

DETERMINAREA TOXICITĂȚII ACUTE A UNOR NOI COMPUȘI CHIMICI CU PROPRIETĂȚI ANTITUBERCULOASE

Sergiu Parii¹ - conf. cercet., dr. șt. med.,
Vladimir Valica¹ - prof. univ., dr. hab. șt. farm.,
Fliur Macaev^{1,2} - prof. cercet., dr. hab. șt. chim.,
Sergei Pogrebnoi² - conf. cercet., dr. șt. chim.,
Veaceslav Boldescu² - conf. cercet., dr. șt. chim.,
Eugenia Stângaci² - conf. cercet., dr. șt. chim.,
Gheorghe Duca² - prof. univ., dr. hab. șt. chim., acad. AȘM,
Albert Ivancic² - cercet. șt. stag.,
Liliana Rusnac¹ - conf. cercet., dr. șt. farm.,
Eugeniu Nicolai¹ - cercet. științ.,
Alina Ungureanu¹ - cercet. științ.,
Livia Uncu¹ - conf. univ., dr. șt. farm.,
Anastasia Macaeva¹ – studentă,

¹Centrul Științific al Medicamentului (CSM) al IP USMF „Nicolae Testemițanu”

²Institutul de Chimie al AȘM

069616999, sergiu.parii@usmf.md

Rezumat

La Institutul de Chimie al AȘM au fost sintetizați compuși, principalele substanțe active ale cărora reprezintă derivați ai oxadiazolilor. Datele preliminare ale testărilor *in vitro* au determinat activitatea inhibitorie asupra creșterii coloniilor *M.tuberculosis*. În cadrul proiectului „De la compuși naturali la analogii lor și spre evaluarea preclinică a noilor compuși cu proprietăți antituberculoase” la Centrul Științific al Medicamentului al IP USMF „Nicolae Testemițanu” a fost evaluată toxicitatea acută a 7 compuși sintetizați. Pentru compușii MF51, MF14 s-a constatat toxicitatea minimă, ei fiind plasați în clasa de toxicitate 5 conform *TG 423 Acute Toxic Class Method (OECD)*.

Cuvinte-cheie: derivați ai oxadiazolilor și azoniabiciclo[3.3.1]nonanei, compuși medicamentoși, toxicitate acută

Summary. Determination of acute toxicity of new chemical compounds with antituberculosis properties

Several compounds were synthesized at the Institute of Chemistry of ASM, the main active substances of those are oxadiazole derivatives. Preliminary data of *in vitro* tests has determined inhibitory activity on *M. tuberculosis* colony growth. In the project „From natural compounds to their analogues and to preclinical evaluation of new compounds with antituberculosis properties” the acute toxicity of 7 synthesized compounds were assessed at Scientific Center of Medicine from IP SUMPh „Nicolae Testemitanu”. The minimal toxicity of compounds MF51, MF14 was determined and they were placed in toxicity class 5 according to *TG 423 Acute Toxic Class Method (OECD)*.

Key words: derivatives of oxadiazole and azoniabiciclo[3.3.1]nonane, medical compounds, acute toxicity

Резюме. Определение острой токсичности новых химических соединений, обладающих противотуберкулёзными свойствами

В Институте Химии АНМ были синтезированы соединения, основные активные вещества которых являются производными оксадиазолов. Предварительные данные испытаний *in vitro* определили их ингибиторную активность относительно роста колоний *M.tuberculosis*. В проекте «От природных соединений к их аналогам и доклинической оценки новых соединений с противотуберкулёзными свойствами» в Научном Центре Лекарств ПУ ГУМФ „Николае Тестемитану” была определена острая токсичность 7 синтезированных соединений. Для соединений MF51, MF14 была установлена минимальная токсичность и эти соединения были помещены в классе токсичности 5 в соответствии с *TG 423 Acute Toxic Class Method (OECD)*.

