

A study on toxicity, local irritative effect of and allergic response to a novel intranasal medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester

B. S. Burlaka  *A,B,C,D, I. F. Bielenichev  A,F,E

Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine

A – research concept and design; B – collection and/or assembly of data; C – data analysis and interpretation; D – writing the article; E – critical revision of the article; F – final approval of the article

Key words:

N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, medication for intranasal delivery, pharmacology, acute toxicity, allergic reaction.

Zaporizhzhie
medical journal
2021; 23 (1), 126-131

*E-mail:

burlakabogdan@gmail.com

Development of novel medications for delivery of active ingredients with systemic absorption and high bioavailability is an actual challenge for modern pharmaceutical and medical science. Nowadays, the number of diseases of the central nervous system is continuously growing. These conditions lead to impairment of mnemonic and intellectual brain functions, to a decrease in mental alertness and memory in particular, which results in deterioration in the quality of life, sometimes in disability and patients' partial or complete dependence on other people. The existing variety of nootropics does not fully respond to modern criteria of clinical science and practice due to insufficient effectiveness and neuroavailability. Recently, scientists have drawn attention to the potential of intranasal administration for delivery of active ingredients with systemic effect to human blood flow. Intranasal administration for delivery of active ingredients will enhance neuroavailability and, thus, a therapeutic effect of drugs. At the Departments of Medicines Technology, Pharmacology and Medical Formulation of ZSMU, a composition of the novel medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery was developed as the result of complex physical and chemical, microbiological and biopharmaceutical experiments. The medication contains 1 % of N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, 5 % of Glycerin and Poltava Bischofite (standardized solution prepared at the Department of Medicines Technology of ZSMU), Sodium carboxymethyl cellulose solution and Tween 80 (1 %). Given the above, the urgent task is to study some safety parameters of the developed dosage form.

The aim of the research is to study some toxicological parameters, local irritative effect of and allergic response to an effective dose of created medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery.

Materials and methods. The created medications for intranasal delivery were used as materials for each test. These medications contained N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester (Noopept) 1 %, Glycerin and standardized Poltava Bischofite (5 % each), Sodium carboxymethyl cellulose solution, and Tween 80 (1 %). N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester (CAS №157115-85-0, obtained from Shijiazhuang Prosperity Import and Export Co., Ltd., China. Purity: ≥98 %), Poltava Bischofite (standardized solution prepared at the Department of Medicines Technology of ZSMU), Polysorbate 80 (obtained from Limited liability company "Synbias", Kyiv), Sodium carboxymethyl cellulose (obtained from Limited liability company "Synbias", Kyiv), Glycerin (obtained from Limited liability company "Synbias", Kyiv), Benzalkonium chloride (obtained from Limited liability company "Istok-Plus", Zaporizhzhia). A study of acute toxicity, allergic response and irritating effect on skin, and cutaneous anaphylaxis reaction was conducted on white rats. Local irritative effect (Conjunctival allergen provocation test, CAPT) of created medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery was determined on guinea pigs in accordance with recommendations of the State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine and other recommendations. Results were statistically processed by means of the standard statistical package of the licensed program Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J). For all analysis types the P-value < 0.05 (95 %) was considered statistically significant.

Results. One-time intranasal delivery of the maximum allowable volume of the medication under research (0.4 ml) to the rats weighing 100 g in a dose of 40 mg/kg did not result in death of any of 6 animals of the experimental group overnight. In the course of studying potential local irritative effect of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, two experimental animals out of 10 developed a slight reddening of the conjunctiva immediately after the administration. No changes in mucous membrane of the eyes were observed in other eight experimental animals. Daily application of the studied medication for intranasal delivery (0.5 g) to a shaved area of the lateral surface of the animals' bodies (4 × 4 cm) during 5 days, and consequent one-time application of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester (0.3 g), did not result in anaphylactic shock development. No visible reactions were detected in the experimental animals after 20 more skin applications of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester during 4 weeks (5 times per week). The skin area exposed to application in animals of the control and experimental groups looked the same.

