

Acute Toxicity Study Morpholinium 2-[5-(PYRIDIN-4-YL)-1,2,4-TRIAZOL-3-YLTHIO] Acetate in White Mice

Inna V. Bushueva¹, Evgeniy G. Knysh², Aleksandr I. Panasenko³

¹ Department of Clinical Pharmacy, Pharmacotherapy and Management and Pharmacy Economics of Faculty of Postgraduate Education, Zaporozh'ye State Medical University, 38 Stalevarov st., Zaporozh'ye, Ukraine

² Department Management and Pharmacy Economics, Medical and Pharmaceutical Commodity Research, Zaporozh'ye State Medical University, 26 Mayakovskiy Ave., Zaporozh'ye, Ukraine

³ Department of Toxicology and Inorganic Chemistry, Zaporozh'ye State Medical University, 26 Mayakovskiy Ave., Zaporozh'ye, Ukraine

Abstract

Creation of new low-emission and high domestic drugs with a wide spectrum of biological activity, which could compete with expensive imported drugs - one of the urgent tasks of pharmaceutical science. A key step in creating original drugs is directed synthesis of biologically active substances with pronounced pharmacological effect and low toxicity. Analysis of scientific literature over the last decade has shown that a great opportunity to create new and effective drug substances have heterocyclic compounds, in particular, derivatives of 1,2,4-triazole. Of particular interest is the morpholinium 2-[5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetate, as a substance with high pharmacological activity. Accordingly, the search for biologically active substances of 1,2,4-triazole, is relevant, has theoretical and practical significance. In the course of the study found that the investigated substance belong to the class of low-toxic or non-toxic compounds.

Keywords: morpholinium 2-[5-(pyridin-4-yl)-1,2,4-triazol-3-ylthio] acetate, acute toxicity, parameters of acute toxicity.

Створення та впровадження в практику нових малотоксичних та високоефективних вітчизняних лікарських засобів із широким спектром біологічної активності на основі цілеспрямованого пошуку нових малотоксичних та високоефективних сполук з потенційною протимікробною, протитуберкульозною, антиоксидантною, протизапальною, антигіпоксичною, гіполіпідемічною та іншими видами фармакологічної активності, які б могли конкурувати з дорогими імпортованими препаратами - одне із актуальних завдань фармацевтичної науки. Ключовим етапом створення оригінальних лікарських препаратів є цілеспрямований синтез біологічно активних речовин з вираженим

¹ Corresponding author. Department of Clinical Pharmacy, Pharmacotherapy and Management and Pharmacy Economics of Faculty of Postgraduate Education, Zaporozh'ye State Medical University, 38 Stalevarov st., Zaporozh'ye, Ukraine, 69035. Tel: +380961399843; e-mail address: valery999@ukr.net (I.V. Bushueva)

фармакологічним ефектом та низькою токсичністю. Аналіз науково-технічної літератури за останнє десятиріччя показав, що великі можливості для створення нових ефективних лікарських субстанцій надають гетероциклічні сполуки, зокрема, похідні 1,2,4-тріазолу. Ядро 1,2,4-тріазолу є структурним фрагментом багатьох синтетичних лікарських засобів з протигрибковою, антидепресивною, гепатопротекторною, ранозагоюючою, імуномодельюючою, противірусною активністю. Особливу зацікавленість викликають похідні 1,2,4-тріазолу, що містять як замісник 3-піридиновий фрагмент, оскільки поєднання в одній молекулі структурних фрагментів 1,2,4-тріазолу та 3-піридину може призвести до появи речовин із високою фармакологічною активністю. Виходячи з цього, пошук біологічно активних речовин серед похідних 1,2,4-тріазол-3-тіонів, що містять 3-піридиновий замісник, є актуальним, має теоретичну і практичну значимість [4,5,7,8,9].

Параметри гострої токсичності речовини морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату [2,3,11] вивчалися в експерименті з гострою приманкою статевозрілих лабораторних тварин: білих мишей, білих щурів і котів. Тварини забезпечувалися повноцінним раціоном живлення і відходом. Спостереження за станом тварин здійснювалося від моменту приманки і впродовж 7 діб після неї. Розрахунок параметрів гострої токсичності препарату вироблений графічним методом пробіт-аналіза Літчфілда і Уїлкінсона [1] методом В.Б. Прозоровського [10].

