

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА «ХРОМАРЦИН»

М. П. КУЧИНСКИЙ, Г. П. ЦИРУЛЬ

Республиканское научно-исследовательское дочернее унитарное предприятие
«Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелецкого»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220003, e-mail: bievmtut.by

(Поступила в редакцию 06.02.2020)

На современном этапе границы возможностей применения нанотехнологий в самых различных отраслях существенно расширились. В частности, в сельском хозяйстве и ветеринарной медицине это позволяет разрабатывать принципиально новые подходы к лечению и профилактике заболеваний сельскохозяйственных животных. Так, нами в данном исследовании рассматривается новый комплексный препарат «Хромарцин» на основе наночастиц цинка, марганца, хрома и железа, разработанный в качестве дополнительного источника эссенциальных микроэлементов для животных и, таким образом, оно посвящено решению актуальной проблемы развивающегося направления ветеринарной фармакологии и токсикологии – исследованию токсичности препарата на основе наночастиц.

С целью изучения острой токсичности препарата «Хромарцин» устанавливали его среднесмертельные дозы для двух видов лабораторных животных (белые мыши и крысы). Для этого хромарцин в нативном виде задавали животным внутрижелудочно однократно и многократно с помощью инъекционной иглы с напавленной оливой мышам и молочного катетера крысам. В ходе проведения эксперимента и в течение 14 суток после затравки за животными вели постоянные наблюдения с регистрацией их общего состояния, клинических признаков интоксикации и наличия летальных исходов. Гибель животных как в эксперименте на белых мышах, так и в опыте на крысах была зарегистрирована только в группах, в которых хромарцин лабораторным животным вводили многократно. На основании полученных данных по методу Кёрбера были рассчитаны среднесмертельные дозы препарата. Установили, что ЛД₅₀ для мышей составила 146 667, а для крыс – 240 000 мг/кг живой массы, что, согласно ГОСТ 12.1.007, позволяет отнести хромарцин к IV классу опасности (веществам малоопасным).

Ключевые слова: лабораторные животные, острая токсичность, наночастицы, микроэлементы, хромарцин.

At the present stage, the boundaries of the possibilities of using nanotechnologies in a wide variety of industries have expanded significantly. In particular, in agriculture and veterinary medicine this allows developing fundamentally new approaches to the treatment and prevention of diseases of farm animals. So, in this study, we are considering a new complex preparation «Chromarcin» based on zinc, manganese, chromium and iron nanoparticles, developed as an additional source of essential microelements for animals and, thus, it is devoted to solving urgent problems of the developing field of veterinary pharmacology and toxicology - the study of the toxicity of a drug based on nanoparticles.

In order to study the acute toxicity of the Chromartsin preparation, its average lethal doses were established for two types of laboratory animals (white mice and rats). For this,

chromarcin in the native form was given to animals intragastrically once and repeatedly using an injection needle with a fused olive to mice and a milk catheter to rats. During the experiment and within 14 days after seeding, the animals were constantly monitored with registration of their general condition, clinical signs of intoxication and the presence of fatal outcomes. The death of animals both in the experiment on white mice and in the experiment on rats was recorded only in groups in which chromarchin was administered to laboratory animals repeatedly. Based on the data obtained by the Kerber method, the median lethal doses of the drug were calculated. It was found that the LD50 for mice was 146,667, and for rats – 240,000 mg / kg of live weight, which, according to GOST 12.1.007, allows chromhartsin to be classified as hazard class IV (low-hazard substances).

Key words: *laboratory animals, acute toxicity, nanoparticles, microelements, chromarcin.*

