

**ПОРІВНЯЛЬНИЙ АСПЕКТ ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ
АНТИГЕЛЬМІНТНОГО ФІТОПРЕПАРАТУ «ЩИТНИК»
КЛАСИЧНИМ ТА АЛЬТЕРНАТИВНИМ МЕТОДАМИ**

Ж. М. Періг
jannaperig16@gmail.com

Державний науково-дослідний контрольний інститут
ветеринарних препаратів та кормових добавок,
вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

За міжнародними вимогами, випробування безпеки (токсичності) різних речовин на живих системах (людини, тварин, екосистем) здійснюються відповідно до гармонізованих методичних рекомендацій Організації економічного співробітництва і розвитку (OECD) та Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів (ICH). У наш час наукові співтовариства і регуляторні органи країн Євросоюзу приділяють величезну увагу встановленню безпеки і спектру токсичної дії лікарських препаратів, хімікатів, різних продуктів біотехнології і наноматеріалів.

У науковій статті наведено результати порівняльного визначення параметрів гострої токсичності фітопрепарату «Щитник» за допомогою класичного та альтернативного (європейського) методів.

Принцип альтернативного (європейського) методу визначення гострої токсичності ґрунтується на поетапній процедурі з використанням мінімальної кількості тварин на кожному етапі досліджень, що дозволяє зробити висновок щодо класифікації досліджуваної речовини з віднесенням його до одного з розрядів класів токсичності, які визначаються фіксованим DL_{50} порогових значень. Альтернативний метод визначення класу гострої токсичності згідно з OECD (тест № 423) не застосовує обов'язковий летальний результат і для досліду використовується мінімальна кількість тварин.

За класичного методу визначення гострої токсичності проводили у два етапи: попередній та розширений. На попередньому етапі досліджень препарат вводили в дозах від 500 до 4500 мг/кг, з інтервалом 1000 мг/кг і на кожен дозу було використано по 3 лабораторні тварини. На розгорнутому етапі сформовані дослідні групи по 6 тварин в кожній. Препарат вводили в дозах від 5000 до 13000 мг/кг, з інтервалом 2000 мг/кг маси тварин. Клас токсичності визначали згідно зі СОУ 85.2-37-736:2011.

Встановлено, що DL_{50} препарату «Щитник» за класичним методом визначення параметрів гострої токсичності становить понад 13000 мг/кг, а альтернативним — більше 5000 мг/кг. На дослідження за класичним методом було витрачено 39 лабораторних тварин, а за альтернативним — 9 тварин.

Ключові слова: ТЕСТ OECD № 423, КЛАСИЧНИЙ МЕТОД, АЛЬТЕРНАТИВНИЙ МЕТОД, ГОСТРА ПЕРОРАЛЬНА ТОКСИЧНІСТЬ, ФІКСОВАНА ДОЗА, ЩИТНИК, БІЛІ ЩУРИ

**COMPARATIVE ANALYSIS OF RESEARCH OF ACUTE TOXICITY
OF ANTHELMINTIC PHYTOPREPARATION “SHCHYTYNYK”
BY CLASSICAL AND ALTERNATIVE METHODS**

J. Perig
jannaperig16@gmail.com

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives,
11 Donetska str., Lviv 79019, Ukraine

According to international requirements the testing of safety (toxicity) of various substances in living systems (human, animals and ecosystems) is carried out according to the harmonized methodological recommendations of the organization for Economic Cooperation and Development (OECD) and the International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of medicines (ICH). At the moment the scientific community and regulatory authorities of EU countries are paying great attention to the establishment of security and range of toxic effects of drugs, chemicals, biotechnology products and various nanomaterials.

The article contains the results due to the comparative determination of parameters of acute toxicity of phytopreparation “Dryopteris filix-mas” using classical and alternative (European) methods.

The principle of alternative (European) method for determining acute toxicity is based on a phased procedure using the minimum number of animals at each stage of the research, which suggests the classification of investigated substance of attributing it to one of the categories of toxicity classes, which are defined DL_{50} fixed threshold values. An alternative method for determining the acute toxicity class according to the OECD (test no. 423) does not apply mandatory a fatal outcome and for the experiment using the minimum number of animals.

