

УДК 619:636.085.12

ОЦЕНКА ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ И КУМУЛЯТИВНЫХ СВОЙСТВ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА «ХРОМАРЦИН» НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ МИКРОЭЛЕМЕНТОВ

М. П. КУЧИНСКИЙ, Г. П. ЦИРУЛЬ

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеслесского»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220003

(Поступила в редакцию 14.02.2019)

Нанотехнологии, как одно из ведущих направлений развития современной фундаментальной и прикладной науки, открывают перед человечеством массу возможностей. С одной стороны, наночастицы потенциально применимы в самых различных отраслях, включая медицинскую и ветеринарную фармакологию, где появились перспективы для разработки и внедрения в производство новых поколений лекарственных средств и биологически активных добавок [2]. С другой – становление новой области знания требует от нас глубокого и всестороннего изучения различных последствий внедрения нанотехнологий в повседневную жизнь, в том числе анализа безопасности применения наноматериалов для человека, животных и окружающей среды в целом.

Произведено изучение хронической токсичности и кумулятивных свойств экспериментального препарата «Хромарцин» при его ежедневной выпойке в виде раствора с водой лабораторным мышам. В хроническом эксперименте препарат применяли в течение 30 дней, для определения коэффициента кумуляции – 60. Клинико-лабораторное исследование показало, что длительное применение хромарцина в дозах 14 700 и 7 350 мг/кг гибели животных не вызвало, но сопровождалось нарушением функций печени, снижением у животных аппетита и темпов роста. На основании полученных данных также установлено, что хромарцин можно отнести к веществам со слабовыраженной степенью кумуляции ($K_k > 5$).

Ключевые слова: лабораторные мыши, хроническая токсичность, кумуляция, наночастицы, микроэлементы, хромарцин.

Nanotechnology, as one of the leading directions in the development of modern fundamental and applied science, opens up a lot of opportunities for humanity. On the one hand, nanoparticles are potentially applicable in a wide variety of industries, including medical and veterinary pharmacology, where there are prospects for developing and introducing new generations of drugs and dietary supplements into production. On the other hand, the development of a new field of knowledge requires us to thoroughly and comprehensively study the various consequences of introducing nanotechnologies into everyday life, including the analysis of the safety of using nanomaterials for humans, animals and the environment as a whole.

A study was made of the chronic toxicity and cumulative properties of the experimental drug "Chromarcin" daily drunk by laboratory mice as a water solution. In the chronic experiment, the drug was used for 30 days, to determine the cumulation factor – 60. Clinical and laboratory research showed that prolonged use of chromarcin at doses of 14,700 and 7,350 mg / kg did not cause death, but was accompanied by abnormal liver function, and reduction of animal appetite and growth. On the basis of the data obtained, it was also established that chromarcin can be attributed to substances with a mild degree of cumulation ($K_k > 5$).

Key words: laboratory mice, chronic toxicity, cumulation, nanoparticles, microelements, chromarcin.

Введение

Вопрос о токсическом воздействии наночастиц на биологические объекты и о его механизме во многих случаях на сегодняшний день остаётся открытым. Наиболее выгодным подходом к оценке токсичности наноматериалов с точки зрения экономии материальных ресурсов и времени являются исследования *in vitro*. Однако в таких исследованиях получают достаточно противоречивые данные о токсичности наночастиц, что связано, по видимости, с их способностью влиять либо на сам анализируемый материал, либо на систему обнаружения производимого эффекта. Ряд авторов придерживается мнения, что в условиях *in vitro* невозможно воспроизвести тот токсический эффект, который можно наблюдать *in vivo* [4, 5].

Следовательно, изучение токсичности препаратов, разрабатываемых на основе наночастиц, на лабораторных животных является важной задачей современной фармакологии и токсикологии. В связи с этим целью данной работы стало изучение хронической токсичности и кумулятивных свойств препарата «Хромарцин» на лабораторных мышах.

Основная часть

Препарат «Хромарцин» представляет собой однородную жидкость тёмно-коричневого цвета, содержащую в определённом соотношении наночастицы хрома, марганца, цинка и железа в суммарном количестве 3,31 мг/см³. Хроническую токсичность и кумулятивные свойства препарата изучали на 60-ти белых мышах живой массой 18–20 г, которых рандомизированно разделили на 6 групп по 1 голов в каждой:

✓ хронический эксперимент – I–III опытные и IV контрольная,

✓ кумуляция – I_к опытная и II_к контрольная.

Соотношение самцов и самок во всех группах животных – 1:1. Подопытных животных содержали в виварии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского» в условиях свободного доступа к воде и корму. В течение всего эксперимента за мышами вели наблюдение и учитывали общее состояние, изменения аппетита и поведенческих реакций, состояние видимых слизистых оболочек, кожного и шерстного покровов. Прирост живой массы по отношению к массе животных в начале эксперимента определяли каждые 10 дней. По окончании опыта мышей всех групп подвергли эвтаназии (декапитации с отбором крови для биохимического исследования в хроническом эксперименте). При проведении патологоанатомического вскрытия оценивали макроскопическую картину важнейших внутренних органов, производили их взвешивание и расчёт массовых коэффициентов. Объём и продолжительность исследований, методы, регистрируемые параметры и другие условия проведения исследования регламентировались методическими указаниями [1]. Статистический анализ полученных данных проводили с использованием пакета анализа данных MS Excel.