Ключевые слова: производные оксадиазола и азониабцикло[3.3.1]нонана, лекарственные соединения, острая токсичность

Introducere. Principalele substanțe active ale preparatelor studiate reprezintă derivații oxadiazolilor, unii fiind combinați cu promotorii activității antimicobacteriene – β -ciclodextrine: 1-(2-hidroxietyl)-3-(4-(5-(2-oxo-2-feniletiltio)-1,3,4-oxadi-

azol-2-il)fenil)tiourea, 1-(4-(5-(2-(2,4-diclorfenil)-2-oxoetiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)-3-(2-hidroxietyl)tiourea, sistemul binar al 1-(2-hidroxietyl)-3-(4-(5-(2-oxo-2-feniletiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)tioureei cu β -ciclodextrină, sistemul

binar al 1-(2-hidroxietyl)-3-(4-(5-(2-oxo-2-feniletiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)tioureei cu hidroxipropil- β -ciclodextrină, sistemul binar al 1-(4-(5-(2-(2,4-diclorfenil)-2-oxoetiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)-3-(2-hidroxietyl)tioureei cu β -ciclodextrină, sistemul binar al 1-(4-(5-(2-(2,4-diclorfenil)-2-oxoetiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)-3-(2-hidroxietyl)tioureei cu hidroxipropil- β -ciclodextrină.

Unul din preparatele studiate conține un compus din clasa nouă - 5-amino-1-(2-hidroxietyl)-4,6-dioxa-1-azoniabaciclo[1]nonan. 6 din 7 preparate supuse evaluării în cadrul acestui studiu conțin substanțe active din grupul derivaților oxadiazolului pentru care anterior a fost determinată *in vitro* activitatea inhibitorie contra *Mycobacterium tuberculosis* [1, 2]. Datele obținute au demonstrat că la concentrația 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ compuşii aceştia inhibă creșterea > 90% de mico-bacterii [2]. Rezultate comparabile au fost obținute de către alți autori pentru compuşii cu structuri similare. Astfel, Patel *et al.* au depistat doi compuşii din grupul derivaților cumarinici ai 5-tio-1,3,4-oxadiazolului cu concentrațiile inhibitorii la nivelul de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [3]. Alți analogi studiați de Yar *et al.* [4] au demonstrat activitatea inhibitorie > 90% la concentrații de 6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Unul din preparatele studiate conține ca substanță activă 5-amino-1-(2-hidroxietyl)-4,6-dioxa-1-azoniabaciclo[3.3.1]nonan care reprezintă o clasă nouă de compuşii cu puține date privind activitatea lor biologică disponibilă. Din datele preliminare (nu au fost încă publicate) ale testărilor *in vitro* efectuate la Institutul de Ftiziopneumologie a fost determinată activitatea inhibitorie asupra creșterii coloniilor *M. tuberculosis*. De asemenea, se cunoaște că compuşii dați manifestă activitate citotoxică selectivă față de celulele liniei HeLa ale cancerului ovarian [5].

Informațiile obținute din studiile de toxicitate acută la animale sunt esențiale pentru determinarea potențialului toxic al unui produs chimic la om. Obiectivul studiilor este de a identifica potențialul toxicologic, în doză unică s-au repetată în decurs de 24 ore, al substanțelor medicamentoase [6]. Premiza de a folosi animale în testarea acută este aceea că efectele administrării unui agent sintetic pe un animal mimează posibilele rezultate pe care agentul le poate produce la om sau alte mamifere [7].

În ultimul deceniu au apărut controverse asupra folosirii metodei clasice de determinare a toxicității acute [7]. Testul LD50 (50% din doza letală maximă) a fost elaborat atunci, când alți indicatori de toxicitate nu erau disponibili sau nu au fost foarte sensibili și când tehnologia de început nu a putut susține cerințele. În plus, numărul de animale necesare pentru validarea protocolului este mare și s-a sugerat, că metoda distruge inutil un număr mare de animale de

laborator. Unele sugestii pentru actualizarea testului includ: utilizarea unui număr mai mic de animale în estimarea dozelor de început pentru testările ulterioare, luarea în considerare a mai puține căi de expunere și obținerea de informații suplimentare în timpul unui studiu, care se adaugă la baza cunoștințelor disponibile despre un produs chimic [8,9].

Cantitatea extraordinară de date toxicologice acute deja existente despre substanțele chimice și clasele chimice disponibile în prezent nu permit generarea repetată de valori ale LD50 cu introducerea unei noi formulări pentru același compus, un nou derivat al aceleiași clase chimice sau o altă combinație de substanțe chimice cunoscute. A fost sugerată chiar completa eliminare a testului [10].

