



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 76960

(13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 31/517

A61P 23/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ЗНЕБОЛЮВАННЯ

1

(21) 2003032528
(22) 11.09.2001
(24) 16.10.2006
(86) PCT/CN01/01391, 11.09.2001
(31) 00 1 24517.1
(32) 18.09.2000
(33) CN
(46) 16.10.2006, Бюл. № 10, 2006 р.
(72) Дунь Чінбін, CN, Шум Френк Гайкунь, CN
(73) ВЕКС МЕДІКАЛ ЛІМІТЕД, CN
(56) CN 1145225 A; 19-03-1997
WO 98/51290 A2; 19-11-1998
US 4,022,899 B1; 10-05-1977
US 4,029,793 B1; 14-06-1977
US 6,030,974 B1; 29-02-2000
(57) 1. Спосіб довготривалого, до 20 днів, знеболювання у ссавців, які відчувають біль, в якому системно вводять ефективну кількість препарату, що містить блокатор натрієвих каналів, вибраний з групи, яка складається з тетродотоксину, сакситоксину та їх похідних, у фармацевтично прийнятному носії, і що ефективно полегшує біль при введенні вищезазначеного препарату у дозі від 0,1 до 5мкг на кілограм ваги тіла.
2. Спосіб за п.1, в якому блокатор натрієвих каналів є сполукою, вибраною з групи, що складається з тетродотоксину, ангідротетродотоксину, тетродоаміноксину, метокситетродотоксину, етокситетродотоксину, деокситетродотоксину та тетродонової кислоти.
3. Спосіб за п.1, в якому системне введення здійснюють шляхом внутрішньом'язової ін'єкції, підшкірної ін'єкції, внутрішньовенної ін'єкції, перорального приймання, під'язикового приймання, накладання шкірного пластиру, імплантованого осмотичного насоса, колагенового імплантата, аерозольної інгаляції або введенням супозиторія.

2

4. Спосіб за п.1, в якому біль викликано механічним, хімічним або ішемічним подразненням чи запаленням.
5. Спосіб за п.1, в якому біль є невропатичним болем.
6. Спосіб за п.1, в якому причиною болю є рак.
7. Спосіб за п.1, в якому препарат вводять однією чи більшою дозою в день протягом періоду лікування.
8. Спосіб за п.1, в якому ссавцем є особина жіночої статі у репродуктивному віці.
9. Спосіб за п.3, в якому розчин для ін'єкцій вводять кожні 3-12 годин протягом періоду лікування.
10. Спосіб за п.9, в якому період лікування складає від одного до десяти днів.
11. Спосіб за п.10, в якому лікування складає три дні.
12. Спосіб за п.9, в якому лікування повторюють.
13. Спосіб за п.3, в якому вказане введення здійснюють шляхом ін'єкції і препарат містить розчин тетродотоксину в оцтовій кислоті.
14. Спосіб за п.1, в якому блокатором натрієвих каналів є сполука, що містить тетрагідропуриновий компонент, який включає два гуанідинових фрагменти, зв'язаних стійким азокетальним зв'язком, що має молекулярну формулу $C_{10}H_{17}N_7O_4$ (молекулярна маса 299,30), або його похідні.
15. Спосіб за п.14, в якому блокатором натрієвих каналів є гідроксисакситоксин або неосакситоксин.
16. Спосіб за п.6, в якому біль виникає внаслідок онкологічного захворювання, вибраного з групи хвороб, до складу якої входять рак печінки, рак прямої кишки, лейоміосаркома, рак кісток, рак лімфатичної системи, рак стравоходу, рак геніталій, рак передміхурової залози, рак травної системи, рак шлунка, рак товстого кишечника, рак грудей, рак дихальної системи, рак легень, рак бронхів, рак сечовидільної системи, лімфома та рак шкіри.

Даний винахід пропонує метод полегшення більш різних типів, наприклад, центрального болю, болю при ракових хворобах, а, також, фантомного болю, шляхом системного введення сполук,

що блокують натрієві канали, тобто тетродотоксин та сакситоксин.

Біль - відчуття, що може спричинити дискомфорт, викликати муки і страждання. Біль буває хронічним та пульсуючим. Може бути гострим,

(19) UA (11) 76960 (13) C2

тупим, чи щемливим. Проте, якими б не були больові почування, правдиво описати чи охарактеризувати біль може лише той, хто його відчуває. Оскільки прояви болю суто індивідуальні, ніхто сторонній не спроможний чітко їх оцінити.

Всесвітня Організація Охорони Здоров'я (ВО-ОЗ) визнає так звані "три ступеня анальгезії" - систему, яку застосовують при фармакологічному знеболюванні. Вона починається з введення відносно малих доз слабких анальгетиків і закінчується великими дозами сильнодіючих препаратів. Три ступеня передбачають використання:

неопіоїдних анальгетиків - таких, як нестероїдні протизапальні засоби (НПЗЗ) - окремо, чи разом з коанальгетиками;

слабких опіоїдів - окремо, або разом з коанальгетиками - від хронічного та помірного болю.

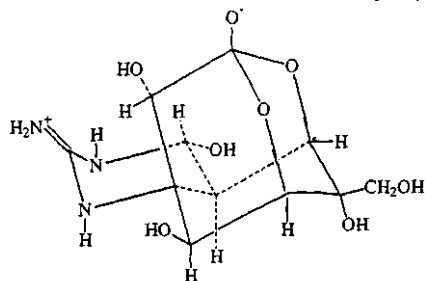
сильнодіючих опіоїдів, - окремо, або разом з коанальгетиками - від хронічного та сильного болю.

Застосування опіоїдних анальгетиків, навіть щоб поліпшити сильний біль, викликає сумніви в медичних колах через наявність небезпеки призвичаїтися до препарату. [Див., наприклад, працю S.E. Weitz et al., New Jersey Medicine, Vol.97: 63-67 (2000)].

Тетродотоксин - це небілковий нейротоксин, що міститься в організмах багатьох тварин, серед яких риби голкобрюх та бичок, тритони, жаби і смугастий восьминіг.

Тетродотоксин отримують з яєчників та ікри деяких видів голкобрюха, риби підряду *Gymnodontes*. Тетродотоксин речовина, що викликає отруєння при вживанні неправильно приготовленої риби фуґу в японських суши-барах. Також можливо добути тетродотоксин з каліфорнійського тритона (*Taricha torosa*).

Одним з видів біологічної активності тетродотоксина є зв'язування альфа-субодиниці натрієвих каналів нейронів. Тетродотоксин має хімічну формулу $C_{11}H_{17}N_3O_8$, а його молекулярна маса становить 319,28. У десятому виданні американського довідника Мерка (*The Merck Index*) за 1983р. вказано, що тетродотоксин - це родова назва сполуки октагідро-12-(гідроксиметил)-2-іміно-5,9:7,10а-діметан-10аН-(1,3)діоксоцино(6,5-d)-піримідин-4,7,10,11,12-пентола, що має таку структуру:



Згідно тому ж довідникові [*The Merck Index*, 10th Ed., 1983], тетродотоксин також називають макулотоксин, сфероїдин, тарихатоксин, тетродонтоксин, отрута фуґу або ТТХ.

[За американським патентом U.S. Patent No.6,030,974], назва «тетродотоксин» або «ТТХ» належить до амінопергідрокіназолинових сполук, що мають молекулярну формулу $C_{11}H_{17}N_3O_8$, та

їх похідних, серед яких ангідротетродотоксин, тетродоамінотоксин, метокситетродотоксин, етокситетродотоксин, деокситетродотоксин і тетродонова кислота (див. у Као). Прикладом аналогів ТТХ є, також, нові ТТХ-аналоги, виділені з різних живих організмів, а також частково або повністю синтезовані хімічним шляхом. Див., наприклад, [працю Yotsu, M. et al. *Agric. Biol. Chem.*, 53 (3): 893-895 (1989)]. Такі аналоги зв'язано з тією ж ділянкою в альфасубодиниці натрієвих каналів, що й ТТХ.

[У працях Adams, et al., U.S. Patent No.4,022,899 та 4,029,793] наведено склад препарату для місцевого знеболювання, що містить, у фармацевтично прийнятному носії, суміш певного токсину, тобто тетродотоксину або дезокситетродотоксину, та іншої сполуки: найчастіше стандартного препарату для місцевого знеболювання, або аналога, що забезпечує провідникову блокаду. Стандартним препаратом для місцевої анестезії може бути аміноацетанлід (наприклад, лідокаїн), аміноалкілбензоат (наприклад, прокаїн або кокаїн), амінокарбамат (наприклад, диперодон), N-феніламідин (наприклад, фенацетин), N-аміноалкіламід (наприклад, дибукаїн), амінокетон (наприклад, фаликаїн) чи амінофір (наприклад, прамоксин).

Згідно [з американським патентом U.S. Patent No.6,030,974], назва «сакситоксин» або «STX» належить сполукам, що мають тетрагідропуринову функцію з двома гуанідиновими фрагментами зі стабільним азокетальним зв'язком молекулярна формула тих сполук: $C_{10}H_{17}N_3O_4$ (молекулярна маса 299,30); та їх заміщеним похідним, до яких належать, серед інших, гідроксисакситоксини і неосакситоксин. Див. [працю Bower et al., *Nonprotein Neurotoxins, Clin. Toxicol.* 18(7): 813-863 (1981)].

Тетродотоксин та його значення в дослідженні збудження розглядалися [в праці C.Y. Kao, *Pharmacological Reviews*, Vol.18, No.2, 997-1049 (1966)]. Автор підкреслює, що одним з найпомітніших проявів впливу тетродотоксину на тваринний організм в цілому є, швидко прогресуюче та помітне, ослаблення всієї, доволіно скорочуваної, включаючи й дихальну, мускулатури [стор.1016]. Проте, там же зазначено, що питання про специфічну дію тетродотоксину на центральну нервову систему є спірним [стор.1022, рядок 3].

[У працях Pan et al., американський патент U.S. Patent 5,846,975], описано застосування сполук гідрованого амінохіназолина, таких як тетродотоксин, у лікуванні наркотичної залежності у людей. Тетродотоксин показав свою ефективність при синдромі відміни опіуму, героїну, морфіну, кокаїну, амфетаміну, долантину, дигідроеторфину й метадону. У цьому патенті наведено дозування, ефективне при зніманні абстинентних симптомів.

Тетродотоксин може використовуватися як місцевий анестетик, за силою дії він у десять тисяч разів перевищує традиційні місцеві ненаркотичні знеболювальні засоби [див. працю C.Y. Kao and F.A. Fulman, *J. Pharmacol.*, 140, 31-40 (1965)]. В матеріалах [американських патентів U.S. Patent No.4,022,899 та U.S. Patent No.4,029,793] наведено дані про дію препаратів тетродотоксина у поєд-

нанні з іншими анестетиками, що мають широке застосування.

[Американський патент U.S. Patent No.6,030,974] наводить засіб місцевої анестезії для ссавців, які відчувають біль у ділянках епітелію. Засіб полягає в локальному застосовуванні на відповідній ділянці, та за допомогою фармацевтично прийняттого носія, ефективної дози сполуки, що довгочасно блокує натрієві канали. На роль цього блокатора натрієвих каналів [американський патент U.S. Patent No.6,030,974] пропонує сполуку, що містить тетродотоксин або сакситоксин з концентрацією у межах 0,001-10 мілімолей.

[У праці Zapata et al., Pain 72:41-49 (1997)] обговорюється використання тетродотоксину для приглушення невропатичної ектопічної активності в невромах, гангліях задніх корінців спинного мозку і нейронах його задніх рогів. Неврональна активність є наслідком невроми, викликані механічним, хімічним чи ішемічним пошкодженням. Досліджувалася дія внутрішньовенно введеного ТТХ на неврональне індукування сідничного нерва у самців щурів. Разом з тим, дозування та дія препарату вивчалися у даних дослідженнях на тваринах, перебуваючих у стані анестезії та на штучному диханні. Через це, ті дози перевищують максимально допустимі за звичайних умов, а застосування не відповідає існуючим нормам застосування тетродотоксину в клінічних умовах.

Незважаючи на всебічні дослідження ефективності ТТХ та його похідних, як блокаторів натрієвих каналів і засобу місцевого знеболювання, про системне застосування чистого ТТХ як анальгетика не повідомлялося. Здається, що спроможність ТТХ поліпшити біль, що є продуктом діяльності центральної нервової системи, а не збудження периферичних нервів, не було описано.

Рішення проблем поліпшення сильного хронічного болю, що виникає, наприклад, при ракових хворобах, а, також, допомога пацієнтам, які страждають від фантомних болів, є дуже важливим у сучасній медицині, особливо враховуючи широке розповсюдження ракових захворювань серед населення.

Хворі на рак часто страждають від сильного болю. Цей біль називають центральним або хронічним. Проте не тільки ракові пацієнти можуть відчувати центральний чи хронічний біль - дуже сильними та важкопереносимими болями є й фантомні. Усі ці види болю лікували опіатами (наприклад, морфіном). Недоліком опіатної аналгезії є призвичаїння організму до опіатів.

Гострий локальний біль може спричинитися зубним болем, подразненням слизової оболонки очей, запаленням нервових тканин, гангренозною виразкою, виразкою геніталій, ураженням епітелію через опіки, хірургічне втручання чи підвищену чутливість.

Сприймання болю можна також розділити на три категорії: загострене ноцицептивне сприйняття; опосередкований біль, зумовлений стійким аферентним стимулом; та невропатичний біль, пов'язаний зі зміненим сприйняттям через пошкодження нерва.

Деякі препарати-блокатори натрієвих каналів (лідоканін і мексілетин), загальнозживані для міс-

цевого знеболення, також було застосовано системно. Вони маргінально ефективні при блокуванні загостреного ноцицептивного сприйняття, але мають деякий вплив на чутливість спинного мозку та виділення субстанції Р, що вказує на беззаспокійливу дію. Разом з тим, ефективні дози перевищують максимально дозволені, і, тому, побічні ефекти перешкоджають застосовуванню таких сполук як системних беззаспокійливих засобів. Крім того, блокатори натрієвих каналів були раніше вже визнані абсолютно неефективними щодо зняття невропатичного болю. [Див. працю M.S. Wallace, Calcium and Sodium channel blocking compounds for the Treatment of Pain, Clin. J. Pain, Vol.16: S80-S85 (2000)].

Ряд блокаторів натрієвих каналів (наприклад, лідоканін і карбамазепін) було застосовано для лікування невропатичного болю в тригемінальній невралгії. Такі речовини спроможні блокувати натрієві канали, перешкоджаючи аномальній діяльності периферичної нервової системи, у концентраціях, що не порушують нервову провідність. Разом з тим, через можливість завдати серйозні пошкодження печінці, слід обмежити застосування карбамазепіна жінкам на початковій стадії вагітності та в період грудного вигодовування, а, також, обережно прописувати його людям похилого віку та хворим на глаукому і ангіокардіопатію у важкій формі. З іншого боку, лідоканін настільки збуджує центральну нервову систему, що може спричинити тремтіння, спазм, клонічну судому. Тому ці два препарати вважають непридатними до застосування системно як нові анальгетики. Таким чином виникла зацікавленість у розробці інших сполук-блокаторів натрієвих каналів.

У 1998 році, у праці Rabert et al була продемонстрована наявність більш ніж єдиного виду натрієвих каналів у сенсорних нейронах ганглія заднього корінця у щурів. Такі натрієві канали диференціювали за різною чутливістю до ТТХ: чутливий, або сенсильний до ТТХ натрієвий канал (TTX-S) блокується ТТХ при IK_{50} на рівні 1-20 наномолей. Стійкий до дії ТТХ, тобто ТТХ-резистентний (TTX-R) натрієвий канал блокується при IK_{50} приблизно на рівні 100 мікромолей. Усі натрієві канали типів $rBIIA$, $rBII1$, $rSKM1$, $rPN1$ і $rPN4$ належать до категорії ТТХ-S, тобто сенсильних, тоді як натрієві канали $rPN3/SNS$ є ТТХ-R, тобто резистентні. Також існує два типи натрієвих каналів у сенсорних нейронах ганглія заднього корінця у людини: $hPN1$ є ТТХ-S каналом, а $hPN3$ належить до ТТХ-R каналів, які блокуються ТТХ при $IK_{50}=80$ мікромолей. У цій праці також показано, що з натрієвими каналами сенсорних нейронів ганглія заднього корінця у ссавців пов'язано принаймі два види струму, що з'являються під час руху іонів натрію: струм, сенсильний до ТТХ (TTX-SI_{Na}) зі швидкою кінетикою інактивації, та струм, резистентний до дії ТТХ (TTX-R_{Na}), з повільнішою кінетикою інактивації. Біологічну роль цих двох натрієвих струмів не виявлено, але численні дослідження довели, що параметри струмів ТТХ-R_{Na} в ганглії заднього корінця, очевидно, забезпечують потрібні умови для постійного вмикання нейронної передачі сигналу в ситуаціях, характерних для більшості невропатичних болей.

