

УДК:619:615.015.4

DOI: 10.52419/issn2072-2419.2022.3.68

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ТОЛТРАЗУРИЛА, ТИНИДАЗОЛА И ЛЕВАМИЗОЛА

Бутенко А.В.- асп. каф. терапии и фармакологии, Оробец В.А.- зав.каф. терапии и фармакологии, д.вет. н., проф., Киреев И.В.- проф. каф. терапии и фармакологии, д.биол. н., доц.

ФГБОУ ВО «Ставропольский государственный аграрный университет»

Ключевые слова: толтразурил, тинидазол, левамизол гидрохлорид, острая токсичность, субхроническая токсичность, раздражающее действие

Keywords: toltrazuril, tinidazole, levamisole hydrochloride, acute toxicity, subchronic toxicity, irritant effect



РЕФЕРАТ

В результате проведенных исследований установлено, что предлагаемый препарат на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида по среднесмертельной пероральной дозе в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 относится к четвертому классу опасности – вещества малоопасные. Для оценки острой токсичности препарата сформировали опытные и контрольные группы белых крыс линии Wistar массой тела 190.2 ± 5.92 грамм. Для исследования острой токсичности препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида готовили суспензию с использованием эмульгатора «Полисорбат 80». Приготовленную суспензию в разных дозировках вводили посредством внутрижелудочного зонда опытными животным и равный объем физиологического раствора контрольной группе белых крыс. При введении препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида в дозе 3745 мг/кг зафиксирована гибель двух крыс, что составляет 20% опытной группы №5. При введении препарата в дозе 5350 мг/кг зарегистрировано 5 павших животных или 50% опытной группы №8, а при введении 6420 мг/кг - 10 павших лабораторных животных, т.е. всех животных опытной группы №10. При регистрации массы тела белых крыс опытных и контрольных групп не установлено статистически достоверных различий показателей за весь период наблюдения. В то же время, необходимо отметить, что в группах опытных лабораторных животных, в которых испытывали препарат в дозе от 3745 мг/кг до 5885 мг/кг установлены в сравнении с контролем более низкие значения прироста массы тела. Установлено, что минимальная переносимая доза составляет 3210.0 мг/кг, LD16 – 3679.7 мг/кг, LD50 – 5029.0 мг/кг, LD84 – 6121.5 мг/кг, LD100 – 6420.0 мг/кг и SLD50 – ± 406 . Полученные данные позволяют перейти к изучению субхронической токсичности и раздражающего действия разработанного препарата.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение кишечных протозойных заболеваний собак является актуальной проблемой для предотвращения распространения зоонозных заболеваний. Например, кишечные паразитарные заболевания собак (*Strongyloides stercoralis*, *Ancy-*

lostoma ceylanicum, *Trichuris vulpis*, *Giardia duodenalis* и *Blastocystis hominis*), которые зарегистрировали у австралийских домашних собак, могут привести к инфицированию человека [3, 4, 5, 6, 7, 8]. В Австралии образцы фекалий домашних собак ($n = 300$) были собраны в обще-

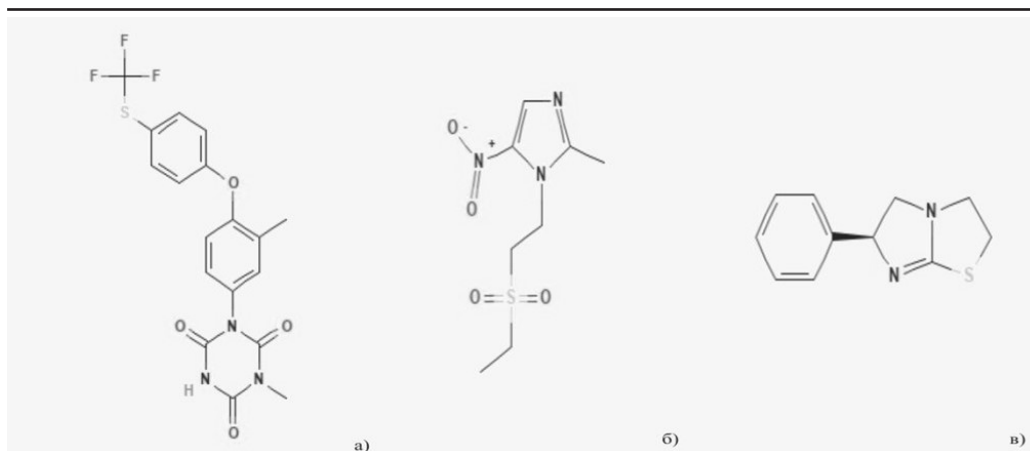


Рис. 1. Химическая структура: а) толтразурила, б) тинидазола, в) левамизола гидрохлорида

