

- тов // Эксперим. и клин. фармакол. — 2003. — Т. 66, №6. — С. 20–23. [Dzhagatspanyan I.A., Parokinyan R.G., Nazaryan I.M. Experimental evaluation of the neurotropic spectrum of some antiepileptic drugs. *Ekspierimtal'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2003; 66 (6): 20–23. (In Russ.)]
3. Луценко Р.В. Производные 2-оксииндолин-3-гликоксилевой кислоты при резерпиновой модели депрессии // Вестн. Винницкого гос. мед. ун-та. — 2011. — №1. — С. 123–125. [Lutsenko R.V. The 2-oxiindolin-3-glyoxylic acid with reserpine-induced depression model. *Vestnik Vinnitskogo meditsinskogo universiteta*. 2011; 1: 123–125. (In Russ.)]
4. Луценко Р.В., Бобирьев В.Н., Девяткина Т.А. Анксиолитическое действие производных 2-оксииндолин-3-гликоксилевой кислоты: компьютерное прогнозирование и экспериментальное подтверждение // Казанский мед. ж. — 2013. — Т. 94, №4. — С. 553–560. [Lutsenko R.V., Bobir'ov V.N., Devyatkina T.A. Anxiolytic effect of 2-oxiindolin-3-glyoxylic acid derivatives: computer prediction and experimental confirmation. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2013; 94 (4): 553–560. (In Russ.)]
5. Рудакова И.Г., Белова Ю.А., Котов А.С. Фармако-резистентная эпилепсия поддается лечению // Вестн. эпилептол. — 2013. — №1. — С. 3–7. [Rudakova I.G., Belova Yu.A., Kotov A.S. Drug-resistant epilepsy is treatable. *Vestnik epileptologii*. 2013; 1: 3–7. (In Russ.)]
6. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Медицина, 2005. — 832 с. [Khabriev R.U. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*. (Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances.) Moscow: Meditsina. 2005; 832. (In Russ.)]
7. Canoun-Poirine F., Bastuji-Garin S., Alonso E. et al. Risk and prognostic factors of status epilepticus in the elderly: a case-control study // *Epilepsia*. — 2011. — Vol. 52, N 10. — P. 1849–1856.
8. Clements S., Schreck C.B. Evidence that GABA mediates dopaminergic and serotonergic pathways associated with locomotor activity in juvenile chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) // *Behavior Neurosci.* — 2004. — Vol. 118, N 1. — P. 191–198.
9. D'souza D.C., Gil R.B., Zuzarte E. et al. γ -Aminobutyric acid — serotonin interactions in healthy men: implications for network models of psychosis and dissociation // *Biol. Psychiatry*. — 2006. — Vol. 59. — P. 128–137.
10. Gerald M.C., Riffes W.H. Acute and chronic effects of d- and l-amphetamine on seizure susceptibility in mice // *Eur. J. Pharmacol.* — 1973. — Vol. 21, N 3. — P. 323–330.
11. Gregory L.H., Qian Z. Choosing the correct AED: from animal studies to the clinic // *Pediatr. Neurol.* — 2008. — Vol. 38, N 3. — P. 151–162.
12. Lopez-Meraz M.-L., Gonzalez-Trujano M.-E., Neri-Bazan L. et al. 5-HT_{1A}-receptor agonists modify epileptic seizures in three experimental models in rats // *Neuropharmacology*. — 2005. — Vol. 49. — P. 367–375.
13. Oni J.O., Awe O.E., Olajide A.O. et al. Anticonvulsant and depressant activities of the seed extracts of *Adnanthera parvonia* // *J. Natur. Products*. — 2009. — Vol. 2. — P. 74–80.
14. Ren-Qi H., Cathy L., Bell-Horner M.I. et al. Pentylentetrazole-induced inhibition of recombinant γ -aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors: mechanism and site of action // *J. Pharm. Experim. Therap.* — 2001. — Vol. 298, N 3. — P. 986–995.
15. Wesolowska A., Nikiforuk A., Chojnacka-Wójcik E. Anticonvulsant effect of the selective 5-HT_{1B} receptor agonist CP 94253 in mice // *Eur. J. Pharm.* — 2006. — Vol. 541, N 1–2. — P. 57–63.

