

*Алексеев Н.А., к.ф.н.
ведущий научный сотрудник*

*Малюшкова Е.В.,
ведущий научный сотрудник*

Белорусский государственный университет, г. Минск

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ
ПЕРОРАЛЬНОГО ПРИМЕНЕНИЯ
КАЛИЯ N-АЦЕТИЛАМИНОСУКЦИНАТА**

Аннотация: Обобщены литературные данные доклинических исследований калия N-ацетиламиносукцината (CAS 3397-52-2) и изучена хроническая токсичность и генотоксичность. По литературным данным: канцерогенность не выявлена, выявлены антигипоксическое, анксиолитическое и гастропротективные свойства. Калия N-ацетиламиносукцинат не вызывал мутаций в тесте Эймса, и не было обнаружено кластогенных эффектов в клетках фибробластов китайского хомячка. Крысы линии Fischer (F344) по 10 в группе подвергались в течение 13 недель неограниченному воздействию 0, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10% калия N-ацетиламиносукцината. Значительное снижение прироста массы тела наблюдалось у крыс в группе 10%, и все крысы в этой группе умерли в течение первых 4 недель эксперимента. Однако в других группах, получавших препарат, все крысы дожили до конца эксперимента. Наблюдалось снижение прироста массы тела на $\geq 2,5\%$. Объем потребляемой питьевой воды в группах, получавших самые высокие дозы, был очень мал, хотя в группе, получавшей 5%, он был больше, чем в других группах. В ходе гематологических и биохимических исследований не было обнаружено специфических изменений каких-либо параметров, связанных с дозой. Крысы, погибшие во время эксперимента, были сильно истощены. Ни в одной из других тестируемых групп гистологически не

было обнаружено специфических поражений, хотя наблюдалась атрофия органов. Шести собакам калия N-ацетиламиносукцинат давался путем помещения в мясной фарш в дозе 250 мг/кг ежедневно в течение 14 дней. Через 20-30 минут после введения у собак появлялась небольшая гиперактивность (бегали по вольеру, лаяли больше обычного), летальных эффектов не наблюдалось. Все симптомы проходили в течение 2-3 часов. В дальнейшем общее состояние и поведение собак не отличалось от таковых у контрольных животных. Потребление корма и воды животными, получившими препараты, не снижалось. Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 28 дней, а также данные некропсии не выявили отличий с контрольной группой. Таким образом, калия N-ацетиламиносукцинат можно отнести к V классу практически нетоксичных лекарственных веществ.

Ключевые слова: *сукцинат, янтарная кислота, доклиническое исследование, токсичность*

Alekseev N.A., Ph.D.

Leading Researcher

Malyushkova E.V.,

Senior Researcher,

Belarusian State University, Minsk

NONCLINICAL STUDY OF ORAL TOXICITY OF POTASSIUM N-ACETYLAMINOSUCCINATE

Abstract: *The literature data of nonclinical studies of potassium N-acetylaminosuccinate (CAS 3397-52-2) are summarized and chronic toxicity and genotoxicity are studied. According to the literature data: carcinogenicity was not revealed, antihypoxic, anxiolytic and gastroprotective properties were revealed. Potassium N-acetylaminosuccinate did not cause mutations in the Ames test, and clastogenic effects were not detected in Chinese hamster*

fibroblast cells. Fischer rats (F344) were exposed to 0, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10% potassium N-acetylaminosuccinate for 13 weeks without limit. A significant decrease in body weight gain was observed in rats in the 10% group, and all rats in this group died during the first 4 weeks of the experiment. However, in the other groups receiving the drug, all rats survived to the end of the experiment. There was a decrease in body weight gain of $\geq 2.5\%$. The volume of drinking water consumed in the groups receiving the highest dose was very small, although it was greater in the group receiving 5% than in the other groups. No specific changes in any parameters related to the dose were found in the hematological and biochemical studies. Rats that died during the experiment were severely emaciated. In none of the other tested groups were specific lesions detected histologically, although organ atrophy was observed. Potassium N-acetylaminosuccinate was administered to six dogs by placing it in minced meat at a dose of 250 mg/kg daily for 14 days. Twenty to 30 minutes after administration, the dogs became slightly hyperactive (running around the enclosure, barking more than usual), but no lethal effects were observed. All symptoms disappeared within 2 to 3 hours. Subsequently, the general condition and behavior of the dogs did not differ from those of the control animals. The consumption of food and water by the animals that received the drugs did not decrease. The results of toxicometry, observation data for the experimental animals for 28 days, and necropsy data did not reveal any differences with the control group. Thus, potassium N-acetylaminosuccinate can be classified as class V of practically non-toxic drugs.

