

СКРИНІНГОВЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ГІПОГЛІКЕМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ТВЕРДОЇ ДИСПЕРСІЇ ТІОКТОВОЇ КИСЛОТИ ТА ВИЗНАЧЕННЯ ЇЇ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ

Ковалевська І.В., Рубан О.А., Кононенко Н.М., Чикіткіна В.В.

Національний фармацевтичний університет, м. Харків, Україна,

inga.kovalevskaya@gmail.com

Резюме.

Актуальність. Тіоктова кислота займає важливе місце в утилізації вуглеводів і здійсненні нормального енергетичного обміну, що покращує «енергетичний статус» клітини. Оскільки тіоктова кислота необхідна для підтримки окислення карбонових кислот в циклі Кребса, вона бере участь в регулюванні ліпідного та вуглеводного обміну, сприяє зниженню концентрації глюкози в крові і збільшенню вмісту глікогену в печінці.

Метою роботи було скринінгове дослідження гіпоглікемічної дії твердої дисперсії тіоктової кислоти (ТДТК), розробленої на кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету.

Матеріал та методи. Дослідження проведено на білих безпородних щурах масою 160-180 г, які утримувались у розпліднику віварію Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ згідно з санітарно-гігієнічними нормами. Усі досліди виконувалися з дотриманням загальних етичних принципів щодо проведення експериментів на тваринах.

Результати дослідження. Встановлено, що ТДТК на моделі інсулінорезистентності у щурів чинить виражений антигіперглікемічний ефект у дозах 40 та 50 мг/кг. У результаті проведеного дослідження встановлена LD_{50} ТДТК – 7000 мг/кг. Згідно з класифікацією речовин за токсичністю, ТДТК відноситься до V класу токсичності речовин (практично нетоксичні речовини).

Висновки. У процесі дослідження виявлено, що тверда дисперсія тіоктової кислоти у дозі 40, яка відповідають середній терапевтичній добовій дозі тіоктової кислоти 600 мг/добу, спричиняє виражений достовірний антигіперглікемічний ефект.

Ключові слова: тверді дисперсії, тіоктова кислота, гіпоглікемічна дія

Вступ. Тіоктова кислота (1,2-дитіолан-3-пентанова кислота), «вітамін N», є невід'ємною частиною клітин організму, що вивільняють енергію аеробним шляхом [1]. Вона чинить потужну антиоксидантну дію, яка полягає в здатності безпосередньо видаляти вільні радикали, відновлювати ендogenous антиоксиданти, такі як глутатіон, аскорбінову кислоту і вітамін Е. Крім того, тіоктова кислота займає важливе місце в утилізації вуглеводів і здійсненні нормального енергетичного обміну, що покращує «енергетичний статус» клітини. Оскільки тіоктова кислота необхідна для підтримки окислення карбонових кислот в циклі Кребса, вона бере участь у регулюванні ліпідного та вуглеводного обміну, сприяє зниженню концентрації глюкози в крові і збільшенню вмісту глікогену в печінці [2]. Вказані властивості

обумовлюють її застосування у комплексній терапії цукрового діабету II типу (ЦД).

Метою даної роботи було скринінгове дослідження гіпоглікемічної дії твердої дисперсії тіоктової кислоти (ТДТК) [3,4], розробленої на кафедрі заводської технології ліків Національного фармацевтичного університету.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження проведено на білих безпородних щурах масою 160-180 г, які утримувались у розпліднику віварію Центральної науково-дослідної лабораторії НФаУ згідно з санітарно-гігієнічними нормами. Усі досліди виконувалися з дотриманням загальних етичних принципів щодо проведення експериментів на тваринах.