Введение. Экономические и социальные требования к эффективности работы животноводства и темпам роста производительности отрасли, среди прочего, подразумевают постоянный поиск возможностей для наиболее полной реализации генетического потенциала продуктивности сельскохозяйственных животных, что осуществимо лишь при условии обеспеченности организма полноценным питанием, сбалансированным, в том числе, по минералам. Таким образом, разработка новых биологически активных добавок и препаратов на основе микроэлементов для сельскохозяйственных животных не вызывает сомнений в своей актуальности. Использование в этих целях наночастиц металлов представляется достаточно перспективным направлением благодаря особым физико-химическим свойствам, обуславливающим их высокий химический потенциал и биологическую активность [1, 4]. На сегодняшний день для некоторых наночастиц была изучена и установлена способность легко проходить сквозь плазматические мембраны клеток, а для части из них – эффективно восполнять дефицит микроэлементов в организме [1, 3, 4]. В то же время вопрос о токсическом воздействии наночастиц на биологические объекты и о его механизме, а также о потенциальных последствиях их использования для здоровья человека и животных в краткосрочной и долгосрочной перспективе, во многих случаях остаётся открытым, что является немаловажным сдерживающим фактором для развития данного направления фармакологии. Из литературных данных известно, что токсичность наночастиц зависит не только от применяемых в экспериментах доз, но и от размера частиц, их формы и методов введения. Для отдельных наночастиц металлов, например, установлена их высокая токсичность при ингаляционном методе введения в организм животных, для других – наоборот, более низкий по сравнению с солями и хелатами этих же металлов уровень токсичности в наноформе [3, 5, 8, 9]. Немаловажным также представляется вопрос о методике проведения токсикологиче-

ских исследований нанопрепаратов. С точки зрения экономии материальных ресурсов и времени, бесспорно, более приемлемыми и выгодными при оценке токсичности наноматериалов являются исследования *in vitro*. Однако, в таких исследованиях зачастую получают противоречивые данные, что связано, вероятно, с уникальными свойствами наночастиц, которые способны оказывать воздействие на сам анализируемый материал или на систему обнаружения производимого эффекта, а по мнению отдельных авторов, в условиях *in vitro* в принципе невозможно воспроизвести токсический эффект, который можно было бы наблюдать в опыте на живом организме [3–6, 7, 10]. Таким образом, неординарность физических и химических свойств наночастиц и неполнота имеющихся на сегодняшний день данных о биохимических эффектах, модулируемых ими в клетках живых организмов, делают изучение токсичности нанопрепаратов задачей первостепенной важности для современной фармакологии и токсикологии. В связи с этим целью данной работы явилось изучение острой токсичности нового комплексного препарата «Хромарцин» на основе наночастиц микроэлементов, созданного нами совместно с сотрудниками ГНУ «Институт физико-органической химии НАН Беларуси».

Основная часть. Ветеринарный препарат «Хромарцин» представляет собой коллоидный раствор тёмно-коричневого цвета, содержащий в определённом соотношении смесь наночастиц соединений хрома, марганца, цинка и железа в суммарном количестве 3,30–3,35 мг/см³. Препарат предназначен для перорального применения свиньям и крупному рогатому скоту в качестве профилактического средства при гипомикроэлементозах, также при послеродовой патологии у коров и с целью повышения устойчивости организма молодняка и его сохранности.

Исследования по определению острой токсичности хромарцина выполнялись в соответствии с «Методическими указаниями по токсикологической оценке химических веществ и фармакологических препаратов, применяемых в ветеринарии» [2]. Изучение острой токсичности препарата проводили на 42 белых мышах и 42 белых лабораторных крысах, массы которых на момент начала эксперимента составляли 18–22 г и 180–220 г соответственно. Подопытных животных содержали в виварии института, в условиях свободного доступа к воде и корму. Перед проведением испытаний мыши и крысы были рандомизированно распределены на 7 групп (14 групп всего) по 6 особей в каждой (самцы и самки в соотношении 1:1). В течение 10 дней до начала исследования ежедневно проводили осмотр подопытных животных. Ка-

ких-либо отклонений в их общем состоянии, поведенческих реакциях, интересе к воде и корму за этот период не зафиксировали. Далее лабораторные мыши и крысы были разделены на шесть экспериментальных (I-VI) и одну контрольную (VII) группы.

Испытуемый препарат в нативном виде экспериментальным животным вводили натошак внутрижелудочно одно- и многократно. При его многократном назначении интервал между введениями составлял 1,5–2 часа. Общая длительность обработки не превышала 12 часов. Доза на одно введение составляла 40 000 мг/кг массы. Кратность введений зависела от испытуемой дозы и для каждой из опытных групп была различной. Контрольным животным многократно внутрижелудочно вводили дистиллированную воду в объёмах, эквивалентных максимальным дозам препарата в экспериментальных группах. Дизайн эксперимента описывает табл. 1.

