

ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НАНОРАЗМЕРНОЙ ФОРМЫ 20-ГИДРОКСИЭКДИЗОНА ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ

К.Т. Еримбетов^{1,2}, А.В. Федорова¹,
А.Я. Гончарова², О.В. Обвинцева¹

¹Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», 249013, Калужская обл. г. Боровск, пос. Институт, Российская Федерация
²ООО «Научно-исследовательский центр «Парк активных молекул», Калужская обл., 249030, г. Обнинск, Российская Федерация

Впервые получена и предложена наноразмерная форма 20-гидроксиэкдизона в виде клатратного комплекса с арабиногалактаном со средним размером частиц 35,3 нм. В результате изучения острой токсичности выявлено, что новая наноразмерная форма 20-гидроксиэкдизона относится к VI классу относительно безвредных лекарственных веществ по Hodge и к 5 классу токсичности, в соответствии с ГОСТ 32644-2014.

Ключевые слова: 20-гидроксиэкдизон, арабиногалактан, наноразмерная форма, фармацевтическая субстанция, острая токсичность, клатратный комплекс.

Цит: К.Т. Еримбетов, А.В. Федорова, А.Я. Гончарова, О.В. Обвинцева. Острая токсичность наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона при внутрижелудочном введении. Токсикологический вестник. 2021; 2: 59-63.

Введение. Одним из инновационных подходов к созданию нового поколения препаратов является применение в их составе фитопрепаратов, повышающих резистентность организма и обеспечивающих нормальное функционирование всех его органов и систем. В этом плане значительный интерес представляют растительные источники фитоэкдистероидов – полигидроксилированные стероиды, которые не оказывают гормонального действия на млекопитающих. Одним из наиболее широко изучаемых фитоэкдистероидов является 20-гидроксиэкдизон, входящий в состав некоторых видов лекарственных растений. Множественность физиологических эффектов 20-гидроксиэкдизона позволяет применять его как индивидуальное соединение, так и в составе комбинированных препаратов. За последние годы отмечается большой прогресс в изучении 20-гидроксиэкдизона, интенсивно исследуются его фармакологическое действие при различных патологиях и корригирующие свойства в отношении об-

мена веществ в организме [1,2,3,4]. Современные тенденции разработки новых препаратов основываются на создании наноструктурных композиций с улучшенными характеристиками. Одним из подходов к созданию наноразмерной формы препаратов, в частности 20-гидроксиэкдизона является синтез его клатратного комплекса с клатратообразователем арабиногалактаном. Полученная таким образом наноразмерная форма 20-гидроксиэкдизона обеспечивает улучшение его физико-химических свойств, что приводит к увеличению всасываемости, повышению биодоступности и, в конечном итоге, позволяет снизить терапевтические дозы [5,6]. Для новой разработанной наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона особо актуальным является проведение токсикологических исследований, в частности на первом этапе - изучение острой токсичности

Цель работы: оценка острой токсичности новой наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона в экспериментах на крысах.

Еримбетов Кенес Тагаевич (Erimbetov Kenes Tagaevich), доктор биологических наук, научный руководитель аспиранта Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных – филиал ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста, руководитель Службы доклинических и клинических исследований, ООО «Научно-исследовательский центр Парк Активных Молекул», г. Обнинск, Калужская обл., erimbetovkt@mail.ru;

Федорова Елена Владимировна (Fedorova Alena Vladimirovna), аспирант, ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных - филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ им. Л.К. Эрнста», г. Боровск, Калужская обл., ledifav@yandex.ru;

Гончарова Анна Яковлевна (Goncharova Anna Yakovlevna), кандидат биологических наук, директор ООО «Научно-исследовательский центр Парк Активных Молекул», г. Обнинск, Калужская обл., goncharova@ram-alliance.ru;

Обвинцева Ольга Витальевна (Obvintseva Olga Vital'evna), кандидат биологических наук, младший научный сотрудник, ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных - филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства - ВИЖ им. Л.К. Эрнста», г. Боровск, Калужская обл., obvintseva.olga@yandex.ru.

Материалы и методы исследования. Наноразмерная форма 20-гидроксиэкдизона создана на основе синтеза клатратного комплекса с арабиногалактаном с применением твердофазного метода получения на шаровой мельнице Активатор 2S с материалом помольных стаканов из корунда и шаров из оксида циркония диаметры 3, 5 и 10 мм. Измерение размера полученных частиц проведено на приборе Zetasizer Nano ZS.

