetență, diaree (numai la CAF 02), simptome care au revenit la normalitate în 1-2 zile.

Reieșind din rezultatele primite la șobolani a fost estimat LD50/DL50 (tabelul IV).

De asemenea nu s-au constatat deosebiri semnificative între dinamica creșterii masei corporale, consumul alimentelor și a hrăni la animalele din grupurile de cercetare și de control.

La necropsie modificări patologice vizibile în loturile experimentale și de control nu au fost constatate.

Concluzii

Rezultatele experimentale au arătat că compușii CAF-01 și CAF-02 pentru administrarea acută unimomentană la animalele de laborator (șoareci, șobolani) practic nu prezintă efecte toxice.

La șoareci administrarea intragastrală și intraperitoneală nu a dus la decesul animalelor și nu s-au depistat modificări macroscopice ale organelor interne.

La șobolani, în urma investigațiilor efectuate conform recomandărilor TG 423 *Acute Toxic Class Method (OECD)*, posedă toxicitate redusă astfel fiind clasificate: CAF-01 clasa de toxicitate 5 și DL50/LD50 estimat >5000 mg/kg, iar CAF-02 clasa de toxicitate 5 și DL50/LD50 estimat – 2500 mg/kg.

Rezultatele cercetării pot servi ca premiză pentru efectuarea toxicității subacute și cronice a produselor CAF-01 și CAF-02.

Bibliografie:

1. В.М. Белоусов, М.Ю. Леонова. Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии. Москва, 2002, 375 стр.
2. Matcovschi C., Procopișin V., Parii B. Ghid farmacoterapeutic. Chișinău, 2006, 1157 pag.
3. Matcovschi C., Safta V. Ghid farmacoterapeutic. Chișinău, 2010, 1296 pag.
4. Смирнов, Л.Д. В.С. Сускова. Модуляция иммунного ответа антиоксидантами. Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – № 7. С. 773-784.
5. Уминский А.А., Хавстеен Б.Х., Баканева Б.Ф. Пуцино, Биохимия флавоноидов и их значение в медицине 2007, ISBN – 978-5-903789-01-6
6. И. А. Чексарева, А. А. Адамян, Е. В. Кочергина. Влияние раневого покрытия с дигидрохлоридом на репаративные процессы в ране. Материалы 3-й Международной конференции: «Современные технологии и возможности реконструктивно-восстановительной и эстетической хирургии». Москва, 17-18 апреля 2012 г. Стр. 209 – 210.
7. Committee of experts of dangerous goods and on the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals of United Nations Sub-Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (Twenty-first session, 1-10 July 2002, agenda item 8 (c))
8. OECD C(2001)282 Proposal for the updating of three guidelins and the deletion of one guideline of chemicals.
9. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method 17th December 2001.
10. Каркищенко, Н.Н.; Грачева, С.В. и соавт. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. Москва. 2010, с. 358.