Studiul a fost efectuat în cadrul proiectului „De la compuşii naturali la analogii lor și spre evaluarea preclinică a noilor compuşii cu proprietăți antituberculoase” cu cifrul 14.518.04.08A (coordonator-prof. Fliur Macaev, Institutul de Chimie al AȘM), realizat în cadrul Programului de Stat „Designul substanțelor chimice și dirijarea arhitecturii materialelor pentru diverse aplicații” (coordonator-acad. Gheorghe Duca). Scopul principal al proiectului este obținerea compuşilor noi cu proprietăți antituberculoase, toxicitate redusă și activitate crescută față de tulpini multidrog rezistente și cele cu rezistență extinsă. Principalii parteneri ai proiectului sunt Laboratorul de Sinteză Organică al Institutului de Chimie al AȘM, Laboratorul Microbiologia și Morfologia Tuberculozei al Institutului de Ftiziopneumologie „Chiril Draganiuc” și Centrul Științific al Medicamentului al IP Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu.

Obiectivele cercetării:

1. Determinarea toxicității acute și clasei de toxicitate ale compuşilor:

MF 0003 - 1-(2-hidroxietyl)-3-(4-(5-(2-oxo-2-feniletiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)tiourea,

MF 0010 - 1-(4-(5-(2-(2,4-diclorfenil)-2-oxoetiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)-3-(2-hidroxietyl) tiourea,

MF 14 - sistemul binar al 1-(4-(5-(2-(2,4-diclorfenil)-2-oxoetiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)-3-(2-hidroxietyl)tioureei cu β -ciclodextrină,

MF 17 - sistemul binar al 1-(2-hidroxietyl)-3-(4-(5-(2-oxo-2-feniletiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)tioureei cu β -ciclodextrină,

MF 20 - sistemul binar al 1-(4-(5-(2-(2,4-diclorfenil)-2-oxoetiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)-3-(2-hidroxietyl)tioureei cu hidroxipropil- β -ciclodextrină,

MF 22 - sistemul binar al 1-(2-hidroxietyl)-3-(4-(5-(2-oxo-2-feniletiltio)-1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)tioureei cu hidroxipropil- β -ciclodextrină,

MF 51 - 5-amino-1-(2-hidroxietyl)-4,6-dioxa-1-azoniabiclo[3.3.1]nonan.

2. Evidențierea compușilor cu toxicitate cea mai redusă pentru efectuarea următoarelor etape de investigații farmacotoxicologice.

Material și metode. Concentrațiile farmaceutice cu corespunderea dozelor respective de 50 mg/kg, 300 mg/kg, 2000 mg/kg ai compușilor studiați au fost pregătite în cadrul Laboratorului de analiză, standardizare și control al medicamentului al CȘM. Preparatele au fost diluate în volume constante de soluție fiziologică de 0,9% în funcție de doza substanțelor și cantitatea de lichid maximal admisibilă pentru administrare.

Studiul toxico-farmacologic a fost efectuat în Laboratorul de evaluare preclinică și clinică a medicamentului al CȘM pe: 204 șoriceei de laborator (masculi, femele în raport 50% la 50%), vârsta 2 – 3 luni, masa 18-26 gr (192 șoriceei în grupurile experimentale, 12 șoriceei în grupul de control). Animalele au fost obținute din aceeași sursă și menținute în condițiile de viață a laboratorului (cutii standarde de masă plastică) pentru aclimatizare. Condițiile de trai și alimentare au corespuns cerințelor sanitare și normelor de alimentare. Pentru utilizarea apei au fost stabilite autoapeducte. Animalele nu au primit hrană cu 12 ore înainte de inițierea experienței și pe parcursul ei. În dimineața zilei destinate experimentării șoriceei au fost cântărite și repartizați în loturi omogene câte 3 masculi și 3 femele conform masei corporale.

Pentru stabilirea toxicității acute substanțele studiate au fost administrate șoriceilor (fem) enteral prin gavaj și intraperitoneal (masc). Cantitatea de lichid administrată a fost calculată în dependență de masa individuală a animalelor de laborator cântărite înainte de experiment (0,3 ml/g).

Toxicitatea acută și estimarea dozei letale medii DL50/LD 50% a fost determinată prin metoda dozelor fixe cu stabilirea clasei de toxicitate conform TG 423: Acute Toxic Class Method [8].