При оценке хронической токсичности препарат ежедневно в течение 30-ти дней задавали мышам I–III групп в виде раствора с водой методом свободной выпойки в дозах, составивших 1/10, 1/20 и 1/50 от ЛД₅₀ (14 700, 7 350 и 2 940 мг/кг массы тела, соответственно). Животных IV (контрольной) группы никаким дополнительным воздействиям не подвергали. Схема проведения опыта и его результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1. Схема опыта и результаты изучения хронической токсичности препарата «Хромарцин»

Показатели		I	II	III	Контроль (IV)
Группа					
Доза препарата, ЛД ₅₀ /гол в сутки		1/10	1/20	1/50	–
Доза препарата, ЛД ₅₀ всего (за 30 дней)		3	1,5	0,6	–
Количество животных, гол		10	10	10	10
Заболело / пало, гол		0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0
Выжило, гол		10	10	10	10
Ср. живая масса, г	1-й день	19,34±0,12	19,00±0,21	18,96±0,25	19,03±0,17
	11-й день	20,46±0,34*	21,08±0,60*	26,94±0,33	27,17±0,28
	21-й день	20,85±0,55*	22,18±0,51*	29,14±0,55	28,68±0,51
	31-й день	24,33±1,22*	23,19±1,21*	29,94±0,60	29,87±0,68
Среднесуточный привес, г		0,17	0,14	0,37	0,36

* – p<0,001 достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

В первые 4–5 дней эксперимента животные всех групп охотно поедали корм и пили воду, затем у животных I и II групп аппетит начал снижаться, что отразилось на показателях прироста живой массы. По внешним признакам животные опытных групп в течение первых 10 дней опыта не отличались от животных контрольной группы. В дальнейшем в I и II группах наблюдали визуально заметный неравномерный рост подопытных животных, что соответственно выразилось в статистически достоверном отличии живой массы мышей этих групп от контроля (табл. 1). Животные III группы по внешним признакам не отличались от контрольных, а по результатам взвешиваний разница между животными III и IV групп была незначительной. По всем остальным признакам животные опытных и контрольной групп друг от друга не отличались. Случаев заболеваемости и гибели подопытных мышей за время проведения исследования не зарегистрировано.

При вскрытии трупов белых мышей всех групп макроскопических изменений обнаружено не было. Массы и значения массовых коэффициентов внутренних органов животных приведены в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Средние массы внутренних органов

Орган, г		I	II	III	Контроль (IV)
Группа					
Сердце		0,15±0,01	0,14±0,01**	0,17±0,01	0,17±0,004
Легкие		0,21±0,01	0,22±0,01	0,22±0,01	0,22±0,01
Печень		1,38±0,10	1,28±0,06*	1,46±0,03	1,48±0,03
Почки		0,32±0,02	0,32±0,03	0,39±0,02	0,38±0,02
Селезёнка		0,13±0,01	0,13±0,01	0,12±0,01	0,12±0,01

* – p<0,05, ** – p<0,01 достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Таблица 3. Массовые коэффициенты внутренних органов

Орган \ Группа	I	II	III	Контроль (IV)
Сердце	0,63±0,03*	0,61±0,03	0,58±0,01	0,57±0,01
Легкие	0,89±0,07*	0,95±0,04***	0,75±0,02	0,73±0,02
Печень	5,74±0,37	5,61±0,32	4,89±0,10	4,96±0,14
Почки	1,33±0,08	1,35±0,07	1,30±0,05	1,26±0,04
Селезёнка	0,55±0,05**	0,56±0,02***	0,41±0,01	0,39±0,01

* – p<0,05, ** – p<0,01, *** – p<0,001 достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Анализ данных табл. 2 и 3 позволяет заключить, что длительное применение «Хромарцина» в изучаемых дозах в большей степени повлияло на аппетит мышей и прирост живой массы, чем на развитие отдельных органов. Статистически значимые отличия массовых коэффициентов внутренних органов опытных мышей от контрольных наблюдались только в I и II опытных группах, где были зарегистрированы достоверные отличия массовых коэффициентов лёгких, сердца и селезёнки. Это объясняется тем, что средняя живая масса животных данных групп к концу эксперимента была значительно ниже таковой в III и IV группах. Достоверные отличия абсолютных значений массы были отмечены только во II группе: средние массы сердца и печени ниже, чем в контроле (но в пределах физиологической нормы для данного вида животных) [3].

Результаты биохимических исследований сыворотки крови подопытных животных в конце опыта приведены в табл. 4.