ственных местах и исследованы на наличие кишечных гельминтов и простейших с помощью прямой микроскопии и двух методов флотации. Обнаруженные кишечные паразиты включали *Ancylostoma* (25%), *Cystoisospora ohioensis* (9%), *Blas-tocystis hominis* (3%), *Giardia duodenalis* (3%), *Spirometra erinacei* (1%) и *Toxocara canis* (1%), *Sarcocystis* spp. (2%), *Cryptosporidium* spp. (2%) и *Cystoisospora canis* (1%) [6].

Для лечения собак инвазированных кишечными протозойными заболеваниями используют производные нитроимидазола (метронидазол, тинидазол, секнидазол и орнидазол), бензимидазолы (альбендазол, мебендазол), нитазоксанид, фуразолидон, хинакрин, хлорохин и паромомицин [9].

Тинидазол – это пероральный противомикробный препарат широкого спектра действия, используемый для лечения бактериальных, протозойных и паразитарных заболеваний. Тинидазол представляет собой 5-нитроимидазола с антипротозойными свойствами. Механизм действия полностью не изучен. Предполагается, что тинидазол метаболизируется с образованием нитрит-анионов и метронидазола. Токсичность тинидазола достигается за счет истощения сульфгидрильных групп и разрывов нитей ДНК с множе-

ственными попаданиями, имеющими аддитивный эффект и приводящий к гибели клеток (см. рис. 1) [11].

Толтразурил – ветеринарное лекарственное средство кокцидиостатик, 1-метил-3-[3-метил-4-[4-(трифторметилтио)фенокси]фенил]-1,3,5-триазинан-2,4,6-трион (см. рис.1) является симметричным соединением триазинетриона [10].

Левамизол гидрохлорид – антигельминтное средство, широко спектра для лечения паразитарных, вирусных и бактериальных инфекций. Левамизол представляет собой 6-фенил-2,3,5,6-тетрагидроимидазо[2,1-б][1,3]тиазол с S-конфигурацией (рисунок 2). Левамизол гидрохлорид используется (обычно в виде моногидрохлоридной соли) для лечения паразитарных инфекций у свиней, овец и крупного рогатого скота, а ранее использовался у людей в качестве адъюванта к химиотерапии для лечения различных видов рака (из-за его иммуномодулирующего действия) [12].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Изучение фармако-токсикологических параметров препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида проводили на базе лаборатории доклинических исследований факультета ветеринарной медицины Ставропольского государственного аграрного

Таблица №1

Схема внутрижелудочного введения препарата для определения острой токсичности

Название группы	Количество животных	Дозировка препарата, мг/кг
Опытная группа №1	10	1605
*Контрольная группа №1	10	1605
Опытная группа №2	10	2140
*Контрольная группа №2	10	2140
Опытная группа №3	10	2675
*Контрольная группа №3	10	2675
Опытная группа №4	10	3210
*Контрольная группа №4	10	3210
Опытная группа №5	10	3745
*Контрольная группа №5	10	3745
Опытная группа №6	10	4280
*Контрольная группа №6	10	4280
Опытная группа №7	10	4815
*Контрольная группа №7	10	4815
Опытная группа №8	10	5350
*Контрольная группа №8	10	5350
Опытная группа №9	10	5885
*Контрольная группа №9	10	5885
Опытная группа №10	10	6420
*Контрольная группа №10	10	6420

** Крысы контрольных групп получали равный объем физиологического раствора*

университета. Эксперименты на животных проводили согласно правилам, принятым Директивой 2010/63/ев Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года, по охране животных, используемых в научных целях (DIRECTIVE 2010/63/EU OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL on the protection of animals used for scientific purposes. 22 September 2010). Определение острой токсичности препарата проводили согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012) и Методические указания по токсикологической оценке новых препаратов для лечения и профилактики незаразных болезней животных (1087)[1-2].

