

ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ КОН'ЮГАТУ НАНОЧАСТИНОК МІДІ З ЦЕФТРІАКСОНОМ ПРИ ВНУТРІШНЬОШЛУНКОВОМУ ВВЕДЕННІ МИШАМ

©П. В. Сімонов

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця

Резюме: проблема антибіотикорезистентності збудників інфекційних захворювань може бути вирішена шляхом впровадження у медичну практику лікарських засобів на основі наночастинок металів та їх комбінацій з іншими протимікробними засобами. У статті представлено результати визначення параметрів гострої токсичності кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном в експерименті на мишах лінії BALB/c при внутрішньошлунковому введенні. Виявлено, що досліджувана субстанція належить до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини). Біологічними мішенями дії кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном при внутрішньошлунковому введенні мишам є центральна та вегетативна нервові системи, а також шлунково-кишковий тракт та нирки. Оборненість токсичного впливу досліджуваної субстанції на організм тварин підтверджено відсутністю значного впливу на динаміку зміни маси тіла. Доцільним є продовження досліджень кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном з метою впровадження у медичну практику для лікування інфекцій, викликаних, зокрема, антибіотикорезистентними штамми мікроорганізмів.

Ключові слова: наночастинок металів, мідь, цефтріаксон, безпека, дослідження гострої токсичності, внутрішньошлункове введення, миші.

Вступ. Антибіотикорезистентність збудників позалікарняних та внутрішньолікарняних інфекцій на сьогодні є глобальною проблемою медицини [1]. Один зі шляхів вирішення – впровадження у медичну практику нових протимікробних лікарських засобів, ефективних проти резистентних штамів мікроорганізмів. Можливим кандидатом на створення такого медикаменту можуть виступити наночастинок міді, які мають широкий спектр протимікробної активності [2, 3, 4, 5].

Ще один зі шляхів подолання антибіотикорезистентності – застосування комбінацій антибіотиків [6]. На сьогодні відомо, що протимікробна активність наночастинок срібла, золота та оксиду заліза, які використовують разом із антибіотиком цефтріаксоном, перевищує активність окремих компонентів [7, 8].

Доцільним є створення кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном (НЧМЦ), адже мідь, на відміну від срібла, є біогенним металом, проявляє більш широкий спектр протимікробної активності, зокрема, має фунгіцидну дію, та є більш дешевою вихідною речовиною у синтезі досліджуваної субстанції [4].

У літературі існують дані про модифікацію цефтріаксону міддю в іонній формі. Отримана сполука проявляє більш широкий спектр активності, ніж нативний цефтріаксон, – біоцидно впливала на гриби роду *Candida* та резистентний до цефтріаксону штам *Escherichia coli* [9].

На кафедрі фармакології Національного медичного університету імені О. О. Богомольця, м. Київ, протягом 15 років тривають дослідження з наномедици-

ни. Зокрема, спільно зі співробітниками Інститутів НАН і НАМН України досліджено фармакологічні та токсикологічні властивості наночастинок міді, срібла і заліза [10, 11, 12].

У плані продовження наукових пошуків у даному напрямку доцільним є проведення комплексу доклінічних досліджень кон'югату НЧМЦ для подальшого впровадження даної субстанції в медичну практику.

Важливим етапом створення нового лікарського засобу є проведення комплексу доклінічних досліджень, серед яких особливе значення має визначення гострої токсичності. Метою даного етапу розробки медикаменту є отримання даних щодо безпеки, характеру можливих токсичних впливів активної субстанції на органи та системи, а також встановлення класу токсичності досліджуваної сполуки.

Мета дослідження – визначення параметрів гострої токсичності кон'югату НЧМЦ в експерименті на лабораторних мишах при внутрішньошлунковому введенні.

Методи дослідження. Кон'югат НЧМЦ синтезований у Інституті біологічної хімії імені Ф. Д. Овчаренка НАН України, м. Київ. Вихідними компонентами у синтезі досліджуваної субстанції виступали стабільні сферичні наночастинок нуль-валентної міді розміром 20 нм, синтезовані за оригінальним протоколом методом хімічної конденсації у водному розчині, та антибіотик цефтріаксон. Масове співвідношення компонентів «наночастинок міді у перерахунку на метал» та «цефтріаксон» у кон'югаті НЧМЦ складало 3,2/5,0.

