

УДК 619.615.5

ВИЗНАЧЕННЯ DL₅₀ БІОЛОГІЧНО АКТИВНОГО ЗАСОБУ НА ОСНОВІ ПЕПТИДОГЛІКАНУ

В. І. Кушнір
wolodjak@gmail.com

Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок, вул. Донецька, 11, м. Львів, 79019, Україна

Характерною особливістю препаратів мікробного походження є їх здатність проявляти антибактеріальні та імуностимулювальні властивості. У практиці ветеринарної медицини їх застосовують із метою лікування і профілактики захворювань травного тракту та для підвищення імунного статусу організму. Дослідження проведені на базі лабораторії фармакології і токсикології Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Метою роботи було встановити параметри гострої токсичності біологічно активного засобу на основі пептидоглікану молочнокислих і біфідобактерій за внутрішньошлункового та підшкірного способів введення, а також визначити подразнювальну дію на слизові оболонки очей та шкіру. Дослідження проводенні на білих щурах, мишах і кролях.

У зв'язку з тим, що за внутрішньошлункового та підшкірного способів введення середньолетальну дозу (DL₅₀) досліджуваного біологічно активного засобу встановити не вдалося, препарат вводили у максимальних дозах. У результаті проведених досліджень встановлено, що за одноразового внутрішньошлункового введення препарату в дозах 5000 та 10000 мг/кг і за підшкірного способу введення у дозах 1500, 3000 та 5000 мг/кг загибелі та захворювань лабораторних мишей і щурів не було, клінічних симптомів отруєння та відхилень у поведінці тварин також не виявили. Крім того, не встановлено змін у вагових коефіцієнтах маси внутрішніх органів. У відповідності з класифікацією хімічних речовин за ступенем небезпечності (ГОСТ 12.1.007-76), досліджуваний препарат за внутрішньошлункового введення відноситься до 4 класу (малотоксичні речовини), а згідно з класифікацією речовин за токсичністю за підшкірного способу введення відноситься до 6 класу токсичності (відносно нешкідливі речовини). Крім того, препарат не викликав подразнювальної дії після нанесення на слизові оболонки очей кролів, тому індекс первинного подразнення дорівнює нулю.

Ключові слова: ГОСТРА ТОКСИЧНІСТЬ, DL₅₀, СТУПІНЬ НЕБЕЗПЕЧНОСТІ, ПОДРАЗНЮВАЛЬНА ДІЯ, ПЕПТИДОГЛІКАН, ЛАБОРАТОРНІ ТВАРИНИ

THE DETERMINATION OF DL₅₀ OF BIOLOGICALLY ACTIVE PRODUCT CONTAINING PEPTIDOGLYCAN

V. I. Kushnir
wolodjak@gmail.com

State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Donets'ka str., 11, Lviv, 79019, Ukraine

The typical peculiarity of medicinal products of microbial origin is their capability to demonstrate antibacterial and immune stimulating properties. In the practice of veterinary medicine they are used aiming at the treatment and prophylaxis of the intestinal tract diseases and enhancing the immune condition of the organism. The tests were conducted on the basis of the pharmacology and toxicology laboratory of State Scientific Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives. The aim of the work was to determine the parameters of the acute toxicity of biologically active product containing peptidoglycan of lactate bacteria and bifidobacteria administered intragastrically and subcutaneously and also to determine their irritating effect on mucous membrane of eye and skin. The tests were conducted using white rats, mice and rabbits.

As it was impossible to determine DL_{50} of the tested biologically active product administered intragastrically and subcutaneously, the medicinal product was administered in the maximal doses. The conducted tests showed that single intragastrical administration of the medicinal product in the doses of 5000 and 10000 mg/kg and subcutaneous administration in the doses of 1500, 3000 and 5000 mg/kg the death and disease occurrence of laboratory mice and rats were not observed, the signs of poisoning and changes in animal behaviour were not also observed. There were not also the changes in weight coefficients of internal organs. According to the classification of chemical substances on the basis of danger degree the tested medicinal product administered intragastrically belongs to the 4th class (less toxic substances) and due to this classification the tested medicinal product belongs to the 6th class (harmless substances). The medicinal product did not cause the irritating effect as a result of its application to mucous membrane of rabbit eye, index of primary irritation is equal to zero.