Conclusions. Complex studies of some toxicological parameters (such as mortality, dynamics of body weight change, local irritative effect and allergic response to the effective dose of a novel medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery) have been performed. Summarizing obtained results, it can be confirmed that the medication under study does not cause any local irritative effect and allergic response and does not demonstrate general toxic effects in case of its intranasal delivery. Thus, further research of the novel medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal administration has a potential perspective.

Вивчення токсичності, місцевоподразнювальної та алергізувальної дії нового інтраназального лікарського засобу з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину

Б. С. Бурлака, І. Ф. Беленічев

Розробка нових лікарських форм для доставлення активних речовин системної дії з високою біодоступністю – актуальна проблема сучасної фармацевтичної та медичної науки. Чималий арсенал ноотропних препаратів через їхню невисоку ефективність і незначну нейродоступність не відповідає сучасним вимогам клінічної науки та практики. Останнім часом учені

звертають увагу на перспективність застосування інтраназального шляху введення для транспортування лікарських речовин системної дії у кровотік людини. Використання інтраназального шляху введення для доставлення діючих речовин сприятиме поліпшенню нейродоступності, а отже підвищенню терапевтичної ефективності препаратів. На кафедрах технології ліків, фармакології та медичної рецептури Запорізького державного медичного університету (ЗДМУ) в результаті комплексних фізико-хімічних, мікробіологічних і біофармацевтичних досліджень розробили склад нової інтраназальної форми з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину, що містить 1 % етилового ефіру N-фенілацетил-L-пролілгліцину, 5 % гліцерину та бішофіту полтавського (стандартизованого на кафедрі технології ліків ЗДМУ), розчин натрій карбоксиметилцелюлози та 1 % твіну-80. Актуальним є вивчення окремих параметрів безпечності розробленої лікарської форми.

Мета роботи – вивчення окремих параметрів токсичності, місцевоподразнювальної та алергізувальної дії ефективної дози створеної інтраназальної форми з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину.

Матеріали та методи. Для кожного дослідження як матеріали використовували розроблені інтраназальні форми, що містили 1 % етилового ефіру N-фенілацетил-L-пролілгліцину (ноопепт), по 5 % гліцерину та бішофіту полтавського (стандартизованого), розчин натрій карбоксиметилцелюлози та 1 % твіну-80. Етиловий ефір N-фенілацетил-L-пролілгліцину (CAS №157115-85-0, отримали від Shijiazhuang Prosperity Import and Export Co., Ltd., China. Purity: ≥ 98 %), бішофіт полтавський (стандартизований розчин – на кафедрі технології ліків ЗДМУ), полісорбат-80 (ТОВ Синбіас, м. Київ), натрій КМЦ (ТОВ Синбіас, м. Київ), гліцерин (ТОВ Синбіас, м. Київ), бензалконію хлорид (ТОВ «ИСТОК-ПЛЮС», м. Запоріжжя).

Гостру токсичність, алергізувальну та шкірноподразнювальну активність, активну шкірну анафілаксію вивчали на білих щурах, а дослідження місцевоподразнювальної дії (кон'юнктивальна проба) інтраназальної форми з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину виконали на мурчаках відповідно до рекомендацій ДФЦ МОЗ України та згідно з іншими рекомендаціями. Статистично результати опрацювали, застосовуючи ліцензійний пакет програми Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ804I382130ARCN10-J). Для всіх видів аналізу статистично значущими вважали різницю $p < 0,05$ (95 %).