УДК 612.084: 615.036.8: 615.099.092: 615.076.9

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ НАНОРАЗМЕРНОГО СВЕКЛОВИЧНОГО ПЕКТИНА

Надырбек Юльчибекович Алимжанов¹, Искандер Шаршеевич Чакеев^{2*},
Шарипа Жоробековна Жоробекова³, Индира Орозобаевна Кудайбергенова¹,
Борис Николаевич Ленишин²

¹Кыргызская государственная медицинская академия, г. Бишкек, Кыргызская Республика;

²Национальный центр онкологии Минздрава Кыргызской Республики, г. Бишкек, Кыргызская Республика;

³Институт химии Академии наук Кыргызской Республики, г. Бишкек, Кыргызская Республика

Реферат

DOI: 10.17750/КМЖ2015-208

Цель. Определение острой токсичности и класса опасности наноразмерного низкоэтерифицированного свекловичного пектина.

Методы. Использовали метод Кербера по изучению острой токсичности веществ, метод пробит-анализа разных значений летальной дозы способом наименьших квадратов, морфологические исследования, методы статистического анализа (непараметрические методы — критерий Вилкоксона-Манна-Уитни). Определение острой токсичности пектина проводили на 40 половозрелых крысах линии Wistar обоего пола с массой тела 160–230 г.

Результаты. Энтеральное введение крысам пектина в дозе 12 000 мг/кг массы тела животного не повлияло на их общее состояние и не привело к гибели животных. По результатам пробит-анализа получены следующие величины летальных доз (LD), вызывающих гибель 16, 50, 84 и 100% животных соответственно: LD₁₆ = 34 990,6542056074 ≈ 35 г/кг, LD₅₀ = 74 242,9906542057 ≈ 74 г/кг, LD₈₄ = 113 495,327102804 ≈ 113 г/кг, LD₁₀₀ = 133 121,495327103 ≈ 133 г/кг. При гистологическом исследовании препаратов органов крыс, получивших пектин в дозе 12 000 мг/кг массы тела, не выявлено структурных изменений тканей исследованных органов. Изучаемый препарат — наноразмерный низкомолекулярный пектин, может быть отнесен, согласно ГОСТ 12.1.007-76, к IV классу опасности (малоопасные вещества). По Hodge и Sterneг и классификации К.К. Сидорова субстанция пектина может быть отнесена к практически нетоксичным препаратам (LD₅₀ >10 000 мг/кг), что соответствует V классу соединений.

Вывод. Полученные результаты свидетельствуют о полной безопасности наноразмерных форм пектина, что открывает перспективы дальнейших исследований его биологических свойств.

Ключевые слова: острая токсичность, класс опасности, наноразмерный пектин.

ACUTE TOXICITY OF NANOSIZED BEET PECTIN

N.Yu. Alimzhanov¹, I.Sh. Chakeev², Sh.Zh. Zhorobekova³, I.O. Kudaybergenova¹, B.N. Lepshin²

¹Kyrgyz State Medical Academy, Bishkek, Kyrgyzstan;

²National Oncology Center of Kyrgyzstan Healthcare Ministry, Bishkek, Kyrgyzstan;

³Institute of Chemistry and Chemical technology of National Academy of Science of Kyrgyz Republic, Bishkek, Kyrgyzstan

Aim. To determine the acute toxicity and hazard class of nanosized low-esterified beet pectin.

Methods. To study the acute toxicity of substances, Kerber's method was used. Probit analysis for different values of lethal dose calculated by least squares method, as well as morphologic studies, statistical analysis (non-parametric methods – Wilcoxon-Mann-Whitney test) were used. Pectin toxicity was studied on 40 mature Wistar rats of both gender and body weight of 160–230 g.