Для оценки острой токсичности препарата сформировали опытные и контрольные группы белых крыс линии

Wistar массой тела 190.2 ± 5.92 грамм. Для исследования острой токсичности препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида готовили суспензию с использованием эмульгатора «Полисорбат 80». Приготовленную суспензию в разных дозировках вводили посредством внутрижелудочного зонда опытным животным и равный объем физиологического раствора контрольной группе белых крыс. Схема внутрижелудочного введения препарата на основе орнидазола и левамизола гидрохлорида контрольным и опытным группам белых крыс (см. табл. 1).

Статистическую обработку данных проводили с использованием операционной системы Arch Linux и программного обеспечения LibreOffice Calc Community, version: 7.1.8.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении острой токсичности

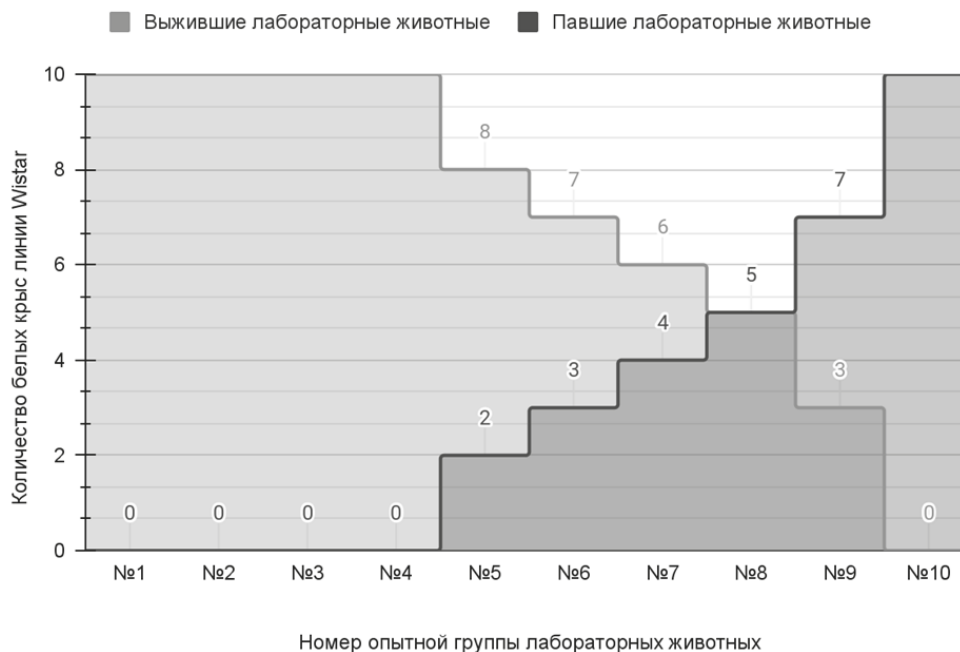


Рис. 2. Количество выживших и павших белых лабораторных животных при введении препарата

препарата установлено, что в контрольных №1 – 10 и опытных №1 – 4 группах не отмечено гибели лабораторных животных, а в опытных группах №5 – 10 зарегистрировано 31 случаев гибели белых крыс.

При введении препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида в дозе 3745 мг/кг зафиксирована гибель двух крыс, что составляет 20% опытной группы №5. При введении препарата в дозе 5350 мг/кг зарегистрировано 5 павших животных или 50% опытной группы №8, а при введении 6420 мг/кг - 10 павших лабораторных животных, т.е. всех животных опытной группы №10 (см. рис.2).

При наблюдении за клиническим состоянием и поведением лабораторных животных на фоне внутрижелудочного введения препарата установлено, что период до проявления признаков отравления составил от 10 минут до 16 часов. Зависимость времени наступления ле-

тального исхода от дозировки действующего вещества препарата.

Гибель лабораторных животных зарегистрирована после внутрижелудочного введения препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида в следующих дозировках: 3745 мг/кг в период от 480 до 960 минут, 4280 мг/кг в период от 60 до 480 минут, 4815 мг/кг в период от 30 до 240 минут, 5350 мг/кг в период от 30 до 240 минут, 5885 мг/кг в период от 10 до 60 минут и 6420 мг/кг в период от 10 до 60 минут (см. рис.3).