Ноцицептори являють собою первинні аферентні нейрони, що реагують на шкідливі та небезпечні для тканин подразники, та займають особливе положення серед усіх сенсорних нейронів, оскільки їх можливо сенсibilізувати. Зниження порога і посилення відповідної реакції на постійний подразник, що характерно для сенсibilізування ноцицептора, вважають головною причиною гіперальгезії або болісності, пов'язаної з ушкодженням тканин. Речовини, виділені у місці пошкодження тканини, сенсibilізують ноцицептори, викликаючи каскад реакцій, що ведуть до зміни іонної провідності периферичного закінчення ноцицептора. Відомо, що сенсорні нейрони малого діаметру в ганглії заднього корінця виявляють властивості TTX-R каналу. Різні запальні ураження та безпосереднє пошкодження волокон сенсорного нейрона призводять до зниження порогів активації сенсорних нейронів, тоді як тривала активація сенсорних нейронів може викликати як центральну сенсibilізацію, так і дійсно руйнівну діяльність у спинному мозку. При високому рівні збудження сенсорних нейронів істотно зростають активність натрієвих каналів і регульований напругою потік іонів натрію. Результати багатьох сучасних досліджень вказують, що підвищення TTX-RI_{Na} може грати значну роль у гіперзбудливості сенсорних нейронів. Підвищений TTX-RI_{Na} може сприяти розвитку різних форм гострого та хронічного болю, наприклад, невропатичного болю або болю при невромі, які викликані запаленням та пошкодженням нерву. Щоб дослідити дію гіперальгезичних агентів, які модулюють TTX-RI_{Na} в первинній культурі нейронів ганглія заднього корінця, було застосовано електрофізіологічні методи фіксації потенціалу. Отримані результати вказують, що простагландин E₂ (PGE₂), аденозин і серотонін підвищують TTX-RI_{Na}, зміщують співвідношення провідність/напруга у бік гіперполяризації та збільшують швидкість його активації і інактивації. Навпаки, тромбоксан B₂, продукт реакції циклооксигенази, що не призводить до гіперальгезії, не впливає на TTX-RI_{Na}. Такі результати свідчать, що підвищення TTX-RI_{Na} дає підстави для зростання нейрональної сенсibilізації ноцицепторів, викликані гіперальгезичними агентами. Внутрішньооболонкове введення антисенсових і сенсових олігодеоксинуклеотидів (ODN_S), які орієнтовані на унікальну послідовність rPN3 або SNS, застосовувалося, щоб дослідити роль цих каналів у гіперальгезії, викликану PGE₂. Виключно антисенсові олігодеоксинуклеотиди (ODN_S) призводили до зниження гіперальгезії, викликані PGE₂. Така, викликана PGE₂ гіперальгезія частково виліковувалася після 4 днів, рахуючи від останньої ін'єкції антисенсових олігодеоксинуклеотидів та повністю зникла протягом 7 днів. Анти сенсові олігодеоксинуклеотиди селективно й значним чином знижували щільність струму TTX-RI_{Na} в культурах сенсорних нейронів. Отримані результати свідчать на користь гіпотези про те, що модуляція TTX-RI_{Na} сприяє запальній гіперальгезії.

Автори Novakovic et al. через свої імуністохімічні дослідження доводять, що в місці пошкодження відбувається акумуляція натрієвих каналів, зокрема, каналів PN3. Невропатична травма змінює субклітинну локалізацію каналів PN3, так само

як і нервову провідність. В моделях невропатичного та невромного болю антероградний аксонний транспорт натрієвих каналів повністю блокується, а в моделі невропатичного болю при хронічній странгуляційній травмі (CCI) - суттєво знижується. Оскільки натрієві канали, і, напевно, канали TTX-R, постійно транспортуються до периферійних закінчень, - зміни в аксонному транспорті, кінець кінцем призводять до акумуляції каналів у пошкодженій ділянці. Дегенерація нерва та наступна регенерація безлічі нових відростків аксона може відбуватися на ділянці пошкодження в рамках моделей хронічної странгуляційної травми та невроми. Багато з таких нових відростків виявляються імуніопозитивними по відношенню до PN3. У регенонованих волокнах має місце надмірне накопичування натрієвих каналів. Сенсibilізація ЦНС є важливою характеристикою невропатичного болю. Формування й підтримка сенсibilізації ЦНС спирається на інформацію відчуття, яку передають нервові волокна ноцицептора. Оскільки канали TTX-R беруть участь в кодуванні інформації про болеві відчуття, вони (TTX-R канали), певно, відіграють важливу роль у сприйнятті больового сигналу.

Таким чином, вважається, що модуляція натрієвих каналів TTX-R бере участь у сенсibilізації ноцицепторів у стані хронічного болю. Розподілення тканин каналів TTX-R обмежується субпопуляцією сенсорних нейронів, що мають властивості ноцицепторів. Можливо, що розробка фармакотерапевтичного агента, селективно блокуючого канали TTX-R, допоможе створити ефективний засіб для поліпшення болю. hPN3 спроможний відіграти важливу роль при розробці терапевтичного препарату для лікування гострого та хронічного болю.

TTX, блокуючи канали TTX-R, може сприяти антиноцицептивній дії TTX у тварин. У запропонованих для тварин моделях болю, невроми, невропатичний біль або хронічна дизестезія, викликані штучним пошкодженням периферичних сенсорних нервів, призводять до ектопічних викидів, що відбуваються як в очазі пошкодження, так і, відповідно, зумовлюють гіперзбудливість певних нейронів заднього рога спинного мозку. TTX пригнічує невропатичну ектопічну активність невром, нейронів ганглія заднього корінця і заднього рога залежно від введеної дози. Проте, на теперішній час, залишається нез'ясованою роль каналів TTX-S і TTX-R у формуванні ектопічних викидів у невромах, нейронах ганглія заднього корінця і заднього рога.

TTX справляє антиноцицептивну дію в дозуванні, що не викликає помітних змін у поведінці тварин. Разом з тим, TTX при такому дозуванні не модулює розподілення та функції натрієвих каналів, а також не повністю блокує нервову провідність при різних проявах болю. Результати досліджень свідчать, що TTX спроможний раптово вплинути на натрієві канали TTX-R для забезпечення антиноцицептивної дії.

Біль буває гострим або хронічним. Гострий біль може бути дуже сильним, але триває він відносно недовго. Найчастіше, такий біль - сигнал про пошкодження тканин організму, він, у більшості випадків, зникає після усунення пошкодження.

Хронічний біль, за своєю інтенсивністю, може варіюватися від слабкого до дуже сильного; він

відчувається так чи інакше ще досить довго. Хронічний біль часто з'являється без будь-яких зовнішніх ознак пошкодження.

ТТХ ефективно допомагає від гострого болю, викликаного механічним або хімічним подразненням, а, також, запаленням.

Було встановлено, що тетродотоксин (ТТХ) ефективно впливає на біль, спричинений раком печінки, прямої кишки, лейміосаркомою, раком кісток, шлунка, лімфатичної системи, стравоходу та іншими поширеними формами рака. ТТХ також допомагає від центрального, хронічного і фантомного болю.

Тетродотоксин ефективний по відношенню до всіх форм важкого хронічного болю. Тетродотоксин спроможний забезпечити аналгезію ссавців, що страждають від гострого чи хронічного болю. Запропонований цим винаходом метод передбачає системне (загалом, для всього організму) введення ефективної дози тривалодіючої сполуки-блокатора натрієвих каналів, тобто тетродотоксину, за допомогою фармакологічно прийнятного носія.

ТТХ вводиться в дозуванні, що знаходиться в інтервалі 0,1-1мкг/кг. Схема вживання ТТХ передбачає до 4-х доз на день протягом 3-х днів. Введена доза нерідко діє до 20 днів.

Чистота препарату ТТХ, як правило, складає 96% чи більше.

Сакситоксин (STX) - це високоселективний і високоактивний блокатор натрієвих каналів. За матеріалами [американського патенту U.S. Patent 6,030,974], як ТТХ, так і STX специфічно зв'язуються з ділянкою, розміщеною на зовнішній частині альфа-субодиниці натрієвого каналу. Ця ділянка належить до зони SS1, або SS2 [див. працю Evans, Tetrodotoxin, Saxitoxin, and Related Substances: Their Applications in Neurobiology, International Review of Neurobiology, Vol.15, pp.83-166, 1972, Academic Press].

ЛД₅₀ сакситоксину для мишей при внутрішньоочеревинній ін'єкції становить 10мкг/кг [Schantz, E.J., McFarren, E.F., Schaeffer, M.L. and Lewis, K.H.: Purified shellfish poison for bioassay standardization. J.Assoc. Official Agric. Chemist. 41: 160-168, 1958.]; для шурів, при внутрішньоочеревинному введенні, ЛД₅₀ дорівнює 10,5мкг/кг [Watts, J.S., DaCosta, F. and Reilly, J.: Some factors influencing the action of paralytic shellfish poison in rats. Fed. Proc. 24: 392, 1965]; за існуючими оцінками, летальна доза для людини (при пероральному введенні) знаходиться у межах від 300мкг до 1,0мг [Bower et al., Clin. Toxicol., 18(7). 813-863, 1981].

Оскільки ТТХ і STX мають однакову токсичність та подібні за принципом дії, - їх дозування не має суттєвих розбіжностей.

Біль може виникати з багатьох приводів. Нерідко це трапляється через травми типу розтягнення зв'язок або удару м'язів, через переломи кісток або хірургічне втручання. Багатьом знайомий біль, пов'язаний з запаленням, наприклад, зубний біль. Дуже поширене явище - головний біль, що часто виникає з невідомих причин.

Хворі на рак можуть відчувати біль з різних приводів: його може спровокувати розвиток хвороби, це також може бути наслідком лікування. На-

приклад, після будь-якого хірургічного втручання людина відчуває біль; це - наслідок операції. Однак, далеко не всі хворі на рак відчувають біль, а серед тих, хто відчуває - не всі страждають від болю постійно.

Біль від раку може залежати від типу онкозахворювання, від його стадії (ступінню ураження) й больового порога (больової стійкості) даного пацієнта. Біль при раку, що триває кілька та більше днів може бути викликаний:

- притисканням пухлиною внутрішніх органів, нервів або кісток;
- порушенням кровообігу, оскільки рак блокує кровоносні судини;
- блокадою якого-небудь органу чи тракту;
- розростанням метастаз - ракових клітин;
- інфекцією чи запаленням;
- хіміотерапією, радіотерапією або хірургічним втручанням;
- ригідністю суглобів внаслідок знерухомлювання;
- емоційним напруженням, депресією, страхом, як психологічною реакцією на хворобу.

Різниця між гострим і хронічним болем обговорюється [у праці Joseph T. Dipiro, Pharmacotherapy: A Pathophysiologic Approach, Third Edition, Appleton & Lange (1997) p.1263]. На думку автора, гострий біль може вважатися корисним фізіологічним процесом, що попереджує людину про ймовірну хворобу, чи ситуації, потенційно загрозливі для організму. Проте гострий, безперервний, некупіруваний біль втрачає свою біологічну корисність і може згубно впливати на організм, викликаючи, наприклад, психічні ускладнення. За відсутністю ефективного лікування болю, стрес та побічні рефлекторні реакції часто призводять до гіпоксії, гіперкапнії, гіпертензії, надмірної активності серця та перманентним емоційним розладам. Порушення, що виникають, спроможні не тільки значно подовжити період одужання, але й призвести до летального кінця.

В нормальних умовах гострий біль швидко вщухає, оскільки в процесі одужання больова стимуляція знижується. Разом з тим, за певних умов біль триває місяці й роки, переходячи в хронічний з параметрами суттєво відмінними від тих, що характеризують гострий біль. Взагалі розрізняють 4 підвиди хронічного болю: травматичний, що триває довше стандартного часу одужання; біль, пов'язаний з хронічним захворюванням; біль недиагностованого органічного походження та раковий біль, хронічний та гострий. Пацієнти з хронічним болем часто страждають від серйозних психічних розладів, провокованих боязню нового болю та пам'яттю про старий. Крім того, у страждаючих хронічним болем людей може виникати фізична залежність, стійкість до анальгетиків, а також порушення сну; крім того, вони гостріше реагують на зміни у навколишньому середовищі, що спроможні підсилити як біль, так і реакцію на нього. Дуже важливо розрізняти гострий і хронічний біль, оскільки їх лікування потребує різних підходів.

Як гострий, так і хронічний біль можливо, також, класифікувати за тривалістю. Гострий триває, або передбаченою що він буде тривати не менш, як місяць (наприклад, післяопераційний біль. Хро-

нічний біль визначають як той, що триває довше, ніж один місяць (наприклад, раковий, або фантомний біль).

Національний інститут неврологічних захворювань та інсульту, інші лікувальні заклади США (<http://healthlink/mcw.edu/article/921391401.html>; від 29 червня 2000р.), визначають синдром центрального болю як неврологічний стан, який викликано ураженням центральної нервової системи (ЦНС) - головного мозку, стовбуру мозку або спинного мозку. Біль має постійний характер та найчастіше визначається печінням, почуттям ниття чи різання. Часом це нетривалі спалахи нестерпно гострого болю.

Центральний біль являє собою сполучення больових відчуттів, найбільш відомим з яких є постійне печіння. До печіння додаються почуття холоду та поколювання, і, також, щось схоже на реакцію, коли торкаються оголеного нерва (як роблять стоматологічне зондування, наприклад). Почуття постійного печіння значно посилюється навіть при легкому доторканні. Хворі можуть відчувати деяку отерплість в частинах тіла, які уражені тим пекучим болем. Постійне відчуття печіння та втрата тактильної чутливості сильніше виявляють себе на дистальних частинах тіла, таких як ступні та кисті. За інтенсивністю біль знаходиться в діапазоні від помірного до сильного, та часто загострюється при русі та зміні температури (здебільшого у бік зниження).

Синдром центрального болю може розвинути через місяці і навіть роки після пошкодження ЦНС. Таке порушення має місце серед пацієнтів, що хворі на розсіяний склероз, тих, що мали інсульт або перенесли ампутацію кінцівок, чи травми головного або спинного мозку. Біль у тих, хто страждає на цей синдром, зовсім не знімається знеболювальними препаратами, або знімається частково. Хворі мають вживати седативні препарати і, як можливо, уникати стресів та перенапруження нервової системи. Синдром центрального болю - не смертельне захворювання. Але у багатьох пацієнтів цей синдром є причиною болю, що не можна усунути.

Найкращий спосіб зняти біль - усунути його причини. Наприклад, по можливості, причину ракового болю усувають шляхом видалення пухлини або, принаймні зменшення її розміру. Для цього лікар може призначити хірургічне лікування, радіотерапію або хіміотерапію. Якщо проведення наведених процедур неможливе, або якщо причина болю невідома, застосовуються методи знеболювання.

У минулому знеболювальні препарати розподілялися на анальгетики периферійної (аспірин, ацетамінофен) та центральної дії (опіоїди). Тепер, завдяки більш докладним уявленням про процес знеболювання та анальгетики, більш прийнятне розподілення анальгетиків на неопіоїдні та опіоїдні.

Неопіоїдні анальгетики часто виявляються ефективними від легкого або помірного болю, а також при болях, спричинених ревматоїдним артритом. Типовими неопіоїдними анальгетиками є аспірин, ацетамінофен та інші нестероїдні проти-

запальні засоби (НПЗЗ), наприклад, ібупрофен, піроксикам і напроксен.

Опіоїди (або опіати) - це загальна назва для натуральних та синтетичних речовин, які зв'язуються зі специфічними опіоїдними рецепторами центральної нервової системи, викликаючи агоністичну дію. Опіоїдні анальгетики відіграють дуже важливу роль у зніманні сильного гострого, післяопераційного і хронічного болю, в тому числі болю при ракових хворобах. До найбільш поширених опіоїдних анальгетиків належать кодеїн, морфін, метадон і фентаніл.

Традиційні методи знеболювання при ракових захворюваннях передбачають використання опіатів, таких як кодеїн, гідроморфон (ділаудид), леворфанол (лево-дроморан), метадон (долофін), морфін, оксикодон (перкодан), і оксиморфон (нуморморфан). Їх призначають перорально (п/о), у вигляді ін'єкцій (внутрішньом'язово (в/м), шляхом введення в вену (внутрішньовенно, або в/в), чи ректально (у вигляді супозиторіїв). Існують також інші методи призначення анальгетичних засобів, що використовуються для більш тривалого знеболювання. Не всі наркотичні препарати доступні у кожній з цих форм.

НПЗЗ групи ібупрофена (щоб вживати ібупрофен у значних дозах необхідно мати дозвіл лікаря) використовуються для лікування болю при ракових захворюваннях. До цієї групи належать такі знеболювальні препарати як мотрин, напросин, налфон і трілізат. Їх вживають від болю діапазону від помірного до сильного, вони найбільш ефективні для нейтралізації болю, спричиненого метастазами в кістках.

Вважають, що тетродотоксин не є опіоїдним агоністом, оскільки він не зв'язується зі специфічними опіоїдними рецепторами центральної нервової системи (ЦНС) і не справляє на них агоністичної дії. Тетродотоксин - це специфічний блокатор натрієвих каналів. Блокатори натрієвих каналів вживаються як місцеві анестетики (наприклад, лідокаїн). Очевидно, що тетродотоксин не є опіоїдним агоністом і, таким чином, його можна віднести до класу неопіоїдних анальгетиків. Тобто потенційно тетродотоксин є дуже сильним неопіоїдом, застосування якого не викликає звикання.

Автори даного винаходу відкрили, що тетродотоксин (ТТХ), його аналоги та похідні є ефективними від болей, викликаних такими раковими захворюваннями, як рак печінки, рак прямої кишки, лейоміосаркома, рак кісток, рак шлунку, лімфатичний рак, рак стравоходу, інші основні типи раку. Тетродотоксин, його аналоги та похідні ефективно знімають у людини та інших ссавців болі, спричинені як злоякісними новоутвореннями (карциномами), так і іншими пухлинами. Карциноми з'являються в геніталіях (також у передміхуровій залозі), травній системі (також у шлунку та товстій кишці), у грудях, органах дихання (в тому числі легенях і бронхах), сечовидільній системі. Можна також сюди додати лімфому і рак шкіри.

Людина, яка перенесла ампутацію руки або ноги може як раніше відчувати біль, чи інші неприємні відчуття, що немов виходять з кінцівки, якої вже нема. Лікарям невідомо, чому таке трапляється, але біль від втрачених, вже «фантомних», кін-

цівок не уявний, а абсолютно реальний. Те ж саме відмічено у випадках видалення грудей - жінки відчують біль у вилучених грудях.

Універсального метода знеболювання, спроможного позбавити фантомних болей будь-якого пацієнта, на жаль доки ще не існує. Для лікування цього виду болю застосовувалися різні методики, в тому числі, медикаментозне лікування, фізіотерапія та стимуляція нервів. Тетродотоксин, призначений відповідно методики, що пропонує даний винахід, забезпечує позбавлення болю фантомного типу.

