

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СУБСТАНЦИИ МАГНИЯ L-АСПАРАГИНАТА С ПИРИДОКСИНОМ ПРИ ОДНОКРАТНОМ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ И КРЫСАМ

**А. А. Спасов, Л. И. Бугаева, С. А. Лебедева, А. Ю. Гетманенко,
Е. А. Кузубова, М. К. Синолицкий, И. Н. Иежица**

*Волгоградский государственный медицинский университет,
кафедра фармакологии и биофармации ФУВ, кафедра фармакологии,
Научно-исследовательский институт фармакологии*

В экспериментах на лабораторных мышах и крысах установлено, что субстанция магния L-аспарагината с пиридоксином относится к классу малотоксичных. Границы LD_{50} субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином при внутрижелудочном введении мышам составляют 9 773 (7366,6 ÷ 12965,5) мг/кг у самцов и 9 541 (7691,8 ÷ 11835,5) мг/кг у самок; границы LD_{50} субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином при внутрижелудочном введении крысам составляют более 8000 мг/кг. В клинике отравления отмечены эффекты депривации ЦНС: седация, снижение подвижности и рефлекторных реакций на звуковые, тактильные и болевые раздражители.

Ключевые слова: магния L-аспарагинат, витамин B_6 , лекарственная безопасность, доклинические исследования, острая токсичность, LD_{50} .

STUDY OF TOXIC PROPERTIES OF MAGNESIUM L-ASPARTATE AND PYRIDOXINE FOLLOWING A SINGLE INTRAGASTRIC DOSE TO MICE AND RATS

**A. A. Spasov, L. I. Bugaeva, S. A. Lebedeva, A. Yu. Getmanenko,
E. A. Kuzubova, M. K. Sinolitskiy, I. N. Iezhitsa**

Studies on mice and rats have shown that magnesium L-aspartate and pyridoxine belong to substances and preparations presenting a relative low toxicity risk. The LD_{50} value for magnesium L-aspartate and pyridoxine following intragastric administration in mice was 9773 (7366,6 ÷ 12965,5) mg/kg in males, and 9541 (7691,8 ÷ 11835,5) mg/kg in females. The LD_{50} value for magnesium L-aspartate and pyridoxine following intragastric administration in rats was more than 8000 mg/kg. Experimental magnesium L-aspartate and pyridoxine intoxication revealed deprivation of the CNS, sedation, decreased mobility, hyporeflexia to acoustic, tactile, and pain stimuli.

Key words: magnesium L-aspartate, vitamin B_6 , drug safety, preclinical studies, acute toxicity, LD_{50} .

Важнейшее физиологическое значение магния определяется его ролью в жизнедеятельности организма. Являясь одним из наиболее распространенных катионов внутри клетки, магний играет роль кофактора множества ферментов и участвует практически во всех видах обмена веществ (Seelig M. S., 1980 [20]; Gunther T., 1993 [15]; Altura B. M., 1994 [12]; Спасов А. А. с соавт., 2000 [8]; Maier J. A., 2004 [18]; Скальный А. В., 2004 [7]; Rayssiguier Y., 2005 [19]; Kimura M., 2007 [16]; Durlach J., 2007 [13]). Магний поступает в организм с водой и пищей, а также в составе фармакологических средств, что используется в основном для восполнения недостаточности этого элемента.

В клинической практике применяется относительно небольшое число препаратов магния. В частности, отечественный препарат магния сульфат широко используется в акушерской и гинекологической практике, а также кардиологии, реаниматологии, гастроэнтерологии. Препарат применяется преимущественно в лекарственной форме для парентерального введения [1, 2, 11]. В высоких дозах под действием сульфата магния наблюдаются эффекты депривации ЦНС, гипохлоремичес-