В контрольных №1 – 10 и опытных группах №1 – 4 не зарегистрировано нарушения поведенческих реакций лабораторных животных, видимых признаков интоксикации не отмечено.

В опытных группах №5 – 10 отмечено нарушение поведенческих реакций животных, которое проявлялось нарушением поедания корма и потребления воды, отсутствием реакций на внешний раздражитель. Острое отравление лабораторных

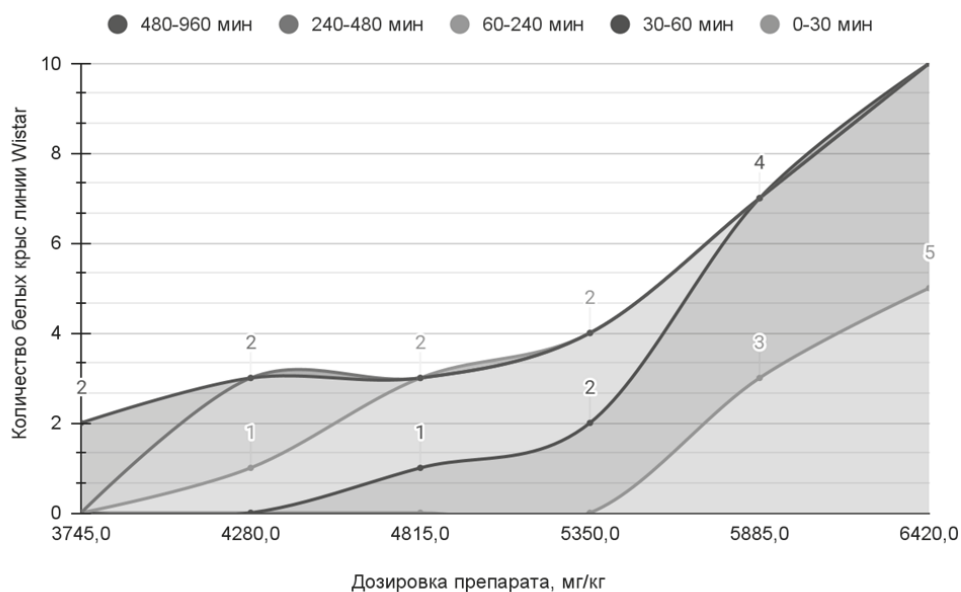


Рис. 3. Количество павших животных в зависимости от времени и дозировки препарата

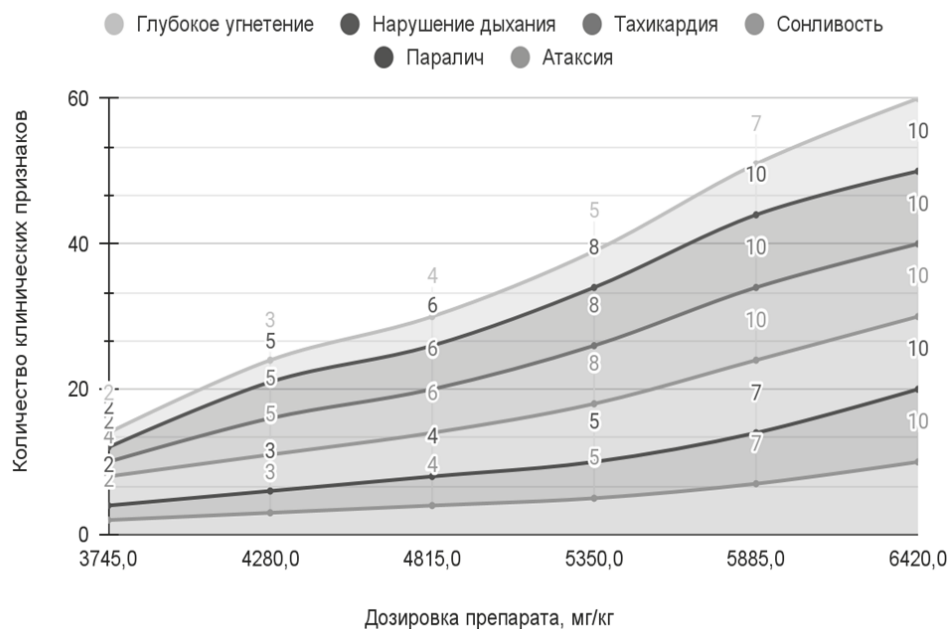


Рис. 5 – Сочетание клинических признаков лабораторных животных

Таблица 3

Результаты определения массы тела лабораторных животных (n=10)