Результати. Одноразове інтраназальне введення максимально припустимого об'єму 0,4 мл препарату щурам масою 100 г у дозі 40 мг/кг не викликало загибель жодної з 6 тварин групи дослідження протягом доби. Вивчаючи можливу місцевоподразнювальну дію інтраназального гелю з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину, у 2 із 10 тварин зареєстрували слабе почервоніння кон'юнктиви відразу після введення препарату. В інших 8 тварин не було змін слизової оболонки очей. Щоденне нанесення на вистрижену ділянку бокової поверхні тулуба тварин (4 × 4 см) 0,5 г інтраназальної форми, яку вивчали, протягом 5 днів, а потім одноразового нанесення 0,3 г інтраназального гелю з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину не спричинило розвиток анафілактичного шоку. Після нанесення 20 повторних нашкірних аплікацій інтраназального гелю з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину протягом 4 тижнів (5 разів на тиждень) не зареєстрували видимі реакції у тварин. Зовнішній вигляд шкірних покривів у місці нанесення не відрізнявся у тварин контрольної та дослідної групи.

Висновки. Здійснили комплексні дослідження окремих параметрів токсичності (летальність, динаміка зміни маси тіла, місцевоподразнювальна та алергізувальна дія) ефективної дози нової інтраназальної форми з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину. За результатами, що отримали, цей препарат не викликає місцевоподразнювальну й алергізувальну реакцію, не проявляє загальну токсичну дію в умовах інтраназального введення. Перспективним є продовження досліджень нової інтраназальної лікарської форми з етиловим ефіром N-фенілацетил-L-пролілгліцину.

Ключові слова: етиловий ефір N-фенілацетил-L-пролілгліцину, назальна лікарська форма, фармакологічні дослідження, гостра токсичність, алергізувальна дія.

Запорізький медичний журнал. 2021. Т. 23, № 1(124). С. 126-131

Изучение острой токсичности, местнораздражающего и алергизирующего действия нового интраназального лекарственного препарата с N-фенилацетил-L-пролилглицином

Б. С. Бурлака, И. Ф. Беленичев

Разработка новых лекарственных форм для доставки действующих веществ системного действия с высокой биодоступностью – актуальная проблема современной фармацевтической и медицинской науки. Существует значительный арсенал ноотропных препаратов, который в силу невысокой эффективности и незначительной нейродоступности не в полной мере отвечает современным требованиям клинической науки и практики. В последнее время внимание ученых акцентировано на перспективности применения интраназального пути введения для транспортировки лекарственных веществ системного действия в кровотоки человека. Использование интраназального пути введения для доставки действующих веществ будет способствовать улучшению нейродоступности, а значит, и повышению терапевтической эффективности препаратов. На кафедрах технологии лекарств и фармакологии и медицинской рецептуры Запорожского государственного медицинского университета (ЗГМУ) в результате комплексных физико-химических, микробиологических и биофармацевтических исследований разработан состав новой интраназальной формы с этиловым эфиром N-фенилацетил-L-пролилглицина, которая содержит 1 % этилового эфира N-фенилацетил-L-пролилглицина, 5 % глицерина и бишофита полтавского (стандартизованного на кафедре технологии лекарств ЗГМУ), раствор натрий карбоксиметилцеллюлозы и 1 % твина-80. Актуальным является изучение некоторых параметров безопасности разработанной лекарственной формы.

Цель работы – изучение некоторых параметров токсичности, местнораздражающего и алергизирующего действия эффективной дозы созданной интраназальной формы с N-фенилацетил-L-пролилглицина.

Материалы и методы. Для каждого исследования в качестве материалов использовали разработанные интраназальные формы, которые содержали 1 % N-фенилацетил-L-пролилглицина, по 5 % глицерина и бишофита полтавского (стандартизованного), раствор натрий карбоксиметилцеллюлозы и 1 % твина-80. N-фенилацетил-L-пролилглицин (CAS №157115-85-0, получен от Shijiazhuang Prosperity Import and Export Co., Ltd., China. Purity: ≥ 98 %), бишофит полтавский (стандартизованный раствор – на кафедре технологии лекарств ЗГМУ), полисорбат 80 (ООО Синбиас, г. Киев), натрий КМЦ (ООО Синбиас, г. Киев), глицерин (ООО Синбиас, г. Киев), бензалкония хлорид (ООО «ИСТОК-ПЛЮС», г. Запорожье). Острую токсичность, алергизирующую и кожнораздражающую активности, активную кожную анафилаксию изучали на белых крысах, а исследования местнораздражающего действия (кон'юнктивальная проба) интраназальной формы с N-фенилацетил-L-пролил-