Substanțele testate au fost administrate unimomentan șoriceilor enteral prin gavaj și intraperitoneal în doze-teste de 50, 300, 2000 mg/kg. Dozele mai mari de 2000 mg/kg nu au fost folosite din cauza necesității unui volum mai mare de soluție fiziologică, fapt ce nu corespundea recomandărilor [7, 8]. Animalelor din grup de control sa administrat volum similar de soluție fiziologică (NaCl 0,9%).

Animalele au fost supravegheate timp de 14 zile. În timpul observațiilor a fost înregistrat comportamentul animalelor, activitatea motorie, coordonarea mișcărilor, reacția la excitanți fizici (lumină, zgomot), funcția respiratorie, starea pielii și a mucoaselor. De asemenea, a fost înregistrat timpul apariției fenome-

nelor de intoxicație și decesul animalelor. Vizual s-a determinat tabloul clinic al intoxicației.

Animalele decedate și cele muribunde din fiecare lot (după eutanasiere) au fost disecate în mod separat, pentru efectuarea studiului organelor interne și confirmarea modificărilor obținute în experiență.

Toate informațiile, inclusiv cele obținute în testul primar au fost apoi integrate într-un model pentru determinarea clasei de toxicitate și estimarea gradului de toxicitate.

Investigațiile preclinice au fost aprobate de Comitetul de Etică al Cercetării al IP USMF „Nicolae Testemițanu”, nr. 2 din 23.09.2014.

Rezultate. Pe parcursul studiului nu s-au constatat modificări în comportamentul și activitatea motorie spontană a animalelor din grupul intact. Animalele erau în mișcare active, întrebunțau hrană și apă. Starea mucoaselor și învelișului cutanat era în normă, fără schimbări patologice. Culoarea urinei era galbenă deschisă. Blana animalelor avea un aspect îngrijit, lucios, fără focare de alopecie. Dinții păstrați. Mucoasele vizibile erau palide, lucioase, netede. Glandele mamare ale femelelor la palpare fără îndurații și fără eliminare. Organele genitale masculine normal exprimate. Deformări sau edeme a extremităților nu s-au remarcat.

La administrarea atât enterală, cât și intraperitoneală a dozei de 50 mg/kg și supravegherea timp de 14 zile nu s-au constatat modificări în comportamentul animalelor, schimbări vizuale exterioare anatomice și nici decesul lor.

Administrarea substanțelor cercetate în doze de 300, 2000 mg/kg s-a caracterizat printr-o perioadă de hipodinamie și reducere a reacției la stimulii exogeni. Majoritatea animalelor au revenit la starea inițială pe parcursul primelor 4 ore – 24 ore (300 mg/kg) și 24 -72 ore (pentru 2000 mg). La animalele decedate care au primit dozele de 300, 2000 mg/kg s-a constatat o diminuare a activității motorii, cu reacție redusă, apoi din ce în ce mai slabă la stimulii exogeni, cu dezvoltarea unei stări terminale (gasping) și decesul animalelor în decurs de 24 ore – 96 ore – mascul (4 zi) ore. Convulsii s-au constatat ocazional. Rezultatele sunt prezentate în tabelele 1.14. Procentajul maxim de letalitate LD 42% a fost estimat pentru MF17 la 2000 mg/kg.

Reieșind din rezultatele obținute referitor la mortalitatea animalelor la care au fost administrate preparatele studiate s-a estimat LD50/DL50 (rezultatele – în tabelul 15).

În perioada după administrarea preparatelor studiate în special a compușilor MF0003, MF22, MF17 (dar uneori și a compușilor MF0010, MF20) ocazional la doza de 300 mg/kg și mai accentuat la doza

de 2000 mg/kg au fost constatate la animale astfel de simptome ca: somnolență, adinamie cu evoluție ulterioară în agitație, inapetență, diaree, inflamația mucoaselor, schimbarea culorii blăunii, căderea părului, hipersalivație, cianoza membrelor inferioare, care au revenit la normalitate în 1-3 zile. La administrarea compușilor MF51 și MF14 ocazional la doza de 2000 mg/kg au fost constatate somnolență, adinamie, inflamația mucoaselor, inapetență, care au revenit la normalitate în 1-2 zile.