Название группы	Хср±Δ					
	Исходная	1 сутки	3 сутки	7 сутки	9 сутки	14 сутки
Опытная группа №1	190.0±5.91	191.4±5.99	194.5±5.84	200.2±6.09	203.3±5.98	211.1±5.71
Контрольная группа №1	189.6±5.78	191.1±5.69	194.1±5.65	200.1±5.66	203.0±5.72	210.5±5.88
Опытная группа №2	191.5±4.48	193.0±4.35	196.1±4.3	202.0±4.28	205.2±4.16	212.8±4.01
Контрольная группа №2	194.5±5.46	196.0±5.57	198.9±5.61	204.9±5.83	207.9±5.93	215.4±6.08
Опытная группа №3	192.1±5.09	193.7±5.06	196.4±5.22	202.7±5.4	205.7±5.43	213.2±5.79
Контрольная группа №3	189.0±4.93	190.4±4.87	193.6±4.71	199.7±4.86	202.8±5.08	210.6±5.18
Опытная группа №4	188.0±3.85	189.6±4.01	192.7±4.12	198.8±4.41	201.6±4.25	209.2±4.03
Контрольная группа №4	191.5±6.09	193.0±6.04	196.1±6.03	201.8±6.15	204.9±6.2	212.5±5.97
Опытная группа №5	188.9±4.92	190.1±4.91	192.7±4.88	197.8±5.06	200.4±5.08	206.5±4.99
Контрольная группа №5	194.6±5.84	196.2±5.84	199.1±5.8	205.3±5.93	208.3±6.12	215.5±5.89
Опытная группа №6	191.6±3.5	192.8±3.51	195.4±3.49	200.4±3.45	202.8±3.36	209.0±3.41
Контрольная группа №6	191.9±6.19	193.3±6.14	196.5±6.19	202.6±6.14	205.6±6.15	213.0±6.11
Опытная группа №7	190.7±4.2	192.0±4.17	194.6±4.26	199.6±4.26	202.0±4.18	208.3±4.05
Контрольная группа №7	192.3±7.3	193.8±7.27	196.5±7.51	202.5±7.39	205.6±7.19	212.8±7.31
Опытная группа №8	187.0±6.16	188.1±6.18	190.3±6.16	194.8±6.07	197.0±6.11	202.5±6.18
Контрольная группа №8	188.5±4.08	190.0±4.07	193.3±3.98	199.4±4.34	202.4±4.37	209.7±4.43
Опытная группа №9	188.9±8.32	189.9±8.32	192.0±8.27	196.2±8.26	198.3±8.32	203.6±8.35
Контрольная группа №9	189.4±5.36	191.0±5.38	194.1±5.49	200.2±6.02	203.4±6.08	210.8±5.88
Опытная группа №10	-	-	-	-	-	-
Контрольная группа №10	-	-	-	-	-	-

* $p \leq 0,05$ – разница статистически достоверна в сравнении с показателями контрольной группы

животных сопровождалась следующими клиническими признаками: атаксия, паралич, угнетение, тахикардия, учащенное дыхание, которое становилось поверх-

ностным, прерывистым. Смерть наступала в состоянии глубокого угнетения (см. рис. 5).

Контроль массы тела лабораторных

Таблица 3

Расчет LD₅₀ действующих веществ толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида методом Миллера и Тейнтера

Название группы	Дозировка, мг/кг	Количество животных		Гибель, %	Соответствующие пробиты
		Выживших	Павших		
Опытная группа №1	1605	0	10	0	3.04
Опытная группа №2	2140	0	10	0	3.04
Опытная группа №3	2675	0	10	0	3.04
Опытная группа №4	3210	0	10	0	3.04
Опытная группа №5	3745	8	2	20	4.16
Опытная группа №6	4280	7	3	30	4.48
Опытная группа №7	4815	6	4	40	4.75
Опытная группа №8	5350	5	5	50	5.00
Опытная группа №9	5885	3	7	70	5.52
Опытная группа №10	6420	0	10	100	6.96

животных опытных и контрольных групп проводили до введения, на первые, третьи, седьмые, девятые и четырнадцатые сутки. Поскольку в опытной группе №10 погибли все лабораторные животные, и гибель наступила в период от 10 до 60 минут, данную группу в расчетах массы тела не учитывали (см. табл.3).