Results. Enteral administration of 12 000 mg/kg of pectin did not affect the general condition and did not lead to lethal outcome. The following values of lethal doses were calculated using probit analysis: $LD_{50}=34\,990.6542056074\approx 35$ g/kg, $LD_{50}=74\,242.9906542057\approx 74$ g/kg, $LD_{84}=113\,495.327102804\approx 113$ g/kg, $LD_{100}=133\,121.495327103\approx 133$ g/kg. Histological study of rat organ tissues that received 12 000 mg/kg of pectin showed no structural changes in tissues of examined organs. Study drug – nanosized low molecular weight pectin, might be referred to hazard class IV (low hazard substances) according to GOST 12.1.007-76. and classification K.K. Sidorov Pectin substance may be considered as practically nontoxic drug ($LD_{50} > 10,000$ mg/kg), which corresponds to Class V compounds according to Hodge and Sterner classification and classification by K.K. Sidorov.

Conclusion. The results indicate complete safety of nanosized forms of pectin, which opens up prospects for further studies of the biological properties of this substance.

Keywords: acute toxicity, hazard class, nanosized pectin.

В последнее время полисахариды стали широко использовать в качестве полимерной стабилизирующей оболочки со свойствами легко растворимых биоактивных материалов полифункционального назначения [2]. Особый интерес среди этих веществ представляют растительные полисахариды – пектины.

Пектины – собирательное название группы структурно динамичных кислых полисахаридов, в которых элементарным звеном служит галактуроновая кислота. Макромолекула этих веществ содержит разные фрагменты линейной и разветвлённой областей. Структура пектинов зависит от многих факторов и может существенно меняться в процессе роста и развития растения [8].

Пектины представляют определённый интерес для медицины, так как обладают достаточно широким спектром фармакологических эффектов, которые детерминированы их низкой токсичностью, высокой биодоступностью и мембранотропностью [7, 8].

Известны препараты медицинского назначения, содержащие пектин, – викаир, викалин, плантаглоцид, гипохолестерин, фластахол, флавоглоцид, бутаквертин, глюкамин, которые применяют для лечения широкого круга заболеваний.

Многообещающим направлением в области создания новых препаратов медико-биологического назначения признана разработка полисахаридных наноконструктов [4].

Наноматериалы привлекают к себе достаточно серьёзное внимание из-за уникальных свойств, которые, прежде всего, обусловлены их размерами. Величина наночастиц может варьировать от единиц до сотен нанометров. Миниатюризация сопровождается

появлением «нетипичных» химических и биологических свойств, отличных от свойств молекул того же вещества [3].

В указанном контексте наше внимание привлёк наноразмерный пектин, полученный из свекловичного жома и обработанный по технологии высокоэнергичного диспергирования. Целью нашего исследования было определение острой токсичности наноразмерного свекловичного пектина.

Объектом исследования стал свекловичный пектин, диспергированный в шаровой мельнице при 1425 оборотах в минуту (материал шаров и ячейки – карбид вольфрама) в течение 10 мин. В обработанном таким образом пектине содержание D-галактуроновой кислоты составило 83,0%, карбоксильных и метоксильных групп – 14,8 и 4,6% соответственно, $M_w=15$ кДа [6]. Согласно данным, полученным с использованием ультразвукового анализатора размера частиц, указанное время обработки пектина является оптимальным, при котором показатели среднего размера частиц диспергированного пектина показали минимальные значения. На рис. 1 представлены данные электронной микроскопии размеров пектина после диспергирования.

Инфракрасные спектры пектина демонстрировали широкие пики поглощения с 3420 до 3330 cm^{-1} в области высоких частот. Эти пики соответствовали колебанию гидроксильных групп, участвующих в образовании водородных связей. В низкочастотной области ν (C=O) отмечен пик 1750 cm^{-1} , пик 1730 cm^{-1} соответствовал поглощению воды и отражал асимметричные колебания при 1630 cm^{-1} ионизированных карбоксильных групп ν_{as} (COO-). Максимальный пик

