

ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-2-21-24

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ $\alpha(1,2)$ -L-РАМНО- $\alpha(1,4)$ -D-ГАЛАКТОПИРАНОЗИЛУРОНАНА *Acorus calamus L.* В ФОРМЕ ИНЪЕКЦИОННОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

К. А. Лопатина¹, А. А. Чурин^{1, 2}, А. М. Гурьев³, Е. П. Зуева¹, Т. И. Фомина¹, Т. И. Ветошкина¹, Т. Ю. Дубская¹, Т. Ю. Ламзина¹, Л. А. Садрикина¹, Е. П. Федорова¹, О. В. Неупокоева¹, Е. А. Сафонова¹, Т. Г. Разина¹, С. Г. Крылова¹, Е. Н. Амосова¹, О. Ю. Рыбалкина¹, М. В. Белоусов³

В рамках доклинического исследования проведено изучение острой и хронической токсичности (1,2)-L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus L.* в форме нового инъекционного средства, планируемого для использования в химиотерапии опухолей. Результаты острого эксперимента показали, что введение этого вещества в указанной лекарственной форме мышам и крысам в максимально допустимом объеме не оказывает токсического действия на организм животных. По результатам исследования хронической токсичности при введении лекарственного средства крысам внутрибрюшинно в дозах 20, 100 и 200 мг/кг в течение 3 мес не отмечено гибели животных и каких-либо патологических изменений их общего состояния, динамики массы тела, функциональной активности изученных внутренних органов и систем. Выявлено дозозависимое местнораздражающее действие.

Ключевые слова: полисахариды; *Acorus calamus L.*; острая токсичность; хроническая токсичность; доклинические исследования; крысы; мыши.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема химиотерапии злокачественных новообразований является актуальной и предполагает разработку новых средств, способных повышать эффективность специфического лечения и уменьшать побочные проявления терапии. Перспективными в этом плане являются полисахариды растительного происхождения, которые обладают широким спектром фармакологических эффектов, направленных на восстановление нарушенного цитостатическими агентами гомеостаза [6]. В НИИФиРМ имени Е. Д. Гольдберга Томского НИМЦ (Томск) и ГБОУ ВПО СибГМУ Минздрава России (Томск) проведена работа по доклиническому изучению $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана в форме инъекционного средства. На базе Центра внедрения технологий СибГМУ и лаборатории инновационных фармацевтических технологий разработаны методы выделения и изучения химической

структуры (мономерный состав, характер гликозидных связей, молекулярная масса), извлечения индивидуальных полисахаридов из растительного сырья [7]. Разработаны лабораторный регламент и проект фармакопейной статьи предприятия на субстанцию, состав и технологии получения инъекционной лекарственной формы. Показана принципиальная возможность применения исследуемого лекарственного средства как изолированно, так и совместно с цитостатическими препаратами различного типа действия (паклитаксел, циклофосфан, 5-фторурацил) для лечения злокачественных новообразований. Установлено, что противоопухолевый и антиметастатический эффект цитостатиков увеличивается при одновременном применении с исследуемым лекарственным средством за счет снижения их токсического влияния на здоровые ткани организма: костный мозг; печень; эпителий тонкого кишечника [8, 10, 11]. Раскрыты некоторые механизмы действия полисахаридов айра болотного, показано, что под их влиянием происходит активация противоопухолевой иммунной защиты и переключение неэффективного в отношении опухоли Th2-ответа на более специфичный Th1-ответ [5]. Ранее была проведена предварительная оценка безопасности субстанции суммы водорастворимых полисахаридов айра болотного [2, 3, 4]. Цель настоящей работы — токсикологическое исследование $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus L.* в форме инъекци-

¹ ФГБНУ «Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук» «Научно-исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е. Д. Гольдберга», Россия, 634028, Томск, пр. Ленина, 3.

² ФГА ОУ ВО «Национальный исследовательский Томский государственный университет», Россия, Томск.

³ ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 634050, Томск, Московский тракт, 2.

онного препарата в условиях острого и хронического экспериментов на животных. Работа выполнена по Государственному контракту от 14 мая 2012 г. № 16.N08.12.1012 в рамках Федеральной целевой программы “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 г. и дальнейшую перспективу”.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В остром эксперименте использовали конвенциональных аутбредных мышей CD-1 и аутбредных крыс CD 1-й категории (сертификат здоровья лабораторных животных имеется); при изучении хронической токсичности — аутбредных крыс CD (самцы, самки). Животные предоставлены отделом экспериментальных биологических моделей НИИФиРМ имени Е. Д. Гольдберга. Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986); ГОСТ Р 53434 – 2009 “Принципы надлежащей лабораторной практики” (идентичен GLP OECD); “Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств” [9].