При регистрации массы тела белых крыс опытных и контрольных групп не установлено статистически достоверных различий показателей за весь период наблюдения. В то же время, необходимо отметить, что в группах опытных лабораторных животных, в которых испытывали препарат в дозе от 3745 мг/кг до 5885 мг/кг установлены в сравнении с контролем более низкие значения прироста массы тела.

Полученные результаты исследований острой токсичности препарата позволили рассчитать данные для определения зна-

чений летальных доз при внутрижелудочном введении препарата лабораторным животным (см. табл. 4). LD16 и LD84 рассчитывали при построении пробитного графика, где сопоставлены дозы эффекта и соответствующие пробиты (см. рис. 5).

Исходя из полученных данных препарат на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида по среднесмертельной пероральной дозе по ГОСТ 12.1.007–76 относится к четвертому классу опасности, вещества малоопасные (см. табл.5).

ВЫВОДЫ

Проведенное исследование фармако-токсикологических свойств препарата на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида позволяет говорить о том, что данный препарат не обладает выраженной острой токсичностью. Препарат на основе толтразурила, тинидазола и левамизола гидрохлорида по средне-

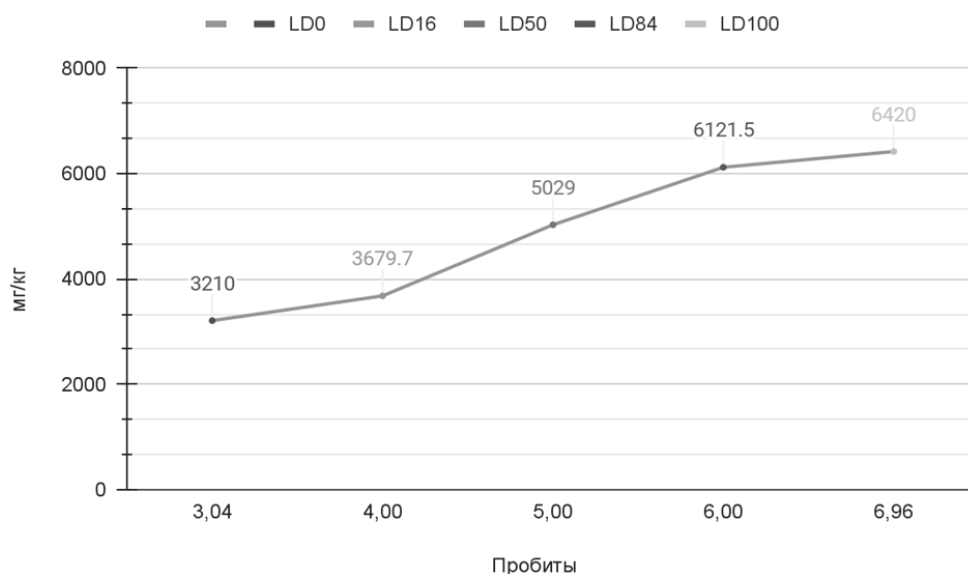


Рис. 5. Графическое отображение острой токсичности препарата

Таблица 5

Параметры острой токсичности препарата при внутрижелудочном введении, мг/кг

Вид животного	Параметры токсичности					SLD ₅ 0
	МПД	LD ₁₆	LD ₅₀	LD ₈₄	LD ₁₀₀	
Белые крысы	3210.0	3679.7	5029.0	6121.5	6420.0	±40.6

смертельной пероральной дозе по ГОСТ 12.1.007–76 (классификация и общие требования безопасности) относится к четвертому классу опасности, вещества малоопасные.

ACUTE TOXICITY STUDY BASED ON TOLTRAZURIL, TINIDAZOLE AND LEVAMISOLA.

Butenko A.V. Orobec V.A., Kireev I.V.