Дослідження проведено на 54 самках білих лабораторних мишей лінії BALB/c масою 18–22 г віком 2,0–2,5 місяці (далі – миші). Тварин утримували в стандартних умовах віварію при температурі повітря 22–24 °C та відносній вологості 50–70 % з вільним доступом до корму та води. Групи тварин формували за методом рандомізації. Період карантину та акліматизації тривав 7 діб.

Дослідження гострої токсичності речовин при внутрішньошлунковому введенні проведено згідно з методичними рекомендаціями [13]. З метою мінімізації необхідної для здійснення експерименту кількості тварин рівні доз кон'югату НЧМЦ визначали із застосуванням експрес-методу згідно з керівними принципами Організації економічного співробітництва та розвитку (ОЕСР) щодо дослідження хімічних речовин (Тест № 423: Гостра пероральна токсичність – Метод визначення класу гострої токсичності) [14].

При встановленні класу гострої токсичності за експрес-методом кон'югат НЧМЦ внутрішньошлунково вводили 12 тваринам за схемою Тесту № 423, представленою у [14], з урахуванням граничних рівнів доз за класифікацією К. К. Сидорова [13]. Введення проводили у дозі 15000 мг/кг – 3 мишам, 5000 мг/кг – 3 мишам, 500 мг/кг – 6 мишам.

Надалі кон'югат НЧМЦ вводили у 6 рівнях доз по 6 тварин у кожному (3160, 3980, 5010, 6310, 7940 та 10000 мг/кг). Контрольну групу склали 6 мишей, яким внутрішньошлунково вводили розчинник – воду для ін'єкцій у об'ємі 0,8 мл.

Протягом 3–4 год перед введенням досліджуваної речовини або розчинника тварин утримували без корму з вільним доступом до води. Введення здійснювали однократно за допомогою металевого зонда. Об'єм введення речовин визначали з розрахунку 0,8 мл на 20,0 г маси тіла тварини.

Після внутрішньошлункового введення досліджуваної речовини або розчинника протягом 14 діб проводили щоденне спостереження за станом тварин, особливостями поведінки, положенням тіла та руховою активністю, споживанням корму та води. Реєстрували терміни розвитку та характер симптомів інтоксикації і випадки смерті. Масу тварин визначали перед введенням та на 3, 7 і 14 (перед евтаназією) добу спостереження. У результатах даний показник представлений у відносних одиницях, за одиницю (1,000) обрано вихідні значення маси тіла тварин. Одразу після загибелі мишей або виведення останніх з експерименту проводили розтин з подальшим візуальним визначенням розмірів, забарвлення, взаємного розташування органів та інших ознак, що можуть вказувати на токсичний вплив досліджуваної речовини.

Протягом випробування здійснювали реєстрацію та підрахунок загиблих тварин в кожному з рівнів доз. На основі отриманих даних проводили пробіт-аналіз результатів за D. J. Finney [15] із застосуван-

ням комп'ютерної програми BioStat 2009 for Windows (v5.8.4.3) компанії AnalystSoft Inc. Отримували значення середньої смертельної дози (LD_{50}) зі стандартною помилкою.

При визначенні впливу досліджуваної субстанції або розчинника на динаміку зміни маси тіла тварин статистичну обробку даних проводили із застосуванням тесту Манна-Уїтні для порівняння незалежних вибірок та парного двовибіркового t-тесту для середніх для порівняння залежних вибірок, за допомогою програм BioStat 2009 for Windows (v5.8.4.3) компанії AnalystSoft Inc. та Microsoft Office Excel 2007 компанії Microsoft. Відмінності показників вважали статистично значущими при $p < 0,05$. Результати окремих вимірювань представлено у відносних одиницях у вигляді середніх значень зі стандартними помилками.

Результати й обговорення. Зовнішній вигляд тварин, рухова активність, споживання води та корму при внутрішньошлунковому введенні найменшої дози кон'югату НЧМЦ (3160 мг/кг) не відрізнялися від контролю.

Токсичні ефекти при застосуванні більших доз (3980–6310 мг/кг) мали дозозалежний характер, у деяких тварин спостерігали зменшення спонтанної рухової активності, пілоерекцію, часткове або повне опущення верхніх повік, відмову від води та корму, сонливість, тремор. Через 1–2 доби після введення спостерігали випадки смерті. У тварин, що вижили, токсичні ефекти характеризувалися зворотністю, на момент завершення дослідження споживання води та корму, рухова активність та зовнішній вигляд мишей нормалізувалися.

