

Recommended by Doctor of Medicine, Professor S. B. Popov

UDC 615.262.1:616.721-001.7:615.454:547.459.5

DOI: 10.24959/cphj.17.1425

I. A. Zupanets, N. V. Davishnia, S. K. Shebeko, M. O. Lyapunov*

National University of Pharmacy

State Scientific Institution "Institute for Single Crystals of the National Academy of sciences of Ukraine"*

THE STUDY OF ACUTE TOXICITY OF THE TOPICAL COMBINATION WITH GLUCOSAMINE AND KETOPROFEN IN THE FORM OF A CREAM-GEL

Safety of new drugs is the most important criteria for the study, and it is determined by the analysis of acute toxicity. When determining acute toxicity the adverse effects of drugs are described in their single use or multiple administrations in a short period of time.

Aim. To determine the toxicity class of a new topical combination containing 5.0 % glucosamine hydrochloride and 2.0 % in the form of a cream-gel or cutaneous application and intragastric introduction.

Materials and methods. The studies were carried out in accordance with EC Directive 86/609 EEC. The cutaneous application of the combination was in the range of doses from 43 to 22600 mg/kg. The object studied was used in the dose range from 500 to 5000 mg/kg in intragastric introduction. The behavior of animals and their survival were observed within 14 days.

Results. During the observation after cutaneous application there was no mortality, changes in the common life cycle of rats and the skin irritation. In intragastric introduction of the combination its LD_{50} was higher than 5000 mg/kg.

Conclusions. Therefore, the study of acute toxicity of the combination has shown the absence of mortality in rats at the maximum allowable doses for cutaneous application and intragastric introduction. This fact indicates a low toxicity of the G/K cream-gel, and it gives the possibility to refer the combination studied to the category of relatively harmless substances.

Key words: topical combination; glucosamine; ketoprofen; acute toxicity; cutaneous application; intragastric administration

I. A. Зупанець, Н. В. Давішня, С. К. Шебеко, М. О. Ляпунов*

Національний фармацевтичний університет, ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України»*

Дослідження гострої токсичності топічної комбінації з глюкозаміном і кетопрофеном у формі крем-гелю

Безпека нових лікарських засобів є найбільш важливим критерієм для дослідження і визначається за допомогою аналізу гострої токсичності. При постановці гострої токсичності описуються побічні ефекти лікарських засобів при їх одноразовому або множинних введеннях впродовж короткого періоду часу.

Мета дослідження. Метою даного дослідження стало визначення класу токсичності нової топічної комбінації, що містить 5,0 % глюкозаміну гідрохлориду та 2,0 % кетопрофену у формі крем-гелю при нашкірній аплікації і внутрішньошлунковому введенні.

Матеріали та методи. Всі дослідження були проведені відповідно до директиви ЄС 86/609 ЕЕС. Нашкірна аплікація комбінації відповідала діапазону доз від 43 до 22600 мг/кг. При внутрішньошлунковому введенні досліджуваний об'єкт застосовувався в діапазоні доз від 500 до 5000 мг/кг. Виживання тварин і їх поведінка були зафіксовані впродовж 14 діб.

Результати. При спостереженні після зовнішнього застосування комбінації не було відмічено летальності серед тварин, змін у загальному життєвому циклі щурів і нашкірних висипань. При внутрішньошлунковому введенні комбінації її LD_{50} було більше за 5000 мг/кг.

Висновки. Отже, дослідження гострої токсичності комбінації показало відсутність летальності тварин при максимальній допустимих дозах для її нашкірної аплікації і внутрішньошлункового введення. Цей факт свідчить про низьку токсичність досліджуваної комбінації і дає можливість віднести її до категорії відносно нешкідливих речовин.

Ключові слова: топічна комбінація; глюкозамін; кетопрофен; гостра токсичність; нашкірна аплікація; внутрішньошлункове введення

И. А. Зупанец, Н. В. Давишня, С. К. Шебеко, М. О. Ляпунов

Национальный фармацевтический университет, ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины»*

Исследование острой токсичности топической комбинации с глюкозамином и кетопрофеном в форме крем-геля

Введение. Безопасность новых лекарственных средств является наиболее важным критерием для исследования и определяется с помощью анализа острой токсичности. При постановке острой токсичности описывают

ся побочные эффекты лекарственных средств при их однократном воздействии или множественных введениях в течение короткого периода времени.