Оскільки тетродотоксин має високу фізіологічну активність, високу токсичність і низькі показники безпечної порогової дози, необхідно акуратно і чітко контролювати протоколи виготовлення та режим дозування. У літературі наведено кілька методів дослідження тетродотоксину, серед яких - метод біологічних вимірів, ультрафіолетова спектрофотометрія, флюорометрія, газова хроматографія, рідинна хроматографія і т. далі. Кожна з цих технологій має свої переваги та свої недоліки. Метод біологічних вимірювань є високоточний, його досить легко запровадити, але його недоліки: низька відтворюваність, велика кількість впливових факторів, розходження результатів залежно від різних тестованих тварин та брак об'єктивності. Метод рідинної хроматографії потребує порівняно великого об'єму проби (20мкг) та має низький поріг чутливості. Для метода флюорометрії потрібно мати флуоресцентний спектрофотометр. Метод ультрафіолетової спектрофотометрії не дозволяє відокремити тетродотоксин від супровідних домішок та має низьку точність. Методи газової хроматографії і електрофорезу також мають свої обмеження.

Високоєфективна рідинна хроматографія (ВЕРХ) вважається основним методом визначення потрібної концентрації, оскільки цей метод поєднує високу виборність з чутливістю та дозволяє одночасно ідентифікувати як склад, так і концентрацію. За допомогою серії стандартних дослідів, доступних будь-якому професіоналу, можливо ефективно визначити як нерухоме, так і рухливе середовище, а, також, надійні параметри розподілу та детектування. Як наслідок, тетродотоксин легко відокремити від основних домішок. Метод ВЕРХ є високочутливим, зручним до застосування, його легко репродукувати.

Тетродотоксин для методики, що пропонує даний винахід, можливо отримати з тканин тварин, наприклад з органів голкобрюха.

Детальний опис метода отримання тетродотоксину та його похідних наведено [в заявці на реєстрацію в Китаї №00124516.3, поданої 18 вересня 2000р.].

За даними біологічного дослідження на мишах типові аналоги ТТХ мають тільки 1/8 або 1/40 долей токсичності ТТХ. Результати дослідження свідчать про те, що дані аналоги забезпечують спільну анальгетичну дію і зовсім не мають негативного впливу.

Винахід стосується усіх блокувальних натрієвих каналів, таких як тетродотоксин і сакситоксин. Також можливе застосування чіріхітоксина (СТХ).

Ефективні також такі аналоги тетродотоксина, як 4-епі-тетродотоксин і ангідро-4-епі-тетродотоксин.

Тетродотоксин або ТТХ належить до амінопегідрохіназолинових сполук, що мають молекулярну формулу $C_{11}H_{17}N_3O_8$ та похідних, серед яких, крім інших, ангідротетродотоксин, тетродамі-нотоксин, метокситетродотоксин, етокситетродотоксин, деокситетродотоксин, і тетродонова кислота. До аналогів ТТХ належать нові аналоги ТТХ, виділені з різних живих організмів, а також, частково або повністю синтезовані хімічним шляхом. [Див., наприклад, працю Yotsu, M. et al. Agric. Biol. Chem., 53 (3): 893-895 (1989)]. Такі аналоги зв'язуються з тою самою, що й ТТХ, ділянкою на зовнішній частині альфа-субодиниці натрієвих каналів.

Сакситоксин або СТХ належить до сполук, що мають тетрагідропуринову функцію, до якої входить два гуанідинових фрагмента, зв'язаних стабільним азокетальним зв'язком, з молекулярною формулою $C_{10}H_{17}N_7O_4$ (молекулярна маса 299,30), та їх заміщеним похідним, до яких, крім інших, належать гідроксисакситоксини і неосакситоксин. [Див. працю Bower et al., Nonprotein Neurotoxins, Clin. Toxicol. 18(7): 813-863 (1981)].

У винаході перевагу віддано таким сполукам, як тетродотоксин, 4-епі-тетродотоксин і ангідро-4-епі-тетродотоксин.

Серед шляхів введення тетродотоксину розрізняють внутрішньом'язові, внутрішньовенні, та підшкірні ін'єкції, під'язикове приймання, шкірний пластр, пероральне приймання, імплантацію осмотичного насоса, колагеновий імплантат, аерозольну інгаляцію або супозиторії. Шляхи введення, дозування та режим приймання наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Застосування Тетродотоксина

Шлях введення	Доза (мкг/50кг людської ваги)	Режим дозування
Внутрішньом'язові ін'єкції	5-50	4-2 рази на день
Внутрішньовенні ін'єкції	5-30	3-2 рази на день
Підшкірні ін'єкції	5-50	4-2 рази на день
Під'язикове приймання	5-30	3-2 рази на день
Шкірний пластр	5-60	4-2 рази на день
Перорально	5-30	3-2 рази на день
Імплантований осмотичний насос	30-60	1
Колагенові імплантати	30-60	1
Аерозольна інгаляція	5-50	4-2 рази на день
Супозиторій	5-30	3-2 рази на день

Активний інгредієнт тетродотоксин або сакситоксин, звичайно, розводять у носії: дистильованій воді або буфері - оцтовокислому розчині ацетата натрію. Проте препарат може мати й інші компоненти, серед яких, між інших, буферні розчини для підтримки або регулювання рН, такі як ацетатні, цитратні, фосфатні і боратні буфери; агенти, що підвищують в'язкість, як полівініловий спирт і целюлози: гідроксипропілметилцелюлоза і карбомер; консерванти, такі як хлорид бензалконія, хлорбутанол, ацетат фенілртуті і нітрат феніл ртуті; речовини, що підтримують осмолярність, такі як хлорид натрію, манітол і гліцерин, а також речовини, що підсилюють проникнення, такі як гліколі, олеїнова кислота, алкіламіни та подібні до них. Також

можливе додавання у препарат вазоконстриктора. Можливі й комбіновані препарати, до яких входять блокатор натрієвих каналів тривалої дії, антибіотик, стероїдні або нестероїдні протизапальні засоби і/або вазоконстриктор.

Приписи щодо кожного метода введення, які вказано в таблиці 1, в цілому, вважаються відомими в науці. [Див. працю Remington, the Science and Practice of Pharmacy, 19th ed., A.R. Gennaro, ed., c.1995 by The Philadelphia College of Pharmacy and Science, (головним чином, частина 7)].

Як наведено в таблиці 1, звичайне дозування становить від 5 до 60мкг для дорослих. Найтиповіша доза для дорослих: від 20 до 40мкг.

Тетродотоксин, його аналоги і похідні являють собою ефективні знеболювальні засоби для людини та інших ссавців при болях, спричинених злоякісними новоутвореннями (раком) або іншими пухлинами. Це пухлини, що з'являються у репродуктивній системі (та простаті), травній системі (включаючи шлунок і товсту кишку), грудях, органах дихання (серед яких легені і бронхи) та сечовивідній системі; також, це лімфома і рак шкіри, що підтверджено нижченаведеними прикладами.

Блокатори натрієвих каналів несподівано виявили себе ефективними як системні анальгетики тривалої дії для полегшення сильного болю. Не очікувалося й те, що при системному призначенні спостерігалися мінімальні побічні ефекти, основні з яких - відчуття затерпlosti в губах і кінцівках. Змучені болем пацієнти спроможні повернутися до нормального життя на період більш ніж 20 днів вже після одного курсу застосування ТТХ. Те, що ТТХ та інші блокатори натрієвих каналів можливо використовувати при лікуванні гострого, центрального й хронічного болю як системні анальгетики, більш ефективні, ніж морфін та інші опіоїдні анальгетики, виявилось повною несподіванкою.

Кількість сполуки, що «ефективно зменшує біль», - це кількість, що знижує больові відчуття пацієнта на 2 одиниці за Цифровою шкалою інтенсивності болю. Кількість, що «дуже ефективно зменшує біль», - це кількість, що знижує больові відчуття пацієнта на 4 і більше одиниць за Цифровою шкалою інтенсивності болю. Кількість сполуки, що «ефективно усуває біль» - це кількість, яка знижує больові відчуття пацієнта, за Цифровою шкалою інтенсивності болю, до нуля.

Приклади

Приклад 1. Технологія приготування

У ролі фармацевтичного препарату в клінічному дослідженні (Приклад 2) було застосовано тетродотоксин для ін'єкцій. Технологія його приготування наведена в таблиці 2.

Таблиця 2

Технологія приготування тетродотоксину

Тетродотоксин	15мг
0,5% розчин оцтової кислоти	1мл
буферний розчин солі оцтової кислоти	50мл (5% загального об'єму підготовленого)
оцтової (pH=3,5) кислоти	фармацевтичного розчину)
Вода для ін'єкцій	1000мл

Розрахунки дозувань ТТХ для ін'єкцій базовано на результатах доклінічних фармакологічних і

фармакодинамічних досліджень. Розрахунок клінічної фармацевтичної дози базовано на дозуванні, ефективному для тварин. Загалом її розраховують як 1/5 ефективної дози для тварин. За масу тіла людини беруть 50, 60 і 70 кг, відповідно.

LD₅₀ (половина інгібуючої дози) знеболювального засобу ТТХ при проведенні дослідження конвульсивних скорочень у мишей, індукованих оцтовою кислотою, дорівнює 2,80мкг/кг (внутрішньом'язово, в/м). Відповідно рекомендована клінічна доза для людини становить:

$$2,80\text{мкг/кг} \times (1/5) \times 50(60, 70)\text{кг} = 28,0(33,6, 39,2)\text{мкг}.$$

Ефективне дозування ТТХ у досліді з вивченням запалення при дії формаліну на щурів становить 2,5мкг/мг (в/м) (P<0,01). Відповідно, рекомендована клінічна доза для людини становить:

$$2,50\text{мкг/кг} \times (1/5) \times 50(60, 70)\text{кг} = 25,0(30,0, 35,0)\text{мкг}.$$

Розрахунки початкової клінічної дози можуть також бути базовані на значенні LD₅₀. Враховуючи результати фармакодинамічних досліджень, клінічна доза може бути розрахована як 1/50 LD₅₀. За масу тіла людини беруть 50, 60 і 70кг, відповідно.

Виходячи з результатів фармакологічних досліджень і пов'язаних з ними джерел, дозування ТТХ для ін'єкцій, застосоване у клінічному дослідженні (Приклад 2), становить 30мкг/2мл.

Приклад 2. Клінічне дослідження

Клінічне дослідження було проведено з 21 вересня по 10 жовтня 1999р. Його метою було вивчення анальгетичного ефекту ін'єкцій тетродотоксину (чистота ТТХ-89%, зареєстрована назва ТЕТРОДИН (TETRODIN), партія №990122, виготовлювач - "Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd.", Гуансі, Китай) на 11-ти хворих, що страждали від хронічних болей через запущений рак.

1.1 Об'єкти дослідження. Одинадцять пацієнтів з раком останньої стадії добровільно погодились взяти участь у цьому дослідженні. Сканування засобом комп'ютерної томографії (КТ) та медико-патологічне дослідження підтвердили наявність раку в усіх одинадцяти пацієнтів. Усі страждали від помірних або сильних болей, за «больовою шкалою» ВООЗ.

Серед 11 учасників дослідження було 6 чоловіків і 5 жінок. Вік найстарішого учасника - 76 років, наймолодшого - 26 років. У п'ятьох було діагностовано рак печінки в останній стадії. Один з пацієнтів страждав на лейоміосаркому (саркома гладких м'язових волокон) з супровідним післяопераційним раком печінки, у двох був післяопераційний рецидив раку шлунку, у одного - післяопераційний рецидив карциноми стравоходу, у одного - післяопераційний рецидив раку прямої кишки і у одного - карцинома товстого кишечника з супровідним раком печінки. Усі пацієнти брали участь у цьому клінічному дослідженні добровільно.

1.2 Препарат і дозування. Ін'єкція тетродотоксину, в/м, 30мкг/2мл. Усім пацієнтам внутрішньом'язово вводили 30мкг тетродотоксину двічі на день (кожні 12 годин). Курс тривав протягом 3-х днів (всього 180мкг тетродотоксину).

1.3 Критерії оцінки. Після проведення клінічної оцінки за нижченаведеним методом, було виявлено анальгетичний ефект тетродотоксину на 11-ти

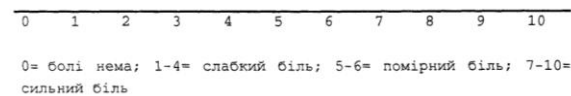
пацієнтах. Дослідження провадилися без контрольної групи. Це було відкрите дослідження, у якому як пацієнтам, так і лікарям був відомий препарат, що застосовувався.

Класифікація інтенсивності болю і спосіб реєстрації.

За протоколом було потрібно, щоб за 24 години перед початком дослідження учасники не приймали інших анальгетичних препаратів. Протягом 3-денного курсу застосування тетродотоксину учасники також не приймали інших анальгетиків. Біль оцінювався за допомогою Цифрової шкали інтенсивності болю, описаної нижче. Вихідна інтенсивність болю оцінювалася до першого введення тетродотоксину. Після кожного введення тетродотоксину (о 8 годині ранку та 8 годині вечора щодня), член дослідницької групи провадив спостереження і реєстрував інтенсивність болю у кожного з пацієнтів у таких 14-ти часових інтервалах: 5 хвилин, 10 хвилин, 15 хвилин, 20 хвилин, 30 хвилин, 1 година, 2 години, 3 години, 4 години, 5 годин, 6 годин, 7 годин, 8 годин і 12 годин.

2.1 Реєстрація методу інтенсивності болю

Під час проведення цього дослідження, для підрахунку і реєстрації інтенсивності болю у учасників дослідження, було використано рекомендований ВООЗ метод Цифрової шкали інтенсивності болю від 0 до 10. Коротко це можна пояснити так. Пацієнти самі оцінювали свій біль, виходячи з цифрової шкали від 0 до 10, наведеної нижче, після чого давали свою оцінку лаборантові.



Встановлення анальгетичного ефекту

3.1 Різниця в інтенсивності болю (РІБ). РІБ розраховують шляхом віднімання показника інтенсивності болю в кожний момент часу після застосування препарату від показника інтенсивності болю до застосування препарату.

3.2 Знеболювання. Після розрахунку інтенсивності болю, що відчуває пацієнт у кожний з часових інтервалів, дослідник оцінює знеболювальний ефект і дає йому одне з таких п'яти значень:

0: знеболювання немає;

I: незначне знеболювання (біль зменшився приблизно на 25%);

II: помірне знеболювання (біль слабкішає приблизно на 50%);

III: значне знеболювання (біль слабкішає приблизно на 75%);

IV: повне знеболювання (біль повністю зникає).

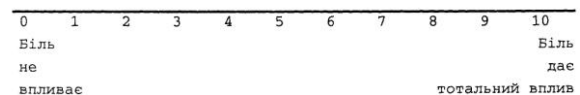
3.3 Оцінка «якості життя». Біль впливає на нормальне життя кожного пацієнта та на спроможність людини робити буденні справи. Це називають якістю життя. Біль, який відчуває кожна окрема особа, може, залежно від своєї сили, викликати роздратованість, депресію, та зниження апетиту. Дослідник мусить брати до уваги будь-які зміни в якості життя пацієнта, оцінюючи анальгетичний ефект нового препарату. Нижченаведена цифрова шкала відображає оцінки: від найвищої

до найнижчої. Слід мати на увазі, що така оцінка «якості життя» є суб'єктивною, і що лікар, що приймає участь у дослідженнях, покладається на опис пацієнтом будь-яких змін (до і після використання тетродотоксину) у якості життя, як на головне джерело інформації при проведенні цієї оцінки. Питання, які ставлять пацієнтові при встановленні змін у якості його життя, стосуються повсякденної діяльності, морального стану, мобільності (здатності ходити), звичайної роботи (робота поза домом, так і вдома), якості сну, характеру пацієнта, взаємовідносин з іншими людьми, ставлення до життя.

Якість життя оцінювалася учасниками дослідження самостійно до застосування препарату та кожні 8 годин від початку його застосування.

Якість життя - це настрій, здатність ходити, звичайна робота (робота поза домом, так і вдома), а також взаємовідносини з іншими людьми, сон і сприйняття життя. Нижченаведена цифрова шкала виражає ступінь впливу болю на якість життя:

0: не впливає
1-3: незначний вплив
4-7: помірний вплив
8-9: сильний вплив
10: тотальний вплив



4. Результати

4.1 Анальгетичний ефект. В усіх учасників досліджень було відзначено поліпшення болю різного ступеню через 30 хвилин після першого вживання тетродотоксину. Декотрі з них повідомляли про суттєве поліпшення болю протягом 5 хвилин. Після завершення 3-денного курсу застосування тетродотоксину двічі на день, інтенсивність болю у всіх учасників дослідження знизилася до 0, за винятком одного хворого, чий показник дорівнював 1.

Ці результати показують, що в усіх пацієнтів біль було повністю знято на період від 20 до 30 днів по завершенні 3-денного курсу застосування тетродотоксину. Жодний пацієнт не виявив ознак будь-яких симптомів залежності після застосування тетродотоксину протягом трьох днів.

4.2 Вплив на якість повсякденного життя. Пацієнти повідомили, що біль, який вони відчували, та який було викликано хворобою та/або протиправною терапією/ліками, помірно або сильно впливав на їх «якість життя». Протягом 3-денного курсу терапії тетродотоксином і наступних 20-30 днів, у якості їх життя було відмічено помітні та переконливі зміни, які вони описували, зокрема, як сильний вплив, ступінь якого надалі знижувалася до помірного або незначного. Через 3 дні застосування тетродотоксину більшість пацієнтів були спроможні повернутися до нормального життя. Декотрі з них знов почали грати в популярну гру маджонг (вид китайських гральних карт) зі здоровими людьми. Вони були у змозі відвідати публічні лазні, що раніше було для них важко зробити через біль та страждання, викликані раком. Один з хворих навіть наважився на тривалу поїздки по залізниці з Харбіну в Пекін.

4.3 Побічні ефекти. Протягом 10-20 хвилин після застосування препарату всі пацієнти відчували затерплість або поколювання в області губ, у кінчику язика й кінчиках пальців рук і ніг. Ці симптоми тривали не більш ніж 30 хвилин, після чого зникли самі по собі. Два пацієнти, які раніше протягом тривалого часу вживали препарат долантин, відчували легку або помірну нудоту, що супроводжувалася легким блюванням, тільки після першої ін'єкції тетродотоксину. Після другої ін'єкції ці симптоми не виявилися. У декотрих пацієнтів артеріальний тиск знизився на 10-15 мм рт.ст., після чого сам по собі повернувся до норми через 40-50 хвилин. У одного з пацієнтів було відмічено посилення серцебиття (тільки після першої ін'єкції), що супроводжувалося блюванням, але за 10-15 хвилин все прийшло до норми само по собі.

