<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-101-105>
УДК 615.21

Оригинальная статья / Research article

Изучение острой токсичности и раздражающего действия назального спрея налтрексона гидрохлорида

Ю. М. Домнина^{1,2*}, В. В. Суслов^{1,2}, С. А. Кедик^{1,2}, Д. А. Ахмедова^{1,2}, А. П. Малкова³

¹ ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (РТУ МИРЭА), 119571, Россия, г. Москва, пр-т Вернадского, д. 86

² АО «Институт фармацевтических технологий» (АО «ИФТ»), 121353, Россия, г. Москва, Сколковское шоссе, д. 21, офис 1

³ АНО «Институт медико-биологических исследований и технологий» (АНО «ИМБИТ»), 143090, Россия, Московская обл., г. Краснознаменск, ул. Строителей, д. 10, корп. 1

* Контактное лицо: Домнина Юлия Михайловна. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Ю. М. Домнина – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; В. В. Суслов – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; С. А. Кедик – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>; Д. А. Ахмедова – <https://orcid.org/0000-0002-0951-939X>; А. П. Малкова – <https://orcid.org/0000-0002-2817-4817>.

Статья поступила: 16.11.2020

Статья принята в печать: 13.01.2021

Статья опубликована: 25.05.2021

Резюме

Введение. Налтрексона гидрохлорид в дозах 1,5–5 мг/сут показал свою эффективность при лечении ряда заболеваний. В связи с отсутствием на фармацевтическом рынке зарегистрированного препарата такого «низкодозированного» налтрексона нами проведена разработка состава назального спрея налтрексона гидрохлорида. Одним из этапов проводимых нами исследований является изучение безопасности разрабатываемого препарата. Первым шагом в этом направлении стало изучение его острой токсичности и местно-раздражающего действия.

Цель. Изучение острой токсичности и местно-раздражающего действия назального спрея налтрексона гидрохлорида.

Материалы и методы. Объектом исследования являлся назальный спрей налтрексона гидрохлорида. Исследование острой токсичности проводили на половозрелых аутбредных мышках-самках. Изучение местно-раздражающего действия – на кроликах породы советская шиншилла (самцах).

Результаты и обсуждение. Проведенное исследование острой токсичности показало, что препарат в дозе, значительно превышающей предполагаемую максимальную суточную терапевтическую дозу для человека, не оказывал значимого токсического действия на организм лабораторных животных. Наличие у исследуемого препарата местно-раздражающего действия в рамках проведенного эксперимента не установлено.

Заключение. Изучена острая токсичность назального спрея налтрексона гидрохлорида при внутрижелудочном введении мышам и местно-раздражающее действие на кроликах. На всех этапах эксперимента проводили наблюдения за общим состоянием животных. Состояние гомеостаза оценивали с помощью функциональных, гематологических и морфометрических методов. По результатам исследований установлено отсутствие местно-раздражающего действия на глазах кроликов, а также отсутствие токсического действия высоких доз препарата на животных. Полученные результаты позволяют продолжить разработку и изучение назального спрея налтрексона гидрохлорида.

Ключевые слова: налтрексона гидрохлорид, назальный спрей, острая токсичность, лабораторные животные

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Ю. М. Домниной были подготовлены экспериментальные образцы для проведения испытаний. А. П. Малковой был проведен эксперимент. Все авторы принимали участие в обработке полученных результатов.

Для цитирования: Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ахмедова Д. А., Малкова А. П. Изучение острой токсичности и раздражающего действия назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):101–105. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-101-105>

Study of Acute Toxicity and Irritant Effect of Nasal Spray Naltrexone Hydrochloride

Yuliya M. Domnina^{1,2}, Vasiliy V. Suslov^{1,2}, Stanislav A. Kedik^{1,2}, Diana A. Akhmedova^{1,2}, Anastasia P. Malkova³

¹ Federal State Budget Educational Institution of Higher Education "MIREA – Russian Technological University", 86, Vernadsky av., Moscow, 119571, Russia

² JSC Institute of Pharmaceutical Technologies, 21/1, Skolkovskoye highway, Moscow, 121353, Russia

³ ANO "Institute for Biomedical Research and Technology" ("IMBIT"), 10/1, Stroiteley str., Krasnoznamensk, Moscow region, 143090, Russia

*Corresponding author: Yuliya M. Domnina. E-mail: domnina.yulia@mail.ru

ORCID: Yuliya M. Domnina – <https://orcid.org/0000-0002-2745-9431>; Vasiliy V. Suslov – <https://orcid.org/0000-0002-9578-2492>; Stanislav A. Kedik – <https://orcid.org/0000-0003-2610-8493>; Diana A. Akhmedova – <https://orcid.org/0000-0002-0951-939X>; Anastasia P. Malkova – <https://orcid.org/0000-0002-2817-4817>.