За даними літератури фармакологічні ефекти тіоктової кислоти розвиваються при

введенні у досить високих дозах – 300-600 мг/добу. Тому для вивчення гіпоглікемічних властивостей ТДТК було обрано дозу, яка була розрахована за методом Риболовлева [5], виходячи з добової дози для людини (600 мг/добу) і склала для щурів 40 мг/кг. Крім того, з метою розширення уявлень про гіпоглікемічну дію ТДТК, в експериментах використовували дози 30 та 50 мг/кг. Дослідження проводили порівняно з антидіабетичним засобом з групи бігуанідів – таблетками метформіну САНДОЗ® (Лек С. А., Польща), доза якого також розрахована за методом Риболовлева, виходячи з добової дози для людини (1000 мг/день) і склала для щурів 60 мг/кг.

Однією з токсикологічних характеристик фармакологічного препарату є показник середньолетальної дози, який визначається при вивченні гострої токсичності. Дослідження проведено на 30 білих нелінійних мишах-самцях та самках масою 18-25 г. Тварин утримували на стандартному раціоні в звичайних умовах віварію ЦНДЛ НФаУ. Всі маніпуляції були проведені згідно з положенням про використання тварин в біомедичних дослідах (Страсбург, 1986 р. зі змінами, внесеними в 1998 р.), «Загально етичними принципами експериментів на тваринах» (Київ, 2001), які узгоджені з положеннями «Європейської конвенції по захисту

хребетних тварин, яких використовують для експериментальних і наукових цілей».

З метою відтворення клініки гострого отруєння і для визначення середньолетальної дози (ЛД₅₀) гостру токсичність твердої дисперсії тіоктової кислоти (ТДТК) вивчали за допомогою методу Кербера [6].

Отримані експериментальні дані обробляли за допомогою стандартного пакету статистичних програм «Statistica 6,0», відмінності вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення.

На першому етапі визначали можливу гіпоглікемічну дію ТДАЛК за умови її одноразового уведення [7]. Гіпоглікемічний ефект оцінювали за здатністю ТДАЛК знижувати рівень глюкози у крові через 60 та 120 хвилин після її внутрішньошлункового уведення натще у дозах 30, 40, та 50 мг/кг.

Рівень глюкози у крові тварин визначали глюкозооксидазним методом з використанням наборів хімічних реактивів «Д-глюкоза», виробництва «Філісіт-Діагностика» (Україна).

Результати експерименту показали, що одноразове введення ТДТК в дозах 30, 40 та 50 мг/кг незначно змінювало концентрацію глюкози у крові (табл. 1).

Таблиця 1

Результати вивчення гіпоглікемічної дії ТДАЛК при однократному введенні нормоглікемічним щурам, ($M \pm m$), $n = 6$

Групи тварин	Рівень глікемії (ммоль/л)		
	вихідні дані	60 хв	120 хв
Контроль	4,47±0,22	4,37±0,19	4,12±0,29
ТДТК, 30 мг/кг	4,21±0,18	4,15±0,22	3,85±0,26
ТДТК, 40 мг/кг	4,38±0,26	4,24± 0,31	4,03±0,19
ТДТК, 50 мг/кг	4,25±0,30	4,08±0,24	3,89±0,24
Метформін, 60 мг/кг	4,39±0,26	3,72±0,22	3,36±0,31*

Примітка:

* – відмінності статистично значущі щодо вихідних даних, $p < 0,05$.

Проте, під дією препарату порівняння на 60-й хвилині спостерігали тенденційне зниження вмісту глюкози на 15,3%, через 120 хвили розвивався достовірний гіпоглікемічний ефект на 23,4% порівняно з вихідними даними (табл. 1).

Таким чином, на підставі отриманих даних можна зробити висновок про незначний ступінь гіпоглікемічної дії натще при однократному уведенні ТДТК у дозах 30, 40, 50 мг/кг.