Изучение острой токсичности фармацевтической субстанции (производитель ооо «Фитопанacea», кристаллический порошок белого цвета, чистота (по вэжж) – 98,58%) и наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона проведено в соответствии с методическими рекомендациями, представленными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [7] и монографии [8]. Основой данного исследования является токсикометрический метод оценки острой токсичности фармацевтической субстанции и наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона при однократном введении с анализом причин наступления гибели и клинической картины интоксикации. В соответствии с ГОСТ 32644-2014 и классификацией Hodge et al. [9,10] устанавливали класс токсичности фармацевтической субстанции и наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона.

Для решения поставленной цели были проведены 2 серии экспериментов на крысах Wistar обоего пола. В первом эксперименте в соответствии с ГОСТ 32644-2014 проведено изучение острой токсичности фармацевтической субстанции 20-гидроксиэкдизон на крысах Wistar (самках) с массой тела 230-240 г, возраст 12-13 недель. Животные были разделены на 5 групп по 3 животных. Во втором эксперименте проведено исследование острой токсичности наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона на крысах Wistar (самцы и самки), с массой тела 240-250 г, возраст 13-14 недель. Крысы были разделены на 7 групп по 5 животных обоего пола. Животных содержали в клетках Т-4 по 3 и 5 особей в условиях искусственного освещения (12 часов светлого и темного времени) с принудительной 16-кратной в час вентиляцией, при температуре 20-22°C и относительной влажности 50-65% на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к питьевой водопроводной воде и брикетированному корму. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 14 суток после введения фармацевтической субстанции и наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона. Крысы в первый день после введения препаратов находились под непрерывным наблюдением. Регулярно фиксировалось общее состояние, особенности поведения и двигательной активности, регистри-

ровались сроки развития интоксикации и гибели животных, изменения массы тела выживших особей.

Свежеприготовленные суспензии фармацевтической субстанции 20-гидроксиэкдизона, приготовленном в 1 % крахмальном геле вводились в желудок (на голодный желудок) металлическим зондом крысам в диапазоне доз 1000-5000 мг/кг массы тела.

Для внутрижелудочного введения наноразмерную форму 20-гидроксиэкдизона растворяли в 1% крахмальном геле до получения суспензии однородной консистенции. Свежеприготовленные суспензии вводились в желудок (на голодный желудок) металлическим зондом крысам в диапазоне доз 1000-20000 мг/кг массы тела.

Статистическая обработка результатов исследований была проведена с применением параметрических и непараметрических методов. Различия между группами считались статистически значимыми при $P \leq 0,05$ [11].

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований получен новый клатратный комплекс 20-гидроксиэкдизона с арабиногалактаном при масс. соотношении: 1:10. Полученный клатратный комплекс имеет кристаллическую форму и выделен в виде наночастиц мелкодисперсного подвижного порошка светло желтого цвета со средним размером частиц 35,3 нм.

Результаты исследований острой токсичности показали, что при однократном внутрижелудочном введении крысам фармацевтической субстанции 20-гидроксиэкдизона в диапазоне доз 1000-5000 мг/кг массы тела за период наблюдения не отмечено гибели животных и ее влияния на шерстный покров, потребление корма, изменение массы тела животных. Вместе с тем введение фармацевтической субстанции вызывает повышение возбудимости и спонтанной двигательной активности, выраженную исследовательскую реакцию, периодически длительные акты груминга. Эти проявления нарастают с возрастанием дозы и продолжаются в течение 1-2 часов непрерывной деятельности по сооружению гнезда. Наблюдение за опытными животными в течение последующих 2 недель не выявило каких-либо отклонений в их состоянии и поведении. По данным литературы для мышей ЛД₅₀ 20-гидроксиэкдизона была на уровне 9,0 г/кг массы тела при внутрижелудочном его введении [12]. В соответствии с ГОСТ 32644-2014, признавая необходимость защиты животных, максимальная доза внутрижелудочного введения при тестировании 20-гидроксиэкдизона составила 5000 мг/кг. При этой дозе не отмечено гибели животных и признаков интоксикации.

Фармацевтическую субстанцию 20-гидроксиэкдизон по данным токсикометрических исследова-

дований и наблюдения за подопытными крысами в течение 14 суток следует отнести к V классу практически нетоксичных веществ [10]. В соответствии с ГОСТ 32644-2014 фармацевтическую субстанцию 20-гидроксиэкдизон можно отнести к 5 классу токсичности.