5. Висновки

При порівнянні тетродотоксину з іншими знеболювальними препаратами відзначалося таке:

5.1 Тетродотоксин треба вводити рідше. Пацієнту достатньо лише однієї 30мкг ін'єкції кожні 12 годин протягом не більш ніж 3-х днів. Результати 3-денного курсу терапії тетродотоксином, що пройшли ці пацієнти, свідчать про швидке поліпшення або повне зняття їх болю.

5.2 Результати короткого курсу терапії тетродотоксином, що тривав всього 3 дні, вказують, що тетродотоксин має значні переваги порівняно з будь-яким іншим з нині використовуваних сильних анальгетиків, які необхідно вживати послідовно і постійно для досягнення ефекту.

5.3 Швидкий ефект. Тетродотоксин починає діяти протягом 5-30 хвилин після його введення.

5.4 Більш тривалий анальгетичний ефект. Після 3-денного курсу застосування тетродотоксину двічі на день анальгетичний ефект тривав протягом 20-30 днів. Жодний з пацієнтів не скаржився на повернення болю в період з четвертого по двадцятий день. У більшості випадків знеболювання було ефективним протягом усього 30-денного періоду спостереження.

5.5 Під час або після терапії тетродотоксином не було відмічено жодних проявів привикання або абстиненції. Решта нині вживаних наркотичних анальгетиків дуже швидко викликає привикання і мають несприятливу побічну дію.

5.6 Незначні побічні ефекти. В учасників дослідження спостерігалися лише незначні побічні ефекти, такі як зниження артеріального тиску, нудота й блювання. Усе зникло само собою за 15-60 хвилин.

5.7 Тетродотоксин також призвів до явної дезінтоксикації пацієнтів з долантин-залежністю.

5.8 Тетродотоксин поліпшує стан онкологічних хворих під час їх лікування. Тетродотоксин не впливає безпосередньо на самі ракові пухлини. Разом з тим, було відзначено значне поліпшення загального і психологічного стану хворих у зв'язку зі зняттям в них болю, викликаного раком.

Результати окремих клінічних випадків

Клінічний випадок 1

У пана Gao, чоловіка 44-х років, з'явилися болі у животі. Їх діагностували як болі гладкої мускулатури задньої стінки очеревини. Хворого було прооперовано. Через рік трапився рецидив болю у

животі, та хворому зробили нову операцію. Медико-патологічне дослідження, проведене після другої операції, показало, що в нього розвилася саркома гладком'язових елементів (лейоміосаркома). Пізніше було встановлено, що саркома поширилася на печінку, і хворому потрібно протиракове лікування (хіміотерапія). Щоб зняти сильні болі в животі йому почали вводити препарат долантин. Ін'єкції долантину йому мусили робити не менш, ніж 3 рази на день. Спочатку він приймав долантин як внутрішньом'язові ін'єкції, потім він вже потребував внутрішньовенних ін'єкцій для прискорення дії препарату. Безпосередньо перед початком терапії тетродотоксином, протягом минулого місяця хворому зробили більш ніж 100 ін'єкцій долантину. Спочатку, після припинення прийому долантину, хворий відчував морфіноподібні симптоми відміни: слабкість і біль в усьому тілі, тремтіння при вставанні та утруднене ходіння. Хворий добровільно погодився на проведення терапії тетродотоксином. Показник рівня болю, що він відчував до застосування тетродотоксину був 8. Через 5 хвилин після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю за шкалою від 0 до 10 знизилася до 0. По завершенні 3-денного курсу терапії він спромігся відвідати публічні лазні і самостійно вимитися. Він відвідав свого приятеля, щоб пограти в маджонг. На день підготовки звіту він веде нормальне життя і продовжує почувати себе добре, не відчуваючи при цьому ніякого болю.

Клінічний випадок 2

У пана Zhang, чоловіка 26-ти років, з'явився біль в області печінки. Хворому поставили діагноз «запущений рак печінки». Хвороба прогресувала і сильні болі, супроводжуємі здуттям живота, стали нестерпними. Щоб поліпшити біль він почав приймати долантин та інші знеболювальні препарати. Хворий добровільно погодився на терапію тетродотоксином. Показник рівня його болю до першого застосування тетродотоксину по шкалі від 0 до 10 дорівнював 8. На другий день вживання тетродотоксину інтенсивність болю зменшилася до 0. Якість його життя значно підвищилася. По завершенні 3-денного курсу терапії він поїхав залізницею з Харбіна в Пекін, щоб продовжити своє лікування від раку.

Клінічний випадок 3

Пані Хіе, жінці 76-ти років, поставили діагноз «рак прямої кишки». У 1996 році хвору було прооперовано. У 1998 році пухлина з прямої кишки метастазувала в печінку. Біль підсилювався доки став нестерпним. Хвора добровільно погодилася на тетродотоксинову терапію. Протягом 20 хвилин після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність її болю знизилася з 6 до 0. Показник впливу болю на якість її життя теж знизився з 10 до 6 після першої ін'єкції тетродотоксину. По завершенні 3-денного курсу терапії тетродотоксином вона повернулася до нормального, на її погляд, життя.

Клінічний випадок 4

Пан Jin, чоловік 63-х років, страждав на рак печінки протягом 8 років. За останні 6 місяців його біль загострився настільки, що інші знеболювальні препарати не могли її поліпшити. Хворий добровільно погодився на терапію тетродотоксином. На другий день застосування тетродотоксину інтенси-

вність його болю знизилася з 7 до 0. Показник якості його життя також значно виріс.

Клінічний випадок 5

Пані Duang, жінці 46-ти років, поставили діагноз «люмбаго», після чого симптоми, відповідні до люмбаго, поступово гіршали. Біль, викликаний люмбаго, ефективно знімався знеболювальними препаратами. За шість місяців до цього дослідження у пацієнтки почалися болі у лівій нозі, які поступово ставали все більш сильними. Протягом тих шести місяців їй поступово прописували все більш сильні знеболювальні препарати: трамадол, пентазоцин і долантин. За ті самі шість місяців у хворої діагностували рак, що спочатку був у печінці і дав метастази у кістки. Рак кісток було виявлено у хребцях L₃, L₄ та L₁₁ і також було підтверджено наявністю остеолітичних уражень. Пацієнтка дала добровільну згоду на терапію тетродотоксином. Безпосередньо перед початком терапії тетродотоксином інтенсивність її болю за шкалою від 0 до 10 становила 9. Через 10 хвилин після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю знизилася до 7, а через 20 хвилин після першої ін'єкції - до 2. По завершенню 3-денного курсу терапії тетродотоксином біль повністю зник.

Клінічний випадок 6

Пані Li, жінка 72-х років, страждала від здуття живота і поганого апетиту. Після того як первісно призначене лікування не дало результатів, було проведено ультразвукове дослідження черевної порожнини і діагностовано рак печінки. Здавалося, що після курсу хіміотерапії її пухлина зменшилася, проте здуття живота і болі в животі посилювалися. Перед початком курсу терапії тетродотоксином у рамках цього дослідження знеболювальні засоби, що вона використовувала, вже не були у змозі зняти біль. Хвора дала добровільну згоду на терапію тетродотоксином, намагаючись якимось поліпшити свій біль. Перед початком застосування тетродотоксину інтенсивність її болю за шкалою від 0 до 10 дорівнювала 7. Через 10 хвилин після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю знизилася до 0. По завершенні 3-денного курсу терапії тетродотоксином вона спромоглася повернутися до нормального життя, що вела би, якби цілком одужала.

Клінічний випадок 7

Пану Li, чоловіку 36-ти років, було поставлено діагноз «запущений рак печінки». Біль, що він зазнавав в області печінки, настільки посилювався, що його не могли зняти внутрішньом'язові ін'єкції долантину. Хворий дав добровільну згоду на терапію тетродотоксином. До застосування тетродотоксину інтенсивність його болю по шкалі від 0 до 10 дорівнювала 7. Через 20 хвилин після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю знизилася до 3, а після третьої ін'єкції тетродотоксину - стабілізувалася на рівні 0. По завершенню 3-денного курсу терапії показник впливу болю знизився до 0, значно підвищивши якість життя хворого.

Клінічний випадок 8

Пану Cheng, чоловіку 60-ти років, поставили діагноз «слизоутворюючий залозистий рак шлунку». Хворому було зроблено операцію по вида-

ленню пухлини. Через три місяці після операції у хворого здувся живіт і з'явилися сильні болі у животі. Комп'ютерна томограма з'ясувала, що пухлина метастазувала в інші органи: легені, печінку, черевну порожнину і лімфовузли. Хворий добровільно погодився на терапію тетродотоксином. До першого застосування тетродотоксину інтенсивність його болю по шкалі від 0 до 10 дорівнювала 8. Через 20 хвилин після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю знизилася до 0. По завершенню 3-денного курсу терапії тетродотоксином він повернувся до нормального, на його думку, життя.

Клінічний випадок 9

Пану Shi, чоловіку 59-ти років, було поставлено діагноз «карцинома стравоходу» після того як він протягом року відчував постійний загридинний біль, який призвів до дисфагії. Останнього місяця біль став настільки сильним, що хворий блював після приймання їжі. Після того як йому зробили операцію по видаленню пухлини, біль, як і раніш, був сильним, і не знімався прописаними йому регулярними ін'єкціями долантину. Хворий дав добровільну згоду на терапію тетродотоксином. До першого застосування тетродотоксину інтенсивність його болю по шкалі від 0 до 10 дорівнювала 8. Після другої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю знизилася до 0. По завершенню 3-денного курсу терапії тетродотоксином він повернувся до нормального, на його думку, життя.

Клінічний випадок 10

Пані Liu, жінка 69-ти років, через три роки після операції по видаленню ракової пухлини шлунку виявила збільшення шийного лімфовузла зліва. Медико-патологічне дослідження виявило, що пухлина у шлунку метастазувала у лімфовузол. За деякий час перед тим, як хвора дала добровільну згоду на терапію тетродотоксином, біль настільки підсилювався, що став нестерпним. До першого застосування тетродотоксину інтенсивність її болю по шкалі від 0 до 10 дорівнювала 9. Через 3 години після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю знизилася до 2, а по завершенні 3-денного курсу терапії тетродотоксином стабілізувалася на рівні 0.

Клінічний випадок 11

У пані Tan, жінки 52-х років, через рік після операції було виявлено рецидив раку прямої кишки. Утворення в її промежині було вражено абсцесом. Локальний біль був виключно сильним і супроводжувався головним болем та запамороченням, які, часом, були настільки сильними, що вона не могла розмовляти. Хвора добровільно погодилася на терапію тетродотоксином. До першого застосування тетродотоксину інтенсивність болю, що вона відчувала, по шкалі від 0 до 10 дорівнювала 7. Через 1 годину після першої ін'єкції тетродотоксину інтенсивність болю знизилася до 0. По завершенні 3-денного курсу терапії тетродотоксином вона повернулася до нормального, на її думку, життя.

Дані по типовим клінічним випадкам узагальнено в таблиці 3:

Таблиця 3

Узагальнені дані по терапії тетродотоксином болю у ракових хворих

№	Ім'я	Стать	Вік	Розвиток хвороби	Тип болю	Дозування (мкг)	Рівень болю до терапії	Рівень болю після терапії	Побічний(-і) ефект(-и)
1	Gao HM	ч	44	Саркома гладкої мускулатури з метастазами в печінку	Локальний біль, біль в усьому тілі	180	8	0	Затерпність, нудота, блювання
2	Zhang BL	ч	26	Остання стадія рака печінки	Напади болю, наростаючий біль	180	6	0	Затерпність
3	Xie SHQ	ж	76	Рак прямої кишки з метастазами в печінку	Тупий біль, локальний біль, біль в усьому тілі	180	6	0	Затерпність
4	Jin DX	ч	63	Рак печінки	Локальний біль, тупий біль	180	7	0	Затерпність
5	Duang YQ	ж	46	Рак печінки з метастазами в кістки	Колючий біль	180	9	1	Затерпність
6	Li SHQ	ж	72	Рак печінки	Напади болю, наростаючий біль	180	7	0	Затерпність
7	Li BF	ч	36	Остання стадія рака печінки	Напади болю, наростаючий біль	180	7	0	Затерпність
8	Cheng B	ч	60	Рак шлунку	Локальний біль, тупий біль	180	8	0	Затерпність, нудота, блювання
9	Shi CHF	ч	59	Післяопераційний рецидив рака стравоходу	Локальний біль, тупий біль	180	8	0	Затерпність
10	Liu SM	ж	69	Рак шлунку з метастазами в лімфосистему	Локальний біль, тупий біль	180	9	0	Затерпність
11	Tan XCH	ж	52	Післяопераційний рецидив рака прямої кишки	Локальний біль, тупий біль	180	7	0	Затерпність

Приклад 3. Вплив ТТХ на ноцицепцію у щурів і мишей

Експериментальні матеріали

Порошок ТТХ, чистий, партія №960510, поставлений "Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant", Ляонін, Китай. Препарат розводився дистильованою водою до потрібної концентрації, рН доводили до 4-5 титруванням оцтової кислоти.

Кристалічна оцтова кислота, чиста для аналізу, "Beijing 52952 Chemical plant", партія №910613.

40%-ий розчин формаліну, особливо чистий, "Beijing No.3 Chemical plant", партія №950712.

Порошок аспірину, чистота 99%, "Xinhua Pharmaceutical Factory", партія №9205292.

Морфіна гідрохлорид, "Qin Hai Pharmaceutical Factory", партія №960804.

Лабораторні тварини

Миші лінії Kunming (Кунмінг), вага 18-22г, поставлені віварієм Академії медичних наук Китаю. Сертифікат якості № Jing Dong Guan Zi (1994) 029.

Щури лінії Wistar (Вістар), вага 180-240г, самці і самиці у співвідношенні 1:1, поставлені відділом лабораторних тварин Пекінського медичного університету. Сертифікат якості № Jing Dong Guan Zi (1994) 092.

3.1 Дослідження конвульсивних скорочень у мишей, індукованих оцтовою кислотою

Мишей було довільно розділено на групи, отримавши ТТХ, групи позитивного контролю (аспірин і меперідин) і групу негативного контролю

(стандартний фізіологічний розчин). Мишей не годували протягом 12 годин до експерименту, даючи тільки досхочу води щоб пити. ТТХ вводили підшкірно або внутрішньом'язово, а як хімічний подразник через 40 хвилин внутрішньоочеревинно вводилася 0,6%-а оцтова кислота (0,1мл/10г). Протягом наступних 15 хвилин спостерігалися і реєструвалися випадки конвульсивних скорочень. Така ж процедура провадилася для мишей у групі, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, групі, що отримувала аспірин, і групі, що отримувала меперідин. Випадки конвульсивних скорочень у групі, що отримувала ТТХ, порівнювали з результатами контрольної групи, а щоб підрахувати процент інгібування конвульсивних скорочень при введенні ТТХ було застосовано таку формулу:

Процент інгібування (%) = (випадки конвульсивних скорочень у контрольній групі - той самий показник у групі, що отримувала ТТХ) / випадки конвульсивних скорочень в контрольній групі × 100%.

Середня інгібуюча доза, ID_{50} , визначалася за логіт-методом.

Результати наведено у таблицях 4 і 5.

Як вказано в таблицях 4 і 5, сила анальгетичної дії ТТХ не залежить від шляху введення. Анальгетична дія ТТХ була набагато сильнішою у порівнянні з аспірином та у 670 разів сильнішою, порівняно з меперідинном.

Таблиця 4. Значення ID₅₀ для ТТХ, аспірина і меперідину, отримані за результатами дослідження конвульсивних скорочень у мишей (підшкірно)

Групи	Кількість тварин в експерименті (n)	Випадки конвульсивних скорочень (n)	Процент інгібування (%)	ID ₅₀ і 95% довірчий інтервал
Стандартний фізіологічний розчин ТТХ (мкг/кг)	20	16,7		
1,0	20	12,5	25,2	
2,5	20	8,9	46,7	2,68
5,0	20	6,9	58,7	(2,32-3,53)
10,0	20	2,8	82,2	мкг/кг
Аспірин (мг/кг)				
100	20	15,0	18,9	
200	20	9,96	46,2	198,8
300	20	5,66	69,4	(181,7-217,5)
400	20	2,7	85,4	мг/кг
Меперідин (мг/кг)				
1,0	20	14,2	23,2	1,8 (1,6-2,1)
2,0	20	8,2	55,6	мг/кг
3,0	20	6,1	67,0	
4,0	20	3,1	83,2	
5,0	20	0,31	98,3	

Таблиця 5. Значення ID₅₀ для ТТХ, аспірину і меперідину, отримані за результатами дослідження конвульсивних скорочень у мишей (внутрішньом'язово)

Група	Кіл-ть тварин	Середнє число конвульсивних скорочень	Частота інгібування (%)	ID ₅₀ (95% довірчий інтервал)
Контроль (стандартний фізіологічний розчин)	20	28,2	--	
ТТХ (мкг/кг)				
1,25	20	20,9	25,9	
2,50	20	15,7	43,9	
5,00	20	9,4	66,7	2,80 (2,37-3,26)
10,00	20	3,2	88,7	мкг/кг
Аспірин (мг/кг)				
100	20	22,1	21,7	
200	20	14,3	49,3	
300	20	7,2	74,4	183,8
400	20	2,7	90,6	(164,9-202,4)

3.2 Дослідження запалення при дії формаліну на щурів

Щурів лінії Wistar було довільно розділено на групу, що отримувала ТТХ, групу позитивного контролю (морфін) і групу негативного контролю (стандартний фізіологічний розчин). Щурів не годували протягом 12 годин до експерименту, даючи тільки необмежену кількість води, щоб пити. Як больовий подразник було використано 2,5%-ий розчин формаліну. ТТХ вводився щурам внутрішньом'язово або підшкірно у різних дозуваннях, після чого тварин розмішували у прозорих пластикових контейнерах розміром 20×20×20см для спостережень. Через 40 хвилин у підшовну поверхню правої задньої лапи підшкірно вводили 0,06мл 2,5%-ого розчину формаліну. Протягом наступних 5 хвилин спостерігали та реєстрували реакції щурів на біль, наприклад,

спроби лизати/гризти, сіпання і підтягування правої задньої лапи. Оцінка реакції на біль провадилася за такою формулою:

Оцінка реакції на біль = час облизування/глодання (сек.)×3+кількість випадків сіпання×2/3+час підтягування (сек.).