Ключевые слова: N-фенилацетил-L-пролилглицин, назальная лекарственная форма, фармакологические исследования, острая токсичность, алергизирующее действие.

Запорожский медицинский журнал. 2021. Т. 23, № 1(124). С. 126-131

глицином проводили на морских свинках в соответствии с рекомендациями ГФЦ МЗ Украины и другими рекомендациями. Статистическую обработку результатов проводили с применением лицензионного пакета программы Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JPZ8041382130ARCN10-J). Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия $p < 0,05$ (95 %).

Результаты. Однократное интраназальное введение максимально допустимого объема 0,4 мл разработанного препарата крысам массой 100 г в дозе 40 мг/кг не вызвало гибель ни одного из 6 животных опытной группы в течение суток. При изучении возможного местнораздражающего действия интраназального геля с N-фенилацетил-L-пролилглицином у 2 из 10 животных зарегистрировали легкое покраснение конъюнктивы сразу после введения препарата. У остальных 8 животных изменения слизистой конъюнктивы не отмечены. Ежедневное нанесение на выстриженный участок боковой поверхности туловища животных (4 × 4 см) 0,5 г созданной интраназальной формы в течение 5 суток, а затем однократного нанесения 0,3 г интраназального геля с N-фенилацетил-L-пролилглицином не приводило к развитию анафилактического шока. При нанесении 20 повторных кожных аппликаций интраназального геля с N-фенилацетил-L-пролилглицином в течение 4 недель (5 раз в неделю) видимые реакции у опытных животных не зарегистрированы. Внешний вид кожных покровов в месте нанесения не отличался у животных контрольной и опытной группы.

Выводы. Проведены комплексные исследования некоторых параметров токсичности (летальность, динамика изменения массы тела, местнораздражающее и аллергизирующее действие) эффективной дозы новой интраназальной формы с N-фенилацетил-L-пролилглицином. Согласно полученным результатам, опытный препарат не характеризуется местнораздражающей, аллергизирующей активностью и не проявляет общего токсического действия при назальном применении. Перспективны дальнейшие исследования новой интраназальной лекарственной формы с N-фенилацетил-L-пролилглицином.

Development of novel medications for delivery of active ingredients with systemic absorption and high bioavailability is an actual challenge for modern pharmaceutical and medical science.

Nowadays, the number of the central nervous system diseases is continuously growing. These conditions lead to impairment of mnemonic and intellectual brain functions, to decrease in mental alertness and memory in particular, which results in deterioration in the quality of life, sometimes in disability and patients' partial or complete dependence on other people [1–4].

The existing variety of nootropics does not fully respond to modern criteria of clinical science and practice due to insufficient effectiveness and neuroavailability.

Recently, scientists have drawn attention to the potential of intranasal administration for delivery of active ingredients with systemic effect to human blood flow. Intranasal administration for delivery of active ingredients will enhance neuroavailability and, thus, a therapeutic effect of drugs [5,6].

Various compounds are used as nootropic agents, such as: cerebral vasodilators (Vinpocetine, Nicergoline), antioxidants and membrane protectors (Mexidol, Pyritinol), pyrrolidone derivatives (Piracetam and its derivatives), GABAergic drugs (γ -aminobutyric acid, Picamilonum, Phenibut), Calcium channel blockers (Nimodipine, Cinnarizine), drugs increasing cholinergic transmission (Ipidacrinum, Donepezilium, Galantamine), herbal preparations (Ginkgo Biloba), neuropeptides and their analogues (Cerebrolysin, Semax, Noopept) [7,8].