Key words: *succinate, succinic acid, nonclinical study, toxicity*

Исследований доклинической токсичности солей янтарной кислоты и ее производных в литературе ограниченное количество. Сукцинат может ингибировать активность α -KG-зависимых оксигеназ (KDMs) и TET-семейства 5-метилцитозиновых (5mC) гидроксилаз. Сукцинат также

опосредует аллостерическое ингибирование пролилгидроксилаз, индуцируемых фактором гипоксии (HIF). Ингибирование HIF PhDs приводит к активации HIF-опосредованной псевдогипоксической реакции, тогда как ингибирование KDMs и TET-семейства 5mC-гидроксилаз вызывает эпигенетические изменения, которые в конечном итоге вызывают рак. Активация KEAP1 при дефиците FH приводит к существенной активации пути антиоксидантной защиты, опосредованного NRF2, создавая восстановительную среду, которая способствует пролиферации клеток. Сукцинация фермента цикла Кребса Aco2 снижает активность аконитазы в MEFS с дефицитом Fh1. Сукцинация также вызывает необратимую инактивацию глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Целью работы было обобщение литературных данных по доклиническим исследованиям калия N-ацетиламносукцината и близких соединений, а также изучение хронической токсичности и генотоксичности в собственных доклинических исследованиях калия N-ацетиламносукцината.

По данным литературы клиническими признаками острой токсичности при применении солей янтарной кислоты у крыс являются слабость и диарея. Большие внутривенные дозы сукцината натрия вызывали у кошек рвоту и диарею (1). В ходе 2-летнего исследования токсичности/канцерогенности сукцинат натрия вводили в неограниченном количестве в питьевой воде в дозах 0, 1 или 2% группам из 50 самцов и 50 самок крыс линии F344. Токсического поражения, вызванного длительным приемом сукцината натрия, обнаружено не было (1). Дикалиевая соль ацетиламиноянтарной кислоты не перечислена в IARC как канцерогенное вещество.

Дикалиевая соль ацетиламиноянтарной кислоты 25 мг/мл (когитум) изучалась на предмет гастропротекторного действия при экспериментальной гастропатии различной этиологии на лабораторных

животных. Моделированные гастропатии: острая стероидно-этаноловая, НПВС-индуцированная, симпатолитическая, пептическая и стрессорная, состояние пищеварительного тракта. Проведено сравнительное исследование когитума в трех экспериментальных дозах (1,0 мл/кг, 2,0 мл/кг и 3,0 мл/кг) с ранитидином, метилурацилом, облепиховым маслом и аспаркамом. Полученные данные о гастропротекторном эффекте когитума при воздействии на желудок язвенов различной природы, о положительном влиянии когитума на секреторную и моторно-эвакуаторную активность желудочнокишечного тракта могут служить основой дальнейших более углубленных исследований гастропротекторных свойств когитума (2).

Негативные симптомы неврозоподобного состояния (поведенческие, анатомические и энергетические) у белых крыс были уменьшены при пероральном приеме сукцината (30 мг/кг). Эффекты зависели от склонности крысы к кататоническому "замораживанию". "Замерзание" было обнаружено по специфическому дыханию: короткий вдох и долгая пауза. У "замороженных" крыс сукцинат в большей степени корректировал системное напряжение, в то время как у "незамораживающихся" животных он в большей степени корректировал активность сукцинат- и NADH-дегидрогеназы. Положительный эффект от введения сукцината, вероятно, связан с его антигипоксическими свойствами (3).

Предполагаемая анксиолитическая активность янтарной кислоты была исследована на мышцах-самцах с использованием ряда экспериментальных методов определения тревожности и сравнена с таковым у известного анксиолитического соединения диазепама. Использование теста с приподнятым плюсовым лабиринтом показало, что диазепам (1,0, 2,0 и 4,0 мг/кг, перорально) или янтарная кислота (3,0 или 6,0 мг/кг, перорально) увеличивали процент попаданий в "открытые объятия" и время, проведенное в "открытых объятиях". В новом тесте на потребление пищи

янтарная кислота (3,0, 6,0 и 12,0 мг/кг) привела к значительному увеличению потребления пищи в течение 5 минут по сравнению с носителем. В тесте на стресс-индуцированную гипертермию через 40 мин после введения препарата измеряли ректальную температуру, янтарная кислота в дозе 1,5 мг/кг подавляла стресс-индуцированную гипертермию. Таким образом, эти результаты показали, что, в отличие от диазепамов, янтарная кислота обладает анксиолитическим действием (4).

Эксперименты проведены на неполовозрелых кроликах с незрелым органом слуха. Слуховая функция оценивалась методами ПИОАЭ, КСВП у интактных животных (контроль) и после введения терапевтической дозы нетромицина, а также нетромицина с препаратами, нормализующими обменные процессы мозга (кортексин, когитум, элькар, витамин В2, кокарбоксилаза). Выявлено ототропное действие комплекса вводимых препаратов, которые снижают выраженность ототоксического эффекта, но не нейтрализуют его (5).