According to the classical method of determining acute toxicity was carried out in two stages: previous and extended. At the preliminary stage of research the drug was administered in doses of 500 to 4500 mg/kg, at intervals of 1000 mg/kg and each dose was used on 3 laboratory animals. In the expanded stage research groups of 6 animals in each are formed. The drug was injected in doses ranging from 5.000 to 13.000 mg/kg, at intervals of 2000 mg/kg of animals body weight. Class of toxicity was determined by JMA 85.2-37-736:2011.

It was established that DL_{50} preparation "Dryopteris filix-mas" according to the classic method determining the parameters of acute toxicity is more than 13.000 mg/kg and the alternative — more than 5000 mg/kg. At a classic research it has been spent 39 laboratory animals, but at the alternative — 9 animals.

Keywords: OECD TEST № 423, THE CLASSIC METHOD, ALTERNATIVE METHODS, ACUTE ORAL TOXICITY, FIXED DOSE, DRYOPTERIS FILIX-MAS, WHITE RATS

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АСПЕКТ ИССЛЕДОВАНИЯ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ АНТИГЕЛЬМИНТНОГО ПРЕПАРАТА «ЩИТНИК» КЛАССИЧЕСКИМ И АЛЬТЕРНАТИВНЫМ МЕТОДАМИ

Ж. Н. Периг

jannaperig16@gmail.com

Государственный научно-исследовательский контрольный институт
ветеринарных препаратов и кормовых добавок,
ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

По международным требованиям испытания безопасности (токсичности) различных веществ на живых системах (человека, животных, экосистем) осуществляются в соответствии с гармонизированными методическими рекомендациями Организации экономического сотрудничества и развития (OECD) и Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов (ICH). В настоящее время научные сообщества и регуляторные органы стран Евросоюза уделяют огромное внимание установлению безопасности и спектра токсического действия лекарственных препаратов, химикатов, различных продуктов биотехнологии и наноматериалов.

В статье приведены результаты сравнительного определения параметров острой токсичности фитопрепарата «Щитник» с помощью классического и альтернативного (европейского) методов.

Принцип альтернативного (европейского) метода определения острой токсичности основывается на поэтапной процедуре с использованием минимального количества животных на каждом этапе исследований, что позволяет сделать вывод о классификации исследуемого вещества с включением его в один из разрядов класса токсичности, которые определяются фиксированным DL_{50} пороговых значений. Альтернативный метод определения класса острой токсичности согласно OECD (тест № 423) не применяет обязательный летальный результат и для опыта используется минимальное количество животных.

Классический метод определения острой токсичности проводился в два этапа: предварительный и расширенный. На предварительном этапе исследований препарат вводили в дозах от 500 до 4500 мг/кг с интервалом 1000 мг/кг, на каждую дозу было использовано по 3 лабораторные животные. На развернутом этапе сформированы исследовательские группы по 6 животных в каждой. Препарат вводили в дозах от 5000 до 13000 мг/кг с интервалом 2000 мг/кг массы животных. Класс токсичности определяли согласно СОУ 85.2-37-736:2011.

Установлено, что DL_{50} препарата «Щитник» по классическому методу определения параметров острой токсичности составляет более 13000 мг/кг, а альтернативным — более 5000 мг/кг. На исследования по классическому методу было израсходовано 39 лабораторных животных, а по альтернативному — 9 животных.

Ключевые слова: ТЕСТ ОЭСР № 423, КЛАССИЧЕСКИЙ МЕТОД, АЛЬТЕРНАТИВНЫЙ МЕТОД, ОСТРАЯ ПЕРОРАЛЬНАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, ФИКСИРОВАННЫЕ ДОЗЫ, ЩИТНИК, БЕЛЫЕ КРЫСЫ

Наукові співтовариства і регуляторні агенції країн Євросоюзу звертають величезну увагу на встановлення безпеки і спектру токсичної дії лікарських препаратів, хімікатів, різних продуктів біотехнології і наноматеріалів. За міжнародними вимогами, випробування безпеки (токсичності) різних речовин на живих системах (людини, тварин, екосистем) здійснюються відповідно до гармонізованих методичних рекомендацій Організації економічного співробітництва і розвитку (ОЕСД) та Міжнародної конференції з гармонізації технічних вимог до реєстрації лікарських препаратів (ICH) [7].