Метою наступного фрагменту роботи стало визначення умовнотерапевтичної дози ТДАЛК за антигіперглікемічною дією на моделі порушення толерантності до глюкози, яку відтворювали за допомогою дексаметазону. Відомо, що введення надмірних доз дексаметазону 3-місячним щурам призводить до розвитку інтолерантності до глюкози, інсулінорезистентності та гіперінсулінемії, але не викликає змін в базальній глікемії, тобто відтворює стан переддіабету. Дексаметазон вводили підшкірно у дозі 0,125 мг/кг протягом 13 діб щурам масою тіла 180-200 г. Тварини були розподілені на такі групи: інтактний контроль; контрольна патологія (КП) – тварини, які отримували

дексаметазон; 3 групи щурів, які на тлі дексаметазону отримували ТДТК у дозах 30, 40 та 50 мг/кг; група щурів, яким на тлі дексаметазону вводили препарат порівняння метформін дозою 60 мг/кг. На 14-й день у тварин вимірювали базальну глікемію та проводили оральний тест толерантності до глюкози (ОТТГ). Для цього щурам після нічного голодування (16-18 годин) вводили перорально розчин глюкози з розрахунку 3 г/кг. Проби крові для визначення рівня глюкози відбирали з хвостової вени до та через 30, 60, 120 хвилин після навантаження глюкозою [8].

Про антигіперглікемічну активність свідчила здатність ТДТК знижувати рівень глікемії на 30-й хвилині ОТТГ. Крім того, антигіперглікемічну дію ТДТК при проведенні ОТТГ оцінювали за інтегральним показником глікемії – площею під глікемічними кривими (*glycemic area under curve, AUC_{glu}* (ммоль/л·хв), яку розраховували за допомогою пакета статистичних програм "MedCalc, v. 9.3.7.0".

Результати експерименту наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Антигіперглікемічна дія ТДАЛК у щурів з інтолерантністю до глюкози за умови ОТТГ, (M ± m), n = 6

Групи тварин	Рівень глікемії (ммоль/л)				
	вихідні дані	30 хв	60 хв	120 хв	AUC _{glu} , ммоль/л·хв
Інтактний контроль	4,28±0,34	6,96±0,45*	5,83±0,31*	4,65±0,35	314,49±17,33
Контрольна патологія	4,56±0,30	14,39±0,42**/p	12,52±0,44**/p	7,13±0,38**/p	488,15±22,61**
ТДАЛК, 30 мг/кг	3,96±0,25	11,06±0,44**/p/m	7,69±0,42**/p/m	6,54±0,31**/p/m	365,43±20,91 ^p
ТДАЛК, 40 мг/кг	4,48±0,36	10,61±0,46**/p	7,34±0,40**/p	5,28±0,35 ^p	351,23±21,36 ^p
ТДАЛК, 50 мг/кг	4,26±0,31	10,82±0,53**/p	7,16±0,42 **/p	5,23±0,47 ^p	337,82±21,64 ^p
Метформін, 60 мг/кг	4,42±0,35	9,35±0,52**/p	6,15±0,29 ^p	5,17±0,34 ^p	317,62±21,68 ^p

Примітки: 1. * – відмінності достовірні по відношенню до вихідних даних, p<0,05;

2. ** – відмінності достовірні по відношенню до значень інтактного контролю, p<0,05;

3. p – відмінності достовірні по відношенню до значень контрольної патології, p<0,05;

4. m – відмінності достовірні по відношенню до значень метформіну, p<0,05.

Відповідно до отриманих даних рівень базальної глікемії у 3-місячних щурів з групи контрольної патології (КП) на 14-ту добу достовірно не відрізнявся від такого у тварин з групи інтактного контролю (ІК) (табл. 2).

Однак, при проведенні ОТТГ визначено суттєве порушення толерантності до глюкози, про що свідчило різке підвищення в 3,2 рази рівня глюкози на 30-й хвилині після вуглеводного навантаження та збереження її протягом всього тесту на рівні, що значно перевищує рівень ІК. Така динаміка глікемії у крові тварин з групи КП протягом тесту відображалася статистично достовірним підвищенням AUC_{glu} щодо значень ІК (табл. 2).

За умови тривалого введення ТДТК спостерігали достовірне зниження рівня постпрандіальної гіперглікемії, викликаній навантаженням глюкози порівняно з показниками групи КП.