Введение янтарной кислоты 500 мг/100 г/сут в течение 20 дней крысам через 60 дней после операции индукции образования камней в мочевом пузыре. Образование камней наблюдалось у 36% животных, получавших янтарную кислоту, и у 60% в контрольной группе. Т.е. янтарная кислота снижает камнеобразование в мочевыводящих путях (6).

Материал и методы. Калия N-ацетиламносукцинат изучался *in vitro* и *in vivo*. Тест Эймса проводился с использованием штаммов *S.typhimurium* TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535 и TA1537, полученных из гомогената печени крыс, предварительно обработанного полихлорированным дифенилом КС-400, или без него, изучались кластогенные эффекты в клетках фибробластов китайского хомячка. С целью изучения хронической токсичности изучались Крысы самцы и самки линии Fischer (F344), по 10 в группе подвергались в течение 13 недель неограниченному воздействию 0, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10% калия N-ацетиламносукцината. Дополнительно

изучалась подострая токсичность на 9 беспородных собаках. Шести собакам калия N-ацетиламиносукцинат давался путем помещения в мясной фарш в дозе 250 мг/кг ежедневно в течение 14 дней. Три собаки составили контрольную группу. Животные наблюдались в течение 4 недель с начала эксперимента. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (7).

Результаты. Значительное снижение прироста массы тела наблюдалось у крыс в группе 10%, и все крысы в этой группе умерли в течение первых 4 недель эксперимента. Однако в других группах, получавших препарат, все крысы дожили до конца эксперимента. Наблюдалось снижение прироста массы тела на $\geq 2,5\%$. Объем потребляемой питьевой воды в группах, получавших самые высокие дозы, был очень мал, хотя в группе, получавшей 5%, он был больше, чем в других группах. В ходе гематологических и биохимических исследований не было обнаружено специфических изменений каких-либо параметров, связанных с дозой. Крысы, погибшие во время эксперимента, были сильно истощены. Однако гистопатологически ни в одном из органов этих крыс не было обнаружено токсических поражений, вызванных тестируемым веществом, хотя наблюдалась атрофия органов. Ни в одной из других тестируемых групп гистологически не было обнаружено специфических поражений – см. рисунок 1. Исходя из снижения массы тела, было определено, что максимально переносимая доза сукцината натрия составляет приблизительно 2-2,5% при приеме с питьевой водой.