Незважаючи на бурхливий розвиток альтернативних методів, досліді з використанням хребетних тварин є надійним підґрунтям для вивчення безпечності та ефективності лікарських засобів. Такі дослідження регулюються комплексом нормативно-правових актів, що мають гарантувати дотримання принципів гуманності та раціонального використання хребетних тварин. Оскільки сучасна наука не в змозі повністю відмовитись від досліджень з використанням хребетних тварин, необхідно прагнути до зменшення їх кількості в експерименті («reduction»), покращення умов утримання та використання («refinement»), надання переваги тваринам, що перебувають на нижчому шаблі еволюційного розвитку, або застосування альтернативних об'єктів і методів («replacement») [3].

Згідно з цими вимогами розроблені гармонізовані методичні рекомендації Організації економічного співробітництва і розвитку (ОЕСР) та Міжнародної конференції з гармонізації (ICH) щодо випробування безпеки (токсичності) різних речовин на живих системах (людини, тварин, екосистем) [4].

Упродовж останніх десятиліть підвищену увагу дослідників привертає пошук нових антигельмінтних препаратів рослинного походження, які мають широкий спектр дії, низьку токсичність і не спричиняють побічної дії на організм хребетних тварин. У зв'язку з цим, науковцями ДНДКІ ветпрепаратів розроблений фітопрепарат «Щитник» на основі кореневища чоловічої папороті (*Rhizoma Dryopteris filix-mas*), що пропонується для

профілактики та лікування цестодозів собак і котів [1]. Важливим етапом у створенні кожного препарату є токсикологічні дослідження як окремих його складників, так і готової лікарської форми. Дослідження токсичності починається з гострого досліду, котрий є першим етапом щодо небезпечності досліджуваної речовини в умовах короткотривалої дії та в результаті проведення якого передбачається отримання даних про смертельні дози [5].

Мета наших досліджень полягала у порівняльному аспекті визначення гострої токсичності протипаразитарного препарату «Щитник» класичним методом та згідно з вимогами ОЕСР.

Матеріали і методи

Встановлення середньосмертельної дози препарату «Щитник» визначали європейськими і класичним методами. За комплектування груп щурів різниця за масою не перевищувала 10 %. Препарат піддослідним тваринам вводили внутрішньошлунково натще за допомогою металевого зонду, одноразово. Для введення препарат розчиняли в ПЕГ-400 у співвідношенні 1:1. Спостереження за тваринами проводили протягом 14 діб.

Принцип методу визначення альтернативного класу гострої токсичності полягає у використанні 3-х тварин однієї статі на кожному етапі та заснований на біометричному оцінюванні [2, 6, 8] з фіксованими дозами, які розподілені за часом прийому так, щоб було можливо оцінити речовину за ступенем небезпеки і систематизувати результати (рис).

Рівень початкової дози має бути таким, щоб з найбільшою вірогідністю викликати загибель деяких з тварин, яким задавали один із чотирьох фіксованих рівнів доз (5, 50, 300 та 2000 мг/кг маси тіла). Згідно зі схемою досліджень, було визначено початкову дозу препарату, яка становила 2000 мг/кг маси тіла.

Клас небезпеки та величину середньосмертельних доз визначали згідно з УГС — узгодженою на глобальному рівні системою класифікації небезпеки та маркування хімічної продукції [4], яка розроблена спільно з Організацією економічного розвитку (ОЕСР).