Monitorizarea folosirii alimentelor și apei nu a constatat modificări statistice semnificative între grupurile cercetate și cel de control. În a doua zi a studiului s-a remarcat o oarecare pierdere a greutății corporale la animalele din toate grupurile, inclusiv grupul de control. Pentru a elimina acest efect (cauzat, probabil, de stresul legat de plasarea animalelor în mediul de experimentare), modificarea greutății s-a efectuat în comparație cu cea a valorilor de fon. Analiza datelor nu a evidențiat diferențe semnificative în dinamica de greutate corporală între animalele experimentale și de control. O creștere ceva mai sem-

nificativă în greutate la animalele de control, comparativ cu cele experimentale. Explorarea nu a purtat un caracter semnificativ.

La necropsie modificări patologice vizibile ale organelor interne în loturile experimentale și de control nu au fost constatate.

Concluzii

1. Cel mai scăzut indice al toxicității acute posedă compușii MF51 (DL50/LD50 >5000 mg/kg) și MF14 (DL50/LD50=5000 mg/kg). De asemenea toxicitate redusă posedă substanțele MF20 și MF0010 (DL50/LD50=2500 mg/kg).

2. Toxicitate sporită posedă MF17 (DL50/LD50 estimat = 300 mg/kg) și MF22 (DL50/LD50 estimat =1000 mg/kg), fiind plasate în clasele de toxicitate respective 3 și 4.

3. Rezultatele cercetării pot servi ca premiză pentru efectuarea studiilor de toxicitate ulterioare a produselor MF51, MF14, care în urma studiilor experimentale s-a constatat că posedă toxicitate minimă, fiind plasate în clasa de toxicitate 5 conform *TG 423 Acute Toxic Class Method (OECD)*.

Tabelele 1-7

Mortalitatea - Toxicitatea acută a MF 51

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	Deces	N animale	Deces	N animale	Deces, %
300 mg/kg	6	-	6	-	6	0
2000 mg/kg	6	-	6	-	6	0

Mortalitatea - Toxicitatea acută a MF 14

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	Deces	N animale	Deces	N animale	Deces, %
300 mg/kg	6	-	6	-	6	0
2000 mg/kg	6	1	6	-	1	8

Mortalitatea - Toxicitatea acută a MF 20

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	Deces	N animale	Deces	N animale	Deces, %
300 mg/kg	6	-	6	1	6	8
2000 mg/kg	6	1	6	1	6	17

Mortalitatea - Toxicitatea acută a MF 0010

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	Deces	N animale	Deces	N animale	Deces, %
300 mg/kg	6	1	6	2	3	25
2000 mg/kg	6	2	6	1	3	25

Mortalitatea - Toxicitatea acută a MF 0003

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	Deces	N animale		N animale	Deces, %
300 mg/kg	6	1	6	2	3	25
2000 mg/kg	6	2	6	2	4	33

Mortalitatea - Toxicitatea acută a MF 22

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	Deces	N animale		N animale	Deces, %
50 mg/kg	6	-	6	-	0	0
300 mg/kg	6	1	6	3	6	33
2000 mg/kg	6	2	6	1	6	25

Mortalitatea - Toxicitatea acută a MF 17

Doze	Masculi intraperitoneal		Femele intragastral		Decesul animalelor	
	N animale	Deces	N animale		N animale	Deces, %
50 mg/kg	6	-	6	-	0	0
300 mg/kg	6	1	6	3	4	33
2000 mg/kg	6	2	6	3	6	42

Tabelele 8-14

Studierea toxicității acute a preparatului MF51

	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă
	300 mg/kg *		Toți șoricicii au rămas vii pe perioada investigațiilor	300 mg/kg **		Toți șoricicii au rămas vii pe perioada investigațiilor	2000 mg/kg *		Toți șoricicii au rămas vii pe perioada investigațiilor	2000 mg/kg**		Toți șoricicii au rămas vii pe perioada investigațiilor
1	21,4	0,4		22,8	0,4		23,4	0,5		25,2	0,5	
2	24,7	0,5		24,3	0,5		25,7	0,6		21,6	0,4	
3	19,3	0,4		21,1	0,4		25,5	0,5		23,3	0,4	
4	25,5	0,5		24,8	0,5		23,6	0,5		22,4	0,4	
5	21,7	0,4		20,7	0,4		25,2	0,5		24,7	0,5	
6	18,9	0,4	19,9	0,4	23,7	0,5	23,9	0,5				