Таблица 1. Схема опыта по определению острой токсичности препарата «Хромарцин» на лабораторных животных

№ группы	Вид животных			
	мыши		крысы	
	кол-во введений	доза препарата, мг/кг	кол-во введений	доза препарата, мг/кг
I	6	240000	8	320000
II	5	200000	7	280000
III	4	160000	6	240000
IV	3	120000	5	200000
V	2	80000	4	160000
VI	1	40000	3	120000
контроль (VII)	6	800 мг H ₂ O×6	8	8000 мг H ₂ O×8

За животными опытных и контрольных групп в течение 14 дней после затравки вели постоянные клинические наблюдения с регистрацией общего состояния (особенностей поведения, интенсивности и характера двигательной активности, наличия и характера судорог, частоты и глубины дыхательных движений, состояния волосяного и кожного покровов, частоты мочеиспускания и дефекации), реакций на корм, воду и внешние раздражители. Учитывали также количество погибших животных. На 14-й день опыта выживших животных подвергали эвтаназии путём передозировки эфирного наркоза. Всех павших в эксперименте и умерщвлённых по его окончании животных вскрывали и макроскопически оценивали состояние внутренних органов. ЛД₅₀ рассчитывали по методу Кёрбера.

Исследования показали, что после первого для мышей и третьего для крыс VI группы внутрижелудочного введения хромарцина в дозах по 40 000 и 120 000 мг/кг соответственно, в первые часы после затравки у животных был нарушен аппетит и наблюдался отказ от воды. Угнетение наблюдали только у 1-й из мышей и у 3 крыс в течение 4–5 часов после введения, остальные животные сохраняли активность. Гибели животных в данных группах зарегистрировано не было.

После применения препарата мышам в дозе 80 000, а крысам 160 000 мг/кг (V группа), что соответствовало второму и четвёртому введениям, у лабораторных животных в течение 5–10 минут сразу после затравки наблюдали произвольное сокращение мышц живота, в дальнейшем – незначительное учащение дыхания у части животных, лёгкую гиподинамию. К концу первых суток среди животных данных групп была зафиксирована гибель: пали 1 мышь и 1 крыса.

С увеличением дозы вводимого препарата до 120 000 мышам и 200 000 мг/кг крысам (IV группа, третье и пятое введения, соответственно) клинические признаки интоксикации усиливались. В первые часы у животных наблюдали тахипноэ, гипотермию, гипо- и адинамию, изменение мышечного тонуса, ослабление реакции на внешние раздражители. Часть мышей занимали неестественные позы, широко расставив передние и задние лапки, остальные – сбивались в «кучку». Крысы вели себя подобным образом. Через 1,5–2 часа после затравки пала 1 мышь. У выживших животных фиксировали полиурию (цвет мочи нормальный) и диарею (жидкие фекалии имели окраску, близкую к цвету исследуемого препарата). В течение первых суток аппетит у животных данных групп был снижен или отсутствовал, нового падежа среди животных не отмечали, но состояние 2 мышей и 2 крыс вызвало опасения: позы животные занимали по-прежнему неестественные, дыхание было учащённым. К концу вторых суток наблюдений отметили гибель 2 крыс и ещё 1 мышки.

Четырёх- и шестикратное внутрижелудочное применение хромарцина животным III группы (соответствует дозам 160 000 мг/кг для мышей и 240 000 мг/кг для крыс) привело к полному отсутствию у лабораторных животных реакции на внешние раздражители в первые 2–3 часа после последнего введения препарата. Как и у животных групп, описанных ранее, отмечали диарею и обильное частое мочеиспускание. Через 1,5–2 часа отметили гибель 2 мышей и 2 крыс. По истечении первых суток зафиксировали гибель ещё одной мыши. В дальнейшем падежа среди животных III группы не отмечали, хотя признаки

интоксикации с большей или меньшей степенью выраженности наблюдали в течение первых 48 часов после затравки.

Введение исследуемого препарата мышам в дозе 200 000 мг/кг (пятикратное применение) привело к сильному угнетению, полному отсутствию реакции на внешние раздражители и крайнему ослаблению мышечного тонуса, непроизвольному и практически не прекращающемуся выведению мочи и кала; в первые сутки наблюдений погибло 5 животных. Семикратное введение препарата крысам (280 000 мг/кг) вызвало гибель 4 особей в течение первых суток, клинические признаки интоксикации были схожи с описанными у мышей.