Цель исследования. Целью данного исследования стало определение класса токсичности новой топической комбинации, содержащей 5,0 % глюкозамина гидрохлорида и 2,0 % кетопрофена в форме крем-геля при накожной аппликации и внутрижелудочном введении.

Материалы и методы. Все исследования были проведены в соответствии с директивой ЕС 86/609 ЕЕС. Накожная аппликация комбинации соответствовала диапазону доз от 43 до 22600 мг/кг. При внутрижелудочном введении исследуемый объект применялся в диапазоне доз от 500 до 5000 мг/кг. Выживание животных и их поведение фиксировали на протяжении 14 дней.

Результаты. При наблюдении после накожного применения комбинации не было зафиксировано летальности среди животных, изменений в общем жизненном цикле крыс и накожных высыпаний. При внутрижелудочном введении комбинации ее LD₅₀ была больше чем 5000 мг/кг.

Выводы. Следовательно, исследование острой токсичности комбинации показало отсутствие летальности животных при максимально допустимых дозах для ее накожной аппликации и внутрижелудочного введения. Этот факт свидетельствует о низкой токсичности исследуемой комбинации и дает возможность отнести ее к категории относительно безопасных веществ.

Ключевые слова: топическая комбинация; глюкозамин; кетопрофен; острая токсичность; накожное нанесение; внутрижелудочное введение

Safety of drugs is one of the most important criteria for the study and their further use. Safety of new drugs is determined by the applied method of acute toxicity. Acute toxicity describes the adverse effects of a substance as a result of the single exposure or multiple exposures in a short period of time (usually less than 24 hours) [1]. To be described as acute toxicity the adverse effects should occur within 14 days of the substance administration [2]. As a rule, the study of acute toxicity in animals is necessary for any medicinal product that will be intended for human use. The information obtained from these studies is useful in choosing doses for repeat-dose study, providing the preliminary identification of target organs, and, occasionally, revealing delayed toxicity [3]. The studies of acute toxicity may also help in selecting the starting doses for Phase 1 clinical trials, and provide the information relevant to acute overdosing in humans.

The **aim** of the study was to determine the toxicity class of a new topical combination containing 5.0 % glucosamine hydrochloride and 2.0 % in the form of a cream-gel (G/K cream-gel) for cutaneous application and intragastric administration.

Materials and methods

The G/K cream-gel combination studied was tested for toxicological properties. In the study 39 white rats aged 4-5 months were used. According to the standard health and safety regulations the experimental animals were kept on the appropriate food diet in the vivarium at the Central Research Laboratory of the National University of Pharmacy certified by the State Enterprise "Centre for Drug Evaluation and Research at the Ministry of Health of Ukraine" as a base for research in experimental pharmacology [4]. The studies were conducted in accordance with EC Directive 86/609 EEC of November, 24, 1986 in compliance with laws, acts and

regulations of the EU countries as to protection of animals used for experimentation and other scientific purposes [5, 6].

The Bioethics Commission of the National University of Pharmacy did not find violations of ethical norms in the studies conducted (No. 12 of 12.17.2014). The combination studied has a form for external use (a cream-gel), the first indicators of its acute toxicity were determined by cutaneous application in 15 rats of both sexes weighing 180-200 g. The study was carried out according to the guidelines [6].

The hair on the side of the rat's body was removed 24 hours before application to the skin of the study object. It was shaven in sizes correlated with the dose of application (from 10 % to 50 %) [7, 8]. The dosing of the object was conducted according to the guidelines from 43 to 22600 mg/kg [6]. Within 14 days there was an observation about the general condition and behavior of animals, their survival, food intake, skin, reflex excitability [6, 7].

According to the standards of Laboratory Practice systematic studies of acute toxicity are necessary even for drugs that have topical dosage forms [6].