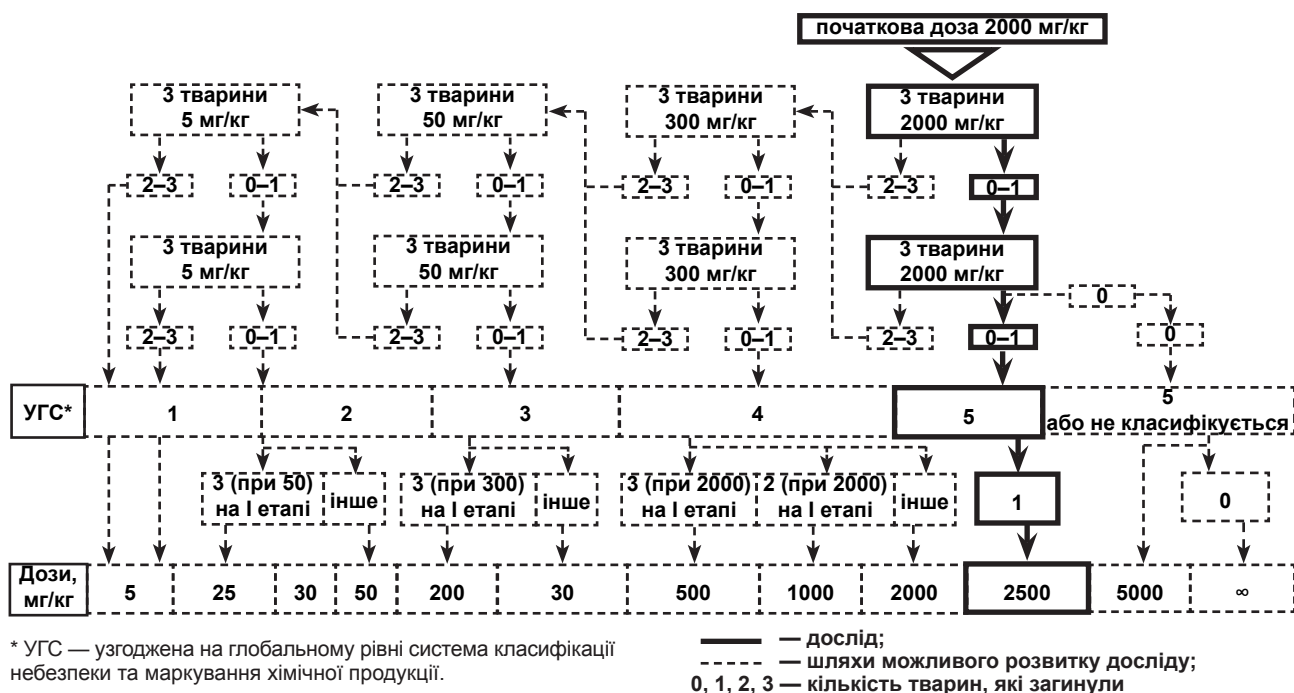


Рис. Схема проведення досліджень (тест № 423 ОЕСР) препарату «Щитник»
 Fig. Scheme of research (test number 423 OECD) of the drug “Shchytnyk”

За класичного методу визначення гострої токсичності експерименти проводили в два етапи: попередній та розширений. На попередньому етапі досліджень препарат вводили в дозах від 500 до 4500 мг/кг, з інтервалом 1000 мг/кг і на кожну дозу було використано по 3 лабораторні тварини. На розгорнутому етапі сформовано дослідні групи по 6 тварин в кожній. Препарат вводили в дозах від 5000 до 13000 мг/кг, з інтервалом 2000 мг/кг маси тіла тварин. Клас токсичності визначали згідно з СОУ 85.2-37-736:2011 [9].

Результати й обговорення

За умов вивчення токсичності препарату «Щитник» альтернативним методом, на першому етапі досліджень після введення препарату в дозі 2000 мг/кг дослідним тваринам загибелі не відзначали. На наступному етапі досліджень трьома тваринами повторно вводили препарат у дозі 2000 мг/кг. Оскільки проаналізувати екстраполяцію з одного виду тварин на інший неможливо, ми окремо вводили дослідним щурам препарат у дозі 5000 мг/кг.

Згідно з першими двома рівнями, загибель тварин не фіксували (рис.). Отже, згідно з класифікацією речовин за небезпекою, при

внутрішньошлунковому введенні препарат входить до V категорії ($2000 > DL_{50} > 5000$ мг/кг) згідно з класифікацією УГС.

За класичного методу досліджень на попередньому етапі гострого дослідження встановлено, що після введення препарату «Щитник» у дозах від 500 до 5000 мг/кг всі тварини залишались живими. На розширеному етапі встановлено короточасне пригнічення тварин, яким вводили максимально випробовувану досліджувану дозу — 13000 мг/кг (табл.). На наступну добу змін в клінічному стані та загибелі дослідних тварин не виявлено.