Keywords: ACUTE TOXICITY, DL_{50} , DANGER DEGREE, IRRITATING EFFECT, PEPTIDOGLYCAN, LABORATORY MICE AND RATS

ОПРЕДЕЛЕНИЕ DL_{50} БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОГЛИКАНА

В. И. Кушнир
wolodjak@gmail.com

Государственный научно-исследовательский контрольный институт ветеринарных препаратов и кормовых добавок, ул. Донецкая, 11, г. Львов, 79019, Украина

Характерной особенностью препаратов микробного происхождения является их способность проявлять антибактериальные и иммуностимулирующие свойства. В практике ветеринарной медицины их применяют с целью лечения и профилактики заболеваний пищеварительного тракта и для повышения иммунного статуса организма. Исследования были проведены на базе лаборатории фармакологии и токсикологии Государственного научно-исследовательского контрольного института ветеринарных препаратов и кормовых добавок. Целью работы было установить параметры острой токсичности биологически активного средства на основе пептидогликана молочнокислых и бифидобактерий при внутрижелудочном и подкожном способах введения, а также определить раздражающее действие на слизистые оболочки глаз и кожи. Исследования были проведены на белых крысах, мышах и кроликах.

В связи с тем, что при внутрижелудочном и подкожном способах введения среднелетальной дозы (DL_{50}) исследуемого биологически активного средства установить не удалось, препарат вводили в максимальных дозах. В результате проведенных исследований установлено, что при однократном внутрижелудочном введении препарата в дозах 5000 и 10000 мг/кг и за подкожного способа введения в дозах 1500, 3000 и 5000 мг/кг, гибели и заболеваний лабораторных мышей и крыс не выявлено, симптомов отравления и отклонений в поведении животных также не наблюдали. Кроме того, не происходили изменения весовых коэффициентов массы внутренних органов. В соответствии с классификацией химических веществ по степени опасности (ГОСТ 12.1.007-76) исследуемый препарат при внутрижелудочном введении относится к 4 классу, а согласно классификации веществ по токсичности при внутрижелудочном и подкожном способах введения относится к 6 классу токсичности (относительно не вредные вещества). При нанесении на слизистые оболочки глаз кролика препарат не вызвал раздражающего действия, а при определении кожно-резорбтивного действия было установлено, что индекс первичного раздражения равняется нулю.

Ключевые слова: ОСТРАЯ ТОКСИЧНОСТЬ, DL_{50} , СТЕПЕНЬ ОПАСНОСТИ, РАЗДРАЖИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ, ПЕПТИДОГЛИКАН, ЛАБОРАТОРНЫЕ ЖИВОТНЫЕ

Активність імунної системи організму залежить від антигенного навантаження, значна частина якого припадає на мікрофлору. Мікроорганізми є потужними стимуляторами імунітету, а деякі проявляють ще й ад'ювантну активність, яка супроводжується посиленням клітинного та гуморального імунітету [1].

Останнім часом до пептидогліканів (ПГ), які є основним та невід'ємним компонентом клітинної стінки практично всіх бактерій, привернута увага багатьох науковців [2, 3]. Це пов'язано, у першу чергу, з тим, що ПГ притаманні ад'ювантні властивості як у гуморальній, так і клітинних відповідях [4]. Окрім того, ПГ та їхнім похідним властива імуномодулювальна активність [5], здатність знижувати проліферацію пухлинних клітин внаслідок активування вродженого імунітету та посилення експресії пухлинних маркерів на трансформованих клітинах [7], а також встановлено їх високу ефективність після лікування тварин, хворих на туберкульоз легень [6].

Із даних наукової літератури відомо, що ПГ та їхні синтетичні аналоги з імуномодулювальними властивостями можуть мати важливе прикладне значення, як неспецифічні імуностимулятори, а також використовуватись як ад'ювантні компоненти для імунотерапії патологій людини і тварин, які пов'язані з функціональними розладами імунної системи [8].

Проте, інтенсивність дії ПГ залежить від їх антигенних структурних особливостей та дози препарату [9]. Власне тому, в таких випадках надзвичайно важливим є визначення їх токсикологічних параметрів. З огляду на це, інтегральним показником нешкідливості всіх лікарських засобів, у тому числі біологічно активних речовин, є гостра токсичність. Вона оцінюється середньолетальною дозою (DL_{50}), а саме дозою, яка за одноразового введення спричиняє загибель 50 %

піддослідних тварин. Вивчення параметрів гострої токсичності дозволяє, в умовах експерименту на тваринах, визначити характер і вираженість клінічних симптомів отруєння лікарським засобом за одноразового застосування у максимальних дозах. Кількісна оцінка показників гострої токсичності характеризується великою точністю і дає можливість визначити місце досліджуваних препаратів у класифікації токсичності речовин [10].