В исследовании использовали $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus* L. в виде 1 % стерильного изотонического раствора, полученного экстемпорально в лабораторных условиях из субстанции $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. серии № 010813. Стерилизацию проводили методом ультрафильтрации через капсулу Sartobran P 0,2 μm (с размером пор 0,2 мкм). Действующим веществом является $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан, выделенный из корневищ аира болотного *Acorus calamus* L.

В остром эксперименте использованы несколько уровней доз в пересчете на действующее вещество с учетом максимально допустимого объема введения препарата [4]: мышам (самцам, самкам) вводили внутривентрикулярно 200, 400, 600 мг/кг; внутрибрюшинно — 300, 400, 600 мг/кг; внутривенно — 100, 200, 300 мг/кг. Крысам (самцам и самкам) вводили внутривентрикулярно 100, 300, 500 мг/кг; внутрибрюшинно — 200, 300, 400 мг/кг; внутривенно — 60, 100, 160 мг/кг. Введение осуществляли одно- или двукратно.

При изучении хронической токсичности $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. вводили крысам с исходной массой 150 – 170 г внутрибрюшинно ежедневно в дозах 20, 100 и 200 мг/кг в течение 3 мес. В каждой экспериментальной группе было по 30 крыс (15 самок и 15 самцов). Контрольная группа состояла из 30 крыс (15 самок и 15 самцов), которые получали в те же сроки внутрибрюшинно физиологический раствор в объеме, эквивалентном растворителю препарата в большей дозе.

Изучение острой токсичности проведено для определения переносимых, токсических и летальных доз

исследуемого лекарственного средства при внутрижелудочном, внутрибрюшинном и внутривенном введении, установления причин наступления гибели животных в течение 14 сут, изучения влияния его на общее состояние. Осмотр экспериментальных животных осуществляли ежедневно в утренние часы. Регистрировали интегральные показатели здоровья животных: внешнее состояние, отклонения в потреблении корма и воды, прирост массы тела. В качестве параметров острой токсичности рассматривали изменение массы тела на 8 и 15 сут после введения лекарственного средства, число погибших и выживших животных, продолжительность жизни.

Длительность наблюдения за лабораторными животными в хроническом эксперименте составила 3,5 мес. Наблюдение за животными для выявления отклонений в состоянии здоровья и смертности проводили 1 раз в сутки непосредственно перед введением препарата. Осматривали внешний вид животных, оценивали двигательную активность и реакцию на внешние раздражители. Массу тела определяли еженедельно перед введением исследуемого лекарственного средства. Массу тела выражали в г, прирост массы тела относительно исходного значения — в процентах. Потребление корма регистрировали еженедельно визуально.

В ходе наблюдений в хроническом эксперименте у крыс (самцов и самок) проводили гематологические и биохимические исследования, определяли почечный метаболизм, оценивали влияние лекарственного средства на функцию сердца, показатели деятельности ЦНС, отбирали органы и ткани для гистологического анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В остром эксперименте на мышах показано, что введение $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в инъекционной лекарственной форме внутривентрикулярно в дозах 200, 400, 600 мг/кг; внутрибрюшинно в дозах 300, 400, 600 мг/кг и внутривенно в дозах 100, 200, 300 мг/кг не оказывает токсического действия на организм животных при наблюдении в течение 14 сут, не приводит к гибели. Наблюдение за животными в течение 14 сут не выявило изменений внешнего вида, аппетита, поведения и двигательной активности мышей. При взвешивании на 8 и 15 сут отмечено, что у всех животных увеличивалась масса тела. Показатели их массы тела не отличались от таковых в соответствующих контрольных группах. Динамика показателя прироста массы тела экспериментальных животных также не отличалась от соответствующих контрольных значений.

Аналогичные результаты показаны в остром эксперименте на крысах, введение $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus* L. в инъ-

екционной лекарственной форме внутривенно в дозах 100, 300, 500 мг/кг, внутривенно в дозах 200, 300, 400 мг/кг, внутривенно в дозах 60, 100, 160 мг/кг не оказывает токсического действия на организм животных при наблюдении в течение 14 сут, не приводит к гибели, не вызывает изменений внешнего вида, аппетита, поведения и двигательной активности. Прирост массы тела во всех экспериментальных группах не отличался от контрольных значений.