Досліджувана речовина вводилася шприцем внутрішньочеревно п'яти групам білих мишей в дозах 1,0; 2,5; 5,0; 12,0 і 25,0 г/кг маси тіла. Кожна дослідна група складалася з шести тварин. Впродовж терміну спостереження за тваринами після введення препарату спостерігалась загибель мишей в групах. Введення субстанції в дозі 25,0 г/кг викликало загибель всіх шести тварин. Доза речовини 12,0 г/кг призводила до загибелі п'яти мишей. Загибель половини тварин групи спостерігалась при введенні речовини в дозі 5,0 г/кг; при введенні морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату в дозі 2,5 г/кг

відбувалась загибель однієї миші групи, а доза 1,0 г/кг не викликала загибелі тварин цієї групи.

Результати експерименту оброблені по методу Літчфілда і Уїлкінсона і представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Результати внутрішньочеревної приманки білих мишей морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4- триазол-3-ілтю ацетатом

Дози г/кг	Ефект, що спостері гався	Відображення ефекту, що спостерігався		Очікуваний ефект		Різниця між ефектом, що спостерігався і очікуваним в%	Складова в X^2
		у пробітах	у %	у пробітах	у%		
1,0	0/6	2,63	0,9	3,07	2,7	1,8	0,036
2,5	1/6	4,03	16,7	4,12	19,0	2,3	0,0045
5,0	3/6	5,0	50,0	4,87	45,0	5,0	0,017
12,0	5/6	5,97	83,3	5,87	80,8	2,5	0,004
25,0	6/6	7,2	98,6	6,7	95,5	3,1	0,007

В результаті аналізу одержані величини токсикометричних параметрів речовини при внутрішньочеревному введенні мишам. Напівлетальна доза (ДЛ₅₀) складала: 5,5 (3,23*9,35) г/кг; ДЛ₀=1,8 г/кг; ДЛ₁₆=2,25 г/кг; ДЛ₈₄=12,5 г/кг; ДЛ₁₀₀=26,0 г/кг; при R=25; K=5; N=18; A=1,24; S=2,25 (1,50-3,37); fs=1,5; f_{лд50}=1,7 і P=0,05. Довірчі межі встановлені тільки для напівлетальної дози, тому що- f_{лду} не визначена через великий довірчий інтервал. Нами також досліджені параметри гострої токсичності даної речовини при внутрішньочеревному введенні білим щурам. Тваринам п'яти груп, що складаються з шести щурів кожна, внутрішньочеревно введено морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4- триазол-3-ілтю)ацетат в дозах: 1,6; 3,2; 4,5; 6,4 і 10,0 г/кг маси тіла. Впродовж періоду спостереження спостерігалась загибель тварин в групах в кількості: 0; 2; 3; 5 і 6

щурів відповідно введеним дозам. Результати роботи представлені в таблиці 2.

Таблиця 2.

Результати внутрішньочеревної приманки білих щурів морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4 - триазол-3-ілтію ацетатом

Дози г/кг	Ефект, що спостері- гався	Відображення ефекту, що спостерігався		Очікуваний ефект		Різниця між ефектом, що спостерігався і очікуваним в%	Складо- ва в X^2
		у пробітах	у %	у пробітах	у%		
1,6	0/6	2,67	1,0	3,07	2,9	1,9	0,013
3,2	2/6	4,57	33,3	4,12	29,8	3,5	0,0055
4,5	3/6	5,0	50,0	4,87	55,0	5,0	0,011
6,4	5/6	5,97	83,3	5,87	78,8	4,5	0,011
10,0	6/6	7,17	98,5	6,7	95,4	3,1	0,021

Побудова прямої дозволила визначити наступні параметри гострої токсичності морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-триазол-3-ілтію)ацетату білим щурам. Напівлегальна доза (ДЛ₅₀) склала: 4,25 (3,15-5,74) г/кг; ДЛ₀=1,76 г/кг; ДЛ₁₆=2,55 (1,73- 3,75) г/кг; ДЛ₈₄=7,0 (4,76-10,29) г/кг; ДЛ₁₀₀= 10,03 г/кг; при R=6,25; K=5; N=18; A=1,14; J_{ДЛ}=1,47; S=1,58 (1,23-2,02); f_s=1,28; f_{д50} і P=0,05.