At the Departments of Medicines Technology, Pharmacology and Medical Formulation of ZSMU a composition of the novel medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery was developed as a result of complex physical and chemical, microbiological and biopharmaceutical experiments. The medication contains 1 % of N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, 5 % of Glycerin and Poltava Bischofite (standardized solution prepared on the Department of Medicines Technology of ZSMU), Sodium carboxymethyl cellulose solution and Tween 80 (1 %).

Aim

The aim of the research is to study some toxicological parameters, local irritative effect of and allergic response to effective dose of created medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery.

Materials and methods

The created medications for intranasal delivery were used as materials for each test. These medications contained N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester (1 %), Glycerin and standardized Poltava Bischofite (5 % each), Sodium carboxymethyl cellulose solution and Tween 80 (1 %). N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester (CAS №157115-85-0, obtained from Shijiazhuang Prosperity Import and Export Co., Ltd., China. Purity: ≥ 98 %), Poltava Bischofite (standardized solution prepared on the Department of Medicines Technology of ZSMU), Polysorbate 80 (obtained from Limited liability company "Synbias", Kyiv), Sodium carboxymethyl cellulose (obtained from Limited liability company "Synbias", Kyiv), Glycerin (obtained from Limited liability company "Synbias", Kyiv), Benzalkonium chloride (obtained from Limited liability company "Istok-Plus", Zaporizhzhia).

Possible toxic effect of the medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester was studied on outbred albino rats weighing 98–110 g in accordance with recommendations of the State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine. Each group consisted of six animals. The intranasal gel under research, containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, was administered intranasally with syringe dispenser in the maximum allowable amount of 0,4 ml. Possible pathological changes in behavior and appearance, as well as death of animals were recorded within 14 days. Autopsy and morphological studies were performed only in dead animals [9].

Allergic response and irritating effect on skin of the intranasal medication was studied by means of skin application on outbred albino rats of both sexes weighing 120–150 g (2 groups – control and experimental with 10 animals in each) in accordance with recommendations

of the State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine. On the lateral surface of the body of animals, an area of a 4 × 4 cm was shaved. This area was exposed to application of 0.5 g of a dosage form, then the animals were located in individual cells to prevent licking off the drug. The application of the intranasal gel was repeated 20 more times by means of cutaneous applications 5 times per week.

Skin allergy reactions were analyzed daily according to the scale of evaluation of skin samples. The first test was conducted after 10 applications (in the event of detecting allergic reaction, further application of the medication was intended to stop). In case of negative or doubtful effect, the number of skin applications was to be increased to 20.

The research on local irritative effect (Conjunctival allergen provocation test (CAPT)) of created medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery was carried out on guinea pigs weighing 480–520 g (2 groups – control and experimental with ten animals in each), in accordance with recommendations of the State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine and other recommendations.

On the conjunctiva of both eyes of animals from the experimental group, 0.01 ml of gel was applied with the dispenser. The animals from the control group received distilled water administration into conjunctival sac. The observation lasted for 3 days. Allergic reaction was assessed according to a scale: 0 points – no changes in the conjunctiva; 1 point – slight reddening of the conjunctiva; 2 points – reddening of the conjunctiva and swelling. The study of cutaneous anaphylaxis reaction to medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery was conducted on outbred albino female rats weighing 180–190 g (two groups – control and experimental with ten animals in each) in accordance with recommendations of the State Pharmacological Center of the Ministry of Health of Ukraine.