кий алкалоз [20]. Другой отечественный препарат — магния оксид — обладает низкой биодоступностью и используется перорально в качестве антацидного средства [14, 17]. Препараты органических солей магния: магния оротат, магния лактат, магния аспарагинат — также применяются перорально по различным показаниям (заболевания сердца, дислипидемии, судороги, депрессия), обладают умеренной биодоступностью, но при этом возможно их синергичное применение в сочетании с веществами, повышающими биодоступность магния, например, с пиридоксином (витамином B_6). Комбинированная форма соли магния с пиридоксином зарубежного производства — препарат «Магне B_6 » — разрешена для применения в России. Вместе с тем высокая стоимость препарата ограничивает широкое его использование в клинической практике, что послужило предпосылкой к поиску отечественного аналога. В этом отношении представляют интерес совместные научные разработки химиков-синтетиков ЗАО «Биоамид» (г. Саратов) и фармакологов ВолГМУ. По результатам данных работ было выявлено высокоактивное вещество — магния L-аспарагинат в комбинации с пиридоксином,

обладающее хорошей биодоступностью [9, 10]. В настоящее время проводятся доклинические токсикологические исследования данного вещества, с целью оценки его безопасности и перспективности внедрения в клиническую практику.

В этой связи в настоящей работе сочли целесообразным исследовать токсические свойства данной комбинации при однократном пероральном введении лабораторным животным.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучение острой токсичности и определение LD_{50} субстанции магния L-аспарагинат в комбинации с пиридоксином при однократном внутрижелудочном введении мышам и крысам.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на половозрелых лабораторных животных обоего пола: 120 белых мышам массой 18—22 г и 100 белых крысах массой 190—230 г, полученных из питомника государственного предприятия НИИ гигиены токсикологии и профпатологии МЗ РФ г. Волгограда. Эксперименты проводились согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению новых фармакологических веществ [3, 4]. При проведении экспериментов учитывались «Принципы надлежащей лабораторной практики» (ГОСТ Р-53434-2009) и правила, принятые Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986). До начала эксперимента животные в течение двух недель находились на карантине, а в последующем распределялись по группам для проведения исследований. В каждую группу входило не менее 5 особей самок и самцов.

Субстанцию магния L-аспарагината с пиридоксином растворяли в дистиллированной воде на магнитной мешалке с подогревом и вводили опытным группам животных атравматическим металлическим зондом в возрастающих дозах: мышам — 5000; 7500; 10000; 12500 и 15000 мг/кг; крысам — 2000; 4000; 6000 и 8000 мг/кг. Были сформированы также контрольные группы самцов и самок мышей и крыс, которым интрагастрально вводили дистиллированную воду в объеме 20 мл/кг (эквивалентно объему, использованному для растворения вещества, вводимого опытным группам).

После введения испытуемой субстанции мышам и крыс по одной особи помещали на 24 часа в изолированные плексигласовые домики для наблюдений /150 × 250 × 150 мм/. В первые восемь часов от момента введения субстанции наблюдения за животными вели непрерывно, в дальнейшем — периодически; при этом животные были лишены пищи и воды и изолированы от внешних раздражителей. В последующий 2-недельный период наблюдения за животными проводились 2 раза в день. На вторые сутки выживших животных объединяли по группам и разме-

щали в стандартные пластиковые клетки, предназначенные для мышей и крыс (самцов и самок отдельно), со свободным доступом к воде и пище.