Довірчі межі для ДЛ₀ і ДЛ₁₀₀ не встановлені через великий довірчий інтервал. Результати експерименту дозволили розробити розрахунок напівлетальної дози морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-триазол-3-ілтію)ацетату при внутрішньочеревному введенні білим щурам за методом В.Б. Прозоровського, яка склала 4,5(2,58-6,84) г/кг. При зіставленні одержаних напівлегальних доз, розрахованих різними методами, видно, що вони виявилися близькими по величині.

Величини напівлетальних доз при внутрішньочеревному введенні мишам та щурам дозволили визначити коефіцієнт видової чутливості (КВЧ):

$$KBЧ = \frac{4,25 \text{ г/кг}}{5,5 \text{ г/кг}} = 0,77 (1)$$

Величина KBЧ свідчить про відсутність видової чутливості або її слабкої дії для морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату.

Гостра токсичність морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату була також вивчена і при внутрішньошлунковому введенні білим щурам. Розчинена в дистильованій воді речовина спеціальним зондом та шприцем вводилася внутрішньошлунково білим щурам п'яти груп, які склалися з шести тварин в кожній групі. Дози, що вводилися, склали: 6,4; 13,0; 20,0; 25,0 і 35,0 г/кг маси тіла. У першій групі загибель тварин не спостерігалась, в другій - загинув один щур, в третій - три, в четвертій - п'ять і в п'ятій загинули всі тварини. Розрахунок напівлетальних доз проведений аналогічно попереднім експериментам. Результати представлені в таблиці 3.

Таблиця 3.

Результати внутрішньочеревної приманки білих щурів морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4 - тріазол-3-ілтіо ацетатом

Дози г/кг	Ефект, що спостері гався	Відображення ефекту, що спостерігалось		Очікуваний" ефект		Різниця між ефектом що спостерігався і очікуваним в %	Складова в X^2
		у пробітах	у % %	у пробітах	у %		
6,4	0/6	2,10	0,028	1,85	0,093	0,065	0,0002
13,0	1/6	4,03	16,7	3,90	13,6	3,1	0,008
20,0	3,6	5,00	50,0	5,13	55,0	5,0	0,011
25,0	5/6	5,97	83,3	5,8	78,8	4,5	0,012
35,0	6/6	7,20	98,6	6,72	95,7	2,9	0,018

Напівлегальна доза морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату при внутрішньошлунковому введенні щурам складала:

19,0 (14,50-24,89) г/кг; ДЛ₀=11,04 (6,28-16,06) г/кг; ДЛ₁₆=13,5 (10,71-17,01) г/кг; ДЛ₈₄=27,0 (21,43-34,02) г/кг; ДЛ₁₀₀=35,5 (21,87+56,0) г/кг; при R =5,47; K=5; N=12; A=1,07; f_{ДЛy}=1,26; S=1,4 (1,19-1,65); f_{ДЛ100}=1,60; f_{ДЛ50} =1,31 і P=0,05.

Розрахунок величини напівлегальної дози: речовини при внутрішньошлунковому введенні щурам по методу В.Б. Прозоровського встановив її величину на рівні 17,8(13,54-22,70) г/кг.

Величини напівлетальних доз, одержані різними методиками виявилися близькими. Як зазначалося вище, був також проведений експеримент з внутрішньовенним введенням морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілітіо)ацетату котам.

Чотирьом групам тварин внутрішньовенно був введений стерильний розчин препарату в дозі: 0,5; 0,8; 1,0 і 1,5 г/кг маси тіла. Кожна група складалась з шести котів. В результаті експерименту у першій групі загинув 1 кіт, у другій - три, в третій - чотири і в четвертій всі тварини. Результати приманки і розрахунок методом пробіт-аналіза представлені в таблиці 4.