С целью оценки параметров острой токсичности наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона осуществляли ее внутрижелудочное введение крысам обоего пола в возрастающих дозах по методу пробит-анализа Литчфилда-Уилкоксона [11, 13]. Исследование токсичности высоких доз препарата удалось провести при 4-х кратном с интервалом 1 час внутрижелудочном введении крысам 1/4 указанных доз.

Результаты определения острой токсичности наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона приведены в таблице. Внутрижелудочное однократное введение наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона в диапазоне доз 1000-20000 мг/кг массы тела не приводило к гибели крыс, изменениям их внешнего вида, в потреблении корма. Проявления клинических признаков интоксикации, в частности угнетение, затрудненное дыхание, снижения двигательной активности, возбудимости, связанные с введением больших объемов жидкостей в интервале действующих доз от 8000 до 20000 мг/кг, проходили в течение 1 суток наблюдения.

В процессе наблюдения за подопытными крысами не было выявлено гибели и различий в проявлении клинических признаков интоксикации между самками и самцами. На основании этого можно сделать вывод о том, что не выявлено существенных половых различий в чувствительности к токсическому действию фармацевтической субстанции и наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона при ее внутрижелудочном введении крысам.

Из-за отсутствия гибели животных при внутрижелудочном введении наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона в дозах до 20000 мг/кг в максимально допустимом объеме для крыс – 6,0 мл не было возможности установить ее ЛД₅₀. Ограничения по объемам внутрижелудочного введения жидкости крысам не позволили изучить ее токсичность в более высоких дозах, чем 20000 мг/кг массы тела. При этом высшая суточная терапевтическая доза, в качестве метаболического средства составляет 30 мг на человека.

После макроскопического исследования органов были получены следующие результаты:

- сердце состоит из правильно располагающихся волокон в виде пучков, патологических изменений не обнаружено;
- легкие имели умеренное полнокровие, просветы альвеол и бронхов свободны, встречаются скопления лейкоцитов, а после разреза – свежие кровоизлияния;

Таблица

Результаты исследования острой токсичности наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона

Дозы, мг/кг	Общее количество крыс	Количество павших животных	Клиника интоксикации
1000	5♂+5♀	0	признаки умеренной возбудимости, спонтанной двигательной активности, исследовательской реакции
2000	5♂+5♀	0	признаки умеренной возбудимости, спонтанной двигательной активности, исследовательской реакции
4000	5♂+5♀	0	усиление возбудимости, спонтанной двигательной активности, исследовательской реакции периодически груминг, непрерывная деятельность по сооружению гнезда
8000	5♂+5♀	0	повышенная возбудимость, признаки снижения двигательной активности, выраженная исследовательская реакция, периодически длительные акты груминга
12000	5♂+5♀	0	признаки снижения двигательной активности, возбудимости, периодически длительные акты груминга
16000	5♂+5♀	0	умеренное угнетение, связанное с введением больших объемов жидкостей, сниженная двигательная активность
20000	5♂+5♀	0	умеренное угнетение, связанное с введением больших объемов жидкостей, сниженная двигательная активность, затрудненное дыхание

– печень крыс без пятен, патологических изменений не имела, размеры в пределах нормы, внутриклеточная жидкость клеток печени зернистая.

– почки имели стандартные размеры, патологии не обнаружено, без особых изменений;

– желудок и кишечник имели нормальную эпителиальную ткань, без патологических изменений.

Однократное внутрижелудочное введение крысам 20-гидроксиэкдизона в исходной и наноразмерной форме в диапазоне исследованных доз не вызвало каких-либо патологических изменений в их организме.

Новую наноразмерную форму 20-гидроксиэкдизона по данным токсикометрии и наблюдения за подопытными крысами в течение 14 суток можно отнести к VI классу относительно безвредных

лекарственных веществ. В соответствии с ГОСТ 32644-2014 наноразмерная форма 20-гидроксиэкдизона относится к 5 классу токсичности.

Таким образом, в результате проведенных исследований установили, что при однократном внутрижелудочном введении крысам 20-гидроксиэкдизона в исходной и наноразмерной форме по параметрам токсичности существенных различий не обнаружено.

Выводы.

1. Впервые получена и исследована наноразмерная форма 20-гидроксиэкдизона в виде клатратного комплекса с арабиногалактаном.