Шести- и восьмикратное применение хромарцина мышам и крысам (в дозах 240 000 и 320 000 мг/кг соответственно) привело к 100 %-ной гибели экспериментальных животных в первые часы после последнего введения. В последующий период наблюдений гибели животных не отмечалось. Состояние выживших мышей и крыс всех экспериментальных групп полностью стабилизировалось по истечении 48–72 часов после затравки.

У мышей и крыс контрольных групп после третьего и пятого введений воды отмечали вялость и несколько заторможенную реакцию на внешние раздражители. После шести- (мышкам) и восьмикратного (крысам) внутрижелудочного введения воды у животных отсутствовали аппетит и жажда. В первые 24–36 часов после завершения эксперимента состояние контрольных животных полностью нормализовалось, они охотно начали принимать корм и воду, активно передвигались по клеткам и реагировали на внешние раздражители. Гибели животных в контрольных группах не было.

Полученные в опыте данные представлены в табл. 2.

Таблица 2. Данные, характеризующие токсичность препарата «Хромарцин» в остром опыте на мышах и крысах

№ группы	Вид животных					
	мыши			крысы		
	кол-во жив-х, гол			кол-во жив-х, гол		
	общее	пало	выжило	общее	пало	выжило
I	6	6	0	6	6	0
II	6	5	1	6	4	2
III	6	3	3	6	2	4
IV	6	2	4	6	2	4
V	6	1	5	6	1	5
VI	6	0	6	6	0	6
контроль (VII)	6	0	6	6	0	6

Расчёты показали, что среднесмертельная доза препарата на основе наночастиц микроэлементов при внутрижелудочном введении для белых мышей составила 146 667 мг/кг массы, а для лабораторных крыс – 240 000 мг/кг.

По результатам вскрытия и макроскопического исследования внутренних органов павших и эвтаназированных экспериментальных животных, получавших хромарцин в исследуемом диапазоне доз, каких-либо патологических изменений внутренних органов обнаружено не было.

Заключение. ЛД₅₀ препарата «Хромарцин» при его многократном внутрижелудочном введении лабораторным мышам и крысам составила 146 667 и 240 000 мг/кг живой массы соответственно, что, согласно ГОСТ 12.1.007, позволяет отнести его к IV классу опасности, т.е. веществам малоопасным.

ЛИТЕРАТУРА

1. Переваримость рациона и баланс питательных веществ при скормливании телятам нанопорошков кобальта и меди / Е. Ильичёв [и др.] // Молочное и мясное скотоводство. – 2011. – № 5. – С. 27–29.
2. 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.
3. Ankamwar, B. Biocompatibility of Fe₃O₄ nanoparticles evaluated by in vitro cytotoxicity assays using normal, glia and breast cancer cells / B. Ankamwar, T. C. Lai, J. H. Huang, R. S. Liu, M. Hsiao, C. H. Chen, Y. K. Hwu // Nanotechnology. – 2010. – № 21 (7). – P. 75–102.
4. Connor E. E Gold nanoparticles are taken up by human cells but do not cause acute cytotoxicity / E.E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, [et al.] // Small. – 2005. – № 1. – P. 325–327.
5. Kroll, A. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges / A. Kroll, M.H. Pillukat, D. Hahn, J. Schnekenburger // European journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2009. – № 72 (2) – P. 370–377.
6. Lin, W. Cytotoxicity and cell membrane depolarization induced by aluminum oxide nanoparticles in human lung epithelial cells A549 / W. Lin, I. Stayton, Yu-W. Huang, X.-D. Zhou, Y. Ma // Toxicological & Environmental Chemistry. September-October 2008. – Vol. 90, № 5. – P. 983–996.
7. 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.
8. Wang, J. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration / J. Wang, G. Zhou, C. Chen, [et al.] // Toxicology Letters. – 2007. – V. 168. – №. 2 – P. 176–185.
9. Warheit, D. B. Pulmonary toxicity studies in rats with triethoxyoctylsilane (OTES)-coated, pigment-grade titanium dioxide particles: bridging studies to predict inhalation hazard / D. B. Warheit, K. L. Reed, T. R. Weeb // Experimental Lung Research. – 2003. – V. 29. – № 6. – P. 593–606.

10. Wright, J. B. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing / J.B. Wright, K. Lam, A.G. Buret, M.E. Olson, R.E. Burrell // Wound Repair Regen. – 2002. – V. 10 (3). – P. 141.