На 30-й хвилині ОТТГ, у час максимального підйому рівня глюкози у крові експериментальних щурів у відповідь на пероральне вуглеводне навантаження, у групах тварин, що отримували ТДТК констатували достовірне зниження рівня глікемії на 21%, 26,3% та 24,8% відповідно.

Отримані дані відповідають помірному антигіперглікемічному ефекту, за виразністю якого ТДТК у дозах 40 та 50 мг/кг не поступалася препарату порівняння метформіну, ефект якого в перший термін спостереження склав 35% порівняно з КП.

В наступні часові проміжки тестування встановлено, що ТДТК в дозах 40 та 50 мг/кг в однаковій мірі достовірно на рівні метформіну запобігала розвитку гіперглікемії, спричиненої введенням глюкози на порівняно з КП. Підтвердженням антигіперглікемічного ефекту ТДТК були і результати порівняльного аналізу площини під глікемічними кривими AUC_{glu}, що є інтегральним параметром оцінки навантаження глюкозою. Значення AUC_{glu} у групах тварин, яким вводили ТДТК у всіх дозах – 30, 40 та 50 мг/кг, та препарат

порівняння метформін, були достовірно меншими за значення AUC_{glu} тварин з групи КП (табл. 2).

Отже, узагальнюючи отримані дані можна зробити висновок про те, що ТДТК у дозах 30, 40 та 50 мг/кг, які відповідають середнім терапевтичним добовим дозам тіоктової кислоти для перорального застосування у людини – 500, 600 та 700 мг/добу, на моделі інсулінорезистентності у щурів чинить виражений антигіперглікемічний ефект у дозах 40 та 50 мг/кг, який достовірно не відрізняється від дії метформіну.

Для встановлення LD₅₀ ТДТК її вводили одноразово внутрішньошлунково у вигляді водного розчину одноразово 5 групам мишей по 6 у кожній. Вводили 5 доз, включаючи дозу, яка не викликає загибелі жодної тварини, і дозу, що викликає загибель всіх тварин у групі.

Про ступінь токсичності ТДТК судили за зміною загального стану тварин. Спостереження за тваринами вели протягом 14 днів.

Із результатів, наведених у табл. 3, загибель тварин настає при введенні ТДТК дозою 6000 мг/кг. Клінічна картина інтоксикації характеризувалася збудженням, у подальшому тварини приймали бічне положення, загибель тварин супроводжувалася судомами. У мишей, які залишились живими ознак інтоксикації не спостерігали: тварини були охайними, активними, із задовільним апетитом, реагували на звукові і світлові подразники, процеси сечовиділення і дефекації були у нормі, порушення дихання та судом не спостерігали. Рефлекторна збудливість у всіх тварин була збережена.

Оскільки у експерименті не отримали прямопропорційної залежності загибелі тварин від дози досліджуваного засобу, значення LD₅₀ розраховували з використанням методу Кербера [8].

Середньосмертельну дозу розраховують за формулою: $LD_{50} = LD_{100} - zd/6$. Оскільки LD₁₀₀ дорівнює 10000 мг/кг, LD₅₀ ТДАЛК складає 7000 мг/кг.

Таким чином, у результаті проведеного класу токсичності речовин (практично дослідження встановлена ЛД₅₀ ТДТК – нетоксичні речовини). 7000 мг/кг. Згідно з класифікацією речовин за токсичністю [6], ТДТК відноситься до V

Таблица 3

Результати дослідження гострої токсичності ТДТК на мишах при внутрішньошлунковому введенні

№ п/п	Доза, мг/кг	Летальність, кількість тварин	Середня летальність між сусідніми дозами, z	Шаг між дозами, d	z*d
1.	5000	0	1,5	1000	1500
2.	6000	5	3,5	1000	3500
3.	7000	2	3	1000	3000
4.	8000	4	5	2000	10000
5.	10000	6			
Сума					18000

Висновки.