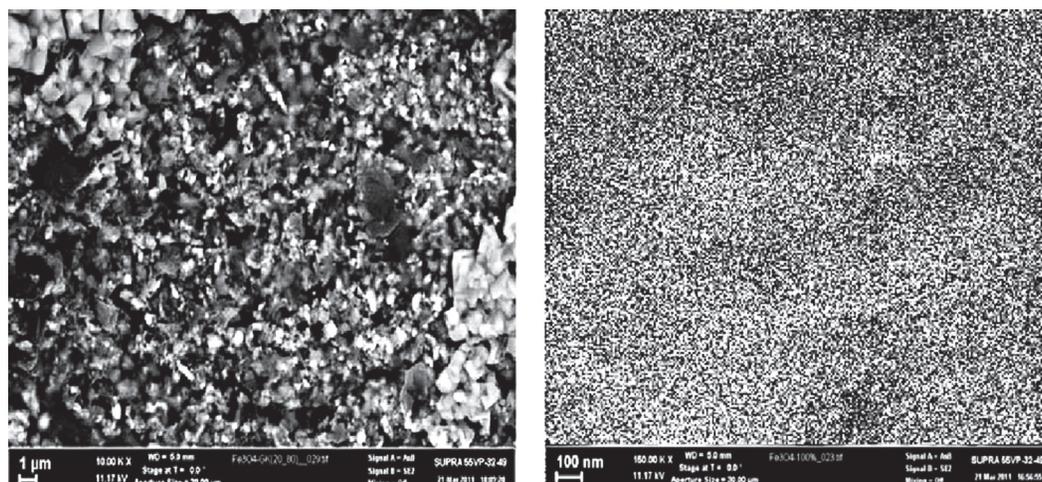


Рис. 1. Электронная микроскопия пектина после диспергирования. Сканирующий микроскоп CARL ZEISS MICROSCOPE EVO-40, AUSTRIA с энергодисперсионной приставкой Inca (Oxford)

1420 см⁻¹ относился к симметричному колебанию группы (COO-). Слабое поглощение при 955 см⁻¹ обусловлено колебаниями γ(OH)-гидроксильной группы с водородными связями. Полученные инфракрасные спектры типичны для пектиновых веществ.

Определение острой токсичности пектина проводили согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [1, 5] на 40 половозрелых крысах линии Wistar обоего пола с массой тела 160–230 г, прошедших карантин в течение 14 сут. Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария. Исследования проводили в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Крысы содержались на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище, в условиях нормальной температурного и светового режима.

Все животные были разделены на четыре группы, по 10 крыс в каждой. Первая группа получала раствор пектина в дозе 12 000 мг/кг (2 раза по 6000 мг/мл с интервалом 4 ч), вторая – в дозе 24 000 мг/кг (4 раза по 6000 мг/мл с интервалом 4 ч), третья – в дозе 48 000 мг/кг (8 раз по 6000 мг/мл с интервалом 4 ч), четвёртая – в дозе 48 000 мг/кг, но в разведении 6000 мг на 1,5 мл. Общая продолжительность наблюдения за животными после введения исследуемого препарата составила 14 дней. В первый день крысы находились под непрерывным наблюдением.

Оценку общего состояния животных

при введении экстракта проводили с учётом изменения поведенческих реакций, нервно-мышечной возбудимости, некоторых вегетативных функций, а также измеряли массу тела до введения изучаемого препарата и после окончания периода наблюдения [6].

Для морфологического исследования забой животных и забор биологического материала осуществляли на 7-й день после введения препарата. Морфологические изменения исследовали на гистологических препаратах тканей лёгких, почек, печени и селезёнки, окрашенных гематоксилином-эозином.

Критериями оценки острой токсичности служили картина интоксикации и выживаемость животных. Расчёт летальных доз (LD), вызывающих гибель 50, 16, 84 и 100% животных (LD₅₀, LD₁₆, LD₈₄ и LD₁₀₀), проведён методом наименьших квадратов с использованием пробит-анализа. Статистическая обработка результатов осуществлена непараметрическими методами (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

При изучении острой токсичности энтеральное введение крысам пектина в дозах до 12 000 мг/кг массы тела животного не влияло на их общее состояние и не привело к гибели животных. Симптомы острого отравления отсутствовали. В 1-е сутки у 3 крыс наблюдалось незначительное увеличение дефекации при введении препарата в дозе 24 000–48 000 мг/кг. Через 1 сут после введения все животные были активны, подвижны, с нормальной координацией движений, стандартной реакцией на внешние раздражители, обычной частотой и глубиной дыхательных движений, нормальной