The study of acute toxicity of the G/K cream-gel was conducted on 24 outbred white rats of both sexes weighing 150-180 g when introducing intragastrically according to the method of Pastushenko et al. [6, 9]. The study object was introduced in the dose range from 500 to 5000 mg/kg (500, 1000, 3000, 5000 mg/kg) [10]. It is the dose threshold up to 5000 mg/kg that is considered reasonable for intragastric introduction in determination of systemic acute toxicity. As a solvent a vegetable oil was used with the ratio of 1 : 1 to the combination studied [11, 12]. Each experimental group contained 6 animals. Within two weeks all groups of animals were monitored. The intoxication of animals was criterion for acute toxicity assessment, namely death of animals, their general condition, changes in the

body weight recorded on the 3rd, 7th and 14th day of the study.

Results and discussion

The results of the study of acute toxicity of the object are presented in Tab. 1 and indicate no mortality in all experimental groups. During 2 weeks observation in cutaneous application there were no changes in the common life cycle of rats, their behavior and appetite. In addition, no irritations or rash on the skin of rats were detected.

The results of the study of systemic acute toxicity according to Pastushenko method [13] are presented in Tab. 2.

The data indicate the absence of mortality in rats after intragastric introduction of the object studied in the range of doses from 500 to 5000 mg/kg within 14 days.

During the observation there were no changes in behavior, appetite, skin and visible mucous membranes, signs of pathological processes in breathing, motor activity, tone of muscles, the cardiovascular system, etc., in all animals studied. No disorders in diuresis and the state of the gastrointestinal tract were observed.

However, introduction of high doses of the G/K cream-gel combination from 3000 mg/kg within the first days of the study caused slight weakness and fatigue. The animals of this group were less active. Somewhere darkening of the stool was noted. But these symptoms disappeared before the 7-day of study, all general indicators returned to the normal level. During the experiment dynamics of changes in the body weight was determined as an important indicator of intoxication (Tab. 3).

At the beginning of the study all animals were weighed on an empty stomach, their average indicators in different groups ranged from 164.3 to 170.5 g. On the third day of the study a significant reduction of the body weight was observed only in the dose of 5000 mg/kg, it was 158.3 ± 4.5 g.

Weighing of animals in all experimental groups on the 7-th day showed the tendency for normaliza-

Table 1
Mortality rates in rats when studying acute toxicity in cutaneous application of the G/K cream-gel (n = 15)

Group	Dose, mg/kg	The number of animals that died in the group / The number of animals in the group
1	43	0/3
2	340	0/3
3	2810	0/3
4	22500	0/3
5	22600	0/3

Note. n – the total number of animals in the study

Table 2
Mortality rates in rats when studying systemic acute toxicity of the G/K cream-gel combination (n=24)

Group	Dose, mg/kg	The number of animals that died in the group / The number of animals in the group
1	500	0/6
2	1000	0/6
3	3000	0/6
4	5000	0/6

Note. n – the total number of animals in the study

tion of the body weight. On the 14-th day of the study the indicators of all groups were close to their start values, and the group with the dose of 1000 mg/kg even slightly exceeded them. Taking into account the absence of mortality in animals in all experimental groups it can be argued that the LD₅₀ value of the object studied was higher than 5000 mg/kg in intragastric introduction.

Table 3
Dynamic of changes in the body weight of rats by the effect of systemic acute toxicity of the G/K cream-gel combination studied (n=24) ($\bar{X} \pm S_x$)

Group	Dose, mg/kg	b.w. before introduction, g	b.w., the 3-rd day, g	b.w., the 7-th day, g	b.w., the 14-th day, g
1	500	164.3±5.5	157.8±5.1	160.7±5.3	164.1±6.0
2	1000	168.5±3.5	162.7±3.2	165.3±3.2	169.3±2.8
3	3000	164.7±4.5	156.7±4.2	159.8±4.2	163.5±4.3
4	5000	170.5±4.3 ¹	158.3±4.5 ¹	164.3±4.4	169.5±4.4

Notes: ¹ – significant differences compared to the body weight (b.w.) before introduction ($p < 0.05$); n – the total number of animals in the study.