2. Установлено, что разработанная наноразмерная форма 20-гидроксиэкдизона относится к VI классу относительно безвредных лекарственных веществ по Hodge и к 5 классу токсичности, в соответствии с ГОСТ 32644-2014.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Володин В.А., Сидорова Ю. С., Мазо В.К. 20-гидроксиэкдизон – растительный адаптоген: анаболическое действие, возможное использование в спортивном питании // Вопросы питания. 2013; 82 (6) :24-30.
2. Anthony T.G., Mirek E.T., Bargoud A.R., Phillipson-Weiner L, DeOliveira C.M., Wetstein B., Graf B.L., Kuhn P.E., Raskin I. Evaluating the effect of 20-hydroxyecdysone (20HE) on mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in the skeletal muscle and liver of rats // Appl. Physiol. Nutr. Metabol. 2015; 40:1324-1328.
3. Erimbetov K.T., Obvintseva O.V., Fedorova A.V., Zemlyanoy R.A., Solovieva A.G. Phenotypic regulation of animal skeletal muscle protein metabolism // Ukrainian Journal of Ecology. 2019; 9 (4):651-656.
4. Kumar R.N., Sundaram R., Shanthy P. Protective role of 20-OH ecdysone on lipid profile and tissue fatty acid changes in streptozotocin induced diabetic rats // European Journal of Pharmacology. 2013; 698 (1-3):489- 498.
5. Розиев Р.А., Гончарова А.Я., Еримбетов К.Т., Подгородниченко В.К. Клатратный комплекс арабиногалактана или гуммиарабика с 20-гидроксиэкдизоном, способ его получения (варианты), фармацевтическая композиция и лекарственное средство // Патент на изобретение РФ № 2572334. 10.01.2016 Бюл. № 1.
6. Федорова А.В., Еримбетов К.Т., Бондаренко Е.В., Гончарова А.Я., Фрог Е.С. Разработка наноразмерной формы 20-гидроксиэкдизона // Эксперим. клин. фармакол. 2018; 81:254.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под редакцией Миронов А.Н. - М.: Гриф и К, 2012 – 944 с.
8. Безопасность лекарств: от доклиники к клинике: монография. Под редакцией А.Л. Хохлова. Москва-Ярославль: ООО «Фотолайф», 2018, - 275 с.
9. ГОСТ-32644-2014. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность – метод определения класса острой токсичности. 2015.
10. Hodge H.C., Gosselin R.E., Smith R.P., Gleason M.N. Clinical Toxicology of Commercial Products // Acute Poisoning. 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore. 1975; 427.
11. Жаворонков Л.П. Основы прикладной медико-биологической статистики. Методическое пособие. Обнинск: ФГБУ МРНЦ Минздрава России. 2012. - 60 с.
12. Ogawa S., Nishimoto N., Matsuda H. Pharmacology of ecdysones in vertebrates // Invertebrate endocrinology and hormonal heterophyly / Ed. W.J. Burdette. Berlin: Springer, 1974. P. 341-344.
13. Проzorовский В.В. Статистическая обработка результатов фармакологических исследований. Психофармакология и биологическая наркология. 2007; 7 (3):2090-2120.

REFERENCES:

1. Volodin V.A., Sidorova Yu.S., Maso V.K. 20-hydroxyecdysone - a plant adaptogen: anabolic effect, possible use in sports nutrition // Nutrition Issues. 2013; 82 (6): 24-30. (In Russian)
2. Anthony T.G., Mirek E.T., Bargoud A.R., Phillipson-Weiner L, DeOliveira C.M., Wetstein B., Graf B.L., Kuhn P.E., Raskin I. Evaluating the effect of 20-hydroxyecdysone (20HE) on mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in the skeletal muscle and liver of rats // Appl. Physiol. Nutr. Metabol. 2015; 40:1324-1328.
3. Erimbetov K.T., Obvintseva O.V., Fedorova A.V., Zemlyanoy R.A., Solovieva A.G. Phenotypic regulation of animal skeletal muscle protein metabolism // Ukrainian Journal of Ecology. 2019; 9 (4):651-656.
4. Kumar R.N., Sundaram R., Shanthy P. Protective role of 20-OH ecdysone on lipid profile and tissue fatty acid changes in streptozotocin induced diabetic rats // European Journal of Pharmacology. 2013; 698 (1-3):489- 498.
5. Roziev R.A. et al. Clathrate complex of arabinogalactan or gum arabic with 20-hydroxyecdysone, method for its preparation (options), pharmaceutical composition and drug // Patent RF, N 2572334; 2016. (In Russian)
6. Fedorova A.V., Erimbetov K.T., Bondarenko E.V., Goncharova A.Ya., Frog E.S. Development of a nanoscale form of 20-hydroxyecdysone // Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology. 2018; 81: 254. (In Russian)
7. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. Edited by A. Mironov - M.: Grif and K, 2012 - 944 p. (In Russian)
8. Drug safety: from preclinic to clinic: monograph. Edited by A.L. Khokhlova. Moscow-Yaroslavl: LLC Photolife, 2018, - 275 p. (In Russian)
9. GOST-32644-2014 Test methods for the effects of chemical products on the human body. Acute oral toxicity is a method for determining the class of acute toxicity. 2015. (In Russian)
10. Hodge H.C., Gosselin R.E., Smith R.P., Gleason M.N. Clinical Toxicology of Commercial Products // Acute Poisoning. 4th ed., Williams & Wilkins, Baltimore. 1975; 427.
11. Zhavoronkov L.P. Fundamentals of applied biomedical statistics. Toolkit. Obninsk: Federal State Budgetary Institution MRRC of the Ministry of Health and Social Development of Russia. 2012. - 60 p. (In Russian)
12. Ogawa S., Nishimoto N., Matsuda H. Pharmacology of ecdysones in vertebrates // Invertebrate endocrinology and hormonal heterophyly / Ed. W.J. Burdette. Berlin: Springer, 1974. P. 341-344.
13. Prozorovsky V.B. Statistical processing of pharmacological research results. Psychopharmacology and biological narcology. 2007; 7 (3): 2090-2120. (In Russian)