Щури у групах, що отримували ізотонічний розчин (ІР) та морфін, були піддані однаковим діям. Процент інгібування больової реакції ТТХ визначався так:

Процент інгібування (%) = (середня кількість випадків реакції на біль у контрольній групі - середня кількість випадків у групі, що отримувала ТТХ) / середня кількість випадків реакції на біль в контрольній групі ×100%.

Середня інгібуюча доза, ID₅₀, визначалася за логіт-методом.

Див. таблиці 6 і 7.

Таблиця 6. Значення ID_{50} (підшкірне введення) для ТТХ і морфіну при дослідженні дії формаліну на щурів

Група	Кіл-ть тварин	Кіл-ть випадків реакції на біль	Процент інгібування (%)	ID_{50} (95% довірчий інтервал)
Контроль (стандартний фізіологічний розчин)	8	237,5		
ТТХ (мкг/кг)				
0,3	8	186,4	21,5	
0,6	8	132,9	44	
1,25	8	72,1	69,6	0,82 (0,66-1,00)
2,5	8	67,3	71,7	мкг/кг
5,0	8	41,3	82,6	
Морфін (мг/кг)				
0,6	8	210,7	11,3	
1,25	8	190,7	19,7	
2,5	8	158,2	33,4	2,63 (2,32-2,98)
5,0	8	46,1	80,6	мг/кг
10,0	8	13,1	94,2	

Таблиця 7. Значення ID_{50} (внутрішньом'язове введення) для ТТХ і морфіну при дослідженні дії формаліну на щурів

Групи	Кількість тварин	Кіл-ть випадків реакції на біль	Процент інгібування (%)	ID_{50} (95% ДІ)
Стандартний фізіологічний розчин	20	203,6		
ТТХ (мкг/кг)				
0,25	10	152,7	25,0	0,93
0,50	10	116,0	43,0	(0,56-1,56)
2,50	10	57,2	71,9	мкг/кг
5,0	10	48,5	76,2	
10,0	10	45,9	77,5	
Морфін (мг/кг)				
2,5	10	131,2	35,6	
3,5	10	51,6	74,6	2,74
5,0	10	30,1	85,2	(2,24-3,35)
6,5	10	22,7	88,9	мг/кг
8,0	10	5,2	91,0	

Як вказано в таблицях 6 і 7, і ТТХ, і морфін виявили значний знеболювальний ефект при дослідженні дії формаліну. Треба додати, що анальгетична дія ТТХ у 3200-2900 разів сильніша, за морфін при підшкірному і внутрішньом'язовому введенні, відповідно.

3.3 Дослідження реакції відсмикування хвоста на щурах

Анальгетична дія ТТХ і морфіну при болю, викликаному термічним впливом, вивчалася через дослідження реакції відсмикування хвоста у щурів.

Щурів довільно розділяли на 7 груп по 8 щурів у кожній. Щурів не годували протягом 12 годин до експерименту, даючи лише необмежену кількість води, щоб пити. Щура фіксували у альгометрі для реєстрації відсмикувань хвоста, потім постійний електричний струм з напругою 12 В подавався на електролампі, що була джерелом термічної дії на

кінчик хвоста щура, після чого реєстрували затримку між дією і відсмикуванням хвоста. Якщо щур не реагував на термічну дію протягом 5-8сек., тварину відбраковували. Тест провадився після ін'єкції ТТХ. Якщо больовий поріг виростав настільки, що щур не відсмикував хвоста протягом 20 секунд дії подразника, освітлювання лампою припиняли щоб запобігти появі пухирів та ушкодження шкіри. В такому випадку вважали, що час затримки між подразненням і реакцією дорівнює 20 секундам.

Результати виявили, що ТТХ при рівнях дози 1,25-5,0мкг/кг справляє помітну анальгетичну дію на біль, спричинений термічним впливом при дослідженні реакції відсмикування хвоста у щурів, але не спрацьовує при більш низьких дозах 0,3-0,6мкг/кг. Така дія була дещо слабкішою ніж у морфіну (див. таблицю 8).

Таблиця 8. Анальгетична дія ТТХ і морфіну на біль, викликаний термічною дією при дослідженні реакції відсмикування хвоста у щурів

Група	Кількість тварин	Час затримки (в хвиликах)
Контроль із стандартним фізіологічним розчином	8	7,6 ± 3,8
ТТХ (мкг/кг)		
0,3	8	8,3 ± 3,7*
0,6	8	10,3 ± 4,9*
1,25	8	13,9 ± 4,2**
2,5	8	17,0 ± 3,5***
5,0	8	17,3 ± 3,8***
Морфін (мг/кг)		
5,0	8	>20

$\bar{X} \pm$ стандартне відхилення

* $P > 0,05$

** $P < 0,05$

*** $P < 0,01$ порівняно з групою, що отримувала стандартний фізіологічний розчин

3.4 Дослідження часової залежності анальгетичної дії ТТХ

Часова залежність анальгетичної дії ТТХ перевірялася шляхом введення ТТХ (підшкірно і внутрішньом'язово) та аспірину (перорально) в дозах, удвічі перевищувалих значення ID_{50} (6мкг/кг і 400мг/кг, відповідно), що були зареєстровані під час досліджень конвульсивних скорочень від дії оцтової кислоти на мишей. Результати свідчать,

що при різних методах введення ТТХ (внутрішньом'язово або підшкірно) результати виявляються однаковими. Початок терапевтичної дії ТТХ відмічався через 15 хвилин і досягав максимуму за 1 годину. При цьому анальгетична дія тривала десь коло 5 годин. Терапевтична дія аспірину починалася через 20 хвилин і досягала свого піку через 30 хвилин. При цьому анальгетична дія тривала десь біля 2 годин (див. таблиці 9, 10, 11, 12).

Таблиця 9. Часова залежність дії ТТХ при дослідженні конвульсивних скорочень у мишей (підшкірно)

	Час після введення (в хвиликах)							
	15	30	60	120	180	240	300	330
Скв ¹	9,9 ± 9,4	8,7 ± 4,0	6,0 ± 5,5	16,9 ± 14,4	7,6 ± 11,7	18,5 ± 13,4	18,6 ± 11,1	22,8 ± 10,1
Пі ²	64,9	69,1	78,7	40,1	72,5	34,0	34,0	19,1
Значення Р	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,05	<0,05	>0,05

Скв Середня кількість випадків конвульсивних скорочень. Порівняно з групою, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, 28,2 ± 12,4, n=20

Пі Процент інгібування, %

Таблиця 10. Часова залежність дії аспірину при дослідженні конвульсивних скорочень у мишей (перорально)

	Час після введення (в хвиликах)						
	10	20	30	40	70	100	130
Скв ¹	11,4 ± 9,9	10,9 ± 10,1	1,98 ± 0,2	4,8 ± 1,1	6,3 ± 1,4	11,6 ± 2,5	11,8 ± 9,5
Пі ²	38,4	41,1	89,2	74,1	65,9	37,1	36,2
Значення Р	>0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	>0,05

Середня кількість випадків конвульсивних скорочень у групі, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, 18,5 ± 6,4, n=20

Таблиця 11. Часова залежність дії ТТХ при дослідженні конвульсивних скорочень у мишів (внутрішньом'язово)

	Час після введення (в хвилинали)							
	15	30	60	120	180	240	300	360
Скв ¹	10,4 ± 8,2	8,0 ± 5,3	5,4 ± 4,1	15,7 ± 7,1	8,8 ± 6,1	10,5 ± 5,8	15,7 ± 5,0	22,3 ± 9,8
Пі ²	63,2	71,6	80,9	44,3	68,8	62,8	44,3	20,9
Значення р	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	<0,01	<0,01	<0,05	>0,05

Середня кількість випадків конвульсивних скорочень в групі, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, 28,2 ± 14,3, n=20

Таблиця 12. Часова залежність дії аспірина при дослідженні конвульсивних скорочень у мишів (перорально)

	Час після введення (в хвилинали)							
	10	20	30	45	60	90	120	150
Скв ¹	19,5 ± 11,7	17,7 ± 9,2	5,5 ± 1,2	8,2 ± 2,7	10,2 ± 3,6	14,4 ± 5,8	19,3 ± 3,1	22,8 ± 9,7
Пі ²	30,8	37,2	80,6	70,9	63,8	49,0	31,6	19,3
Значення р	>0,05	<0,05	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01	<0,05	>0,05

Середня кількість випадків конвульсивних скорочень у групі, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, 28,2 ± 14,3, n=20

Приклад 4. Дослідження фізичної залежності від ТТХ у мишей, щурів та мавп

Можливість фізичної залежності від тетродотоксину (ТТХ) було досліджено на трьох видах тварин і чотирьох тваринних моделях. Для експерименту використовувалися миші лінії Kunming, щури лінії Wistar та мавпи Guangxi (підвид макак-резусів).

Маса тіла:

Щури: 190-230г/кожна

Миші: 20-25г/кожна

Мавпи: 3-6кг/кожна

Стать:

Щури і миші: самці і самиці у співвідношенні

1:1.

Мавпи: будь-якої статі.

Кількість тварин у групі:

Миші: 10/однієї статі/група.

Щури: 5/однієї статі/група.

Мавпи: 3-6.

Розмір вводимі дози для різних особин:

Миша: 0,1мл/на 10г маси тіла.

Щур: 0,2мл/100г.

Мавпа: 0,1мл/кг.

Експериментальні матеріали:

Порошок тетродотоксину, партія №950314, поставлений "Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant", Ляонін, Китай.

4.1 Дослідження стрибання при раптовій відміні препарату у мишей

Мишей, що отримували ТТХ (5,5мкг/кг і 11,5мкг/кг), було довільно розділено на дві групи: групу, що отримувала морфін (постійна доза морфіну 20мг/кг), - позитивний контроль, і групу, що отримувала стандартний фізіологічний розчин (рівний об'єм стандартного фізіологічного розчину), - негативний контроль. Усі препарати призначалися підшкірно 3 рази на день, у незмінній дозі, протягом 7 днів, відповідно. На 8-й день, через 2 години після останнього введення, призначалося 10мг/кг антагоніста морфінових рецепторів M₅₀₅₀ для прискорення синдрому відміни, після чого реєструвалися випадки і частота стрибків. Результати показали, що дані, отримані при дослідженні для групи, яка отримувала морфін, значно відрізнялися від результатів по групі, якій давали ТТХ, і групи негативного контролю, але суттєвої різниці не було між групою, що отримувала ТТХ, і групою, що отримувала стандартний фізіологічний розчин. Це означає, що, при дозуванні, яке вживали в цьому дослідженні, ТТХ, що вводили підшкірно постійною дозою протягом 1 тижня приводив к таким самим результатам, що стандартний фізіологічний розчин, і жоден з них не вказував на ознаки фізичної залежності у мишей (див. Таблицю°13).

Таблиця 13. Порівняння результатів дослідження стрибання у мишей в групах, що отримували ТТХ, морфін і стандартний фізіологічний розчин

Група	Кількість мишей (n)	Процент стрибків (%)	Частота стрибків (Хістандартне відхилення)
Морфін	20	90,0	19,7±16,3
Стандартний фізіологічний розчин	10	20,0*	0,80±2,20*
ТТХ (високе дозування)	20	10,0*#	0,70±2,70*
ТТХ (низьке дозування)	20	10,0*#	1,30±3,90*

Примітка:

* $P < 0,05$ порівняно з морфіном

$P > 0,05$ порівняно зі стандартним фізіологічним розчином

4.2 Дослідження раптової відміни препарату у щурів

Щури, що отримували ТТХ, були довільно розділені на дві групи: групу, що отримувала морфін, - позитивний контроль, і групу, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, - негативний контроль. Було застосовано такі схеми дозування: групи, що отримували ТТХ, починали с доз 1,5мкг/кг і 3,0мкг/кг, відповідно. Дози поступово підвищувались з 9 до 12мкг/кг на 7-й день, відповідно. Група, отримуюча морфін, - 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35мг/кг зі щоденним підвищенням дози. Стандартний фізіологічний розчин (рівні об'єми) було використано для негативного контролю. Усі препарати вводилися підшкірно 3 рази на день. На 8-й

день через 2 години після останньої дози вводилося 2мг/кг M_{5050} для прискорення синдрому відміни, після чого контролювалася реакція на відміну і втрата маси тіла.

Результати свідчать, що оцінка щодо симптомів відміни та втрати маси тіла в обох групах, що отримували ТТХ, не відрізняється від групи, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, і вона значно нижче, чим в групі, що отримувала морфін. Винайдені розходження відрізнялися дуже високою статистичною значущістю ($p < 0,01$). Отримані результати показали, що при підшкірному введенні в дозах, використаних в експерименті, ТТХ не викликає фізичної залежності у щурів (таблиця 14).

Таблиця 14. Порівняння оцінок симптомів відміни в групах, що отримували ТТХ, морфін і стандартний фізіологічний розчин

Група	Оцінка симптомів відміни (Значення±стандартне відхилення)	Оцінка втрати маси тіла (Значення±стандартне відхилення)
Морфін	7,38±1,16	10,00±2,60
Стандартний фізіологічний розчин	0,40±1,20*	0,00±0,00*
ТТХ (високе дозування)	0,30±0,90*#	0,00±0,00*#
ТТХ (низьке дозування)	0,20±0,60*#	0,00±0,00*#

Примітки:

* $P < 0,01$ порівняно з морфіном

$P > 0,05$ порівняно зі стандартним фізіологічним розчином

4.3 Дослідження раптової відміни препарату у мавп

Мавп було розділено на групу позитивного контролю, отримуючу морфін, групу негативного контролю, отримуючу стандартний фізіологічний розчин, і групу, що отримувала ТТХ. Кожна група отримувала препарати 3 рази на день (у 8:30, 14:30 и 20:30). Модель морфінової залежності створювалася методом поступового підвищення дозування. Доза морфіну оберігалася на рівні 3мг/кг протягом 3-х днів, потім її підвищували до 6мг/кг протягом 3-х днів, 9мг/кг протягом 4-х днів, 12мг/кг протягом 4-х днів, поки не виходили на рівень 15мг/кг к 3-му тижню і лишалися на цьому рівні до одного місяця. ТТХ призначався в дозах 1, 2, 3мг/кг по 1 тижню для кожної дози. Коли на 4-му тижні доза становила 4мг/кг, виявилася помітна токсична реакція (блювання), тому дозу зменшили до 3мг/кг. В усіх групах ТТХ призначався протягом місяця. Через одну годину після остан-

ньої дози, введеної о 8.30 на 31-й день, мавпам зробили підшкірну ін'єкцію 1мг/кг налоксону, після чого за ними одразу ж було проведено спостереження протягом наступної години, щоб виявити ознаки синдрому відміни та визначити процент змін маси тіла.

Результати показали, що оцінка симптомів відміни і процент зниження маси тіла в групах, що отримували ТТХ і стандартний фізіологічний розчин, були значно нижчі, чим у групі, що отримувала морфін ($p < 0,01$), і, що, як оцінка симптомів відміни, так і процент зниження маси тіла були дуже схожі з даними для групи, що отримувала ТТХ, і групи, що отримувала стандартний фізіологічний розчин. Таким чином, застосування антагоніста морфіну - налоксону для провокації синдрому відміни у мавп після тривалого вживання ТТХ не викликає морфіноподібних симптомів відміни, тобто, ТТХ не здатен викликати опіатну фізичну залежність (таблиця 15).

Таблиця 15. Результати дослідження реакції на раптову відміну препарату у мавп в групах, що отримували ТТХ, морфін і стандартний фізіологічний розчин (середнє значення \pm стандартне відхилення)

Група	n	Оцінка симптомів відміни	Втрата маси тіла (%)
Морфін	3	61,0 \pm 2,6	6,6 \pm 1,7
Стандартний фізіологічний розчин	3	2,6 \pm 4,6*	0,7 \pm 0,6*
ТТХ	6	2,6 \pm 4,6*#	0,4 \pm 0,8*#

Примітки:

* $P < 0,01$ порівняно з морфіном

$P > 0,05$ порівняно зі стандартним фізіологічним розчином

4.4 Дослідження реакції природної відміни у мавп

Мавп було розділено на групу позитивного контролю, що отримувала морфін, групу негативного контролю, що отримувала стандартний фізіологічний розчин, і групу, що отримувала ТТХ. Режими дозування, їх зміна і методики були тими ж, що при дослідженні реакції раптової відміни. Через 30 днів, після досягнення таких самих високих доз, як у дослідженні раптової відміни, прийом було подовжено до 90-го дня, після чого приймання морфіну, ТТХ і стандартного фізіологічного розчину припинявся. Симптоми відміни та змін маси тіла у кожній групі контролювалися протягом тижня після завершення приймання, причому спостереження провадилися 3 рази на день, і всі дані обробляли-

ся у відповідності з таблицями спостереження(див. додатки 1, 2 і 3).

Результати в таблицях 16 і 17 вказують, що протягом тижня після завершення тривалої, трьохмісячної терапії ТТХ аніяких симптомів відміни не спостерігалось. Через 3 дні після завершення приймання ТТХ у кількох мавп зрідка відмічали щось схоже на збудження і занепокоєння, але ця поведінка дуже швидко припинялася. Маса тіла в групі, що отримувала ТТХ, не тільки не зменшувалася, але, навпаки, зростала у порівнянні з показниками періоду лікування. З іншого боку, в групі, що отримувала морфін, виявилися явні симптоми відміни. Таким чином, тривале приймання ТТХ не викликає ніяких ознак фізичної залежності.