При введенні найбільших доз (7940 мг/кг та 10000 мг/кг) через 2 год спостерігали випадки смерті тварин, яким передувало пригнічення рухової активності, що чергувалося з періодами моторного збудження та швидкого, неупорядкованого руху кінцівок. Деякі миші гинули на 1–2 добу, реєстрували ознаки діареї та виділення порфірину, при розтині у однієї тварини виявлено блідість та зернистість нирок, що може вказувати на нефротоксичний вплив субстанції (рівень дози – 10000 мг/кг). Інших відмінностей під час патоморфологічного дослідження з боку розміру, кольору, форми та розташування внутрішніх органів виявлено не було. Стан тварин, що вижили, нормалізувався та на 14 добу за більшістю ознак відповідав такому у групі контролю, що свідчить про оборотність токсичного впливу кон'югату НЧМЦ.

Таким чином, в межах даного дослідження гострої токсичності кон'югату НЧМЦ при внутрішньошлунковому введенні мишам встановлені такі біологічні мішені дії досліджуваної субстанції, як центральна та вегетативна нервові системи, травна система, а також, при застосуванні у максимальній дозі – 10000 мг/кг, токсичний вплив на нирки.

У літературі на сьогодні недостатньо даних стосовно фармакологічних та токсикологічних властивос-

тей кон'югатів або комплексів сполук міді з цефалоспоринами. Можна припустити, що внесок у профіль безпеки таких субстанцій роблять як окремі складові (родоначальні речовини), так і унікальні параметри, зумовлені створенням нової структури.

Згідно з даними літератури, наночастинки міді при внутрішньошлунковому та внутрішньоочеревинному введенні тваринам здатні викликати патологічні зміни у шлунково-кишковому тракті, печінці, нирках, селезінці та центральній нервовій системі [16, 17, 18].

Картина гострого отруєння цефтріаксоном, у свою чергу, характеризується ураженням центральної та вегетативної нервових систем з подальшим порушенням функцій серцево-судинної та дихальної систем під впливом рівнів доз лікарського засобу, що значно перевищують терапевтичні [19].

Вплив різних рівнів доз кон'югату НЧМЦ на динаміку зміни маси тіла мишей представлено на рисунку 1. У групі контролю (введення води для ін'єкцій) протягом експерименту даний показник поступово зростає та на 14 добу перевищував вихідне значення на 6,7 %.

При введенні найменшої дози кон'югату НЧМЦ 3160 мг/кг спостерігали тенденцію до зменшення маси тіла тварин на 3 добу, але даний показник статистично значуще не відрізнявся від вихідного значення наприкінці експерименту. На 3 добу експерименту спостерігали зменшення маси тіла на 4,7 % порівняно з контролем.

При застосуванні дози 3980 мг/кг спостерігали зменшення маси тіла на 3 добу порівняно як з вихідним значенням (7,3 %), так і з контролем (7,3 %). Наприкінці дослідження даний показник нормалізувався.

При введенні кон'югату НЧМЦ у дозі 5010 мг/кг у тварин, що вижили, на 14 добу спостерігали збільшення маси тіла на 10,7 % порівняно з вихідним значенням. Статистично значущих відмінностей показника з контролем не виявлено.

При застосуванні дози 6310 мг/кг спостерігали зменшення маси тіла тварин на 3,5 % на 3 добу та збільшення даного показника на 3,7 % на 14 добу порівняно з вихідним значенням, а також зменшення на 3,5 % на 3 добу порівняно з контролем.

При введенні кон'югату НЧМЦ у дозі 7940 мг/кг серед мишей, що вижили, спостерігали збільшення маси тіла на 4,1 та 6,1 % порівняно з вихідним значенням на 7 та 14 добу відповідно.

Незважаючи на тенденцію або статистично значуще зменшення маси тіла тварин на 3 добу експерименту в групах введення кон'югату НЧМЦ, наприкінці дослідження даний показник у більшості випадків сягав контрольних значень. У групах, починаючи з 3 доби експерименту, переважно відбувалося збільшення маси тіла тварин. Це свідчить про оберненість токсичного впливу кон'югату НЧМЦ на організм мишей.