K.T. Erimbetov^{1,2}, A.V. Fedorova¹, A.Ya. Goncharova², O.V. Obvintseva¹

ACUTE TOXICITY OF NANOSCALE FORM OF 20-HYDROXYECDYSONE IN INTRAGASTRIC ADMINISTRATION

¹All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition - a branch of the Federal Science Center of Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 249013, Kaluga Region, Russian Federation

²Research Center "Park of Active Molecules", 249030, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

The nanoscale 20-hydroxyecdysone was first proposed and obtained in the form of a clathrate complex with arabinogalactan with an average particle size of 35,3 nm. The study of its acute toxicity has revealed that the product belongs to class VI of relatively harmless drugs according to Hodge and to class 5th in accordance with GOST 32644-2014.

Keywords: 20-hydroxyecdysone, arabinogalactan, nanoscale form, pharmaceutical substance, acute toxicity, clathrate complex.

Quote: K.T. Erimbetov, A.V. Fedorova, A.Ya. Goncharova, O.V. Obvintseva. Acute toxicity of nanoscale form of 20-hydroxyecdysone in intragastric administration. Toxicological review. 2021; 2:59-63.

Переработанный материал поступил в редакцию 02.02.2021 г.



ЮБИЛЕЙНЫЕ ДАТЫ

САВАТЕЕВ НИКОЛАЙ ВАСИЛЬЕВИЧ

(к 100-летию со дня рождения)

22 марта 2021 года исполнилось 100 лет со дня рождения доктора медицинских наук, профессора, лауреата Государственной премии СССР, Заслуженного работника высшей школы РФ, почетного доктора Военно-медицинской академии, генерал-майора медицинской службы Саватеева Николая Васильевича.

Н.В. Саватеев родился в 1921 в г. Петрограде. После окончания в 1944 г. Военно-морской медицинской академии был направлен на флот. Участвовал в боевых действиях в составе частей Ленинградского фронта, Беломорской флотилии, Балтийского Флота и Амурской флотилии, имел ранения. За мужество и героизм, проявленные в годы Великой Отечественной войны и войны с Японией Н.В. Саватеев был награжден орденом Отечественной войны I степени, двумя орденами Красной Звезды, орденом «Знак почета» и другими медалями и памятными знаками.

В 1947 г. поступил в адъюнктуру при кафедре токсикологии и санитарно-химической защиты Военно-морской медицинской академии. Успешно защитил кандидатскую диссертацию и в 1950 г. был назначен преподавателем кафедры токсикологии и санитарно-химической защиты Военно-морской медицинской академии. С 1956 г. по 1961 г. проходил службу в Научно-исследовательском институте Военно-морского флота на различных должностях в отделе корабельной токсикологии. В 1960 г. защитил докторскую диссертацию, в 1962 г. ему присвоено ученое звание



профессора. С 1961 г. по 1969 гг. проходил службу в Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, где последовательно занимал должности старшего преподавателя и заместителя начальника кафедры военно-полевой терапии.

В 1970 г. назначен на должность начальника Научно-исследовательского института военной медицины МО СССР, которым руководил до 1973 г. С момента создания в 1972 г. и до 1986 г. возглавлял кафедру токсикологии и медицинской защиты Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова, одновременно исполняя обязанности ученого секретаря Ученого совета академии.