Received: 16.11.2020

Revised: 13.01.2021

Published: 25.05.2021

Abstract

Introduction. Acute toxicity of naltrexone hydrochloride nasal spray during intragastric administration to mice and local irritant effect on rabbits was studied. At all stages of the experiment, observations were made on the General condition of the animals. The state of homeostasis was evaluated using functional, hematological and morphometric methods. According to the results of research, there was no local irritant effect on the eyes of rabbits, as well as no toxic effect of high doses of the drug on animals. Introduction. Naltrexone hydrochloride in doses of 1.5–5 mg/day has shown its effectiveness in the treatment of a number of diseases. Due to the lack of such a "low-dose" naltrexone registered on the

© Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ахмедова Д. А., Малкова А. П., 2021

© Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Akhmedova D. A., Malkova A. P., 2021

pharmaceutical market, we have developed the composition of the nasal spray naltrexone hydrochloride. One of the stages of our research is to study the safety of the drug being developed. The first step in this direction was to study its acute toxicity and local irritant effect.

Aim. Study of acute toxicity and local irritant effect of naltrexone hydrochloride nasal spray.

Materials and methods. The object of the study was a nasal spray of naltrexone hydrochloride. Acute toxicity studies were performed on outbred adult mice (females). Study of local irritant effect on Soviet chinchilla rabbits (males).

Results and discussion. The study of acute toxicity showed that the drug, at a dose significantly higher than the estimated maximum daily therapeutic dose for humans, did not have a significant toxic effect on the body of laboratory animals. The presence of a local irritant effect in the studied drug was not established in the framework of the experiment.

Conclusion. As part of the experiment, the drug under study did not have a local irritant or toxic effect on the animal body. The results obtained allow us to continue the development and study of the nasal spray naltrexone hydrochloride.

Keywords: naltrexone hydrochloride, nasal spray, acute toxicity, laboratory animals

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Yuliya M. Domnina experimental samples were prepared for testing. Anastasia P. Malkova an experiment was carried out. All authors took part in the processing of the obtained results.

For citation: Domnina Yu. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Akhmedova D. A., Malkova A. P. Study of acute toxicity and irritant effect of nasal spray naltrexone hydrochloride. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2021;10(2):101–105. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-101-105>

ВВЕДЕНИЕ

Налтрексона гидрохлорид в дозах 1,5–5 мг/сут показал свою эффективность при экспериментальном применении для терапии рассеянного склероза, болезни Крона, фибромиалгии, синдрома приобретенного иммунодефицита и ряда других заболеваний [1].

В связи с отсутствием на фармацевтическом рынке зарегистрированного препарата, обеспечивающего такие дозировки налтрексона, нами проведена разработка назального спрея налтрексона гидрохлорида [2]. Несмотря на то что острая токсичность компонентов, входящих в состав спрея, известна, ее изучение является обязательным исследованием в рамках доклинических испытаний для гибридных лекарственных препаратов при изменении лекарственной формы.

В статье изложены результаты изучения острой токсичности и местно-раздражающего действия назального спрея налтрексона.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлся назальный спрей налтрексона гидрохлорида, разработанного ранее состава [2].

Экспериментальные животные

Исследования проводили на половозрелых аутбредных мышах-самках, полученных из питомника лабораторных животных филиала «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ» РАМН, и кроликах породы советская шиншилла – из питомника лабораторных животных ФГУП ОПХ «Манихино».

Мыши имели массу 18–22 г, кролики – 2,0–2,5 кг. Масса животных, отобранных для эксперимента, не отклонялась от средней по группе более чем на 10 %.

Животных содержали в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами в барьерных и стандартных помещениях, рекомендуемых для содержания грызунов [3, 4]. Карантин животных составлял 10 суток. Во время этого периода за животными вели ежедневное наблюдение. Все животные оставались здоровыми.