Летальність тварин після однократного внутрішньошлункового введення кон'югату НЧМЦ представлено в таблиці 1.

На основі наведених у таблиці 1 даних за допомогою комп'ютерної програми BioStat 2009 for Windows (v5.8.4.3) компанії AnalystSoft Inc. побудований графік пробіт-аналізу гострої токсичності кон'югату НЧМЦ (рис. 2). При цьому дози речовин представлено у вигляді логарифмічної шкали, а ефект (смертність) – у відсотках (%).

Розраховане значення LD_{50} зі стандартною помилкою становило $(5409,4 \pm 646,5)$ мг/кг. Отримані резуль-

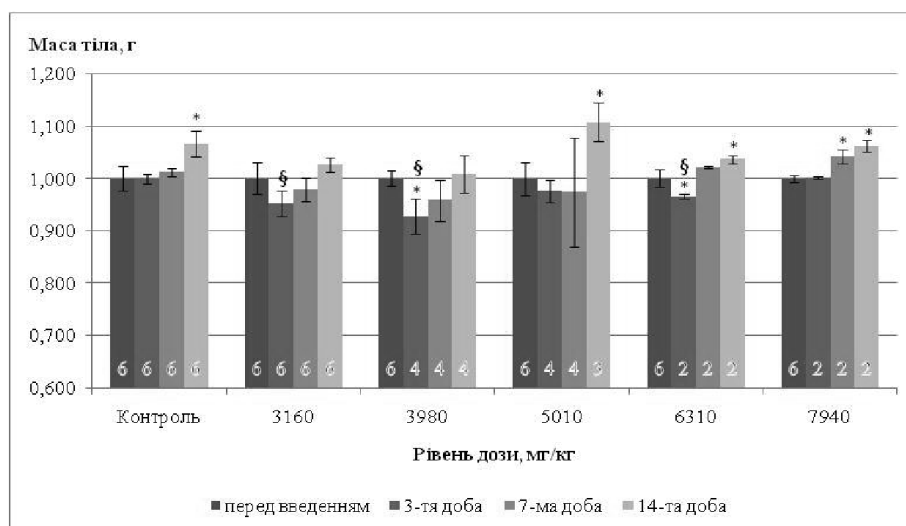


Рис. 1. Динаміка зміни маси тіла мишей залежно від рівня дози після однократного внутрішньошлункового введення кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном.

Примітки: * – статистично значуща відмінність порівняно з вихідним значенням показника, $p < 0,05$;
§ – статистично значуща відмінність порівняно з контролем, $p < 0,05$; розмір вибірки (n, кількість тварин) зазначений у стовпчиках знизу.

Таблиця 1. Летальність мишей після однократного внутрішньошлункового введення кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном залежно від рівня дози протягом 14 днів спостереження

Рівень дози, мг/кг	Кількість загиблих тварин		Загальна кількість тварин
	абс.	%	
0	0	0	n=6
3160	0	0	n=6
3980	2	33,3	n=6
5010	3	50,0	n=6
6310	4	66,7	n=6
7940	4	66,7	n=6
10000	6	100	n=6