Таблиця 16. Порівняння оцінок синдрому відміни протягом періода природної відміни (середнє значення \pm стандартне відхилення)

Група	n	Кількість днів після відміни						
		1	2	3	4	5	6	7
Морфін	4	34,8 \pm 26,4	35,3 \pm 20,5	28,3 \pm 5,4	16,3 \pm 7,5	15,3 \pm 5,7	10,3 \pm 0,5	10,5 \pm 2,5
		0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
ТТХ	6	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0
Стандартний фізіологічний розчин	3	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0	0,0 \pm 0,0

Таблиця 17. Процентні зміни маси тіла у кожній групі мавп протягом періода природної відміни (середнє значення \pm стандартне відхилення)

Група	n	Кількість днів після відміни							Загальне середнє значення $\chi \pm CO$
		1	2	3	4	5	6	7	
Морфін	4	-4,8 \pm 0,4	-7,1 \pm 2,5	-5,4 \pm 3,4	-5,9 \pm 2,0	-6,8 \pm 2,4	-6,6 \pm 2,4	-5,9 \pm 1,4	-6,1 \pm 0,8
		1,6 \pm 2,9	2,4 \pm 1,5	3,0 \pm 0,8	3,1 \pm 0,7	3,0 \pm 1,8	2,4 \pm 1,1	2,8 \pm 2,6	2,6 \pm 0,5*
Стандартний фізіологічний розчин	3	1,6 \pm 1,4	2,9 \pm 3,7	3,8 \pm 2,9	3,1 \pm 1,8	3,7 \pm 2,7	3,5 \pm 2,8	4,1 \pm 1,6	3,2 \pm 0,8*#
ТТХ	3	1,6 \pm 1,4	2,9 \pm 3,7	3,8 \pm 2,9	3,1 \pm 1,8	3,7 \pm 2,7	3,5 \pm 2,8	4,1 \pm 1,6	3,2 \pm 0,8*#

Примітки:

* $P < 0,01$ порівняно з морфіном

$P > 0,05$ порівняно з групами, що отримували стандартний фізіологічний розчин

Додаток 1.

Таблиця спостережень синдрому відміни при дослідженні раптової відміни препарату у щурів

		Рік	Місяць	День							
Кіл-ть щурів	Стать	Тестуєми препарат	Маса тіла до відміни (г)								
Симптоми		Оцінки	15'	30'	45'	60'	90'	120'			
Поведінка	Встрахування	(2)									
	Дратівливість	Слабка (1)									
	при доторканні	Сильна (2)									
	Стук зубами	Періодично (0,5)									
Симптоми автономної нервової системи		Постійно (1)									
	Сльозотеча	(4)									
	Діарея	М'яке випорожнення (4)									
		Неоформлене випорожнення (8)									
	Слиновиділення	Легке (1)									
		Інтенсивне (2)									
Маса тіла після відміни (г)											
Процент змін маси тіла											

Примітки:

Сумарна оцінка:

Додаток 2.

Таблиця спостережень синдрому відміни у мавп

		Маса тіла (кг)	Час останньої дози			Місяць	День	Година			
\ час		В день			В день			В день			
Симптоми		8.00	14.30	20.30	8.00	14.30	20.30	8.00	14.30	20.30	
Легкі	Збуджений стан										
	Дратівливість										
	Плач										
	Відсутність апетиту										
	Рідке випорожнення										
	Слиновиділення										
	Ринорея										
Середні	Приплив крові до лицевої зони										
	Тремор										
	Анорексія										
	Ригідність м'язів										
	Судороги										
	Пілоерекція										
	Черевні перейми										
Важкі	Супінація через слабкість										
	Діарея										
	Атипові положення тіла										
	Блювання										
	Положення лежачи на боці з заплющеними очима										
	Дуже важкі										
	Стан виснаження										
	Смерть										
Сумарна оцінка симптомів											
Маса тіла (кг)											
Температура тіла (°C)											

Додаток 3.

Класифікація симптомів синдрому відміни у мавп і метод розрахунку оцінки

I. Ступіні

1. Легка: страх, позіхання, сльозотеча, тремтіння, гіперемія лицевих частин, потовиділення, плач, дратівливість, зниження апетиту, рідке випорожнення.

2. Середня: тремор, анорексія, пілоерекція, м'язові судороги, черевні перейми, діарея та анергічна супінація.

3. Важка: помітний неспокій, положення лежачи на боці з заплющеними очима, атипові поло-

ження тіла, блювання, блідість шкірного покриву та помітні м'язові спазми.

4. Дуже важка: виснаження (відсутність емоцій, задишка, дегідратація), різко виражена втрата маси тіла, порушення кровообігу і смерть.

II. Оцінка (оцінка за класифікацією ступенів + оцінка симптомів)

Легка: 5 балів за ступінь, 3 бали за кожний симптом, з відрахуванням 1 бала при повторенні проявів того ж самого симптому протягом даного дня.

Середня: 10 балів за ступінь, 4 бали за кожний симптом, з відрахуванням 1 бала при повторенні

проявів того ж самого симптому протягом даного дня.

Важка: 17 балів за ступінь, 4 бали за кожний симптом, з відрахуванням 1 бала при повторенні проявів того ж самого симптому протягом даного дня.

Дуже важка: 32 бали за ступінь, 20 балів за виснаження, 30 балів за смерть.

III. Основа оцінки

При наявності різниці в ступеню симптомів, оцінка має бути різною. Більш того, оцінка мусить варіюватися залежно від кількості симптомів одного ступеня, проте кінцевий і результат не має бути вище, ніж сума ступенів.

Оцінка для трьох симптомів одного ступеня дорівнює рахункові за один симптом вищого ступеня. Наприклад, три симптоми легкого ступеня тяжкості $(5+(3 \times 3))=1$ симптому середнього ступеня $(10+4)$.

Три симптоми середнього ступеня тяжкості $(10+(4 \times 3))=1$ симптому важкого ступеня $(17+5)$.

Якщо тварина досягає стадії виснаження або гине, усі інші симптоми ігноруються. Таким чином, отримана оцінка дорівнює сумі оцінок симптомів легкого, середнього і важкого ступенів.

Приклад 5

Загальні фармакологічні дослідження тетродотоксину

Експериментальні матеріали

Порошок тетродотоксину, партія №971208, поставлений "Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant", Ляонін, Китай. Препарат розчинявся у стандартному фізіологічному розчині у відповідних концентраціях для внутрішньоочередового введення (0,1 мл на 10 г ваги тіла).

Кофеїн: "Shanghai Second Chemical Reagents Co", партія №950801.

Розчин діазепаму для ін'єкцій: "People's Pharmaceuticals of Tianjing Amino Acid Co.", партія №970424.

Морфін: "National Institute on Drug and Biological Product", партія №1201-9612.

Фенобарбітал натрію: "Beijing Tongxian Yuchai Fine Chemicals", партія №950427.

Лабораторні тварини

Для експериментів було використано мишей лінії Kunming (вагою від 17 до 22 г), самці і самиці у співвідношенні 1:1. Розходження у вазі тіла тварин у кожнім тесті не перевищували 5 г.

5.1 Вплив на загальну поведінку мишей

Мишей було довільно розділено на 6 груп по 10 у кожній. Тваринам зробили внутрішньоочере-

винні ін'єкції ТТХ (2,5, 5 і 10 мг/кг), кофеїну (10 мг/кг), діазепаму (5,0 мг/кг) або стандартного фізіологічного розчину, відповідно. Через п'ятнадцять хвилин після введення реєструвалися зміни у загальній поведінці, рухах тіла, ході, наявність надмірного слиновиділення та м'язового тремору, а також зміни розміру зіниць.

Результати тестів показали, що після отримання одноразової дози 2,5 мг/кг або 5,0 мг/кг ТТХ миші зберігали нормальний характер рухів тіла і ходу, не відмічалось надмірного слиновиділення або аміостазії, не було змін у розмірі зіниць. Тільки у мишей, які отримали одноразову дозу 10 мг/кг ТТХ, в цілому спостерігалось сходження діафрагми ока і обмеження фізичних переміщень.

5.2 Вплив на вегетативну рухливість мишей

Мишей було довільно розділено на 12 груп по 12 мишей у кожній. Далі їх формували у три групи, що отримували ТТХ в дозах 2,5, 5,0 і 10 мг/кг, відповідно, і дві позитивні контрольні групи, тобто, групу, що отримувала 10 мг/кг кофеїну (подразник центральної нервової системи (ЦНС)), групу, що отримувала 5 мг/кг діазепаму (депресант ЦНС), а також «порожню» контрольну групу (стандартний фізіологічний розчин). Тестування по черзі проводилося на групах, що отримували ТТХ, і контрольних групах. Через п'ятнадцять хвилин після введення, миші (групами по 4) поміщалися в реєстратор загальних локомоторних рухів TDW-02 і фіксувалися на п'ять хвилин. Потім протягом наступних п'яти хвилин реєструвалися локомоторні рухи мишей і порівнювалися результати для груп, що отримували ТТХ, позитивних контрольних груп і «порожньої» контрольної групи. Значимість виявлених розходжень визначалася на основі t-критерію.

Результати тестування показали, що після отримання одноразової дози 2,5 мг/кг або 5,0 мг/кг ТТХ у мишей реєструвалися нормальні рухи тіла і хода, було відсутнє надмірне слиновиділення або аміостазія, не спостерігалися зміни у розмірі зіниць. Тільки у мишей, що отримали однократну дозу 10 мг/кг ТТХ, в цілому спостерігалось сходження діафрагми ока і обмеження фізичних переміщень. Тому їх вегетативна рухливість була значно нижче порівняно з «порожньою» контрольною групою ($P < 0,01$), але такою ж ($P > 0,05$) порівняно з позитивною контрольною групою (діазепам), що вказує на те, що ТТХ у такій дозі (10 мг/кг) справляє певний седативний ефект (таблиця 18).

Таблиця 18. Вплив тетродотоксину (ТТХ) на вегетативну рухливість мишей

Препарат	Рівень дози	Кількість тварин	Показник вегетативної рухливості ($\bar{X} \pm$ стандартне відхилення)
Стандартний фізіологічний розчин	-----	12	591 \pm 111
Кофеїн	10 мг/кг	12	777 \pm 178 *** ●●
Діазепам	5,0 мг/кг	12	323 \pm 203 *** ●●●
ТТХ	2,5 мкг/кг	12	547 \pm 99 ●●●
ТТХ	5,0 мкг/кг	12	540 \pm 118 ●●●
ТТХ	10 мкг/кг	12	442 \pm 98 ** ●●●

** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ порівняно зі стандартним фізіологічним розчином

●● $P < 0,001$ порівняно з кофеїном

●●● $P < 0,001$ порівняно з діазепамом

5.3 Вплив на тривалість сну, викликаного фенобарбіталом натрію

Було проведено попереднє дослідження з метою визначення рівня дози, при якій фенобарбітал натрію викликає би сон у 100 відсотків тварин. Така доза виявилася рівною 40мг/кг.

Мишей було довільно розділено на 5 груп по 10 мишей у кожній. Їх формували у три групи, що отримували ТТХ в дозах 2,5, 5,0 і 10мкг/кг, відповідно, одну позитивну контрольну групу (діазепам, 2,5мг/кг) і одну «порожню» контрольну групу (стандартний фізіологічний розчин). Миші у кожній групі отримували внутрішньоочеревинні ін'єкції, а потім мишам в усіх групах вводили 40мг/кг фенобарбіталу натрію за 10-15 хвилин до проявлення ефектів максимального впливу ТТХ або діазепаму. Для того щоб визначити, чи спроможний був тес-

тований препарат подовжити сон мишей, викликаний фенобарбіталом натрію, реєструвалося запізнення встановлювального рефлексу. Порівнювалися розбіжності у запізненнях між отримуваними ТТХ групами і контрольними групами, а для того, щоб визначити, наскільки вагомі виявлені розбіжності, застосовували t-тест.

Результати показали, що, якщо говорити про ефект пролонгування часу сну, викликаного фенобарбіталом натрію, то групи, що отримували ТТХ у кількості 2,5мкг/кг, 5,0мкг/кг і 10мкг/кг, суттєво не відрізнялися від контрольної (що отримувала стандартний фізіологічний розчин) групи ($P > 0,05$), але демонстрували вагомі розбіжності порівняно з позитивною контрольною (діазепам) групою ($P < 0,001$). Результати наведено у таблиці 19.

Таблиця 19. Вплив тетродотоксину (ТТХ) на тривалість сну мишей, викликаного фенобарбіталом

Препарати	Рівні дози	Кіл-ть тварин	Час сну ($\bar{X} \pm$ стандартне відхилення) хвил
Стандартний фізіологічний розчин		10	33,3 \pm 14,5 *** ●●●
діазепам	2,5 мг/кг	10	146,2 \pm 53,0 ●●●
ТТХ	2,5 мкг/кг	10	35,1 \pm 26,2 ●●●
ТТХ	5,0 мкг/кг	10	36,3 \pm 18,7 ●●●
ТТХ	10 мкг/кг	10	26,6 \pm 22,5 ●●●

*** $P < 0,001$ порівняно зі стандартним фізіологічним розчином

●●● $P < 0,001$ порівняно з діазепамом

5.4 Вплив на релаксацію скелетних м'язів у мишей

Мишей було довільно розділено на п'ять груп по десять мишей у кожній. Їх формували у три групи, що отримували ТТХ у дозах 2,5, 5,0 і 10мкг/кг, відповідно, одну позитивну контрольну групу (діазепам, 5мг/кг) і одну «порожню» контрольну групу (стандартний фізіологічний розчин). Мишей роз-

міщували на металевій сітці, встановленій на столі під кутом 50 градусів к горизонталі, і давали їм можливість вільно переміщуватися по сітці. Вважалися за придатних і відбиралися ті миші, які протягом години не падали з сітки.

Потім мишам у кожній групі було зроблено відповідні ін'єкції, і тварин знову розміщували на сітці та надавали свободу рухатися. Спостереження за

ними провадили протягом наступних 50 хвилин, і тварин, що падали, знов повертали на сітку. Вважалося, що введений препарат ефективно викликає релаксацію скелетних м'язів, якщо миша падала три рази підряд. Результати показали, що з точки зору здатності викликати релаксацію скелетних м'язів, групи, що отримували ТТХ у дозах

2,5мкг/кг, 5,0мкг/кг і 10мкг/кг, істотно не відрізнялися від «порожньої» контрольної (стандартний фізіологічний розчин) групи ($P>0,05$), але демонстрували суттєві відмінності від позитивної контрольної (діазепам) групи ($P<0,001$). Результати наведено у таблиці 20.

Таблиця 20. Вплив тетродотоксину (ТТХ) на релаксацію скелетних м'язів (метод підйому по сітці)

Препарати	Рівні дози	Кіл-ть тварин	Кіл-ть тварин з позитивним ефектом	
фізіологічний розчин	-----	10	0	
Діазепам	5 мг/кг	10	8	***
ТТХ	2,5 мкг/кг	10	0	***
ТТХ	5,0 мкг/кг	10	0	***
ТТХ	10 мкг/кг	10	0	***

*** $P < 0,001$ порівняно зі стандартним фізіологічним розчином

*** $P < 0,001$ порівняно з діазепамом

5.5 Вплив на серцево-судинну і дихальну системи собак під анестезією

Для цього випробування використовували здорових безпородних собак, самців і самок у співвідношенні 1:1, з вагою тіла 10-15кг. Анестезія собак робилася внутрішньовенним введенням фенобарбіталу натрію у дозі 30мг/кг. Потім їх фіксували у положенні лежачи на спині, і хірургічним шляхом відкривали доступ до стегнової артерії, у яку вводили трубку, щоб контролювати артеріальний кров'яний тиск. Для вливання живильного розчину хірургічним шляхом відкривали доступ до стегнової вени другої задньої кінцівки. Частота і глибина дихання контролювалися поміщенням у ніздрі носовим енергообмінним пристроєм TR-612T. Серцева діяльність контролювалася за електрокардіограмою у двох відведеннях з голчастими електродами. Усі параметри, що контролювалися, синхронно записували багатоканальним реєстратором RM-6000.

Після хірургічного втручання систему стабілізували протягом 30 хвилин чи більше до повного врівноваження контрольованих параметрів, потім їх значення фіксувалися як величини, реєстровані до ін'єкції дози ТТХ. У сидниці собакам було зроблено внутрішньом'язові ін'єкції розчинів ТТХ або ж рівного об'єму стандартного фізіологічного розчину у випадку «порожньої» контрольної групи, відповідно. Значення тих же параметрів реєструвалися через 15, 30, 45, 60, 90, 120 і 180 хвилин після введення.

Результати показали, що, при внутрішньом'язовій ін'єкції, ТТХ у дозах 1мкг/кг, 2мкг/кг або 4мкг/кг справляє помітний вплив на кров'яний тиск, серцевий ритм, електрокардіограму, частоту і глибину дихання ($P>0,05$).

Приклад 6. Дослідження токсичності препарату ТТХ

Для досліджень використовувалися миші лінії Kunming і щури лінії Wistar.

Вік: 40 днів для мишей і сім тижнів для щурів. Стать: самці і самиці у співвідношенні 1:1 для обох ліній тварин. Вага тіла: 18-20г для мишей; 130-170г для щурів. Об'єм ін'єкції: 0,1мл/10г для мишей; 0,2мл/100г для щурів.

Експериментальний матеріал: чистий порошок тетродотоксину, виготовлений "Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd".

6.1 Гостра токсичність ТТХ для мишей

Експериментальний матеріал: порошок тетродотоксину, партія №ML-003, поставлений "Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd".

Мишей не годували протягом 12 годин, після чого їх було довільно розділено на різні групи, залежно від дози, у відповідності з вагою тіла, 10/стать/група. Після введення ТТХ різними шляхами (внутрішньовенно, внутрішньоочеревинно, підшкірно) одразу ж реєструвалися реакції кожної тварини, спостереження провадилося протягом тижня після введення препарату. При цьому відмічали токсичні реакції і розподіл летальних кінців. Розтин провадився безпосередньо після кожного випадку загибелі тварини, також фіксувалися патологічні зміни. Мікроскопічні патологічні дослідження провадилися на тих тваринах, в яких під час загальних обстежень було виявлено зміни. Значення LD_{50} с довірчим інтервалом (ДІ) 95% розраховували за методом Біссса.