Мышей содержали по 6 особей в клетках из поликарбоната, кроликов – в индивидуальных клетках из нержавеющей стали. Все клетки имели приспособления для корма и воды. Для кормления мышей использовали комбинированный корм ПК-120 для лабораторных мышей и крыс (сертификат соответствия № РОСС RU.ПТ 62.Д00511 ГОСТ Р 55453-2013 до 04.04.2021 г.), для кроликов К-122 (сертификат соответствия № РОСС RU.ПС 04.Д00222 ГОСТ Р 32897-14 до 14.05.2021 г.). Животные получали корм без ограничения, за исключением ночи перед взвешиванием и эвтаназией. Поили животных фильтруемой водопроводной водой в стандартных питьевых бутылочках со свободным доступом животных к воде.

Все манипуляции с животными проводили согласно правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследований и других научных целей [5].

Исследование острой токсичности

Для изучения острой токсичности рандомизировано были сформированы экспериментальная и контрольная группы самок, состоящие из 6 голов. Отбор был проведен методом случайной выборки с учетом массы тела. Животные экспериментальной группы получали внутривенно исследуемый препарат в максимально разрешенном объеме 1 мл [6]. Животным контрольной группы внутривенно вводили воду очищенную в таком же объеме.

В течение исследования, ежедневно утром и во второй половине дня, вели наблюдение за каждым

животным. В день введения препаратов наблюдение проводили каждый час.

Массу тела определяли взвешиванием до введения препаратов и на 3, 7, 15 сутки эксперимента. Животных взвешивали на весах ACOM PC-100W-5 (ACOM, Южная Корея, свидетельство о поверке № АБ 0287869 до 26.03.2021). Точность используемых весов была верифицирована до начала исследования.

Забор крови для клинического анализа производили из хвостовой вены после 18 часов голодания. Кровь отбирали в специальные пробирки «Юнивет» с антикоагулянтом ЭДТА. Анализы проводили на гематологическом анализаторе Mindray BC-2800-vet (Mindray, Китай, свидетельство о поверке № АБ 0177073 до 28.10.2020). Определяли следующие показатели:

- количество эритроцитов (RBC);
- гематокрит (HCT);
- количество тромбоцитов (PLT);
- количество гемоглобина (HGB);
- количество лейкоцитов (WBC) с дифференцированием по трем популяциям: лимфоциты (LYM), моноциты (MID), гранулоциты (GRAN).

На 15 сутки эксперимента всех животных подвергали эвтаназии методом ингаляции двуокиси углерода (CO₂) с дальнейшим макроскопическим и морфометрическим исследованием органов. После регистрации смерти мышей подвергали полной некропсии, которая включала осмотр внешней поверхности тела, всех проходов, черепной, грудной, брюшной полостей с органами и тканями.

Макроскопически исследовали лимфатические узлы, аорту, сердце, гортань, трахею, легкие, тимус, пищевод, желудок, тонкий кишечник, толстый кишечник, печень с желчным пузырем, поджелудочную железу, селезенку, почки, надпочечники, мочевой пузырь, яичники, матку, влагалище, подчелюстную слюнную железу с лимфатическими узлами, щитовидную железу и головной мозг.

Взвешивали сердце, легкие, тимус, печень, селезенку, почки, яичники, надпочечники и головной мозг.

Оценка местно-раздражающего действия

Оценку местно-раздражающего действия препарата проводили на глазах кролика. Использовали трех кроликов. За сутки до начала проведения эксперимента визуально проверяли оба глаза каждого кролика на предмет обнаружения отклонений от нормы. Препар

ат вводили в нижний отдел конъюнктивального мешка правого глаза по 0,1 мл однократно. Контролем служил левый глаз, куда вводили 0,1 мл стерильного 0,9 % раствора натрия хлорида. Наблюдение проводили в течение 24, 48, 72 часов с момента нанесения. Осмотр проводили с использованием лупы и офтальмоскопа при фокальном освещении.

Обработка данных

Все экспериментальные данные обрабатывались методом вариационной статистики (принятый уровень значимости – $P \leq 0,05$). Достоверность результатов оценивали с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для изучения острой токсичности был выбран внутрижелудочный способ введения. Исследуемый препарат вводили мышам в объеме 1 мл, что соответствует средней введенной дозе 1089 мг/кг. Так как исследуемый препарат содержит термореверсивный полимер и способен к загустеванию при температурах 35–37 °С, во избежание закупорки желудочно-кишечного тракта животных, препарат был разбавлен водой в соотношении 1:1. Введение осуществляли два раза по 1 мл разбавленного препарата с перерывом между введениями длительностью 2 часа.