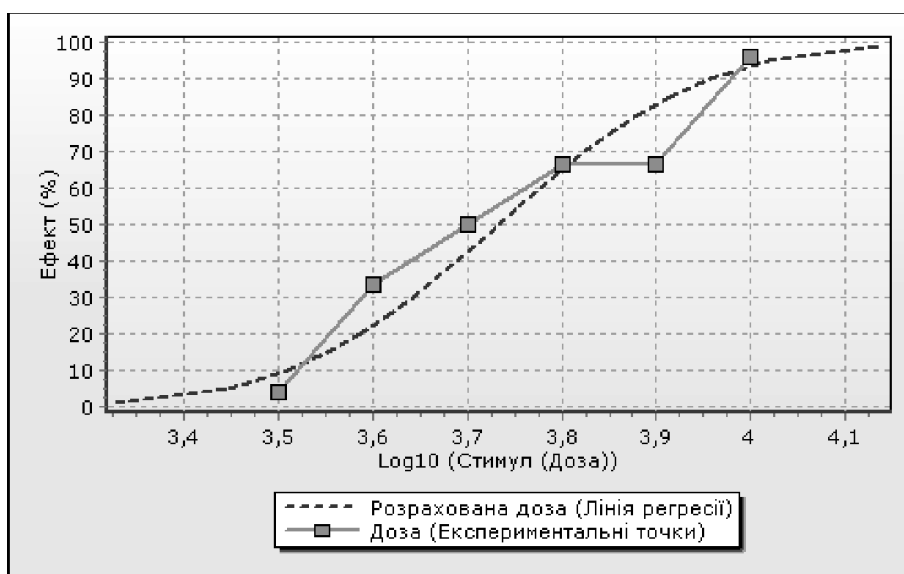


Рис. 2. Графік пробіт-аналізу залежності ефект-доза для мишей після однократного внутрішньошлункового введення кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном при 6 рівнях доз.

тати дозволяють віднести кон'югат НЧМЦ до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова [13].

Висновки. 1. Кон'югат сферичних наночастинок нуль-валентної міді розміром 20 нм, отриманих за оригінальним протоколом методом хімічної конденсації у водному розчині, з цефтріаксоном належить до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова при однократному внутрішньошлунковому введенні самкам білих лабораторних мишей лінії BALB/c.

Біологічними мішенями дії кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном при внутрішньошлунковому введенні мишам є центральна та вегетативна нервові системи, а також шлунково-кишковий тракт та нирки.

Оберненість токсичного впливу кон'югату наночастинок міді з цефтріаксоном на організм мишей при однократному внутрішньошлунковому введенні підтверджена відсутністю значного впливу досліджуваної субстанції на динаміку зміни маси тіла дослідних тварин.

Список літератури

1. Llor C. Antimicrobial resistance: risk associated with antibiotic overuse and initiatives to reduce the problem / C. Llor, L. Bjerrum // Ther. Adv. Drug Saf. – 2014. – Vol. 5, № 6. – P. 229–241.
2. Нанонаука, нанобіологія, нанофармація / [Чекман І. С., Ульберг З. Р., Маланчук В. О. та ін.]. – К. : Поліграф плюс, 2012. – 328 с.
3. In vitro susceptibility of filamentous fungi to copper nanoparticles assessed by rapid XTT colorimetry and agar dilution method / E. Ghasemian, A. Naghoni, B. Tabaraie [et al.] // J. Mycol. Med. – 2012. – Vol. 22, № 4. – P. 322–328.
4. Ingle A. P. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: a review / A. P. Ingle, N. Duran, M. Rai // Appl. Microbiol. Biotechnol.

Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин
Pharmacological researches of biologically active substances

- 2014. – Vol. 98, № 3. – P. 1001–1009.
5. Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications / G. Ren, D. Hu, E. W. C. Cheng [et al.] // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2009. – Vol. 33. – P. 587–590.
6. Burden of antibiotic resistance in common infectious diseases: role of antibiotic combination therapy / K. C. Mehta, R. R. Dargad, D. M. Borade [et al.] // *J. Clin. Diagn. Res.* – 2014. – Vol. 8, № 6. – P. ME05–ME08.
7. Influence of hybrid inorganic/organic mesoporous and nanostructured materials on the cephalosporins' efficacy on different bacterial strains / M. Carmen Chifriuc, D. Mihaiescu, E. Ilinca [et al.] // *IET Nanobiotechnol.* – 2012. – Vol. 6, № 4. – P. 156–161.
8. Morphological analysis of the antimicrobial action of silver and gold nanoparticles stabilized with ceftriaxone on *Escherichia coli* using atomic force microscopy / M. R. Shah, S. Ali, M. Ateeq [et al.] // *New J. Chem.* – 2014. – Vol. 38, № 11. – P. 5633–5640.
9. Ali A. E. Synthesis, spectral, thermal and antimicrobial studies of some new tri metallic biologically active ceftriaxone complexes / A. E. Ali // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2011. – Vol. 78, № 1. – P. 224–230.
10. Влияние наночастиц серебра на гематологические показатели крови крысиной линии Wistar при генерализованной инфекции / А. О. Прискока, Л. С. Резниченко, З. Р. Ульберг [и др.] // *Рецепт.* – 2014. – № 5(97). – С. 51–59.
11. Ефективність дії наночастинок міді до збудників інфекційно-запальних процесів різної локалізації / Л. С. Резниченко, А. В. Руденко, П. В. Сімонов [та ін.] // *Вісник фармації.* – 2012. – № 3(71). – С. 75–78.
12. Оцінка біобезпечності субстанції наночастинок заліза *in vitro* та *in vivo* / Л. С. Резниченко, А. М. Дорошенко, С. М. Дибкова [та ін.] // *Галицький лікарський вісник.* – 2014. – № 3. – С. 59–62.
13. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації / під ред. О. В. Стефанова. – К. : Авіцена, 2001. – 528 с.
14. OECD guideline for testing of chemicals. Guideline 423: Acute oral toxicity – Acute toxic class method. – Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2001. – 14 p.
15. Finney D. J. Probit Analysis / Finney D. J. – [3-rd ed.]. – Cambridge: Cambridge University Press, 1971. – 333 p.
16. Liao M. Gene expression profiling of nephrotoxicity from copper nanoparticles in rats after repeated oral administration / M. Liao, H. Liu // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 34, № 1. – P. 67–80.
17. Integrated metabolomic analysis of the nano-sized copper particle-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in rats: a rapid *in vivo* screening method for nanotoxicity / R. Lei, C. Wu, B. Yang [et al.] // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 232, № 2. – P. 292–301.
18. Subchronic toxicity of copper oxide nanoparticles and its attenuation with the help of a combination of bioprotectors / L. I. Privalova, B. A. Katsnelson, N. V. Loginova [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2014. – Vol. 15, № 7. – P. 12379–12406.
19. Ceftriaxone: an update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections / H. M. Lamb, D. Ormrod, L. J. Scott [et al.] // *Drugs.* – 2002. – Vol. 62, № 7. – P. 1041–1089.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ КОНЪЮГАТА НАНОЧАСТИЦ МЕДИ С ЦЕФТРИАКСОНОМ ПРИ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОМ ВВЕДЕНИИ МЫШАМ