Таблица 1

Масса тела крыс в граммах до и через 14 сут после введения пектина ($\bar{x} \pm Sx$)

Испытуемые дозы, мг/кг массы тела	Масса тела животных до введения препарата	Масса тела животных на 14-е сутки наблюдения	Прирост массы тела
	n=10	n=10	
12 000	204,0±5,1	240,0±7,3*	36,0±7,0
24 000	228,0±3,7	252,0±6,6*	24,0±5,5
48 000	214,0±6,0	210,0±2,5	—
48 000	220,0±3,2	205,0±2,0	—

Примечание: *статистически значимые изменения массы тела животных на 14е сутки наблюдения по сравнению с показателем до введения препарата (p < 0,01).

консистенцией фекальных масс, частотой мочеиспускания и окраской мочи, с хорошим аппетитом и нормальным внешним видом. За период наблюдения крысы, получившие пектин в дозе 12 000 и 24 000 мг/кг, статистически значимо прибавили в массе тела (табл. 1).

Пробит-анализ, проведённый методом наименьших квадратов, показал следующие величины LD:

$$LD_{16} = 34\,990,6542056074 \approx 35 \text{ г/кг};$$

$$LD_{50} = 74\,242,9906542057 \approx 74 \text{ г/кг};$$

$$LD_{84} = 113\,495,327102804 \approx 113 \text{ г/кг};$$

$$LD_{100} = 133\,121,495327103 \approx 133 \text{ г/кг}.$$

В табл. 2 приведена выживаемость животных, получивших вышеуказанные дозы пектина.

Из приведённых данных видно, что доза 12 000 мг/кг не вела к гибели экспериментальных животных. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 и классификациям разных авторов, вещества, у которых $LD_{50} > 10\,000$ мг/кг, относятся к IV-V классу опасности, то есть к малоопасным [2], тогда как расчётное зна-

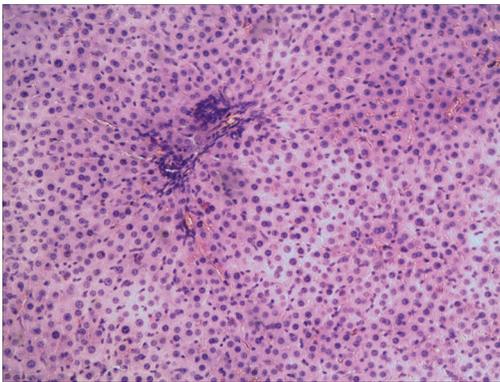


Рис. 2. Печень крысы на 7-й день после введения препарата. Доза 12 000 мг/кг. Увеличение 10×20

Таблица 2

Выживаемость животных

Доза пектина, мг/кг	12 000	24 000	48 000	48 000
Выжили	10	9	8	7
Погибли	0	1	2	3

чение LD_{50} пектина было в 7 раз выше нормативных значений и составляло 74 г/кг. При введении 24 000 и 48 000 мг/кг на 10-е и 12-е сутки погибли несколько крыс (см. табл. 2).

При гистологическом исследовании препаратов органов крыс, получивших 12 000 мг/кг пектина, изменений в структуре и клеточных элементах не выявлено.

Печень. Печень подопытных крыс имела балочное строение. Во всех клетках были хорошо видны ядра. Перипортальные поля — без лимфогистиоцитарных образований, кровеносные сосуды полнокровные. Купферовские клетки без признаков активизации (рис. 2).

Почки. Гистологическое строение у всех крыс было обычным, структура корковой и мозговой зон не нарушена. Клубочки крупные, без признаков атрофии и воспаления. Эпителий извитых канальцев, прямых канальцев, а также собирательных трубочек — без признаков дистрофии. Жировые включения не выявлены. Соединительнотканная строма — без особенностей (рис. 3).

Селезёнка. Гистологическое строение также не было нарушено. Красная пульпа представлена в основном эритроцитами и другими клеточными элементами крови. Лимфатические фолликулы не изменены. Признаков фиброза не обнаружено. Клеток типа Гоше не выявлено (рис. 4).