Предполагаемая доза для человека 100 мкл/сут или 2,5 мг/сут по налтрексону гидрохлориду (0,036 мг/кг). Таким образом, средняя введенная доза мышам превысила предполагаемую суточную дозу для человека более чем в 30 250 раз. В связи с этим исследование острой токсичности препарата в нескольких дозах с целью установления ЛД₅₀ представлялось неэтичным и нецелесообразным.

Контрольным животным вводили питьевую воду в таком же объеме.

Было обнаружено, что сразу после введения препарата мыши были заторможены, наблюдался тремор, шерсть взъерошена. Однако через 24 часа состояние и поведение мышей не отличалось от состояния и поведения интактных животных. Гибели животных или отклонений в их общем состоянии или поведении в течение периода наблюдения отмечено не было. Масса тела мышей на протяжении эксперимента значимо не отличалась между группами (таблица 1).

Таблица 1. Динамика массы тела мышей-самок (грамм, $M \pm m$)

Table 1. Dynamics of body weight in female mice (grams, $M \pm m$)

№	Наименование группы Group name	Сутки эксперимента Day of experiment			
		Фон Background	3	8	15
1	Контроль Control	23,00 ± 0,365	22,08 ± 0,300	20,00 ± 0,316	20,83 ± 0,380
2	Эксперимент Drug	22,75 ± 0,214	21,67 ± 0,307	20,50 ± 0,183	20,58 ± 0,201

Биохимические исследования (таблица 2) свидетельствуют о том, что в исследуемых дозах налтрексона привело к достоверному сокращению числа эритроцитов в крови мышей. Однако отклонения колебались в пределах референсных значений. Остальные исследуемые показатели клинического анализа опытных групп значимо не отличались от контрольных групп.

Таблица 2. Средние показатели клинического анализа крови мышей-самок ($M \pm m$)

Table 2. Average values of clinical blood analysis in female mice ($M \pm m$)

Срок, сутки Term, day	Группы животных Animal groups	
	Контроль Control	Эксперимент Drug
Эритроциты (RBC), $10^{12}/л$ Erythrocytes (RBC), $10^{12}/l$		
15	11,03 $\pm$ 0,202	10,25 $\pm$ 0,090*
Тромбоциты (PLT), $10^9/л$ Platelets (PLT), $10^9/l$		
15	775,17 $\pm$ 50,539	767,00 $\pm$ 31,968
Гематокрит (HCT), % Hematocrit (HCT), %		
15	51,25 $\pm$ 0,958	47,55 $\pm$ 0,454
Гемоглобин (HGB), г/л Hemoglobin (HGB), g/l		
15	163,67 $\pm$ 4,271	157,17 $\pm$ 1,302
Лейкоциты (WBC), $10^9/л$ Leukocytes (WBC), $10^9/l$		
15	8,87 $\pm$ 1,434	10,86 $\pm$ 1,444
Лимфоциты (LYM), % Lymphocytes (LYM), %		
15	62,92 $\pm$ 7,896	64,60 $\pm$ 6,033
Моноциты (MID), % Monocytes (MID), %		
15	6,37 $\pm$ 1,751	7,30 $\pm$ 1,648
Гранулоциты (GRAN), % Granulocytes (GRAN), %		
15	30,72 $\pm$ 6,170	28,10 $\pm$ 4,395

Согласно результатам морфометрического исследования, проведенного через 15 суток после введения препарата, никаких отклонений выявлено не было. Все макроскопически исследованные органы (сердце, легкие, тимус, желудок, печень, почки, надпочечники и др.) не имели различий с контрольной группой. Относительная масса внутренних органов мышей оставалась в пределах физиологической нормы (таблица 3).

Местно-раздражающее действие оценивали по состоянию роговицы (наличия/отсутствия: помутнения, поражения), радужной оболочки (наличия/отсутствия: реакции на свет, набухания, инъектирования сосудов), конъюнктивы (наличия/отсутствия: инъектирования сосудов), а также наличию отека и выделений (рисунок 1). При визуальном обследовании ни у одного животного не было выявлено патологии и установлено, что препарат – спрей назальный налтрексона

гидрохлорида – не оказывает местно-раздражающего действия при инстилляциях в конъюнктивный мешок глаз животных.