Результати продемонстрували подібність всіх токсичних реакцій незалежно від шляху введення. Головними клінічними симптомами були слабкість задніх кінцівок, прострація, задуха і смерть від припинення дихання. Як правило, смерть наступала протягом 1-15 хвилин після внутрішньовенного введення і за 20-60 хвилин після введення іншими шляхами. Частота летальних кінців не залежала від статі тварини. Виживши миші приходили до норми приблизно через годину після введення препарату. Протягом наступних 7-денних спостережень серед тварин, що вижили, не було відміче-

но аніжких аномалій чи летальних кінців. Розтин загиблих тварин не виявив ніяких відхилень від

норми. Розподілення летальних кінців і розрахунок значень ЛД₅₀ наведено в таблицях 21, 22 і 23.

Таблиця 21. Летальні кінці і ЛД₅₀ серед мишей після одноразового внутрішньовенного введення ТТХ

Доза (мкг/кг)	Логарифм دوزи (x)	Кіл-ть тварин	Кіл-ть леталь- них кінців	Доля леталь- них кінців	Пробіт (y)	Значення ЛД ₅₀ (95% ДІ)
11,8	1,070	10	10	1,000	7,038	
10,0	1,000	10	7	0,700	5,493	8,3
8,5	0,929	10	5	0,500	5,000	
7,2	0,859	10	3	0,300	4,479	(7,5-9,2)
6,1	0,788	10	1	0,100	3,722	

Таблиця 22. Летальні кінці і ЛД₅₀ серед мишей після одноразового внутрішньочеревинного введення ТТХ

Доза (мкг/кг)	Логарифм دوزи (x)	Кіл-ть тварин	Кіл-ть леталь- них кінців	Доля леталь- них кінців	Пробіт (y)	Значення ЛД ₅₀ (95% ДІ)
11,8	1,072	10	9	0,900	6,197	
10,0	1,000	10	8	0,800	5,827	9,0
8,5	0,929	10	4	0,400	4,474	
7,2	0,857	10	1	0,100	3,719	(8,2-9,8)
6,1	0,792	10	0	0,000	2,464	

Таблиця 23. Летальні кінці і ЛД₅₀ серед мишей після одноразового підшкірного введення ТТХ

Доза (мкг/кг)	Логарифм دوزи (x)	Кіл-ть тварин	Кіл-ть леталь- них кінців	Доля леталь- них кінців	Пробіт (y)	Значення ЛД ₅₀ (95% ДІ)
22,9	1,360	10	10	1,000	7,246	
19,5	1,290	10	8	0,800	5,835	16,2
16,5	1,217	10	5	0,500	5,000	
14,1	1,149	10	2	0,200	4,163	(14,7-17,8)
12,0	1,079	10	1	0,100	3,734	

6.2 Гостра токсичність ТТХ для щурів

Експериментальний матеріал: порошок тетродотоксину, партія №000530, поставлений "Nanning Maple Leaf Pharmaceutical Co., Ltd".

Щурів лінії Wistar не годували протягом 12 годин, після чого їх довільно розділили на різні групи залежно від дози та відповідно до ваги тіла, 5/стать/група. Метод тестування був тим же, як у випадку дослідження гострої токсичності для мишей.

Результат показав, що, приблизно через 10-20 хвилин після внутрішньом'язової ін'єкції, щури демонстрували різний ступінь слабкості задніх кінцівок, прискорене дихання і протрацію. У тварин з

активною реакцією спостерігалися значні порушення дихання (дихання Чейна-Стокса) до моменту летального кінця через дихальну недостатність, як правило, протягом 1 години після введення. Вживши тварини знаходилися у загальмованому стані і поступово приходили до норми приблизно протягом 1 години після введення. Спостереження провадилися сім днів, при цьому не відмічалось аніжких інших аномалій чи випадків летальних кінців. Як правило, розтин загиблих тварин не виявляв ніяких відхилень від норми.

Розподіл летальних кінців і розрахунок значень ЛД₅₀ наведено в таблиці 24.

Таблиця 24. Летальні кінці і ЛД₅₀ серед щурів після одноразового внутрішньом'язового введення ТТХ

Доза (мкг/кг)	Логарифм доз (x)	Кіл-ть тварин	Кіл-ть леталь- них кінців	Доля леталь- них кінців	Пробіт (y)	Значення ЛД ₅₀ (95% ДІ)
13,72	1,14	10	10	100	7,49	
12,35	1,09	10	8	80	5,82	11,11
11,11	1,05	10	5	50	5,00	
10,00	1,00	10	2	20	4,18	(10,5-11,7)
9,00	0,96	10	0	0	2,51	

6.3 Дослідження підгострої (28 днів) токсичності ТТХ для макак-резусів

Лабораторні тварини:

20 макак-резусів, по десять особин кожної статі, вік 3-4 роки, вага тіла: самці 6,3±0,5кг; самиці 8,4±0,4кг. Експериментальний матеріал:

Експериментальний матеріал: ін'єкційний препарат тетродотоксину, 30мкг/2мл/ампула, партія №931220, поставлений "Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd".

Мавп було довільно розділено на 5 груп. Три групи отримували ТТХ (1мкг/кг, 2,5мкг/кг або 6,25мкг/кг). Інші дві групи отримували стандартний фізіологічний розчин (порожній контроль) і 0,02%-ий розчин оцтової кислоти (контроль розчинника). Усі експериментальні препарати вводилися раз на день протягом 28 днів підряд. Після введення щоденно контролювалася і реєструвалася загальна поведінка, щотижнево визначалися споживання по корму і вага тіла. Через 24 години після останньої ін'єкції з серця забиралися проби крові, які використовувалися для визначення 13 гематологічних параметрів і 15 параметрів біохімічного складу крові. Через 24 години після останньої ін'єкції умертвляли по одному самцю і по одній самиці з кожної групи, і кров забирали для гематологічного, біохімічного і патологічного досліджень. Решта мавп, що входили до кожної з груп, були під постійним наглядом на протязі 4 тижнів, а потім їх умертвляли для проведення аналогічних досліджень, щоб перевірити можливість відновлення після будь-яких токсичних реакцій, що відмічалися, а, також, можливість проявлення уповільнених токсичних реакцій.

Результати довели, що мавпи з групи, що отримувала ТТХ у дозі 6,25мкг/кг, демонстрували чіткі симптоми токсичного ураження після кожної ін'єкції. Головною токсичною реакцією було блювання. В однієї з мавп у даній групі відзначалися припухлість повіки, легкий параліч і аномальне підвищення рівня АЛТ і лужної фосфатази. У однієї з мавп у групі, що отримувала ТТХ у дозі 2,5мкг/кг, відзначалося незначне блювання, а активність ацетилхолінестерази впала на 41,2%. При вивченні загальних фізіологічних параметрів, за результатами гістопатологічного, гематологічного і офтальмологічного досліджень для групи, що отримувала ТТХ у дозі 1,0мкг/кг, груп порожнього контролю і контролю розчинника, не було виявлено аніяких відхилень, пов'язаних з уживанням препарату. Під час мікроскопічного дослідження тканин мавп, умертвлених на 28-й день, було виявлено локальний м'язовий некроз у місті вве-

дення розчину оцтової кислоти. В кінці періоду відновлення (56-й день) сліди м'язового некрозу були відсутні. За умов даного дослідження рівень нетоксичної дози ТТХ для макак-резусів встановлював 1,0мкг/кг.

Приклад 7. Дослідження місцевої токсичності ТТХ

Експериментальний матеріал: ін'єкційний препарат тетродотоксину, 30мкг/2мл/ампула, партія №931220, поставлений "Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd".

7.1 Дослідження місцевого внутрішньом'язового подразнення у кроликів

Вісім новозеландських білих кроликів, самців, віком 13-18 тижнів і вагою тіла 2,0-2,5кг були довільно розділені на чотири групи, що отримували тетродотоксин (0,56мкг/кг) в оцтовій кислоті, тетродотоксин (0,56мкг/кг) у стандартному фізіологічному розчині, 0,02%-у оцтової кислоти (контроль) і пеніцилін G калієву сіль (позитивний контроль).

Перед введенням кроликам коротко вистригали волоссяний покрив навколо місця ін'єкції на ділянці 3×2см. Ін'єкцію робили у середню частину чотириголових м'язів лівого та правого стегна кролика по 1 мл з кожного боку, відповідно. Одразу ж після введення відстежувалися та реєструвалися погіршення зовнішнього вигляду волоссяного покриву, апатія, анорексія та рухові утруднення. Через 48 годин кроликів умертвляли, препарували чотириголові м'язи і робили поздовжній розтин, щоб відстежити реакції місцевого подразнення у зоні ін'єкції та провести патологічні дослідження. Реакції подразнення класифікували відповідно таких критеріїв оцінки: 0 - відсутність очевидних змін, 1 - легка гіперемія на ділянці менш ніж 0,5×1,0см, 2 - середня гіперемія на ділянці більш ніж 0,5×1,0см, 3 - значна гіперемія разом з переродженням м'язової тканини, 4 - некроз, що виглядає як переродження з коричневим забарвленням, 5 - ознаки великого некрозу.

Результати дослідження показують, що тетродотоксин у дозі 0,56мкг/кг в розведеній оцтовій кислоті, 0,02%-ий розчин оцтової кислоти (розчинник) і пеніцилін G калієва сіль у концентрації $1,54 \times 10^5$ од/кг (позитивний контроль) викликали виражені реакції місцевого подразнення у м'язах кроликів, тоді як такі реакції при застосуванні тетродотоксину у дозі 0,56мкг/кг в стандартному фізіологічному розчині не спостерігалися. На підставі отриманих результатів можна зробити висновок, що подразником був 0,02%-ий розведений розчин оцтової кислоти, а не тетродотоксин у концентрації, що вивчалася у дослідженні (таблиця 25).

Таблиця 25. Значення оцінок за результатами дослідження місцевого м'язового подразнення у кроликів при введенні тетродотоксину

Групи	Оцінки реакції подразнення чотириголового стегнового м'язу кроликів				Сума оцінок
	Зліва		Справа		
	1*	2	1	2	
Тетродотоксин у розведеній оцтовій кислоті	4	4	4	4	16
Тетродотоксин у стандартному фізіологічному розчині	0	0	0	0	0
0,02%-ий розчин оцтової кислоти (середовище)	4	4	4	4	16
Пеніцилін G калієва сіль (позитивний контроль)	4	4	4	4	16

* Кількість тестованих кроликів

7.2 Дослідження загальної гіперчутливості у морських свинок

Двадцять чотири морські свинки лінії Hartley, самці і самиці у співвідношенні 1:1, віком 8-12 тижнів і вагою тіла 250-300г довільно розподілялися на три групи, що отримували тетродотоксин у дозі 0,95мкг/кг, 10%-ий розчин бичачого сироваткового альбуміну (позитивний контроль) і 0,02%-ий розведений розчин оцтової кислоти (контроль розчинника).

Метод сенсibilізації:

У групі, що отримувала тетродотоксин, кожній морській свинці внутрішньоочеревинно вводили 0,5мл препарату сенсibilізуючої дози тетродотоксину через день, роблячи три послідовні ін'єкції. Такий же метод введення застосовували і для групи, що отримувала розчинник, і групи, що отримувала 10%-ий розчин бичачого сироваткового альбуміну (позитивний контроль). Після цього тварини з кожної групи розділялися на дві підгрупи, по чотири особини у кожній.

Метод стимуляції:

У кожній групі тваринам з першої підгрупи через 14 днів після сенсibilізуючої дози (внутрішньоочеревинного введення) внутрішньовенно вводили 1,0 мл препарату подразливої дози у зовнішню частину задньої кінцівки. Тварини з другої підгрупи отримували таку ж дозу тим самим шляхом на 21-й день після сенсibilізуючої дози

(внутрішньоочеревинне введення). За лабораторними тваринами постійно наглядали, щоб виявити ознаки гіперчутливих реакцій, таких як розчухування носа, чхання, пілоерекція, судороги, задишка, нетримання калу і сечі, шок, смерть та ін. Застосовувалися такі критерії оцінки: (-) - відсутність аномальної реакції; (±) повороти, пілоерекція; (+) - розчухування носа, пілоерекція, неспокій, чхання, дихальна недостатність і незначний ціаноз; (++) - пілоерекція, виражена задишка, ціаноз, слабкість кінцівок і повзання на животі; (+++) - смерть.

Результати досліджень показали, що введення тетродотоксину у дозі 0,95мкг/кг і 0,02%-ого розведеного розчину оцтової кислоти (середовище) після стимуляції не призводить до явних реакцій загальної гіперчутливості у морських свинок, тоді як в позитивній контрольній групі, що отримувала 10%-ий розчин бичачого сироваткового альбуміну, відзначався різний ступінь проявів гіперчутливості, наприклад, розчухування носа, пілоерекція, неспокій, чхання і смерть однієї з морських свинок через кілька хвилин після стимуляції (таблиця 26).

Результати тестів показали, що тетродотоксин у дозі на рівні 0,95мкг/кг не викликає реакцій гіперчутливості у морських свинок, тому застосування даного препарату у вказаній дозі вважається безпечним.

Таблиця 26. Результати досліджень загальної гіперчутливості до тетродотоксину у морських свинок

Групи	Гіперчутливі реакції у тварин			
	* -	+	++	+++
Тетродотоксин	8/8	0/8	0/8	0/8
0,02%-ий розведений розчин оцтової кислоти (розчинник)	8/8	0/8	0/8	0/8
10%-ий розчин бичачого сироваткового альбуміну (позитивний контроль)	0/8	4/8	3/8	1/8

Примітка: * (-) відсутність аномальної реакції

7.3 Тести на гемоліз і васкулярну стимуляцію
15 новозеландських білих кроликів, вік: 14-18 тижнів, вага: 2,0-4,0кг. Без розділення за статевими ознаками.

Тест на гемоліз:

Сім мілілітрів крові кролика відбиралося для приготування 2%-ої суспензії еритроцитів у стандартному фізіологічному розчині для використання в експериментах. Як контроль застосовували два мілілітра 0,02%-ого водного розчину оцтової кислоти. В сім пробірок поміщали 2%-у суспензію еритроцитів і стандартний фізіологічний розчин, куди додавали ТТХ у різних кількостях. Пробірки струшували для однорідного змішування розчинів, потім витримували у термостаті при температурі 37°C. Перше спостереження і реєстрацію результатів робили через 15 хвилин, а наступні реєстрації повторювали щогодини протягом чотирьох годин.

Результати показали, що тетродотоксин не викликав гемоліз in vitro.

Тест на васкулярну стимуляцію:

15 кроликів довільно розділяли на три групи, які отримували тетродотоксин 1,0мкг/кг, 0,02%-ий водний розчин оцтової кислоти (контроль розчинника) і стандартний фізіологічний розчин.

Усі групи отримували по одній внутрішньовенній ін'єкції в день протягом 10 днів підряд. Через 24 години після введення умертвляли трьох тварин з кожної групи і препарували кровоносні судини у місці введення для патологічного дослідження. Решту тварин доглядали протягом двох тижнів; потім їх умертвляли і, відповідно, препарували кровоносні судини у місці ін'єкції для проведення патологічного дослідження.

Результати показали, що протягом періоду введення і після нього не відзначалося відхилень у психічному стані, вазі тіла, температурі тіла і споживанні їжі в отримавших препарат тваринах, - це свідчить, що тетродотоксин (1,0мкг/кг) у випадку щоденних внутрішньовенних ін'єкцій не викликає будь-якої помітної васкулярної стимуляції у кроликів.

Приклад 8. Тератогенні ефекти тетродотоксину у мишей при внутрішньом'язовому введенні

Експериментальний матеріал:

Ін'єкційний препарат тетродотоксину, 30мкг/2мл/ампула, партія №931220, поставлений "Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd".

Лабораторні тварини:

Миші лінії Shanghai, 250 самиць і 80 самців, віком 80-100 днів, здорові, статевозрілі, самиці не родили і ніколи не були запліднені. Вага тіла: самиці 25-35г, самці 30-40г.

Мишей довільно розділяли на три групи, що отримували ТТХ (2,5, 5,0 і 10,0мкг/кг), позитивну контрольну групу (циклофосфамід, 20мг/кг), групу контролю розчинника (0,02%-а розведена оцтова кислота) і порожню контрольну групу (для ін'єкцій використовували воду).

В усіх групах кожна самиця отримувала єдину ін'єкцію (внутрішньом'язово) з 6-го по 15-й день вагітності, крім групи позитивного контролю, де кожній самиці єдину ін'єкцію робили на 11-й день вагітності. Миші-самці препарат не отримували.

Результати показали, що протягом періоду введення препарату загальний стан вагітних мишей був нормальним. Після введення у вагітних мишей не спостерігалося аніяких ознак відхилень. Не було виявлено ембріотоксичності чи тератогенного впливу серед мишей лінії Shanghai, що отримували тетродотоксин у вигляді однієї ін'єкції (внутрішньом'язово) щоденно з 6-го по 15-й день вагітності у дозі 2,5, 5,0 і 10,0мкг/кг, що дорівнювала 1/8, 1/4 і 1/3 ЛД₅₀, відповідно. Не було виявлено також ніяких дефектів екстер'єру, внутрішніх органів і скелета у тварин, що отримували або 0,02%-у розведену оцтову кислоту (контроль розчинника), або воду для ін'єкцій. Разом з тим, показник тератогенного впливу становив 100% при одноразовому введенні циклофосфаміду вагітним мишам на 11-й день. Дане дослідження показало, що тетродотоксин не має ембріотоксичності і, не викликає тератогенної дії на мишей лінії Shanghai.

Приклад 9

9.1 Дослідження мутагенності для Salmonella (проба Еймса)

Експериментальний матеріал: порошок тетродотоксину, партія №940701, поставлений "Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant", Ляонін, Китай.

Потенціал мутагенної дії тетродотоксину на чотири стандартні експериментальні штами Salmonella досліджувався за допомогою методу преінкубації при внесенні у живильне середовище. Результати показали, що тетродотоксин у концентраціях від 0,01 до 100,0 (максимальна розчинність) мкг/зразок не викликає будь-якого збільшення мутацій для чотирьох штамів (TA97, TA98, TA100 і TA102), як за умов активації фракцією S₉, так і без неї. Цей результат вказує, що тетродотоксин не має мутагенного впливу на штами Salmonella.