An area of a 4 × 4 cm was shaved on the lateral surface of the animals' bodies. It was exposed to application of 0.5 g of a dosage form, then the animals were located in individual cells to prevent licking off the drug. Sensitization of animals was estimated in 5 days after the last drug application. For this, 0.3 g of the intranasal gel was applied once on the skin of the ear. The analysis of the anaphylactic shock intensity was performed after 6, 12 and 24 hours using the anaphylactic shock index of Weigle et al.: ++++ – a shock with lethal outcome; +++ – a shock with severe symptoms (general convulsions, asphyxia, the animal loses the ability to stand on its paws, falls to the side, no lethal outcome); ++ – a mild shock (slight convulsions, pronounced symptoms of bronchospasm); + – a slight shock (some anxiety, rapid breathing, itchy muzzle, involuntary urination, defecation, disheveled hair); 0 – a shock reaction did not occur, no symptoms were detected.

Results were statistically processed by means of the standard statistical package of the licensed program Statistica for Windows 13 (StatSoft Inc., № JP-Z8041382130ARCN10-J). Normality of data was estimated according to the Shapiro–Wilk test. The data is described in the form of an average value. The significance of the difference between the average values was determined by

the Student's t test in the normal distribution. For all analysis types the P-value < 0.05 (95 %) was considered statistically significant [8–12].

The experiments involving the animals were carried out in accordance with the International Standards for the Care and Use of Laboratory Animals and with Council Directive 86/609/EEC regarding the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes [13,14].

Results

In researches by R. U. Ostrovska et al. in 2002, it has been found that N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester belongs to Toxicity Class IV (practically nontoxic), LD50 of which is 5078 mg/kg when administered intraperitoneally [7]. Considering the fact that in our research other method of drug administration was used (intranasal delivery), it is necessary to provide a study on some toxicological parameters (mortality and dynamics of body weight change) of the effective dose (40 mg/kg) of N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery. Thus, it has been found that one-time intranasal delivery of the maximum allowable volume of the medication under research (0.4 ml) to the rats weighing 100 g in a dose of 40 mg/kg did not result in death of any of 6 animals of the experimental group overnight (*Table 1*).

After one-time administration of the medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery, the animals were under observation. No visible pathological changes, as well as changes in behavior of the animals occurred on day 1, 7, and 14 of the experiment. It has been found that dynamics of body weight change was within the physiological norm (*Table 2*).

In the course of studying potential local irritative effect of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, two of ten experimental animals developed a slight reddening of the conjunctiva immediately after the administration. No changes in mucous membrane of the eyes were observed in the other eight experimental animals. On the second and third day after the administration, none of the experimental animals developed a positive reaction of mucous membrane of the eye. This indicates the absence of irritant action in this dosage form.

Then, the study of cutaneous anaphylaxis reaction to medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery was conducted. As the result, it has been found that a daily application of the studied intranasal medication (0.5 g) on a shaved area of the lateral surface of the body of animals (4 × 4 cm) during 5 days, and then one-time application of the intranasal gel (0.3 g), did not result in development of anaphylactic shock. No symptoms of anaphylactic shock due to intranasal gel application (0.3 g) after 6, 12 and 24 hours. Thereby, the studied intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester does not induce allergic reactions of anaphylactic type when administered to animals during 5 days.

The conducted research of allergenic effect of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester has revealed the following: no visible reactions were detected in the experimental animals after 20 more skin applications of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester during 4 weeks (5 times

Table 1. A study on acute toxicity of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester using intranasal administration

The maximum allowable volume, ml	Dosage, mg/kg	The number of rats			Mortality, %
		Overall	Dead	Survived	
0.4	40	6	0	6	0

Table 2. The dynamics of body weight change in rats after one-time administration of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, M ± m

The groups of animals	Initial state, (g)	the 7 th day, (g)	the 14 th day, (g)
The intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester	101.3 ± 3.2	127.4 ± 3.8	147.4 ± 2.8
Control group (n = 6)	107.1 ± 9.5	133.1 ± 8.6	154.3 ± 4.1

Table 3. The results of the study on allergenic effect of the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester according to the scale of evaluation of skin samples on the 4th week of observation

The groups of animals n = 10	Designation of reactions	Description of reactions
The intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester	Negative	No changes in skin surface were observed
The control group	Negative	No changes in skin surface were observed

per week). Skin area exposed to application in animals of the control and experimental groups looked the same (Table 3).