Таблица 4. Биохимические показатели сыворотки крови белых мышей при изучении хронической токсичности

Показатели	I группа	II группа	III группа	Контроль (IV)
АЛТ, Ед/л	44,23±0,52	51,35±4,13	50,55±5,3	48,43±6,27
АСТ, Ед/л	114,35±15,97	93,93±7,20	96,60±3,73	95,18±2,99
ЩФ, Ед/л	163,75±5,21**	137,25±4,84*	118,75±4,60	114,00±4,44
Общ. билирубин, мкМоль/л	16,66±6,80	8,91±0,87	7,99±1,02	7,40±1,20
Прям. билирубин, мкМоль/л	2,84±0,24	2,46±0,14	2,08±0,11	1,92±0,45
Мочевина, Ммоль/л	4,48±0,20	4,63±0,24	4,54±0,26	4,60±0,31
Белок общий, г/л	48,30±0,70	53,55±3,50	55,61±4,32	55,70±4,64

* – p<0,05, ** – p<0,01 достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Биохимический статус лабораторных животных опытных групп отличался от показателей контрольной группы незначительно за исключением уровня щелочной фосфатазы. Но среди показателей I группы обращает на себя внимание повышение АсТ и общего билирубина (за счёт его непрямой фракции) а также снижение уровня общего белка, что позволяет сделать заключение о развитии внутрипечёночного холестаза и нарушения белково-синтетической функции печени.

При изучении кумулятивных свойств хромарцина использовали метод ускоренного определения кумулятивного эффекта. Препарат применяли методом свободной выпойки в виде раствора с водой в течение 60 дней.

По результатам исследования было установлено, что к 10-му дню эксперимента отдельные особи опытной группы начали значительно отставать в росте от остальных мышей, находящихся в опыте. Эта тенденция сохранялась в течение всего исследования, а в последние 20 дней опыта живая масса мышей I_к группы в целом начала снижаться и практически вернулась к изначальным значениям. По остальным внешним признакам опытные животные за всё время наблюдений не отличались от контрольных. Гибели мышей в обеих группах зарегистрировано не было. Изменений во внутренних органах при макроскопическом исследовании не обнаружено.

Массовые коэффициенты лёгких, почек и селезёнки от опытных животных достоверно отличались от таковых в контрольной группе. Также с высокой степенью достоверности от контроля отличалась абсолютная масса всех за исключением селезёнки внутренних органов опытных мышей. Это свидетельствует, прежде всего, о неравномерности роста и развития животных опытной группы и об их низкой средней живой массе к концу эксперимента.

В целом за время проведения эксперимента мышам опытной группы было выпоено 25,8×ЛД₅₀ препарата «Хромарцин». При этом ни одна мышь за время исследования не пала. Коэффициент кумуляции рассчитывается по формуле:

$$K_k = \text{ЛД}_{50n} / \text{ЛД}_{500},$$

где K_к – коэффициент кумуляции; ЛД_{50n} – ЛД₅₀ при n-кратном введении; ЛД₅₀₀ – ЛД₅₀, полученная при однократном введении.

Следовательно, так как ЛД_{50n} экспериментально получена не была, а n значительно превысила значение «5», то можно сделать вывод о том, что в соответствии с классификацией химических

веществ по степени кумуляции по Л. Н. Медведю [1] изучаемый препарат можно отнести к веществам со слабо выраженной степенью кумуляции ($K_k > 5$).

Заключение

При изучении хронической токсичности экспериментального препарата «Хромарцин» было выявлено, что его оральное применение в дозах 14 700 и 7 350 мг/кг (1/10 и 1/20 от ЛД₅₀, соответственно) привело к снижению у лабораторных мышей аппетита и темпов роста, негативно отразилось на синтетической и детоксикационной функциях печени. Также отмечали неравномерность развития внутренних органов и организма мышей в целом в I и II опытных группах. Гибели животных не зарегистрировано.

Свободная выпойка препарата «Хромарцин» в течение 60 дней белым лабораторным мышам в суммарной дозе $25,8 \times \text{ЛД}_{50}$ сопровождалось значительным снижением у них аппетита и живой массы. Случаев гибели мышей отмечено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Методические указания по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии / НАН Беларуси, РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»; сост. А. Э. Высоцкий [и др.]. Минск, 2007. – 156 с.
2. Научное обоснование получения наноструктурных и нанокомпозитных материалов и технология их использования в сельском хозяйстве / А. Х. Яппаров [и др.]; под общ. ред. А. Х. Яппарова и Л. В. Коваленко. – Казань: Центр инновационных технологий, 2014. – 304 с.
3. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / сост.: Т. В. Абрашова [и др.]; под ред. В. Г. Макарова и М. Н. Макаровой. – СПб.: Издательство «Лема», 2013. – 116 с.
4. Kroll, A. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges / A. Kroll, MH. Pillukat, D. Hahn, J. Schnekenburger // European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2009. – №72 (2) – P. 370–377.
5. Shetab-Boushehri, SV. Current concerns on the validity of in vitro models that use transformed neoplastic cells in pharmacology and toxicology / SV. Shetab-Boushehri, M Abdollahi // International journal of pharmacology. – 2012. – №8. – P. 594–595.