С учетом классификации степени токсичности химических веществ согласно ГОСТ 12.1.007–76 $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus L.* в инъекционной лекарственной форме при внутривенном введении может быть отнесен к третьему классу умеренно токсичных веществ. При внутривенном и внутривенном способах введения лекарственное средство может быть также отнесено к третьему классу умеренно токсичных веществ согласно классификации, предложенной И. В. Березовской [1]. Отнесение к третьему классу опасности можно считать условным, так как при введении исследуемого препарата в максимально допустимом объеме гибели ни в одной из экспериментальных групп не наблюдали, что свидетельствует о том, что расчетное значение LD_{50} превышает достигнутые в экспериментальном наблюдении дозы препарата.

Во время 3-месячного введения препарата (хронический эксперимент) состояние крыс оставалось удовлетворительным, гибели животных не наблюдали. Все животные равномерно прибавляли в массе. Через 2 недели после отмены препарата масса и процент прироста массы во всех экспериментальных группах не отличались от контроля.

Анализ полученных результатов у крыс (самцов и самок) через 1,5 и 3 мес введения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus L.* в инъекционной лекарственной форме и через 2 недели после отмены препарата не выявил изменений со стороны показателей периферической крови (гемоглобин, эритроциты, ретикулоциты, гематокрит, тромбоциты, СОЭ, общее число лейкоцитов, базофилы, эозинофилы, незрелые нейтрофилы, зрелые нейтрофилы, моноциты, лимфоциты) в экспериментальных группах.

При исследовании костного мозга (недифференцированные бласты, миелобласты, незрелые нейтрофилы, зрелые нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, митозы клеток гранулоцитарного ряда, лимфоциты, моноциты, плазматические клетки, макрофаги, мегакарициты, эритронормобласты, митозы клеток эритроидного ряда, ОКК) у крыс через 1,5 и 3 мес применения $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus L.* в инъекционной лекарственной форме и через 2 недели после отмены не обнаружено каких-либо патологических изменений.

Результаты экспериментов показали, что введение $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранана *Acorus calamus L.* в инъекционной лекарственной форме в течение 3 мес не приводило к изменению биохимических показателей крови крыс (АлАТ, АсАТ, ЩФ, глюкоза, креатинин, мочевины, белок, холестерин, билирубин, калий, натрий, хлор), не отражалось на функциональном состоянии почек (рН, удельная плотность, суточный объем, содержание белка, содержание глюкозы, уробилиноген, нитриты, лейкоциты, скрытая кровь, кетоны, билирубин).

Согласно результатам проведенного исследования, 3-месячное введение исследуемого средства не оказывает влияния на показатели ориентировочно-исследовательского поведения у крыс обоих полов в тесте “открытое поле”, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых отличий между показателями опытных и контрольных групп животных.

Через 3 мес введения и после отмены препарата не выявлено нарушений сердечного ритма и проводимости. Длительность интервалов и амплитуда зубцов электрокардиограммы статистически достоверно не отличались от соответствующих значений у животных контрольной группы и не выходили за пределы физиологических норм, принятых для данного вида животных.

При макроскопическом исследовании на вскрытии у крыс обоих полов, получавших $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus L.* в инъекционной лекарственной форме, обнаружено умеренное полнокровие сосудов париетальной брюшины и тонкие спайки между органами брюшной полости. Степень выраженности обнаруженных изменений зависела от дозы препарата. Какой-либо другой патологии внутренних органов при макроскопическом осмотре не выявлено.

Основные паренхиматозные органы после вскрытия выделяли, взвешивали и вычисляли весовой коэффициент. Анализ полученных данных по массе и коэффициенту массы органов не выявил различий между контрольными и экспериментальными животными. Микроскопическое исследование внутренних органов всех крыс показало, что они имели обычное строение и не отличались от внутренних органов контрольных животных.

Таким образом, патоморфологическое исследование внутренних органов крыс, получавших $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуранан *Acorus calamus L.* в инъекционной лекарственной форме в дозах 20, 100 и 200 мг/кг ежедневно внутривенно в течение 3 мес, не выявило каких-либо патологических изменений. Препарат вызывает раздражение брюшины, что проявляется развитием стерильного продуктивного воспаления и утолщением серозных оболочек органов брюшной полости, которое сохраняется через 2 недели после отмены препарата. Выявленные в ис-

следовании результаты соответствуют ранее полученным данным наблюдений при изучении длительного введения субстанции $\alpha(1,2)$ -L-рамно- $\alpha(1,4)$ -D-галактопиранозилуронана *Acorus calamus* L. крысам и кроликам [2, 3].