Метою роботи було визначення параметрів гострої токсичності біологічно активного засобу на основі ПГ молочнокислих і біфідобактерій, а також шкірно-резорбтивну та подразнювальну дію на слизові оболонки очей.

Матеріали і методи

Дослідження проводили на базі лабораторії фармакології та токсикології Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок. Об'єктом дослідження був біологічно активний засіб на основі ПГ молочнокислих і біфідобактерій. Гостру токсичність біологічно активного ветеринарного засобу на основі ПГ визначали відповідно до «Доклінічних досліджень ветеринарних лікарських засобів» [11]. Досліди з визначення гострої токсичності за внутрішньошлункового введення проводили на білих мишах віком 2–3 місяці, масою тіла 18–20 г та 2,5–3-місячних статевозрілих білих щурах, масою тіла 160–180 г. В орієнтовному досліді препарат вводили в діапазоні доз 50, 500 і 5000 мг/кг маси тіла. На кожну дозу використовували по три білих миші та щури. Для проведення розгорнутого досліді було сформовано, за принципом аналогів, три групи білих мишей та три групи білих щурів (2 дослідні і 1 контрольну) по шість тварин у кожній. Мишам та щурам першої групи (контрольної) задавали ізотонічний розчин натрію хлориду, тваринам другої дослідної

групи — біологічно активний засіб на основі ПГ у дозі 5000 мг/кг, тваринам третьої групи — 10000 мг/кг маси тіла. Препарат вводили зранку натще внутрішньошлунково одноразово за допомогою шприца із зондом. Гостру токсичність препарату за підшкірної ін'єкції визначали на білих мишах і щурах. З цією метою за принципом аналогів було сформовано чотири групи білих мишей, масою тіла 18–20 г, та чотири групи білих щурів, масою тіла 160–180 г по шість тварин у кожній груп. Тваринам першої (контрольної групи) вводили ізотонічний розчин натрію хлориду, тваринам другої дослідної групи вводили препарат у дозі — 1500 мг/кг, третьої у дозі — 3000 мг/кг, четвертої у дозі — 5000 мг/кг маси тіла.

Спостереження за дослідними тваринами здійснювали упродовж 14 діб. Ступінь токсичності досліджуваного засобу оцінювали за зміною загального стану тварин, поведінковими реакціями, реакціями на зовнішні подразники, летальністю, зміною динаміки маси тіла тварин, масовими коефіцієнтами внутрішніх органів. Усі дослідження проводили згідно з правилами «Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей» [12].

Враховуючи те, що за перорального застосування препарату можливе його попадання на слизові оболонки очей та шкіру, проведено вивчення подразнювальної дії на слизові оболонки очей та місцеву (подразнювальну) дію на шкіру. Вивчення подразнювальної дії на слизову оболонку очей проводили на трьох статевозрілих кролях-альбіносах, масою тіла 2–3 кг. Перед початком досліджень у експериментальних тварин ретельно оглядали очі з метою виявлення пошкоджень. Кожній тварині акуратно у нижній відділ кон'юнктивального мішка правого ока закапували 0,1 см³ досліджуваного засобу. Після цього повіки закривали і витримували упродовж 1–2 с, за цих умов ліве око було контролем. Тварин

оглядали через 1, 24, 48, 72 год після застосування засобу, враховували стан рогівки, райдужної оболонки кон'юнктиви, набряк кон'юнктиви та наявність виділень. Оцінку зміни стану слизової оболонки проводили за системою А. Майда [13].

Для вивчення місцевої (подразнювальної) дії кролям за добу до проведення дослідів старанно вистригали шерсть на симетричних ділянках, із яких одна сторона була контролем. Площа обробленої поверхні становила 5–8 % поверхні тіла тварини. Після цього 0,5 см³ препарату наносили на ділянку шкіри, зверху накладали марлевий тампон і фіксували його напівпрозорою пов'язкою. Експозиція препарату тривала 4 години, місцеву (подразнювальну) дію оцінювали зразу після закінчення експозиції, та через 24, 48 і 72 годин. За цих умов враховували ступінь шкірної реакції (почервоніння, підвищення чутливості, припухлість, запалення), включно з еритемою і набряком, а також загальну реакцію лабораторних тварин.