According to the guidelines the further study of higher doses is inappropriate, and the G/K cream-gel combination studied can be classified as a relatively harmless substance [14]. This statement was also proven by the dynamics of changes in the body weight during the experiment.

CONCLUSIONS

Therefore, the study of acute toxicity of the G/K cream-gel combination has shown the absence of

mortality in rats at the maximum allowable doses for cutaneous application and intragastric introduction. This fact indicates a low toxicity of the G/K cream-gel, and it gives the possibility to refer the combination studied to the category of relatively harmless substances.

Conflict of Interests: authors have no conflict of interests to declare.

References

1. Acute toxicity safety emporium : The MSDS HyperGlossary. – 2006. – P. 11–15.
2. Chemical process safety : fundamentals with applications / D. A. Crowl, J. F. Louvar et al. – 3-rd ed., Prentice Hall, New Jersey, 2011. – 254 p.
3. Guidance for industry single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals / Center for Drug Evaluation and Research (CDER). – 1996. – 2 p.
4. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose : Council of Europe 18.03.1986. – Strasbourg, 1986. – 52 p.
5. Лікарські засоби. Належна лабораторна практика (видання офіційне) : настанова СТ-Н МОЗУ 42–6.0:2008 / О. Стефанов, Т. Бухтіарова, В. Коваленко та ін. – К. : Моріон, 2009. – С. 37–68.
6. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіценна, 2001. – 528 с.
7. Яковлева, Л. В. Експериментальне вивчення нових препаратів для місцевого лікування ран : метод. рек. / Л. В. Яковлева, О. В. Ткачова, Я. О. Бутко. – К. : ДЕЦ МОЗ України, 2013. – 52 с.
8. Яковлева, Л. В. Оптимізація доклінічного вивчення ефективності та нешкідливості лікарських засобів у формі мазей та гелів : інф. лист № 101–2008 / Л. В. Яковлева, І. Г. Бутенко, К. П. Бездітко. – К. : Укрмедпатентінф., 2008. – 5 с.
9. Зупанец, І. А. Экспериментальное обоснование использования глюкозамина и его производных в медицине : дис. в форме науч. докл. ... докт. мед. наук: спец. 14.00.25 «Фармакология» / И. А. Зупанец. – Купавна, 1993. – 90 с.
10. Зупанец, К. О. Дослідження токсичних та протизапальних властивостей композиції на основі аміноцукрів – похідних глюкозаміну та флавоноїду кверцетину / К. О. Зупанец, С. Б. Попов, І. А. Отришко // Клінічна фармація. – 2009. – Т. 13, № 4. – С. 50–53.
11. Аюпова, Р. Б. Изучение острой токсичности, аллергенности и эффективности новой мази «Абиес» / Р. Б. Аюпова // Вестник КазНМУ. – 2011. – № 3. – С. 9–20.
12. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под ред. Р. У. Хабриева. – М., 2005. – 832 с.
13. Пастушенко, Т. В. Экспресс-метод для определения среднесмертельных доз химических веществ / Т. В. Пастушенко, Л. Б. Маруший, А. А. Жуков // Гигиена и санитария. – 1985. – № 6. – С. 46–47.
14. Сидоров, К. К. Токсикология новых промышленных химических веществ / К. К. Сидоров. – М. : Медицина, 1973. – Вып. 3. – 47 с.