В период наблюдений отмечали наличие гибели животных в группах, а также оценивали общее состояние (шерстный покров, слизистые оболочки, масса тела), поведенческие и нервно-мышечные (судороги, тремор, подергивания, изменение положения тела и конечностей, рефлекторный ответ на звуковые, тактильные и болевые раздражители) и вегетативные реакции (зрачковый рефлекс, цвет кожи, наличие уриаций, дефекаций, саливаций). Пищевая и питьевая активность оценивалась визуально. Массу тела у животных измеряли в 1 день эксперимента, на 7 и 14 дни. По количеству погибших и выживших особей были рассчитаны границы LD_{50} исследуемой субстанции с применением метода Литчфилда и Уилкоксона [3, 4]. Статистический анализ динамики массы тела у животных выполняли с использованием t-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам исследований на мышах были отмечены характерные признаки клиники отравления субстанцией магния L-аспарагината с пиридоксином и последующей реабилитации. У животных, получавших токсические дозы субстанции, наблюдалось угнетение подвижности, прогрессирующая седация, повышение частоты актов дефекации, снижение реакций на звуковые, тактильные и болевые раздражители, боковое положение. Продолжительность указанных эффектов и их выраженность зависела от дозы субстанции, введенной мышам. Так, после введения субстанции в дозах от 5000 до 7500 мг/кг признаки угнетения подвижности и развитие седации у мышей фиксировались в интервале от 5 до 10 мин после интрагастрального введения исследуемой субстанции и наблюдались в течение последующих 60—120 мин. Гибель части особей отмечалась в интервале 90—120 мин наблюдений (табл. 1). Признаки реабилитации у оставшихся в живых особей наблюдались еще в течение последующих двух часов. Наблюдения за выжившими животными в течение последующих двух недель не позволили зафиксировать значимых различий в состоянии животных в опытных и контрольных группах. Отдаленной гибели у этих животных не отмечалось. Общее состояние опытных животных, пищевая и питьевая активности визуально также не различались с данными показателями в контрольной группе.

После введения мышам субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином в дозах 10000 мг/кг и выше развитие вышеуказанных симптомов наблюдалось в течение 5 мин. Продолжительность эффектов составляла 60—120 мин с момента введения. Отмечалось резкое снижение подвижности, седация, боковое положение, угнетение дыхания, болевой и

тактильной чувствительности, бледность кожных покровов, редкие тонические судороги. Гибель мышей фиксировалась в течение первого часа наблюдений. У оставшихся в живых мышей восстановление подвижности, чувствительности, дыхания отмечалась в течение последующих 2—3 часов. По окончании первых суток наблюдения состояние этих животных практически соответствовало группе контрольных мышей. По результатам наблюдений за этими животными в последующие две недели не выявлено значимых различий с контролем по общему состоянию и приросту массы тела.

По результатам гибели животных, представленным в табл. 1, выявлены несущественные гендерные различия в динамике гибели мышей, фиксируемые лишь при введении испытуемой субстанции в дозе 15000 мг/кг. При этом 100 % гибель отмечалась у самок мышей, тогда как у самцов аналогичной группы количество погибших составило 80 %. Учитывая количество особей, погибших в первые сутки (в последующие сутки наблюдений летальных эффектов в группах не отмечено), был проведен расчет границ ЛД₅₀ [3, 4]. Результаты расчетов представлены в табл. 2, из которых следует, что границы ЛД₅₀ исследуемой субстанции при пероральном введении мышам составляют: 9773 мг/кг у самцов и 9541 мг/кг — у самок.

Таблица 1

Гибель мышей в экспериментах по изучению острой токсичности субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином

Число погибших мышей/число в группе			
доза, мг/кг	самцы	доза, мг/кг	самки
5000,0	0/5	5000,0	0/5
7500,0	1/5	7500,0	1/5
10000,0	3/5	10000,0	3/5
12500,0	4/5	12500,0	4/5
15000,0	4/5	15000,0	5/5

Примечание. Группы контрольных животных в таблицу не внесены.

Ориентируясь на классификацию И. В. Санюцкого [5, 6] и результаты гибели мышей заключили, что субстанция магния L-аспарагината в комбинации с пиридоксином при внутрижелудочном введении мышам может быть отнесена к классу малотоксичных ксенобиотиков.