Таблиця 4

**Результати внутрішньочеревної приманки котів морфоліній
2-(5-(4-піридил)-1,2,4 - триазол-3-ілітіо ацетатом**

Дози г/кг	Ефект, що спостерігався	Відображення ефекту, що спостерігався		Очікуваний" ефект		Різниця між ефектом що спостерігався і очікуваним у %	Складова в X ²
		у пробітах	у %	у пробітах	у %		
0,5	1/6	4,03	16,7	4,10	18,4	1,7	0,0021
0,8	3/6	5,00	50,0	4,80	42,2	7,8	0,038
1,0	4/6	5,43	66,6	5,10	54,0	12,6	0,065
1,5	6/6	6,64	95,0	5,98	83,6	11,4	0,095

В результаті розрахунків одержані наступні параметри гострої токсичності речовини при внутрішньовенному введенні котам:

$DL_{50}=0,92$ (0,56-1,57) г/кг; $DL_0=0,275$ г/кг; $DL_{16}=0,42$ г/кг; $DL_{84}=2,0$ г/кг; $DL_{100}=3,6$ г/кг при $S=2,15$ (0,98-4,73); $A=1,57$; $R=4,0$; $K=4,0$; $N=18,0$; $f_{EA50}=1,65$; $f_s=2,2$.

Через великий довірчий інтервал межі встановлені тільки для напівлетальної дози.

Клінічна картина отруєння морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетатом характеризувалася вираженою руховою загальмованістю, порушенням ритму і глибини дихання, порушенням ритму серцевої діяльності, ціанозом шкірних покривів, наявністю набряків.

При аутопсії тварин спостерігалось повнокров'я та набряклість легенів, наявність петехіальних крововиливів в тканини легенів, які місцями зливалися в крупніші. Печінка збільшена, повнокровна, відмічені крововиливи в печінкову тканину. Петехіальні крововиливи були зафіксовані в ниркових та надниркових тканинах.

По ходу шлунково-кишкового тракту відмічена наявність петехіальних крововиливів та розширення судин. Петлі кишечника декілька роздуті, що свідчить про порушення моторики кишечника. Малюнок головного мозку незначно згладжений, судини розширені, тканина мозку набрякла, повнокровна.

Таким чином, проведені дослідження свідчать, що напівлетальні дози для морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтію)ацетату при внутрішньочеревному введенні білим мишам складають 5,5(3,23-9,35) г/кг; при внутрішньочеревному введенні білим крисам - 4,25(3,15-5,77) г/кг; при внутрішньошлунковому введенні білим крисам - 19,0(14,50-24,89) г/кг; при внутрішньовенному введенні котам- 0,92 (0,56-1,57) г/кг маси тіла. Мінімальні токсичні дози (DL_0) склали: при внутрішньочеревному введенні білим мишам - 1,18 г/кг; внутрішньочеревному введенні білим щурам - 1,76 г/кг; внутрішньошлунковому введенні білим щурам - 10,04 (6,26-16,06) г/кг; при

внутрішньовенному введенні котам - 0,275 г/кг маси тіла. Максимальні токсичні дози (ДЛ₉₉) склали: при внутрішньочеревному введенні білим мишам -26,0 г/кг; при внутрішньочеревному введенні білим щурам 10,03 г/кг; при внутрішньошлунковому введенні білим щурам- 35,0 (21,87-г56,0) г/кг; при внутрішньовенному введенні котам - 3,6 г/кг.

Як видно з проведених результатів, величини параметрів гострої токсичності залежать від виду тварини і способу введення морфоліній 2-(5-(4-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтіо)ацетату.

Виходячи з класифікації хімічних речовин по класах токсичності С.Д. Заугольникова і співавторів [6] досліджувана речовина при внутрішньовенному введенні відноситься до помірно-токсичних, при внутрішньочеревному - малотоксичним, а при внутрішньошлунковому введенні до практично нетоксичних сполук.