Таблица 3. Средние групповые показатели относительной массы внутренних органов мышей-самок (%)

Table 3. Average group indicators of the relative mass of internal organs of female mice (%)

Органы Organ	Группа животных Animal groups	
	Группа № 1 Контроль Group №1 Control	Группа № 2 Эксперимент Group № 2 Drug
Печень Liver	0,91 $\pm$ 0,033	0,85 $\pm$ 0,036
Почки Kidney	0,25 $\pm$ 0,006	0,25 $\pm$ 0,006
Селезенка Spleen	0,07 $\pm$ 0,002	0,07 $\pm$ 0,003
Сердце Heart	0,09 $\pm$ 0,002	0,10 $\pm$ 0,003
Тимус Thymus	0,03 $\pm$ 0,002	0,03 $\pm$ 0,003
Гонады Gonads	0,03 $\pm$ 0,002	0,02 $\pm$ 0,002
Легкие Lungs	0,17 $\pm$ 0,034	0,18 $\pm$ 0,023
Надпочечники Adrenal glands	0,009 $\pm$ 0,001	0,010 $\pm$ 0,001
Головной мозг Brain	0,41 $\pm$ 0,012	0,43 $\pm$ 0,005

Рисунок 1. Глаз кролика спустя 24 часа с момента введения: А – физиологического раствора, контрольный глаз; Б – препарат, опытный глаз

Figure 1. Rabbit's eye 24 hours after administration: А – saline solution, control eye; В – drug, experienced eye

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное на аутбредных половозрелых мышах исследование показало, что в условиях внутрижелудочного введения препарат в дозе, превыша-

ющей предполагаемую максимальную суточную терапевтическую дозу для человека более чем в 30 250 раз, не оказал значимого токсического действия на организм лабораторных животных. Наличие у исследуемого препарата местно-раздражающего действия в рамках проведенного эксперимента не установлено.

Полученные результаты позволяют продолжить разработку и изучение назального спрея налтрексона гидрохлорида.

ЛИТЕРАТУРА

1. Toljan K., Vrooman B. Low-Dose Naltrexone (LDN) – review of therapeutic utilization. *Medical Sciences*. 2018;6(4):82. DOI: 10.3390/medsci6040082.
2. Домнина Ю. М., Кедик С. А., Суслов В. В., Шняк Е. А. Обоснование выбора вспомогательных компонентов назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2018;(4):73–77.
3. ГОСТ Р 56701-2015 «Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств». Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/1200126923>.
4. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 года, № 51). Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/420219460>.
5. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123) Strasbourg, 1986.
6. Миронов А. Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2013. 944 с.

REFERENCES

1. Toljan K., Vrooman B. Low-Dose Naltrexone (LDN) – review of therapeutic utilization. *Medical Sciences*. 2018;6(4):82. DOI: 10.3390/medsci6040082.
2. Domnina Y. M., Kedik S. A., Suslov V. V., Shnyak E. A. Rationale for the selection of auxiliary components for the naltrexone hydrochloride nasal spray. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv = Drug development & registration*. 2018;(4):73–77. (In Russ.)
3. GOST R 56701-2015 "Lekarstvennye sredstva dlya meditsinskogo primeneniya. Rukovodstvo po planirovaniyu doklinicheskikh issledovaniy bezopasnosti s tsel'yu posleduyushchego provedeniya klinicheskikh issledovaniy i registratsii lekarstvennykh sredstv" [Medicinal products for medical use. Guidelines for planning preclinical safety studies for subsequent clinical trials and drug registration]. Available at: <http://docs.cntd.ru/document/1200126923>. (In Russ.)
4. Sanitary and epidemiological rules SP 2.2.1.3218-14 "Sanitarno-epidemiologicheskie trebovaniya k ustrojstvu, oborudovaniyu i soderzhaniyu eksperimental'no-biologicheskikh klinik (vivariyev)" [Sanitary and epidemiological requirements for the device, equipment and maintenance of experimental biological clinics (vivariums)] (approved Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation of August 29, 2014, No. 51). Available at: <http://docs.cntd.ru/document/420219460>. (In Russ.)
5. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.
6. Mironov A. N., editor. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv* [Guide to preclinical research of medicines]. Part 1. Moscow: Grif i K; 2013. 944 p. (In Russ.)