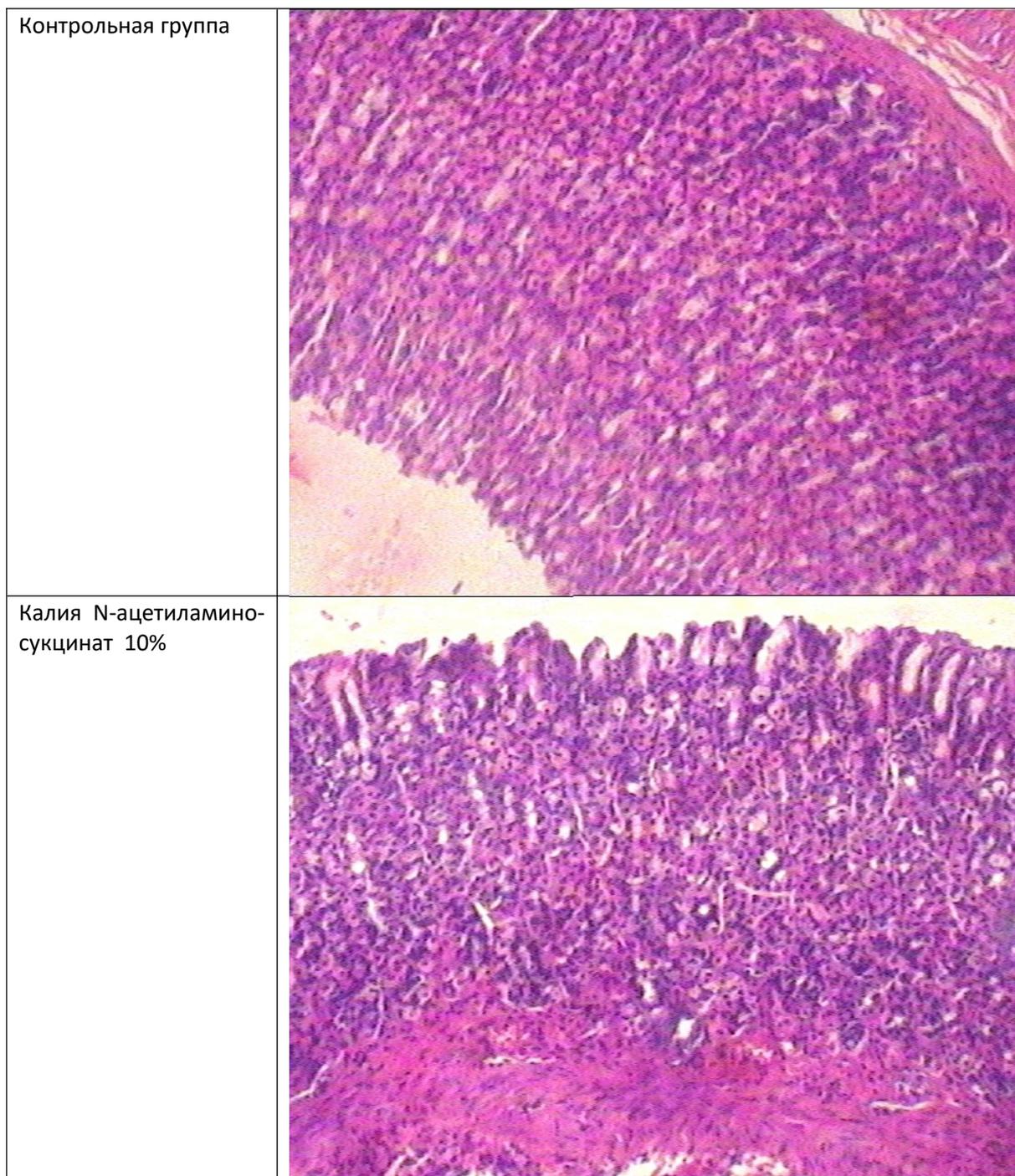


Рисунок 1. Гистологическая картина желудка основной и контрольной групп.

Через 20-30 минут после введения у собак появлялась небольшая гиперактивность (бегали по вольеру, лаяли больше обычного), летальных эффектов не наблюдалось. Все симптомы проходили в течение 2-3 часов. В дальнейшем общее состояние и поведение собак не отличалось от таковых

у контрольных животных. Потребление корма и воды животными, получившими препараты, не снижалось. Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 28 дней, а также данные некропсии не выявили отличий с контрольной группой.

Генотоксичность. Калия N-ацетиламиносукцинат не вызывал мутаций при концентрациях до 5 мг/л в тесте Эймса с использованием штаммов *S.typhimurium* TA92, TA94, TA98, TA100, TA1535 и TA1537, полученных из гомогената печени крыс, предварительно обработанного полихлорированным дифенилом КС-400, или без него, и не было обнаружено никаких кластогенных эффектов в клетках фибробластов китайского хомячка в концентрациях до 1 мг/мл.

Выводы. Показана безопасность перорального приема калия N-ацетиламиносукцината в подостром и хроническом эксперименте на различных животных. Генотоксичность не выявлена. Это позволяет отнести калия N-ацетиламиносукцинат к V классу практически нетоксичных лекарственных веществ.

Использованные источники:

1. Bingham, E.; Cohrssen, B.; Powell, C.H.; Patty's Toxicology Volumes 1-9 5th ed. John Wiley & Sons. New York, N.Y. (2001)., p. V5 757
2. Савенко И. А. Изучение гастропротекторного действия когитума при экспериментальной гастропатии: специальность 14.03.06 "Фармакология, клиническая фармакология": автореферат диссертации на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Савенко Иван Андреевич. – Пятигорск, 2012. – 23 с.
3. Айрапетянцс МG, Левшина IP, Ноздрачева LV, Шуїкин NN. Korrektsiia povedencheskikh i fiziologicheskikh pokazatelei nevrozopodobnogo

sostoianiiia belykh krys vvedeniem iantarnoi kisloty [Correction of behavioral and physiological components of a neurosis-like state of white rats by administration of succinate]. Zh Vyssh Nerv Deiat Im I P Pavlova. 2001 May-Jun;51(3):360-6. Russian. PMID: 11550645.

4. Chen SW, Xin Q, Kong WX, Min L, Li JF. Anxiolytic-like effect of succinic acid in mice. Life Sci. 2003 Nov 7;73(25):3257-64. doi: 10.1016/j.lfs.2003.06.017. PMID: 14561530.
5. Дьяконова И. Н., Ишанова Ю. С., Рахманова И. В. Отопротективное действие кортексина, когитума, элькара при совместном введении с нетромицином в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2020. – Т. 169, № 4. – С. 439-443
6. Thind SK et al; Indian J Med Res; 71 (April): 611 (1980)
7. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины и фармакомоделирования. – М.: изд-во ВПК, 2007. – 320 с.