Лёгкие. Альвеолы имеют обычное гисто-

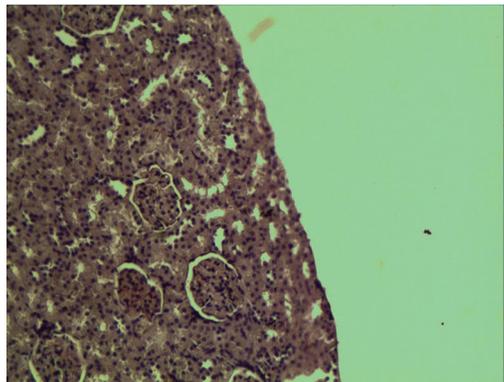


Рис. 3. Почка крысы на 7-й день после введения препарата. Доза 12 000 мг/кг. Увеличение 10×20

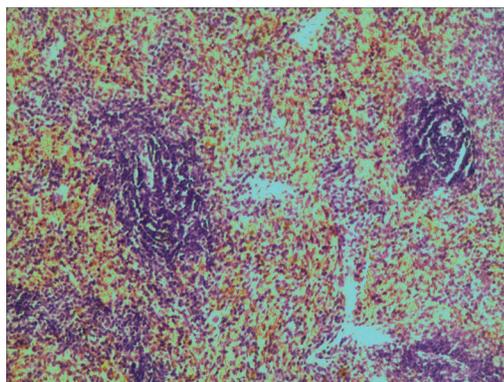


Рис. 4. Селезёнка крысы на 7-й день после введения препарата. Доза 12 000 мг/кг. Увеличение 10×20

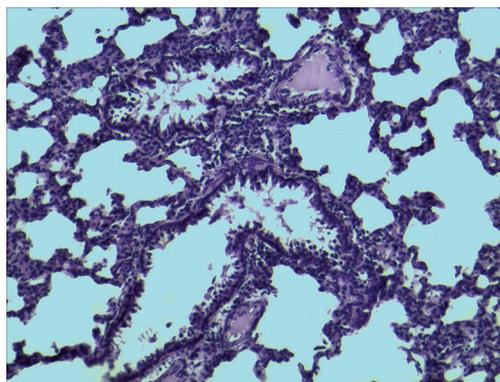


Рис. 5. Лёгкие крысы на 7-й день после введения препарата. Доза 12 000 мг/кг. Увеличение 10×20

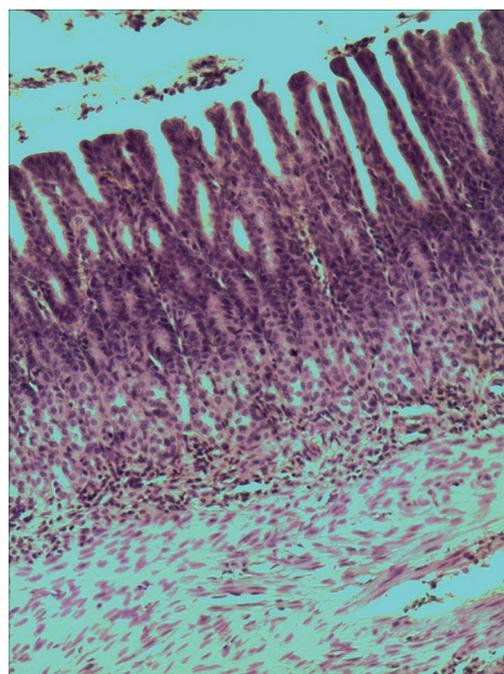


Рис. 6. Желудок крысы на 7-й день после введения препарата. Доза 12 000 мг/кг. Увеличение 10×20

логическое строение. Бронхи со свободным просветом, некоторые с гофрированной стенкой (рис. 5).

Желудок. Признаков повреждения, дистрофии, эрозий, воспаления не обнаружено (рис. 6).

В дальнейшем от оставшихся после данного эксперимента животных (в том числе получивших пектин в дозе 48 000 мг/кг) было получено жизнеспособное потомство без явных признаков отклонений от нормы.