У результаті фармакологічного скринінгу на моделі інсулінорезистентності у щурів, індукованої дексаметазоном, встановлено, що тверда дисперсія тіоктової кислоти у дозах 40 та 50 мг/кг, які відповідають середнім терапевтичним добовим дозам тіоктової кислоти 600 та 700 мг/добу, спричиняє виражений достовірний антигіперглікемічний ефект. За результатами вивчення гострої токсичності твердої дисперсії тіоктової кислоти ЛД₅₀

складає 7000 мг/кг, що дозволяє віднести її до V класу токсичності речовин – практично нетоксичні речовини.

Перспективи подальших досліджень.

Отримані результати доцільно використати при подальших дослідженнях при створення твердих лікарських форм з підвищеною біодоступністю з тіоктовою кислотою для лікування цукрового діабету II типу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Беловол А.Н. Князькова И.И. Альфа-липоевая кислота: от фармакологических свойств к клиническому применению. Ліки України. 2015; 7(93): 4 – 10.
2. Маев И.В., Дичева Д.Т., Андреев Д.Н. Роль тиоктовой (α-липоевой) кислоты в терапии неалкогольной жировой болезни печени. Гастроэнтерология. 2011; №2: С. 48-50.
3. Kovalevska, I. V. Ruban O. A. Development of the methodological approach of obtaining preparations based on solid dispersions Scientific Journal «ScienceRise: Pharmaceutical Science». 2018; 4(14): 4-8. doi: 10.15587/2519-4852.2018.140756.
4. Ковалевская И.В. Рубан Е. А., Кутовая О. В. Исследование свойств твердых дисперсий тиоктовой кислоты, полученных жидкофазным методом Вестник фармации (Белоруссия). 2018; 1 (79): С.47 – 53.
5. Рыболовлев Ю. Р., Рыболовлев Р. С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности. Доклады АН СССР. 1979; Т. 247, №6: 1513–1516.
6. Сидоров К.К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения.- В кн.: Токсикология новых промышленных химических веществ.- М., 1973 Вып. 13: 47-57.
7. Бельский М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Л., 1963. 152 с.

8. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод. рекомендації / [за ред.: член-кор. АМН України О.В. Стефанова]. К: Авіцена, 2001. 528 с.

REFERENCES

1. Belovol A.N. Knyazkova I.I. Alpha-lipoic acid: from pharmacological properties to clinical use. *Liki Ukraine*. 2015; 7 (93): 4–10.
2. Maev I.V., Dicheva D.T., Andreev D.N. The role of thioctic (α -lipoic) acid in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2011; No. 2: S. 48-50.
3. Kovalevska, I.V. Ruban O. A. Development Journal of ScienceRise: Pharmaceutical Science. 2018; 4 (14): 4-8. doi: 10.15587 [/2519-4852.2018.140756.
4. Kovalevskaya I.V. Ruban E. A., Kutovaya O. V. Investigation of the properties of solid dispersions of thioctic acid, obtained by the liquid-phase method. *Vestnik Farmatsii (Belarus)*. 2018; 1 (79): C.47-53.
5. Rybolovlev Yu. R., Rybolovlev R. S. Dosing of substances for mammals according to the constants of biological activity. *Reports of the USSR Academy of Sciences*. 1979; T. 247, No. 6: 1513–1516.
6. Sidorov K.K. On the classification of the toxicity of poisons with parenteral routes of administration.- In the book: *Toxicology of new industrial chemicals*.- M., 1973 Iss. 13: 47-57.
7. Belenky M. L. Elements of quantitative evaluation of the pharmacological effect. L., 1963. 152 p.
8. Pre-clinical research of drugs: method. recommendations / [ed.: Corresponding member AMS of Ukraine O.V. Stefanova]. K: Avicenna, 2001. 528 p.

СКРИНИНГОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЙ СВОЙСТВ ТВЁРДЫХ ДИСПЕРСИИ ТИОКТОВОЙ КИСЛОТЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЕЁ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ

Ковалевская И.В., Рубан Е.А., Кононенко Н.Н., Чикиткина В.В.