Результати дослідження мутагенного впливу препарату тетродотоксину, що використовувався, і дані позитивних контрольних експериментів на Salmonella наведено в таблицях 27 і 28.

Таблиця 27. Результати досліджень мутагенної дії для позитивних контрольних експериментів для *Salmonella*

Концентрація (мкг/зразок)	Кількість колоній <i>Salmonella</i> , що мутували (на зразок \pm стандартне відхилення)				
	S ₉	TA97	TA98	TA100	TA102
0,0	–	138 \pm 18	36 \pm 5	130 \pm 11	270 \pm 45
	+	116 \pm 27	40 \pm 11	154 \pm 21	263 \pm 10
Дексон (50,0)	–	1567 \pm 315	604 \pm 86	562 \pm 50	858 \pm 79
ДМСО	+	126 \pm 41	30 \pm 5	129 \pm 17	242 \pm 10
2-Ариламін (40,0)	–	97 \pm 17	26 \pm 7	97 \pm 13	
	+	1293 \pm 366	1538 \pm 335	1795 \pm 303	
Дигідроксі- антрахінон (100,0)	–				379 \pm 99
	+				906 \pm 69

Таблиця 28. Результати досліджень мутагенної дії тетродотоксину для *Salmonella*

Концентрація (мкг/зразок)	Кількість колоній <i>Salmonella</i> , що мутували (на зразок \pm стандартне відхилення)				
	S ₉	TA97	TA98	TA100	TA102
0,0	–	138 \pm 18	36 \pm 5	130 \pm 11	270 \pm 45
Розчинник*	–	122 \pm 17	30 \pm 8	140 \pm 12	281 \pm 53
0,01	–	126 \pm 9	37 \pm 15	132 \pm 15	273 \pm 42
0,10	–	110 \pm 16	31 \pm 9	123 \pm 25	290 \pm 34
1,0	–	114 \pm 25	32 \pm 10	131 \pm 17	301 \pm 66
10,0	–	114 \pm 15	36 \pm 4	131 \pm 18	282 \pm 63
100,0	–	126 \pm 15	30 \pm 8	139 \pm 11	292 \pm 55
0,0	+	116 \pm 27	40 \pm 11	154 \pm 21	263 \pm 10
Розчинник*	+	106 \pm 19	38 \pm 13	147 \pm 15	277 \pm 28
0,01	+	142 \pm 12	46 \pm 11	142 \pm 18	280 \pm 25
0,10	+	114 \pm 24	44 \pm 19	139 \pm 17	266 \pm 30
1,0	+	110 \pm 24	42 \pm 13	130 \pm 17	299 \pm 51
10,0	+	108 \pm 20	43 \pm 8	149 \pm 14	276 \pm 33
100,0	+	119 \pm 37	44 \pm 8	127 \pm 16	273 \pm 28

* 0,02%-а розведена оцтова кислота

Як впливає з таблиці 29, викликаючи прямі діагностичні мутації дексон (Dexon) і непрямі джерела мутацій 2-ариламін і дигідроксіантрахінон призводили до значного підвищення кількості мутованих колоній досліджуваних штамів - у два чи більше разів порівняно з негативними контрольними групами. Це свідчить про надійність обраного дослідницького підходу. Тетродотоксин у концентраціях від 0,01 до 100мкг/зразок не приводив до будь-якого значного підвищення кількості мутованих колоній для чотирьох перевірених штамів, як в умовах активації фракцією S₉, так і без неї. Такий результат свідчить про відсутність мутагенної дії тетродотоксину на штами *Salmonella*.

9.2 Дослідження хромосомної аберації для легених клітин китайського хом'яка (CHL)

Експериментальний матеріал: порошок тетродотоксину, партія №940701, поставлений "Dalian Ao Sen Pharmaceutical Plant", Ляонін, Китай.

Легеневі клітини китайського хом'яка піддавалися дії тетродотоксину у концентраціях 5,0, 10,0 і 20,0мкг/мл протягом 24 або 48 годин без активації фракцією S₉ і протягом 6 годин за умов активації фракцією S₉. Результати показали, що тетродотоксин не призводить до суттєвого зростання частоти хромосомної аберації порівняно з контролем розчинника.

Результати дослідження здатності тетродотоксину викликати аберацію хромосом легених клітин китайського хом'яка при відсутності метаболічної активації наведено у таблиці 29.

Таблиця 29. Спроможність тетродотоксину викликати аберацію хромосом легеневи́х клітин китайського хом'яка при відсутності метаболічної активації

Препарати (мкг/мл)	Час обработки клітин (в год.)	Кількість спостері- гаємих клітин (штук)	Частота хромосомної аберації (%)
Порожній контроль	24	100	0
Контроль розчинника	24	100	3
Тетродотоксин 5,0	24	100	0
10,0	24	100	0
20,0	24	100	2
Мітоміцин С 0,25	24	100	72**
Порожній контроль	48	100	0
Контроль розчинника	48	100	2
Тетродотоксин 5,0	48	100	1
10,0	48	100	2
20,0	48	100	1
Мітоміцин С 0,25	48	100	99**

** Порівняно з групою контролю розчинника, $P < 0,01$

Як наведено в таблиці 29, через 24 і 48 годин після дії частота хромосомної аберації у порожній контрольній групі в обох випадках дорівнювала 0%. Той самий параметр у групі контролю розчинника дорівнював 3% і 2%, відповідно. Результати дії тетродотоксину у концентраціях 5,0-20,0мкг/мл становили 0-2%. У хромосомах було виявлено структурні аберації. Значення частоти аберації для

позитивної контрольної групи, яку піддавали дії мітоміцину С, досягали 72% і 99% через 24 і 48 годин після дії, відповідно ($P < 0,01$).

Результати, які спостерігалися при дослідженні здатності тетродотоксину викликати аберацію хромосом легеневи́х клітин китайського хом'яка за умов метаболічної активації, наведено в таблиці 30.

Таблиця 30. Здатність тетродотоксину викликати аберацію хромосом у легеневи́х клітинах китайського хом'яка в умовах метаболічної активації

Препарати (мкг/мл)	Суміш S ₉ (мл)	Час обробки клітин (в годинах)	Кількість спостеріга- ємих клітин (штук)	Частота хромосомної аберації (%)
Порожній контроль	-	24	100	2
Контроль розчинника	-	24	100	1
Контроль розчинника	0,5	24	100	1
S ₉ контроль	0,5	24	100	1
Тетродотоксин 5,0	0,5	24	100	0
10,0	0,5	24	100	3
20,0	0,5	24	100	0
Циклофосфамід 20,0	-	24	100	0
20,0	0,5	24	100	50**
Порожній контроль	-	48	100	2
Контроль розчинника	-	48	100	2
Контроль розчинника	0,5	48	100	3
S ₉ контроль	0,5	48	100	0
Тетродотоксин 5,0	0,5	48	100	1
10,0	0,5	48	100	1
20,0	0,5	48	100	1
Циклофосфамід 20,0	-	48	100	3
20,0	0,5	48	100	42**

** Порівняно з контрольною групою S₉, $P < 0,01$

Як наведено в таблиці 30, при дії протягом 24 і 48 годин частота хромосомної аберації в порожній контрольній групі в обох випадках складала 2%; для групи контролю розчинника - 1% і 2%, відповідно; для групи контролю розчинника в присутності S₉ - 1% і 3%, відповідно; для контрольної групи S₉ - 1% і 3%, відповідно. Для груп з дією тетродотоксину, частота хромосомної аберації була в межах 0%-3% при концентраціях 5,0-20,0мкг/мл. У хромосомах було виявлено структурні аберації. Значення частоти аберації для позитивної контрольної групи, яку піддавали дії циклофосфаміду, досяга-

ли 50% і 42%, відповідно ($P < 0,01$), тоді як при відсутності метаболічної активації вони складали 0% і 3%, відповідно.

Вищенаведені результати свідчать, що у відсутності метаболічної активації частота хромосомної аберації у порожній контрольній групі, групі контролю розчинника, групі з дією тетродотоксину в інтервалі концентрацій 5,0-20,0мкг/мл є у межах норми, тоді як в позитивних контрольних групах, у присутності мітоміцину С, було помічено значне зростання частоти аберацій. В умовах метаболічної активації частота хромосомної аберації в по-

рожній контрольній групі, в групі контролю розчинника, в групі контролю розчинника у присутності S_9 , в контрольній групі S_9 , групі з дією тетродотоксину при концентраціях в інтервалі 5,0-20,0мкг/мл також вкладаються у рамки норми, тоді як групи позитивного контролю в присутності циклофосфаміду демонстрували значне зростання показника. Аналогічним чином, частота аберації для позитивної контрольної групи у присутності циклофосфаміду вміщувалося в рамки норми при відсутності метаболічної активації. Отримані результати свідчать про надійність застосованого методу досліджень. Таким чином, тетродотоксин в інтервалі концентрацій 5,0-20,0мкг/мл не викликає хромосомних аберацій в легневих клітинах китайського хом'яка.

9.3 Мікроядерне дослідження дії тетродотоксину на клітини кісткового мозку мишей

Експериментальний матеріал: ін'єкційний препарат тетродотоксину, 30мкг/2мл/ампула, партія №931220, поставлений "Guangxi Asia Health Medical Co., Ltd".

В цьому дослідженні було виділено три групи за дозами тетродотоксину 10, 5 і 2,5мкг/кг. Як шлях введення було застосовано внутрішньом'язову ін'єкцію (індукування). Було сформовано дві контрольні групи: одна була групою контролю розчин-

ника - оцтової кислоти (0,02%); а друга, позитивна контрольна група, отримувала циклофосфамід (60мкг/кг). У другій групі, що отримувала тетродотоксин у концентрації 10мкг/кг, проби відбиралися через 12, 24, 36, 48 і 72 години після введення препарату, тоді як для решти груп зразки для проведення мікроядерного дослідження приготувалися через 24 години після першого введення. Результати показали, що після введення/індукування показник долі мікроядерних клітин для групи, що отримувала тетродотоксин у концентрації 10мкг/кг, складав 4,3%, що значно відрізнялося від даних для групи контролю розчинника ($P < 0,05$), тоді як доля мікроядерних клітин в позитивній контрольній групі досягала 46,5%, що досить помітно відрізняється від значень для групи контролю розчинника ($P < 0,01$). ТТХ в концентраціях 5 і 2,5мкг/кг взагалі не викликав аніяких помітних змін.

Показник чисельності мікроядерних клітин у мишей, що отримували тетродотоксин у дозі 10мкг/кг, через 12, 24, 36, 48 і 72 години після введення наведено у таблиці 31. Результати для всіх груп є у межах норми. На підставі наведених результатів, час умертвіння тварин для приготування зразків має дорівнювати 24 годинам після першої ін'єкції.

Таблиця 31. Показник чисельності мікроядерних клітин для мишей, що отримували тетродотоксин в дозі 10 мкг/кг у різний час

Момент часу (в годинах після введення)	Кіль-ть поліхромато- фільних еритроцитів	Кіль-ть мікроядерних клітин	Доля мікроядерних клітин (%) ($\bar{X} \pm$ стандартне відхилення)
12	6000	22	3,7 \pm 2,2
24	6000	8	1,3 \pm 1,0
36	6000	18	3,0 \pm 1,1
48	6000	16	3,3 \pm 1,3
72	6000	24	4,0 \pm 2,5
Розчинник 24	6000	13	2,2 \pm 0,8

У таблиці 32 наведено результати для тих груп тварин, що отримували тетродотоксин у дозі 10, 5 і 2,5мкг/кг. Показник чисельності мікроядерних клітин для тетродотоксину в дозі 10мкг/кг становив 4,3‰, що статистично відрізнялося від гру-

пи контролю розчинника ($P < 0,05$). Показники мікроядерних клітин для інших груп вкладалися у межі норми, тоді як значення для позитивного контролю досить помітно відрізнялося від результатів для контролю розчинника ($P < 0,01$).

Таблиця 32. Показники чисельності мікроядерних клітин для мишей в усіх групах

Доза (мкг/кг)	Кіль-ть поліхромато- фільних еритроцитів	Кіль-ть мікроядерних клітин	Доля мікроядерних клітин (%) ($\bar{X} \pm$ стандартне відхилення)
10	6000	26	4,3 \pm 1,6*
5	6000	15	2,5 \pm 1,5
2,5	6000	13	2,2 \pm 1,3
Розчинник	6000	13	2,2 \pm 0,8
Циклофосфамід (60 мкг/кг)	6000	279	46,5 \pm 12,8**

* Порівняно з групою контролю розчинника, $P < 0,05$

** Порівняно з групою контролю розчинника, $P < 0,01$

Результати, отримані в конкретних умовах проведення цього дослідження, таких як рівень дози, шлях введення і режим ін'єкцій, показали, що чисельність мікроядерних клітин, що утворилися під дією внутрішньом'язової ін'єкції 10мкг/кг тетродотоксину, трохи зростала і статистично відрізнялася від групи контролю розчинника ($P < 0,05$). Чисельність мікроядерних клітин при введенні (внутрішньом'язово) 2,5 і 5мкг/кг тетродотоксину вміщувалася у межі норми, тоді як для позитивної контрольної групи цей показник досить помітно відрізнявся від групи контролю розчинника ($P < 0,01$). Такі результати свідчать про надійність обраної експериментальної системи.

Результати експерименту показали, що висока доза тетродотоксину (10мкг/кг), що дорівнює 1/2 ЛД₅₀, мала певний вплив на показник чисельності мікроядерних клітин, однак такий висновок не має клінічного значення, оскільки вказана доза набагато перевищує прийняту до клінічного застосування. Для більш детального вивчення такої дії тетродотоксину було проведено ряд додаткових експериментів (див. нижченаведений додаток).

Додаток.

Для більш детального дослідження дії тетродотоксину на чисельність мікроядерних клітин у мишей було проведено додатковий експеримент, результати якого наведено в таблицях 5, 33 і 34.

Таблиця 33. Вплив частоти введення тетродотоксину на показник чисельності мікроядерних клітин *

Доза тетродотоксину (мкг/кг)	Шлях введення	Доля мікроядерних клітин ($^{\circ}/_{00} \pm$ стандартне відхилення) Одноразова ін'єкція Індукуюче дозування **	
0	внутрішньом'язово	2,2	$\pm 0,8$
2,5	внутрішньом'язово	1,3	$\pm 1,7$
5,0	внутрішньом'язово	1,7	$\pm 2,1$
10,0	внутрішньом'язово	1,8	$\pm 1,8$
		5,8	$\pm 2,4^{***}$

* Кількість тварин: від 3 до 5 у групі

** Дві ін'єкції

*** $P < 0,05$ порівняно з групою контролю розчинника

Таблиця 34. Вплив шляху введення тетродотоксину на чисельність мікроядерних клітин

Доза тетродотоксину (мкг/кг)	Шлях введення	Доля мікроядерних клітин ($^{\circ}/_{00} \pm$ стандартне відхилення)
7	внутрішньом'язово	4,7 \pm 3,5
7	внутрішньоочеревинно	4,0 \pm 1,7

Як показано в таблиці 33, доля мікроядерних клітин у присутності високої дози тетродотоксину (10мкг/кг) при одноразовому введенні складала $5,8 \pm 2,4^{\circ}/_{00}$, що було дещо вище норми, тоді як доля мікроядерних клітин при введенні 2,5 і 5мкг/кг тетродотоксину вміщувалася в рамки норми. При цьому у випадку індукуючого дозування (дві ін'єкції) всі показники перевищують результати одноразового введення.

Провадилось порівняння двох шляхів введення, внутрішньом'язового і внутрішньоочеревинного, і наведені у таблиці 34 результати вказують, що показники чисельності мікроядерних клітин у цих двох випадках не дуже помітно відрізнялися один від одного.

Отже, у цьому дослідженні вивчався вплив тетродотоксину на долю мікроядерних клітин в кістковому мозку мишей AMS. При рівні дози, що змінюється від 1/2 до 1/8 ЛД₅₀, тетродотоксин не викликає скільки-небудь помітних збільшень доли мікроядерних клітин, при цьому при впливі тетродотоксину у дозі 1/2 ЛД₅₀ показники були дещо вище норми. Шлях введення також не відіграв статистично помітної різниці щодо показників доли мікроядерних клітин.

Розуміється, що викладений опис і додані до цього документу конкретні варіанти лише ілюструють найкращий метод застосування винаходу та закладених у нього принципів. Зміни і доповнення до винаходу, безсумнівно, можуть бути внесені особами, які мають високу кваліфікацію в цій галузі, без відхилення від суті та масштабів винаходу, а тому передбачається, що він обмежений суто рамками формули винаходу, яка додається.

Статті з наукових періодичних видань і патентна література, яку цитовано в даному документі, включені як посилання - в усій їх повноті і для будь-яких цілей.

Список літератури:

1. Ran HP, Bevan SJ, Dray A. Nociceptive peripheral neurones: cellular properties. In: Wall PD, Melzack R., editors. Textbook of pain, Edinburgh, Churchill livingstone, 1994; 57-78.
2. Woolf CJ, Doubell TP. The pathophysiology of chronic pain-increased sensitivity to low threshold A β -fibre inputs. Current opinion in Neurobiology 1994; 4:525-534.
3. Dray A. Tasting the inflammatory soup: the role of peripheral neurones. Pain Reviews. 1994; 1: 153-173.

4. Rabert DK, Koch BD, Illicka M, et al. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel from human dorsal root ganglia, hPH3/SCN 10A. *Pain* 1998; 78:107-114.

5. Catterall WA, Cellular and molecular biology of voltage-gated sodium channels, *Physiol Rev.* 1992; 72: s15-s18.

6. Akopian AN, Sivilotti L, Wood JN. A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons, *Nature*, 1996; 379: 257-262.

7. Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD. Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 1996; 93: 1108-1112.

8. Khasar SG, Gold MS, Levine JD, A tetrodotoxin-resistant sodium current mediates inflammatory pain in the rat, *Neuroscience letters*, 1998; 256: 17-20.

9. Novakovic SD, Tzoumaka E, McGivern JG, et al. Distribution of the tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions, *J. Neuroscience*, 1998; 18: 2174-2187.

10. Omana-zapata I, Khabbaz MA, Hunter JC, et al. Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons, *Pain*, 1997; 72: 41-49.