Результати й обговорення

Як показали проведені дослідження, загибелі мишей та щурів після одноразового внутрішньошлункового введення біологічно активного засобу на основі ПГ у дозах 5000 та 10000 мг/кг маси тіла не виявили.

Упродовж 14-добового спостереження лабораторні миші та щури мали задовільний апетит, слизові оболонки зберігали природний блідо-рожевий колір, шерсть була гладкою, блискучою. Тварини зберігали рефлекторну збудливість на звукові та світлові подразники, змін кольору сечі та калу не спостерігали, загальна поведінка тварин експериментальних і контрольної груп не відрізнялася.

Крім того, встановлено, що досліджуваний засіб не впливав на масу тварин та вагові коефіцієнти маси внутрішніх органів (табл. 1, 2).

Таблиця 1

Вплив досліджуваного препарату на масу тіла тварин ($M \pm m$, $n=6$)

Групи тварин	Вид тварин	Маса тіла, г		
		3 доба	7 доба	14 доба
I (контрольна)	Миші	19,2 \pm 0,5	20,3 \pm 0,3	20,7 \pm 0,4
	Щури	168,3 \pm 2,6	175,5 \pm 1,4	185,8 \pm 0,9
II дослідна	Миші	19,7 \pm 0,4	20,2 \pm 0,3	20,8 \pm 0,4
	Щури	170,9 \pm 2,5	173,8 \pm 1,5	182,7 \pm 1,3
III дослідна	Миші	19 \pm 0,4	20,3 \pm 0,2	20,6 \pm 0,4
	щури	172,5 \pm 2,5	177,3 \pm 2,1	187,6 \pm 1,9

Таблиця 2

Коефіцієнти масові внутрішніх органів лабораторних тварин ($M \pm m$, $n=6$)

Групи тварин	Вид тварин	Масові коефіцієнти внутрішніх органів					
		печінка	селезінка	серце	тимус	нирки	
						права	ліва
I (контрольна)	миші	51,5 \pm 0,4	9,9 \pm 0,1	5,5 \pm 0,1	5,2 \pm 0,2	9,1 \pm 0,2	10,1 \pm 0,2
	щури	35,7 \pm 1,3	4,2 \pm 0,2	3,6 \pm 0,1	2,6 \pm 0,2	3,2 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1
II дослідна	миші	51,7 \pm 0,4	9,7 \pm 0,2	5,9 \pm 0,2	5,2 \pm 0,4	8,9 \pm 0,2	9,7 \pm 0,3
	щури	34,1 \pm 1,4	4,3 \pm 0,1	3,6 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	3,1 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1
III дослідна	миші	49,9 \pm 1,2	9,7 \pm 0,2	5,7 \pm 0,2	5,1 \pm 0,3	8,8 \pm 0,3	9,7 \pm 0,3
	щури	34,1 \pm 0,7	4,1 \pm 0,2	3,5 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2	3,4 \pm 0,1	3,4 \pm 0,1

Отже, за внутрішньошлункового введення встановити DL_{50} не вдалося, оскільки препарат у максимальних дозах добре переносився тваринами без будь-яких негативних наслідків. Властиво тому, згідно з класифікацією хімічних речовин за ступенем небезпечності (ГОСТ 12.1.007-76), його можна віднести до 4 класу токсичності (малотоксичні речовини).

Після визначення гострої токсичності за підшкірної ін'єкції було встановлено, що досліджуваний засіб у дозах 1500, 3000 і 5000 мг/кг не викликав загибелі та захворювань лабораторних тварин. Дослідний препарат у дозі 5000 мг/кг було введено повторно лабораторним тваринам (по 6 білих мишей та щурів). Після підшкірної ін'єкції і упродовж 14-добового спостереження не було відзначено будь-яких змін поведінки піддослідних тварин, препарат не викликав клінічних симптомів отруєння, а також не

впливав на масу тіла та масові коефіцієнти внутрішніх органів. Відповідно до класифікації речовин за токсичністю, за підшкірної ін'єкції досліджуваний засіб відноситься до 6 класу токсичності (відносно не шкідливі речовини).