Национальный фармацевтический университет, Харьков, Украина

inga.kovalevskaya@gmail.com

Украинский журнал клинической и лабораторной медицины. 2018; 13(4): 28-34.

Резюме.

Актуальность. Тиоктовая кислота занимает важное место в утилизации углеводов и осуществлении нормального энергетического обмена, улучшает «энергетический статус» клетки. Поскольку тиоктовая кислота необходима для поддержания окисления карбоновых кислот в цикле Кребса, она участвует в регулировании липидного и углеводного обмена, способствует снижению концентрации глюкозы в крови и увеличению содержания гликогена в печени.

Целью работы было скрининговое исследование гипогликемического действия твердой дисперсии тиоктовой кислоты (ТДТК), разработанной на кафедре заводской технологии лекарств Национального фармацевтического университета.

Материал и методы. Исследование проведено на белых беспородных крысах массой 160-180 г которые содержались в питомнике вивария Центральной научно-исследовательской лаборатории НФаУ согласно санитарно-гигиеническим нормам. Все опыты выполнялись с соблюдением общих этических принципов по проведению экспериментов на животных.

Результаты исследования. Установлено, что ТДТК на модели инсулинорезистентности у крыс оказывает выраженный антигипергликемический эффект в дозах 40 и 50 мг / кг. В результате проведенного исследования установлено ЛД₅₀ ТДТК - 7000 мг / кг.

Выводы. В процессе исследования выявлено, что твердая дисперсия тиоктовой кислоты в дозе 40, которая соответствуют средней терапевтической дозе тиоктовой кислоты 600 мг / сут, вызывает выраженный достоверный антигипергликемический эффект. Согласно классификации веществ по токсичности, ТДТК относится к V классу токсичности веществ.

Ключевые слова: твердые дисперсии, тиоктовая кислота, гипогликемична действие

SCREENING STUDY OF HYPOGLYCEMIC PROPERTIES OF THIOCTIC ACID SOLID DISPERSION AND DETERMINATION OF ITS ACUTE TOXICITY

Kovalevska I.V., Ruban O.A., Kononenko N.M., Chikitkina V.V.

National University of Pharmacy, Kharkiv, Ukraine

inga.kovalevskaya@gmail.com

Ukrainian journal of Clinical and Laboratory Medicine. 2018; 13(4): 28-34.

Abstract.

Background. Thioctic acid plays an important role in the utilization of carbohydrates and the implementation of normal energy metabolism, which improves the "energy status" of cells. Since thioctic acid is needed to support the oxidation of carboxylic acids in the Krebs cycle, it is involved in regulating lipid and carbohydrate metabolism, contributes to lowering blood glucose concentration and increasing liver glycogen content.

The purpose of the work was to screen the hypoglycemic action of thioctic acid solid dispersion (TASD), developed at the Department of Plant Technology of Medicines of the National University of Pharmacy.

Material and methods. The study was conducted on white non-breeding rats weighing 160-180 g, which were kept in the nursery of vivarium of the Central Research Laboratory of NUPh in accordance with sanitary and hygienic standards. All experiments were carried out in compliance with the general ethical principles for carrying out experiments on animals.

Research results. It has been established that TASD has an expressed antihyperglycemic effect on the insulin resistance model in rats at doses 40 and 50 mg / kg. As a result of the study, LD 50 of TASD has been established as 7000 mg / kg. According to the classification of substances for toxicity, TASD is a class V toxic substance (practically non-toxic substances).

Conclusions. The study has revealed that the solid dispersion of thioctic acid at a dose of 40, which corresponds to an average therapeutic dose of thioctic acid of 600 mg / day, causes a pronounced reliable antihyperglycemic effect.

Key words: solid dispersion, thioctic acid, hypoglycemic action

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: author has no conflict of interest to declare.

*Надійшла 11.09.2018 р.
Рецензент: проф. О.П.Гудзенко*