П. В. Симонов

Национальный медицинский университет имени А. А. Богомольца

Резюме: проблема антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных заболеваний может быть решена путем внедрения в медицинскую практику лекарственных средств на основе наночастиц металлов и их комбинаций с другими противомикробными средствами. В статье представлены результаты определения параметров острой токсичности конъюгата наночастиц меди с цефтриаксоном в эксперименте на мышах линии BALB/c при внутрижелудочном введении. Определено, что исследуемая субстанция относится к V классу токсичности (практически нетоксичные вещества). Биологическими мишенями действия конъюгата наночастиц меди с цефтриаксоном при внутрижелудочном введении мышам являются центральная и вегетативная нервная системы, а также желудочно-кишечный тракт и почки. Обратимость токсического воздействия исследуемой субстанции на организм животных подтверждена отсутствием значительного влияния на динамику изменения массы тела. Целесообразным видится продолжение исследований конъюгата наночастиц меди с цефтриаксоном с целью внедрения в медицинскую практику для лечения инфекций, вызванных, в частности, антибиотикорезистентными штаммами микроорганизмов.

Ключевые слова: наночастицы металлов, медь, цефтриаксон, безопасность, исследования острой токсичности, внутрижелудочное введение, мыши.

ACUTE ORAL TOXICITY TESTING OF THE COPPER NANOPARTICLE-CEFTRIAXONE CONJUGATE IN MICE

P. V. Simonov

National Medical University by O. O. Bohomolets

Summary: the antimicrobial resistance of causative agents of infectious diseases problem may be solved by an introduction of medications based on metal nanoparticles and their combinations with other antimicrobial drugs into medical practice. The results on a determination of the copper nanoparticle-ceftriaxone conjugate acute toxicity parameters in an experiment of oral administration to BALB/c mice were presented in the article. It was found out that the studied substance belonged to the 5th toxicity class (practically non-toxic). Central and autonomous nervous systems, gastro-intestinal tract and kidneys were the biological targets of action of the copper nanoparticle-ceftriaxone conjugate after oral administration in mice. A reversibility of the studied substance's negative influence on animals was confirmed by an absence of significant influence on a dynamics of body mass changes. It seems advisable to continue studies on the copper nanoparticle-ceftriaxone conjugate in order to introduce it into medical practice for a treatment of infections, particularly those caused by antimicrobial resistant strains.

Key words: metal nanoparticles; copper, ceftriaxone, safety; toxicity tests, acute, administration, oral, mice.

Отримано 08.05.2015