В исследованиях на крысах субстанцию магния L-аспарагината с пиридоксином вводили также внутрижелудочно в токсических дозах от 6000 мг/кг до 8000 мг/кг. Введение субстанции в более высоких дозах не проводилось в связи с превышением максимально допустимого объема для внутрижелудочного введения животным, установленного действующими рекомендациями [3, 4]. По результатам экспериментов установлено отсутствие гибели животных при вве-

дении магния L-аспарагината с пиридоксином в указанных дозах. В связи с отсутствием гибели крыс границы токсичности исследуемой субстанции были рассчитаны по максимально введенной дозе, что также допускается действующими рекомендациями [3, 4]. При этом по результатам частичной выборочной эвтанази животных, проведенной на вторые сутки эксперимента и обследования у них различных отделов желудочно-кишечного тракта (желудка, двенадцатиперстной кишки, тонкого и толстого кишечника) наличия остатков исследуемой субстанции не обнаружено, что свидетельствует о ее полной всасываемости из ЖКТ. Не обнаружено также в этих отделах и следов гиперемии, отека и повреждения слизистой.

Клиника отравления испытуемой субстанцией соответствовала таковой, выявленной на мышах. При этом наиболее отчетливо симптомы отравления проявлялись у крыс при введении субстанции в максимальной дозе 8000 мг/кг. Характерным являлось понижение двигательной активности, угнетение реакций на звуковые, тактильные и болевые раздражители, угнетение дыхания, слабый тремор конечностей. Бокового положения у крыс не зафиксировано, гибель особей отсутствовала. Указанные эффекты у животных отмечались через 10—15 мин и продолжались в первые 2—3 часа наблюдений. Период полной реабилитации и восстановления физической активности у крыс фиксировали в течение первых суток наблюдений. На вторые сутки состояние животных было удовлетворительным, слизистые — чистые, шерстный покров — гладкий, блестящий. Восстанавливались частота дыхания, подвижность и реакции на внешние раздражители. Пищевая и питьевая активности визуально не различались с контролем.

На 7-е и 15-е дни эксперимента отмечалась положительная динамика прироста массы тела крыс, получавших субстанцию магния L-аспарагината с пиридоксином, не отличавшаяся от контрольной группы.

Установлено, что ЛД₅₀ субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином при внутрижелудочном введении крысам составляет более 8000 мг/кг.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных исследований можно заключить, что субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином при введении внутрижелудочно мышам и крысам относится к малотоксичным соединениям. На основании представленных данных были рассчитаны различные границы летальности субстанции, введенной внутрижелудочно мышам-самкам и самцам. Установлено, что уровень ЛД₅₀ субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином составил для мышей-самцов 9773 (7366,6 ÷ 12965,5) мг/кг, для самок 9541 (7691,8 ÷ 11835,5) мг/кг. Значение ЛД₅₀ магния L-аспарагината с пиридоксином при внутрижелудочном введении крысам в максимально растворимом объеме составило более 8000 мг/кг (табл. 2).

Таблица 2

Острая токсичность субстанции магния L-аспарагината с пиридоксином в экспериментах на мышах и крысах, мг/кг

Исследуемая группа	ЛД ₅₀
Опыты на мышах	
Самцы	9 773 (7366,6 ÷ 12965,5)
Самки	9 541 (7691,8 ÷ 11835,5)
Опыты на крысах	
Самцы	> 8000
Самки	> 8000

В клинике отравления исследуемой субстанцией отмечены характерные симптомы острого отравления солями магния: элементы угнетающего влияния на ЦНС (седация, нарушение подвижности, угнетение рефлекторных ответов на внешние раздражители). Психоугнетающие эффекты у животных наблюдались через 10—20 мин после введения субстанции, нивелирование данных проявлений прослеживалось в течение первых суток наблюдений. Состояние этих животных на вторые и последующие сутки двухнедельных наблюдений соответствовало таковому в контроле. При этом по окончании наблюдений различий у животных в группах контроль и опыт по параметрам общего состояния, пищевой активности, подвижности и приросту массы тела не обнаружено. Случаев отдаленной гибели у животных не отмечено. Следует отметить быстрое наступление и столь же быстрое прекращение вышеуказанных эффектов, позволяющее сделать предположение о быстром всасывании исследуемой субстанции из ЖКТ, что, в свою очередь, может быть объяснено ее возможной высокой биодоступностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Громова О. А., Серов В. Н., Торшин И. Ю. Магний в акушерстве и гинекологии: история применения и современные взгляды // Трудный пациент — 2008. — № 8. — С. 10—15.
2. Магния сульфат в анестезиологии и интенсивной терапии. Часть 2. Применение магния сульфата в интенсивной терапии / И. В. Молчанов, М. Г. Жильцов, Д. Ю. Ретинский // Клиническая анестезиология и реаниматология — 2008. — Т. 5, № 3 — С. 14—19.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва (2000)
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, Москва (2005)
5. Саноцкий И. В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ. (Токсикометрия). — М.: Медицина, 1970. — 343 с.
6. Саноцкий И. В., Уланова И. П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. — М.: Медицина, 1975. — 327 с.