При анализе результатов изучения острой токсичности методом Кербера при энтеральном введении животным нанораз-

мерного пектина в дозе 12 000 мг/кг признаков острой токсичности не выявлено, летальность отсутствовала. Летальность от доз 24 000 и 48 000 мг/кг была связана с полной закупоркой просвета кишечника, обезвоживанием организма и механическими повреждениями органов желудочно-кишечного тракта, так как препарат вводили в больших объёмах и в течение короткого промежутка времени (8 ч). Мы не нашли литературных данных по изучению острой токсичности с подобными большими дозами.

При морфологическом исследовании изменений в органах крыс, получивших пектин в дозе 12 000 мг/кг, не выявлено. В связи с этим изучаемый препарат может быть отнесён, согласно ГОСТ 12.1.007-76, к IV классу опасности, то есть малоопасным веществам. По Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова субстанция пектина может быть отнесена к практически нетоксичным препаратам: $LD_{50} > 10\ 000$ мг/кг, что соответствует V классу соединений [6].

ВЫВОД

Полученные данные показали, что наноразмерные формы пектина относятся к нетоксичным веществам, что предполагает перспективность проведения дальнейших исследований его фармакологических свойств.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л.: Медгиз, 1963. — 152 с. [Belen'kiy M.L. *Elementy kolichestvennoy otsenki farmakologicheskogo effekta.* (Elements of quantitative assessment of pharmacological effect.) Leningrad: Medgiz. 1963; 152 p. (In Russ.)]
2. Брусенцов Н.А., Брусенцова Т.Н., Сергеев А.В., Шумаков Л.И. Ферримагнитные жидкости, ферро- и

ферромагнитные суспензии для радиочастотной индукционной гипертермии опухолей // Хим.-фарм. журнал. — 2000. — Т. 34, №4. — С. 38–43. [Brusentsov N.A., Brusentsova T.N., Sergeev A.V., Shumakov L.I. Ferrimagnetic liquid, ferro- and ferrimagnetic suspension for radiofrequency hyperthermia induction of tumors. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2000; 34 (4): 38–43. (In Russ.)]

3. Захарова Н.Г., Стрельцова А.Н., Фетисов Г.П. и др. Получение наночастиц магнетита контролируемых размеров для биомедицинского применения // Технол. металлов. — 2012. — №7. — С. 40–42. [Zakharova N.G., Strel'tsova A.N., Fetisov G.P et al. Preparation of magnetite nanoparticles of controlled size for biomedical applications. *Tekhnologiya metallov*. 2012; 7: 40–42. (In Russ.)]

4. Помогайло А.Д., Розенберг А.С., Уфлянд И.Е. Наночастицы металлов в полимерах. — М.: Химия, 2000. — 671 с. [Pomogaylo A.D., Rozenberg A.S., Uflyand I.E. *Nanochastitsy metallov v polimerakh*. (Metal nanoparticles in polymers.) Moscow: Khimiya. 2000; 671 p. (In Russ.)]

5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медици-

на, 2005. — 832 с. [*Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*. (Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances.) Ed. by Khabriev R.U. Moscow: Meditsina. 2005; 832 p. (In Russ.)]

6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. В.П. Фисенко. — Москва, 2000. — С. 220–221. [*Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv*. (Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances.) Ed. by Fisenko V.P. Moscow. 2000; 220–221. (In Russ.)]

7. Хотимченко Ю.С., Кропотов А.В., Хотимченко М.Ю. Фармакологические свойства пектинов // Эфферент. терап. — 2001. — Т. 7, №4. — С. 22–36. [Khotimchenko Yu.S., Kropotov A.B., Khotimchenko M.Yu. Pharmacological properties of pectins. *Efferentnaya terapiya*. 2001; 7 (4): 22–36. (In Russ.)]

8. Voragen A.G.J., Coenen G.J., Verhoef R.P., Schols H.A. Pectin, a versatile polysaccharide present in plant cell walls // *Struct. Chem.* — 2009. — Vol. 20. — P. 263–275.

Правила для авторов —

на сайте «Казанского медицинского журнала»:

www.kazan-medjournal.ru