ABSTRACT

As a result of the studies, it was found that the proposed drug based on toltrazuril, tinidazole and levamisole hydrochloride according to the average lethal oral dose in accordance with GOST 12.1.007–76 belongs to the fourth hazard class - low-hazard substances. To assess the acute toxicity of the

drug, experimental and control groups of whites were formed. Wistar rats weighing 190.2 ± 5.92 grams. To study the acute toxicity of the drug based on toltrazuril, tinidazole and levamisole hydrochloride, a suspension was prepared using the Polysorbate 80 emulsifier. The prepared suspension in different dosages was administered through an intragastric tube to experimental animals and an equal volume of physiological saline was administered to the control group of white rats. With the introduction of a drug based on toltrazuril, tinidazole and levamisole hydrochloride at a dose of 3745 mg/kg, the death of two rats was recorded, which is 20% of the experimental group No. 5. With the introduction of the drug at a

dose of 5350 mg/kg, 5 dead animals or 50% of experimental group No. 8 were registered, and with the introduction of 6420 mg/kg - 10 dead laboratory animals, i.e. all animals of the experimental group No. 10. When registering the body weight of white rats of the experimental and control groups, no statistically significant differences were found in the indicators for the entire observation period. At the same time, it should be noted that in the groups of experimental laboratory animals in which the drug was tested at a dose of 3745 mg/kg to 5885 mg/kg, lower values of body weight gain were established in comparison with the control. The minimum tolerated dose was found to be 3210.0 mg/kg, LD16 - 3679.7 mg/kg, LD50 - 5029.0 mg/kg, LD84 - 6121.5 mg/kg, LD100 - 6420.0 mg/kg and SLD50 - ± 406 . The data obtained allow us to proceed to the study of subchronic toxicity and irritant action of the developed drug.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Миронова А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К, 2013. — 944
2. Самохин В.Т. Методические указания по токсикологической оценке новых препаратов для лечения и профилактики незаразных болезней животных, / утв. дир. института, д.б.н., проф. В.Т. Самохин, ВНИИНБЖ. 1987..
3. Jaleta T.G., Zhou S., Bemm F.M., Schär F., Khieu V., Muth S., Odermatt P., Lok J.B., Streit A. Different but overlapping populations of *Strongyloides stercoralis* in dogs and humans—Dogs as a possible source for zoonotic strongyloidiasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11 :e0005752.
4. Smout F.A., Skerratt L.F., Butler J.R.A., Johnson C.N., Congdon B.C., Thompson R.C.A. The hookworm *Ancylostoma ceylanicum* : An emerging public health risk in Australian tropical rainforests and Indigenous communities. *One Health.* 2017; 3 :66–69. doi: 10.1016/j.onehlt.2017.04.002.
5. Smout F., Schrieber L., Speare R., Skerratt L.F. More bark than bite: Comparative studies are needed to determine the importance of canine zoonoses in Aboriginal communities. A critical review of published research. *Zoonoses Public Health.* 2017; 64 :495–504. doi: 10.1111/zph.12354.
6. Gillespie S, Bradbury RS. A Survey of Intestinal Parasites of Domestic Dogs in Central Queensland. *Trop Med Infect Dis.* 2017;2(4):60. Published 2017 Nov 21. doi:10.3390/tropicalmed2040060
7. George S., Geldhof P., Albonico M., Ame S.M., Bethony J.M., Engels D., Mekonnen Z., Montresor A., Hem S., Tchuem-Tchuente L.A., et al. The molecular speciation of soil-transmitted helminth eggs collected from schoolchildren across six endemic countries. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2016; 110 :657–663.
8. Gordon C., Kursheid J., Jones M., Gray D., McManus D. Soil-transmitted helminths in Tropical Australia and Asia. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2017; 2 :56. doi: 10.3390/tropicalmed2040056.
9. Mørch, Kristine, b; Hanevik, Kurta, b Giardiasis treatment: an update with a focus on refractory disease, *Current Opinion in Infectious Diseases*: October 2020 - Volume 33 - Issue 5 - p 355-364 doi: 10.1097/QCO.0000000000000668
10. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 68591, Toltrazuril. Retrieved January 31, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Toltrazuril>.
11. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 5479, Tinidazole. Retrieved January 30, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Tinidazole>.
12. National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 26879, Levamisole. Retrieved January 30, 2022 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Levamisole>.