Discussion

Thus, it has been found that the studied intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester does not induce a local irritative effect. Considering the obtained research data, we can conclude that the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester neither induces allergic reactions on cellular level, nor provokes allergic dermatitis after 20 applications during 4 weeks.

In the process of evaluation of acute toxicity of the created intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, the obtained results do not contradict the literature sources [7]. This novel medication – the intranasal gel containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester – does not cause death of any animal in any group. Given the LD50 value of the substance of N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester, it is impossible to cause mortality with this method of administration.

Conclusions

A series of complex studies of some toxicological parameters (such as mortality, dynamics of body weight change, local irritative effect and allergic response to the effective dose of a novel medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal delivery) have been performed. Summarizing obtained results, it can be confirmed that the medication under study does not cause any local irritative effect and allergic response and does not demonstrate general toxic effects in case of its intranasal delivery. Thus, further research of the novel medication containing N-phenylacetyl-L-prolylglycine ethyl ester for intranasal administration has a potential perspective.

Prospects for further research. Further studies of the new nasal form with ethyl ester of N-phenylacetyl-L-prolylglycine should be conducted. They are studies on rheological parameters, chemical and microbiological stability.

Funding

The study is funded as a part of scientific research work at Zaporizhzhia State Medical University: “A development of composition, technologies and biopharmaceutical studies on transmucosal delivery of medications” (№ of the state registration 0112U005635).

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.
Конфлікт інтересів: відсутній.

Надійшла до редакції / Received: 25.09.2020
Після доопрацювання / Revised: 08.10.2020
Прийнято до друку / Accepted: 20.10.2020

Information about authors:

Burlaka B. S., PhD, Associate Professor of the Department of Medicinal Preparations Technology, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-4539-7331](https://orcid.org/0000-0003-4539-7331)

Bielenichev I. F., PhD, DSc, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Medical Prescription, Zaporizhzhia State Medical University, Ukraine.

ORCID ID: [0000-0003-1273-5314](https://orcid.org/0000-0003-1273-5314)

Відомості про авторів:

Бурлака Б. С., канд. фарм. наук, доцент каф. технології ліків, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Беленічев І. Ф., д-р біол. наук, професор, зав. каф. фармакології та медичної рецептури, Запорізький державний медичний університет, Україна.

Сведения об авторах:

Бурлака Б. С., канд. фарм. наук, доцент каф. технологии лекарств, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

Беленичев И. Ф., д-р биол. наук, профессор, зав. каф. фармакологии и медицинской рецептуры, Запорожский государственный медицинский университет, Украина.

References

- [1] Pandian, J. D., Gall, S. L., Kate, M. P., Silva, G. S., Akinyemi, R. O., Ovbiagele, B. I., Lavados, P. M., Gandhi, D., & Thrift, A. G. (2018). Prevention of stroke: a global perspective. *Lancet*, 392(10154), 1269-1278. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31269-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31269-8)