Studierea toxicității acute a preparatului MF14

	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă
	300 mg/kg *		Toți șobolanii au rămas vii pe perioada investigațiilor	300 mg/kg **		Toți șobolanii au rămas vii pe perioada investigațiilor	2000 mg/kg *		La a 2-a zi 1 deces	2000 mg/kg**		Toți șoricicii au rămas vii pe perioada investigațiilor
1	21,4	0,4		22,8	0,4		23,4	0,5		25,2	0,5	
2	24,7	0,5		24,3	0,5		25,7	0,6		21,6	0,4	
3	19,3	0,4		21,1	0,4		25,5	0,5		23,3	0,4	
4	25,5	0,5		24,8	0,5		23,6	0,5		22,4	0,4	
5	21,7	0,4		20,7	0,4		25,2	0,5		24,7	0,5	
6	18,9	0,4	19,9	0,4	23,7	0,5	23,9	0,5				

Studierea toxicității acute a preparatului MF 20

	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă
	300 mg/kg *		Toți șobolanii au rămas vii pe perioada investigațiilor	300 mg/kg **		1 deces la a 3 zi	2000 mg/kg *		1 deces la a 2 zi	2000 mg/kg **		1 deces la a 3 zi
1	21,4	0,4		22,8	0,4		23,4	0,5		25,2	0,5	
2	24,7	0,5		24,3	0,5		25,7	0,6		21,6	0,4	
3	19,3	0,4		21,1	0,4		25,5	0,5		23,3	0,4	
4	25,5	0,5		24,8	0,5		23,6	0,5		22,4	0,4	
5	21,7	0,4		20,7	0,4		25,2	0,5		24,7	0,5	
6	18,9	0,4		19,9	0,4		23,7	0,5		23,9	0,5	

Studierea toxicității acute a preparatului MF 0010

	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă
	300 mg/kg *		1 deces la a 3 zi	300 mg/kg **		1 deces la a 4 zi 1 deces la a 5 zi	2000 mg/kg *		La a 2-a zi au decedat 1 fem. 4 zi – 1 masc.	2000 mg/kg **		La a 2-a zi 1 deces
1	21,4	0,4		22,8	0,4		23,4	0,5		25,2	0,5	
2	24,7	0,5		24,3	0,5		25,7	0,6		21,6	0,4	
3	19,3	0,4		21,1	0,4		25,5	0,5		23,3	0,4	
4	25,5	0,5		24,8	0,5		23,6	0,5		22,4	0,4	
5	21,7	0,4		20,7	0,4		25,2	0,5		24,7	0,5	
6	18,9	0,4		19,9	0,4		23,7	0,5		23,9	0,5	

Studierea toxicității acute a preparatului MF 0003

	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă
	300 mg/kg *		1 deces la 1 zi	300 mg/kg **		1 deces la a 2 zi 1 deces la a 3 zi	2000 mg/kg *		La a 2-a zi au decedat 1 fem. 4 zi – 1 masc.	2000 mg/kg **		La a 2-a zi au decedat 1 fem. 3 zi – 1 masc.
1	21,4	0,4		22,8	0,4		23,4	0,5		25,2	0,5	
2	24,7	0,5		24,3	0,5		25,7	0,6		21,6	0,4	
3	19,3	0,4		21,1	0,4		25,5	0,5		23,3	0,4	
4	25,5	0,5		24,8	0,5		23,6	0,5		22,4	0,4	
5	21,7	0,4		20,7	0,4		25,2	0,5		24,7	0,5	
6	18,9	0,4		19,9	0,4		23,7	0,5		23,9	0,5	

Studierea toxicității acute a preparatului MF22

	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă
	300 mg/kg *		1 deces la 1 zi	300 mg/kg **		1 deces la a 1 zi 1 deces la a 2 zi 1 deces la a 3 zi	2000 mg/kg *		1 deces la a 2 zi 1 deces la a 3 zi	2000 mg/kg **		1 deces la a 2 zi
1	21,4	0,4		22,8	0,4		23,4	0,5		25,2	0,5	
2	24,7	0,5		24,3	0,5		25,7	0,6		21,6	0,4	
3	19,3	0,4		21,1	0,4		25,5	0,5		23,3	0,4	
4	25,5	0,5		24,8	0,5		23,6	0,5		22,4	0,4	
5	21,7	0,4		20,7	0,4		25,2	0,5		24,7	0,5	
6	18,9	0,4		19,9	0,4		23,7	0,5		23,9	0,5	