References

1. *Acute toxicity safety emporium: The MSDS HyperGlossary* (2006), 11–15.
2. Crowl, D. A., Louvar, J. F. et al. (2011). *Chemical process safety : fundamentals with applications*. Third Edition, Prentice Hall, New Jersey, 254.
3. Guidance for industry single dose acute toxicity testing for pharmaceuticals (1996). *Center for Drug Evaluation and Research (CDER)*, 2.
4. *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purpose* (1986). Strasbourg, 52.
5. Stefanov, O., Buhtiarova, T., Kovalenko, V. et al. (2009). *Nastanova ST-N MOZU 42–6.0:2008. Likarski zasoby. Nalezhna laboratorna praktyka*. Kyiv: Morion, 37–68.
6. Stefanova, O. V. (2001). *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv*. Kyiv: Avicenna, 528.
7. Yakovlieva, L. V., Tkachova, O. V., Butko, Ya. O. (2013). *Eksperymentalne vyvchennia novykh preparativ dlia miscevoho likuvannia ran*. Kyiv: DETCS MOZ Ukrainy, 52.
8. Yakovlieva, L. V., Butenko, I. H., Bezditko, K. P. (2008). *Optimizatsiia doklinichnoho vyvchennia efektyvnosti ta neshkidlyvosti likarskykh zasobiv u formi mazi ta geliv*. Kyiv: Ukrmedpatentinf., 5.
9. Zupanets, I. A. (1993). *Kupavna*, 90.
10. Zupanets, K. O., Popov, S. B., Otrishko, I. A. (2009). *Klinichna farmatsiia – Clinical pharmacy*, 13 (4), 50–53.
11. Aiupova, R. B. (2011). *Vestnik KazNMU*, 3, 9–20.
12. Khabrieva, R. U. (2005). *Rukovodstvo po eksperimentalnomu (doklinicheskomu) izucheniiu novykh farmakologicheskikh veshchestv*. Moscow, 832.
13. Pastushenko, T. B., Marushyi, L. B., Zhukov, A. A. (1985). *Gigiiena i sanitaria*, 6, 46–47.
14. Sidorov, K. K. (1973). *Toksikologiya novykh promyshlennykh khimicheskikh veshhestv*. Moscow: Meditsina, 3, 47.

Information about authors / Відомості про авторів / Інформація об авторах

Zurapets I. A., Doctor of Medicine (Dr. habil.), professor, head of the Clinical Pharmacology and Clinical Pharmacy Department, National University of Pharmacy

Зупанець І. А., доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний фармацевтичний університет

Зупанець И. А., доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической фармакологии и клинической фармации, Национальный фармацевтический университет

Davishnia I. V., Candidate of Pharmacy (Ph.D.), teaching assistant of the Clinical Pharmacology and Clinical Pharmacy Department, National University of Pharmacy

Давишня І. В., кандидат фармацевтичних наук, асистент кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний фармацевтичний університет

Давишня И. В., кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры клинической фармакологии и клинической фармации, Национальный фармацевтический университет

Shebeko S. K., Candidate of Pharmacy (Ph.D.), associate professor of the Clinical Pharmacology and Clinical Pharmacy Department, National University of Pharmacy

Шебеко С. К., кандидат фармацевтичних наук, доцент кафедри клінічної фармакології та клінічної фармації, Національний фармацевтичний університет

Шебеко С. К., кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры клинической фармакологии и клинической фармации, Национальный фармацевтический университет

Lyuripov M. O., Doctor of Pharmacy (Dr. habil.), professor, honored scientific consultant, State Scientific Institution "Institute for Single Crystals of the National Academy of sciences of Ukraine"

Ляпунов М. О., доктор фармацевтичних наук, професор, заслужений науковий консультант ДНУ «НТК «Інститут монокристалів» НАН України»

Ляпунов Н. А., доктор фармацевтических наук, профессор, заслуженный научный консультант ГНУ «НТК «Институт монокристаллов» НАН Украины»

Адреса для листування: 61057, м. Харків, вул. Пушкінська, 27, кафедра клінічної фармакології та клінічної фармації НФаУ.

+38 057 706 30 72. E-mail: clinpharm@nuph.edu.ua

Mailing address: 27, Pushkinskaya str., Kharkiv, 61057, Department of Clinical Pharmacology and Clinical Pharmacy, National University of Pharmacy. +38 057 706 30 72. E-mail: clinpharm@nuph.edu.ua

Адрес для переписки: 61057, г. Харьков, ул. Пушкинская, 27, кафедра клинической фармакологии и клинической фармации НФаУ.

+38 057 706 30 72. E-mail: clinpharm@nuph.edu.ua