ВЫВОДЫ

1. По результатам исследования острой токсичности исследованное лекарственное средство условно отнесено к третьему классу опасности, так как при внутрижелудочном, внутривенном и внутривентральном способах введения в максимально допустимом объеме препарата гибель экспериментальных животных не отмечена.

2. При хроническом наблюдении не выявлено значимых отклонений от соответствующих показателей здоровых животных со стороны клинических и лабораторных показателей, состояния нервной, сердечно-сосудистой систем, функции почек. Патоморфологические характеристики органов и тканей у крыс после хронического введения лекарственного средства не отличаются от таковых у контрольных животных.

3. Препарат оказывает местнораздражающее действие.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. В. Березовская, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(3), 32 – 34 (2003).
2. А. М. Гурьев, М. В. Белоусов, Р. Р. Ахмеджанов и др., *Бюл. сиб. мед.*, **3**, 57 – 65 (2010).
3. А. М. Гурьев, М. В. Белоусов, Р. Р. Ахмеджанов и др., *Бюл. сиб. мед.*, **6**, 18 – 23 (2010).
4. А. М. Гурьев, М. В. Белоусов, М. С. Юсубов и др., *Бюл. сиб. мед.*, **9**(1), 36 – 39 (2010).
5. М. Г. Данилец, Ю. П. Бельский, Н. В. Бельская и др., *Тихоокеанский мед. ж.*, **1**, 44 – 47 (2011).
6. Е. П. Зуева, К. А. Лопатина, Т. Г. Разина, А. М. Гурьев, *Полисахариды в онкологии*, Печатная мануфактура, Томск (2010).
7. А. П. Корж, А. М. Гурьев, М. В. Белоусов, М. С. Юсубов, *Фармация*, **4**, 24 – 26 (2011).
8. К. А. Лопатина, А. М. Гурьев, Т. Г. Разина, и др., *Сиб. онкол. ж.*, **3**, 59 – 63 (2006).
9. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Гриф и К, Москва (2013).
10. Е. А. Сафонова, А. М. Гурьев, Т. Г. Разина и др., *Рос. биотер. ж.*, **11**(4), 55 – 58 (2012).
11. Е. А. Сафонова, К. А. Лопатина, Т. В. Ветошкина и др., *Бюл. сиб. мед.*, **10**(1), 70 – 75 (2011).

Поступила 31.01.17

PRECLINICAL INVESTIGATION OF GENERAL TOXICITY OF A NEW INJECTION PREPARATION OF $\alpha(1,2)$ -L-RHAMNO- $\alpha(1,4)$ -D-GALACTOPYRANOZYLUROANE FROM *ACORUS CALAMUS* L.

К. А. Lopatina¹, А. А. Churin^{1,3}, А. М. Gur'ev², Е. Р. Zueva¹, Т. I. Fomina¹, Т. I. Vetoshkina¹, Т. Yu. Dubskaya¹, Т. Yu. Lamzina¹, L. A. Sadrikina¹, Е. Р. Fedorova¹, О. V. Neupokoeva¹, Е. А. Safonova¹, Т. G. Razina¹, S. G. Krylova¹, Е. N. Amosova¹, О. Yu. Rybalkina¹, and M. V. Belousov²

¹ E. D. Goldberg Research Institute of Pharmacology and Regenerative Medicine, Tomsk National Research Medical Center, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, ul. Lenina 3, Tomsk, 634028, Russia

² Siberian State Medical University, Moskovskii tract 2, Tomsk, 634050 Russia

³ Tomsk State University, prosp. Lenina 36, Tomsk, 634050 Russia

The acute and chronic toxicity of a new preparation of $\alpha(1,2)$ -L-rhamno- $\alpha(1,4)$ -D-galactopyranozylyuronane from *Acorus calamus* L. intended for antitumor therapy was studied at the stage of preclinical research. As a result of acute experiments, it was established that the drug administration in the maximum permissible amount had no toxic effects on test animals (rats and mice). The study of chronic toxicity showed that the new drug intraperitoneally administered in doses of 20, 100 and 200 mg/kg for three months did not cause death of animals or any pathological changes of their general condition, body weight dynamics, and functional activity of internal organs and systems. Clinical and laboratory parameters in animals during chronic experiments did not differ from those in healthy animals. Some dose-dependent local irritation was observed.

Keywords: polysaccharides; *Acorus calamus* L.; acute toxicity; chronic toxicity; preclinical investigation; rats; mice.