За вивчення подразнювальної дії на слизову оболонку очей встановили, що відразу після введення досліджуваного засобу у нижній відділ кон'юнктивального мішка, було незначне почервоніння кон'юнктиви та виділення із слізних залоз, яке зникло через декілька хвилин. У подальшому помутніння рогівки, набряку кон'юнктиви та виділень не спостерігали, райдужна оболонка була без будь-яких видимих змін.

Після вивчення місцевої (подразнювальної) дії біологічно активного засобу місцевого почервоніння, підвищення чутливості, припухлості, запалення, еритеми та набряку шкіри не встановлено.

Індекс первинного подразнення дорівнював нулю.

Висновки

1. Встановлено, що препарат на основі ПГ за внутрішньошлункового введення, згідно з класифікацією хімічних речовин за ступенем небезпечності (ГОСТ 12.1.007-76), відноситься до 4 класу токсичності (малотоксичні речовини). Відповідно до класифікації речовин за токсичністю після підшкірної ін'єкції досліджуваній засіб відноситься до 6 класу (відносно нешкідливі речовини).

2. Препарат не викликав подразнювальної дії на слизові оболонки очей та шкіру, індекс первинного подразнення дорівнював нулю.

Перспективи подальших досліджень. Проведення хронічного досліді з метою виявлення впливу біологічно активного засобу на основі ПГ на організм тварин за тривалого введення.

1. Pinegin B. V., Andronova T. M. Some theoretical and practise ask of clinical using imunomodulator Likopid. *Immunology*, 1998, no 4, pp. 60–63 (in Russian).

2. Mengin-Lecreux D., Lemaitre B. Structure and metabolism of peptidoglycan and molecular requirements allowing its detection by the *Drosophila* innate immune system. *J. Endotoxin. Res.*, 2005, vol. 11, no 2, pp. 105–111.

3. Boneca I. G. The role of peptidoglycan in pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2005, vol. 8, no 1, pp. 46–53.

4. Lin E., Nguyen A., Russell R. G., Pollard J. W. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *Exp. Med.*, 2001, vol. 193, pp. 727–740.

5. Myhre A. E., Stuestol J. F., Wang J. E. et al. Organ injury and cytokine release caused by

peptidoglycan are dependent on the structural integrity of the glycan chain. *Infect. and Immun.*, 2004, vol. 72, no 3, pp. 1311–1317.

6. Feshenko U. I., Yashina L. A., Ishuk S. H., Matvienko U. A. The possibility of using the immunostimulating drug likopid in pulmonology. *Asthma and Allergy*, 2012, no. 1, pp. 62–66 (in Russian).

7. Kozlov I. H., Feshenko U. I., Voronina E. B., Valiakina T. I., Simonova M. A., Hurianova S. V., Mescheriakova E. A., Andronova T. M. Likopid in tumor immunotherapy: a review of experimental studies. *Questions hematology, oncology and immunopathology in pediatrics*, 2011, vol. 10, no 2, pp. 2–7 (in Russian).

8. Kato I., Canzian F., Plummer M., Franceschi S. et al. Polymorphisms in Genes Related to Bacterial Lipopolysaccharide, Peptidoglycan Signaling and Gastric Precancerous Lesions in a Population at High Risk for Gastric Cancer. *Dig. Dis. Sci*, 2007, vol. 52, no 1, pp. 254–261.

9. Posur V. K. *Immunological activity of bacterial peptidoglycans*. Kiev, Fitosoziozentr Publ., 2002. 236 p. (In Ukrainian).

10. Trachtenberg I. M., Sova R. E. Scheftell V. O. *Problems of norm in Toxicology*. Moscow, Medizina Publ, 1991. 202 p. (In Russian).

11. Kotsyumbas I. Ya. *Preclinical studies of veterinary medical products*. Lviv, Triada plyus Publ., 2006. 360 p. (In Ukrainian).

12. Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Low, Regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/ EEC). *The Rules Governing Medicinal Products in the European Community*, 1991, vol. 1, pp. 145–146.

13. Sanoskii I. V., Ulanova I. P. *Hazard Criteria of the Occupational Health and Toxicology at the Risk Assessment of Chemicals*. Moscow, Medizina Publ., 1975. 328 p. (In Russian).