Отримані дані з визначення DL_{50} дозволяють віднести фітопрепарат «Щитник» до IV класу небезпеки і його характеризувати його як «малотоксичні сполуки» [9].

Отже, враховуючи швидкість проведення досліджень з визначення гострої токсичності європейським (альтернативним) методом, що передбачає використання меншої кількості тварин і дозволяє уникнути використання їх загибелі як кінцевої точки експерименту, ніж традиційні (класичні) методи, а також дозволяє ранжувати речовини таким шляхом, як і іншими методами дослідження з гострої токсичності, можна класифікувати цей метод як «експрес-метод» і рекомендувати

Результати гострого дослідження при внутрішньошлунковому введенні білим щурам препарату «Щитник»
The results of the acute experiment with intra gastric administration of drug «Dryopteris filix-mas» to white rats

Доза препарату, мг/кг Dose of drug, mg/kg	Кількість тварин у групі Number of animals in the group	Число загиблих тварин The number of dead animals		
		Всього Total	в % in %	середній час загибелі average time of death
500	3	0	0	0
1000	3	0	0	0
3000	3	0	0	0
5000	6	0	0	0
7000	6	0	0	0
9000	6	0	0	0
11000	6	0	0	0
13000	6	0	0	0

ти для досліджень ветеринарних препаратів, створених на основі дженериків.

Висновки

1. Препарат «Щитник» за альтернативного методу досліджень згідно з класифікацією УГС належить до 5 категорії небезпеки ($2000 > DL_{50} > 5000$ мг/кг).

2. Препарат «Щитник» за класичного методу досліджень згідно з класифікацією хімічних речовин за ступенем небезпеки належить до IV класу токсичності — малотоксичні речовини ($DL_{50} > 13000$ мг/кг).

3. Метод досліджень згідно з OECD за тестом № 423 є гуманним та економічно доцільним, основними його перевагами є відсутність необхідності визначення летального результату та застосування мінімальної кількості тварин для досліджень. Для встановлення класу токсичності та середньосмертельної дози препарату «Щитник» за класичним методом було використано 39 лабораторних тварин, а за європейським — 9.

Перспективи подальших досліджень.

З метою збереження тварин та дотримання біоетичних вимог згідно з європейськими стандартами, будуть проведені дослідження із визначення гострої токсичності ветеринарних лікарських засобів методом «Acute Oral Toxicity-Up-and-Down-Procedure (UDP)» OECD, Тест № 425.

1. Anti Phitopreparation “Shchytynyk” — dry extract derived alkaline hydrolysis method of male fern rhizome.: Ukraine Patent no. 64274. I. Ya. Kotsjumbas, J. M. Perig, R. Chomiak, O. G. Malyk. The applicant and patentee: State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, number u 2011 01040; appl. 10.11.2011; publ. 10.11.2011, Bull. no. 21, 4 p. (in Ukrainian)

2. Diener W., Schlede E. (1999) Acute Toxicity Class Methods: Alternatives to LD/LC50 Tests. AL-TEX 16, pp. 129–134.

3. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used with research and other scientific purposes. Strasbourg, 18 March 1986.

4. Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28 Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, P. 11.

5. Litvinov N. V, Filonenko M. A, Patrusheva, Frantsuzova S. B, Khrapak V. V. *Preclinical studies of drugs: Guidelines*. K., 2001, 527 p. (in Russian)

6. OECD Test no. 423 “Acute Oral Toxicity — Acute Toxic Class Method”.

7. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD) series on Principles of Good Laboratory Practice and compliance monitoring. No. 1. OECD Principles of Good Laboratory Practice (as revised in 1997). OECD Environmental Health and Safety Publications, Environment Directorate, ENV/MC/CHEM (98).17. Paris, OECD, 1998.

8. Schlede E., Mischke U., Roll R., Kayser D. (1992). A National Validation Study of the Acute-Toxic-Class Method — An Alternative to the LD50 Test. Arch. Toxicol. 66, pp. 455–470.

9. SOU 85.2-37-736:2011. Veterinary preparation. Determination of acute toxicity. Kyiv, Agricultural Policy, 2011, 16 p. (in Ukrainian)