7. Скальный, А. В. Магний. Энергия жизни, уверенность, сила / А. В. Скальный. — М.: МедЭкспертПресс, 2004. — 102 с.

8. Спасов, А. А. Магний в медицинской практике (монография) / А. А. Спасов. — Волгоград: ООО Отрок, 2000. — 272 с.

9. Сравнительная биодоступность некоторых органических солей магния и магниесодержащих препаратов в условиях алиментарной гипомagneзиемии / И. Н. Иежица, М. С. Кравченко, М. В. Харитоновна, А. А. Озеров // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета — 2007. — № 4 (24). — С. 14—26.

10. Сравнительное изучение острой токсичности органических солей магния / А. А. Спасов, Л. И. Бугаева, И. Н. Иежица, М. С. Кравченко, С. А. Лебедева, А. А. Озеров // Микроэлементы в медицине. — 2007 — № 8 (1). — С. 2—4.

11. Чекман И. С. Магний в медицине / И. С. Чекман, Н. А. Горчаков, С. Л. Николай. — Кишинев: Штиница, 1992. — 102 с.

12. Altura, B. M. Importance of magnesium in physiology and medicine and the need for ion selective electrodes / B. M. Altura // Scand. J. Clin. Invest. — 1994. — Vol. 217. — P. 5—9.

13. Durlach, J. Overview of Magnesium research: History and Current Trends / J. Durlach // New perspectives in magnesium research: nutrition and health. Y. Nishizawa, H. Morii, J. Durlach (eds.). — London: Springer-Verlag, 2007. — P. 3—10.

14. Firoz M., Graber M. / Bioavailability of US commercial magnesium preparations // Magnesium Research — 2001. — Vol.14 (4) — P. 257—262.

15. Gunther T. Mechanisms and regulation of Mg²⁺ efflux and Mg²⁺ influx / Miner. Electrolyte Metab. — 1993. — Vol. 19(4—5) — P. 259—265.

16. Kimura M. Overview of Magnesium Nutrition. In: International Magnesium Symposium. New Perspectives in Magnesium Research. London: Springer-Verlag — 2007. — P. 239—260.

17. Kiss, Z. Clinical importance and bioavailability of different magnesium salts after oral administration to humans. / Z. Kiss // Magnes. Res. — 2006. — Vol 19, № 1. — P. 72.

18. Maier J. A., Bernardini D., Rayssiguier Y., Mazur A. High concentrations of magnesium modulate vascular endothelial cell behaviour *in vitro* / Biochim. Biophys. Acta — 2004. — May 24 — Vol. 1689(1) — P. 6—12.

19. Rayssiguier, Y. Magnesium and inflammation: lessons from animal models / Y. Rayssiguier, A. Mazur // Clin. Calcium. — 2005. — Vol. 15, № 2. — P. 245—248. [in Japanese].

20. Seelig, M. S. Magnesium deficiency in the pathogenesis of disease. early roots of cardiovascular, skeletal and renal abnormalities / M. S. Seelig // L. V. Avioli (ed). — New York, N.Y.: Publ. Plenum Medical Book Co., 1980. — 345 p.

Контактная информация

Спасов Александр Алексеевич — д. м. н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, почетный профессор ВолгГМУ, зав. кафедрой фармакологии, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: aspasov@mail.ru