Studierea toxicității acute a preparatului MF17

	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă	m, g	v, ml	Notă
	300 mg/kg *		1 deces la a 3 zi	300 mg/kg **		1 deces la a 1 zi 1 deces la a 2 zi 1 deces la a 3 zi	2000 mg/kg *		1 deces la a 2 zi 1 deces la a 3 zi	2000 mg/kg **		1 deces la a 1 zi 1 deces la a 2 zi 1 deces la a 3 zi
1	21,4	0,4		22,8	0,4		23,4	0,5		25,2	0,5	
2	24,7	0,5		24,3	0,5		25,7	0,6		21,6	0,4	
3	19,3	0,4		21,1	0,4		25,5	0,5		23,3	0,4	
4	25,5	0,5		24,8	0,5		23,6	0,5		22,4	0,4	
5	21,7	0,4		20,7	0,4		25,2	0,5		24,7	0,5	
6	18,9	0,4		19,9	0,4		23,7	0,5		23,9	0,5	

* masculi ** femele Cu Bold – animalele decedate.

Tabelul 15

**Determinarea clasei de toxicitate
conform TG 423: Acute Toxic Class Method
(OECD)**

Denumirea	Clasa de toxicitate	DL50/LD50 mg/kg
MF 51	5	> 5000
MF 14	5	= 5000
MF 20	5	>2000-5000 = 2500
MF 0010	5	>2000-5000 = 2500
MF 0003	4	>300-2000 = 2000
MF 22	4	>300-2000 = 1000
MF 17	3	>50-300 = 300

Bibliografie

1. Macaev, F.; Rusu, Gh.; Pogrebnoi, S.; Gudima, A.; Stingaci, E.; Vlad, L.; ... & Reynolds, R. *Synthesis of novel 5-aryl-2-thio-1,3,4-oxadiazoles and the study of their structure-anti-mycobacterial activities*. Bioorganic & Medicinal chemistry, 2005, 13(16), p. 4842-4850.

2. Macaev, F.; Ribkovskaia, Z.; Pogrebnoi, S.; Boldescu, V.; Rusu, Gh.; Shvets, N.; ... & Reynolds, R. *The structure-antituberculosis activity relationships study in a series of 5-aryl-2-thio-1, 3, 4-oxadiazole derivatives*. Bioorganic & Medicinal chemistry, 2011, 19(22), p 6792-6807.

3. Patel, R. V.; Kumari, P.; Rajani, D. P.; & Chikhalia, K. H. *Synthesis of coumarin-based 1,3,4-oxadiazol-2-ylthio-N-phenyl/benzothiazolyl acetamides as antimicrobial and antituberculosis agents*. Medicinal Chemistry Research, 2013, 22(1), p. 195-210.

4. Yar, M.S.; Siddiqui, A.A.; & Ashraf Ali, M. (2007). *Synthesis and Anti Tuberculostatic Activity of Novel 1, 3, 4-Oxadiazole Derivatives*. Journal of the Chinese Chemical Society, 54(1), p. 5-8.

5. Prodius, D.; Saeed Shah, H.; Iqbal, J.; Macaeva, A.; Dimoglo, A.; Kostakis, G. E.; ... & Powell, A. K. *A novel example of double 6-exo-trig heterocyclization: nitrile conversion to new anticancer active (HeLa cells) primary amine ionic liquids*. Chemical Communications. 2014, 50, p. 4888-4890.

6. Parii, B.; Todiraș, M.; Parii, S.; Valica, V.; Rusnac, L.; Golovin, P. *Rezultatele studiilor experimentale ale preparatului medicamentos combinat Neamon-hepa*. În: Anale științifice ale USMF „Nicolae Testemițanu”. Ediția a XI-a. Chișinău, 2010; 1, p. 329-334.

7. Каркищенко, Н.Н.; Грачева, С.В. и соавт. *Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях*. Москва. 2010, с. 358.

8. Committee of experts of dangerous goods and on the globally harmonized system of classification and labeling of chemicals of United Nations Sub-Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods (Twenty-first session, 1-10 July 2002, agenda item 8 (c)).

9. OECD C(2001)282 Proposal for the updating of three guidelins and the deletion of one guideline of chemicals.

10. OECD guideline for testing of chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 17th December 2001. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788.