REFERENCES / ЛІТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. Елементи кількісної оцінки фармакологічного ефекту // М.Л. Беленький/Л., 1963.- С. 97-106.
2. Гостра токсичність 5-R1-4-R2-тріазол-3-тіонів та їх S-похідних / А.С. Гоцуля, Ю.В. Маковик, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш // Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю “Досягнення в галузі аналітичної, судово-медичної, клінічної токсикології та наркології”. Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики: Зб.наук.ст. – Запоріжжя, 2007. – Вип. XX. – С. 42-47.
3. Деклараційний патент 11341 України, МПК С07D 231/00, А61К31/41. Морфолінієва сіль 5-(3-піридил)-1,2,4-тріазол-3-ілтіоацетатної кислоти, яка має упереджувальну дію щодо набряку мозку, викликаного широкосмуговою вібрацією / Книш Є.Г., Панасенко О.І., Маковик Ю.В., Сапегін І.Д., Мельнікова В.М. -№ u2005 06312; Заявл. 25.06.05; Опубл. 15.12.05, Бюл.№12.
4. Маковик Ю.В., Книш Є.Г., Панасенко О.І. 2-(5-Піридин-3-іл)-4-R-тріазол-3-ілтіо)-ацетатні кислоти та їх естери як біологічно активні сполуки // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики: Зб.наук.ст. – Запоріжжя, 2007. – Вип. XIX, т.ІІ. – С. 332-336.

5. 5-R-2,4-дигідро-1,2,4-триазол-3-тіоцтові кислоти та їх солі як біологічно активні сполуки / В.В. Парченко, Ю.В. Маковик, О.І. Панасенко, Є.Г. Книш, А.М. Леснича // Запоріж. мед. журн. – 2004. – №1, т.2. – С. 37-39.
6. Основи загальної промислової токсикології// під. Ред.. Н.А. Толоконцева і В.А. Філова/Л., Медицина, 1976.- 303с.
7. Перспективное направление поиска биологически активных веществ среди 5-R-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тиоуксусных кислот и их солей / В.В. Парченко, Ю.В. Маковик, А.Г. Каплаушенко, А.Н. Леснича // Матеріали всеукр. наук.-практ. конф. студ. та молодих вчених “Актуальні проблеми клінічної, експериментальної, профілактичної медицини та стоматології” (66 ітог. конф. СНТ ім. М.Д. Довгялло): Тези доп. – Донецьк, 2004. – С. 185-186.
8. Перспективы синтеза новых биоактивных производных 4-амино, 3-моно (3,5-дибром)-1,2,4-триазолов и 5-R-2,4-дигидро-1,2,4-триазол-3-тионов / В.В. Парченко, А.Г. Каплаушенко, Ю.В. Маковик, В.А. Явдокименко, И.Т. Кшановский, А.А. Шмалько // Материалы всеукр. науч.-практ. конф. с междунар. участием “Лекарства – человеку. Современные проблемы создания, исследования и апробации лекарственных средств”. 3 февраля 2005г. – Х., 2005. – С.316.
9. Поиск биологически активных соединений среди 2-[(5-пиридил)-1,2,4-тиазол-3-илтио]-уксусной кислоты и ее производных / Ю.В. Маковик, А.И. Панасенко, Е.Г. Книш, А.Н. Леснича, А.А. Свинтозельский // Материалы всеукр. науч.-практ. конф. с междунар. участием “Лекарства - человеку”. 6 декабря 2004г. – Х., 2004. – С. 96-97.
10. Прозоровський В.Б. Табличний метод визначення ЛД₅₀ речовини з низькою біологічною активністю// В.Б. Прозоровський, М.І. Прозоровська /Фармакологія і токсикологія – 1989.- XIII, №6, С.733-735.
11. Синтез биологически активных веществ на основе 3-моно и 3,4-дизамещенных 1,2,4-триазолин-5-тионов / А.И. Панасенко, В.В. Парченко, Ю.В. Маковик, Е.Г. Книш, В.П. Буряк, М. Г. Бакуменко, А.Н. Леснича // Актуальні питання фармац. та мед. науки та практики: Зб. наук. ст. – Запоріжжя, 2003. – Вип. X. – С.77.