- [2] Malhotra, K., Gornbein, J., & Saver, J. L. (2017). Ischemic Strokes Due to Large-Vessel Occlusions Contribute Disproportionately to Stroke-Related Dependence and Death: A Review. *Frontiers in Neurology*, 8, Article 651. <https://doi.org/10.3389/fneur.2017.00651>
- [3] Barbay, M., Taillia, H., Nedelec-Ciceri, C., Arnoux, A., Puy, L., Wiener, E., Canaple, S., Lamy, C., Godefroy, O., Roussel, M., & GRECOVASC Study Group. (2017). Vascular cognitive impairment: Advances and trends. *Revue Neurologique*, 173(7-8), 473-480. <https://doi.org/10.1016/j.neurol.2017.06.009>
- [4] Zozulia, A. I., & Zozulia, I. S. (2014). Problema tserebrovaskuliarnykh zakhvoriuvan v Ukraini ta sviti i yii perspektyvy [Issue of cerebrovascular diseases in Ukraine and in the world and its prospects]. *Zbirnyk naukovykh prats spivrobitynykiv NMAPO im. P. L. Shupyka*, 23(1), 417-432. [in Ukrainian].
- [5] Kumar, H., Mishra, G., Sharma, A. K., Gothwal, A., Kesharwani, P., & Gupta, U. (2017). Intranasal Drug Delivery: A Non-Invasive Approach for the Better Delivery of Neurotherapeutics. *Pharmaceutical Nanotechnology*, 5(3), 203-214. <https://doi.org/10.2174/2211738505666170515113936>
- [6] Jogani, V., Jinturkar, K., Vyas, T., & Misra, A. (2008). Recent Patents Review on Intranasal Administration for CNS Drug Delivery. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation (Discontinued)*, 2(1), 25-40. <https://doi.org/10.2174/187221108783331429>
- [7] Ostrovskaya, R. U., Gudasheva, T. A., Voronina, T. A., & Sereidenin, S. B. (2002). Original'nyi nootropnyi i neiroprotektivnyi preparat noopept [The novel nootropic and neuroprotector drug noopept]. *Ekspyrymental'naya i klinicheskaya farmakologiya*, 65(5), 66-72. [in Russian].
- [8] Belenichev, I. F., Chernii, V. I., Nagornaya, E. A., Pavlov, S. V., Chernii, T. V., Gorchakova, N. A., Bukhtiyarova, N. V., Andronova, I. A., & Kucherenko, L. I. (2014). *Neiroproteksiya i neiroplastichnost'* [Neuroprotection and neuroplasticity]. OOO "Poligraf plyus". [in Russian].
- [9] Stefanov, A. V. (Ed.). (2001). *Doklinichni doslidzhennia likarskykh zasobiv* [Preclinical studies of drugs]. Avitsena. [in Ukrainian].
- [10] Lapach, S. N., Chubenko, A. V., & Babich, P. N. (2001). *Statisticheskie metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispol'zovaniem EXCEL* [Statistical Methods in Biomedical Research Using EXCEL]. Morion. [in Russian].
- [11] Mironov, A. N. (Ed.). (2012) *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Chast' pervaya* [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one]. Grif i K. [in Russian].
- [12] Ministry of Health of Ukraine. (2014, September 19). *Pro zatverdzhennia standartu "Nastanova. Likarski zasoby. Doklinichni doslidzhennia bezpeky yak pidgruntia klinichnykh vyprovuban za uchastiu liudyny ta reiestratsii likarskykh zasobiv"* [On approval of the standard "Guidelines. Drugs. Preclinical studies of safety as a foundation for clinical trials involving humans and licensing of drugs" (No. 661)]. <https://zakon.rada.gov.ua/rada/show/v0661282-14#Text>
- [13] (2010, October 20). *Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes Text with EEA relevance*. Europa.eu. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex%3A32010L0063>
- [14] Ministry of Education, Science, Youth and Sports of Ukraine. (2012, March 01). *Pro zatverdzhennia Poriadku provedennia naukovykh ustanovamy doslidiv, eksperymentiv na tvarynakh* [On approval of the test and experimental procedure carrying out by scientific institutions on animals (No. 241)]. <https://zakon.rada.gov.ua/laws/show/z0416-12#Text>
- [15] Berezovskaya, I. V. (2003). Klassifikatsiya khimicheskikh veshchestv po parametram ostroi toksichnosti pri parenteral'nykh sposobakh vvedeniya [Classification of chemicals based on parameters of acute toxicity in parenteral administration]. *Khimiko-faomatsevticheskii zhurnal*, 37(3), 32-34. <https://doi.org/10.30906/0023-1134-2003-37-3-32-34>. [in Russian].