

ДОСЛІДЖЕННЯ ТОКСИЧНОСТІ L-ЛІЗИНУ ЕСЦИНАТУ НА АЛЬТЕРНАТИВНИХ ТЕСТ-ОБ'ЄКТАХ

Б.П. Кузьмін¹, професор, доктор мед. наук,

Д.Д. Остапів² старший наук. співробітник, доктор сільгосп.наук,

Т.С. Зазуляк¹, старший наук. співробітник, кандидат біол. наук,

В.А. Туркіна¹, старший наук. співробітник, кандидат біол. наук,

Т.І. Микітчак³, старший наук. співробітник, кандидат біол. наук, О.І. Грушка¹

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького

²Інститут біології тварин НААН

³Інститут екології Карпат НАН України

РЕЗЮМЕ. Проведено оцінку токсичності лікарського препарату L-лізину есцинату на гіллястовусих рачках *Daphnia magna* Straus та сперміях бугаїв. Встановлено, що токсичність L-лізину есцинату, яка призводить до смертності 50% гіллястовусих рачків *Daphnia magna* Straus, проявляється у межах 3,7-18,7 мг/дм³, у залежності від часу дії та концентрації. Концентрація L-лізину есцинату 15 мг/дм³ є слаботоксичною й належить до другого класу токсичності. Концентрація 30 мг/дм³ – помірно токсична, 3 клас токсичності.

L-лізину есцинат в дозах 1/250 LD₅₀ та LD₅₀ чинить вплив на спермії бугаїв, який характеризується пониженою інтенсивністю окисних процесів, зниженням функціонування ланцюга дихання мітохондрій і ресинтезом АТФ, що зумовлює втрату рухливості та зменшення тривалості виживання.

Ключові слова: L-лізину есцинат, токсичність, альтернативні тест-об'єкти

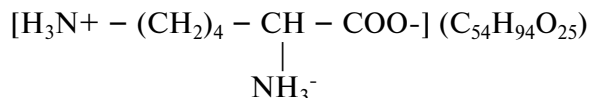
“L-лізину есцинат” (“L-lysine aescinat”, код АТС С05 СХ 03), новий вітчизняний лікарський препарат, який випускається корпорацією “Артеріум” на потужностях АТ “Галичфарм” (м. Львів) [1]. Активнодіючою речовиною препарату є водорозчинна сіль есцину (суміші тритерпенових сапонінових глікозидів із плодів каштану кінського) та амінокислоти лізину [2]. L-лізину есцинат володіє протизапальною, протинабряковою та знеболюючою дією. Препарат призначають при посттравматичних, інтра- і післяопераційних набряках будь-якої локалізації, струсах мозку та при порушенні венозного кровообігу [3, 4, 5]. Промислове виробництво L-лізину есцинату обумовило проведення токсикологічної оцінки та обґрунтування допустимого рівня вмісту речовини в повітрі робочої зони [6].

За правилами нового європейського законодавства, яке набуло чинності з 2007 року, до переліку обов'язкових методів оцінки потенційної небезпечності хімічних речовин для здоров'я людини і довкілля повинні бути включені методи оцінки токсичності на альтернативних тест-об'єктах [7].

Метою роботи була токсикологічна оцінка L-лізину есцинату на альтернативних тест-об'єктах – гіллястовусих рачках *Daphnia magna* Straus та сперміях бугаїв.

Матеріали та методи дослідження. L-лізину есцинат – порошок білого або злегка кремового кольору. Емпірична формула C₆₀H₁₀₈N₂O₂₇.

Структурна формула:



Молекулярна маса препарату дорівнює 1288. Температура плавлення 227–233°C. Добре розчинний у воді та в оцтовій кислоті, малорозчинний у метанолі та практично нерозчинний у 96 % етанолі та ефірах. Середньо-смертельна доза (LD₅₀) L-лізину есцинату при пероральному введенні для білих щурів-самців становить 815 мг/кг [6].

Оцінку токсичності L-лізину есцинату для гіллястовусих рачків *Daphnia magna* Straus (D. magna) проводили у відповідності з КНД 211.14.054-97 [8]. Критерієм токсичності препарату була загибель 50% і більше піддослідних тварин упродовж визначеного часу (через 1 год., 6 год., 24 год., 48 год., 72 год., та 96 год. проведення експерименту). Для порівняння токсичності різних концентрацій L-лізину есцинату (0,06 мг/дм³, 0,12 мг/дм³, 0,2 мг/дм³, 7,2 мг/дм³, 15 мг/дм³, 30 мг/дм³) використовували середню летальну концентрацію (ЛК₅₀) за певний термін дії. Для кожної концентрації проведено по три паралельні досліди на виживання.

Перед проведенням дослідів визначали придатність культури дафній до біотестування за допомогою еталонної токсичної речовини – двохромовоокислого калію (K₂Cr₂O₇). ЛК₅₀ у

цьому випадку становила 1,1 мг/дм³. Експериментально встановлений діапазон реагування тест-об'єкту *D. magna* коливається у межах 0,9-1,5 мг/дм³. Тобто культура була придатною для проведення біотестування. Всього у дослідах використано 180 особин *D. magna* віком до 24 год. та 30 особин у контрольному об'ємі. Дафній розсаджували по 10 особин у ємності зі 100 см³ води.

Для оцінки токсичності L-лізину есцинату на сперміях бугаїв використовували свіжотримані еякуляти таких фізіологічних характеристик: об'єм 4-5 см³, концентрація сперміїв 0,7-0,9x10⁹ клітин/см³, кількість живих статевих клітин 70-85 %. Проби сперми ділили на контрольну розріджену фосфатно-сольовим буфером (ФСБ) складу: NaCl – 0,8 г, KCl – 0,02 г, Na₂HPO₄ – 0,11 г, KH₂PO₄ – 0,02 г, MgCl₂ – 0,01 г, H₂O до 100 см³ та дослідні з додаванням у ФСБ L-лізину есцинату у дозах 1/250 ЛД₅₀ (3,36 мг) та ЛД₅₀ (815 мг). Визначали: виживання сперміїв (год.) до припинення прямолінійного поступального руху в збереженій при температурі 2-5⁰С спермі, дихальну активність (ex tempore) – полярографічно (нг-атом O/0,1 см³ сперми (С)Чхв) у термостатованій комірці (температура 38,5⁰С) об'ємом 1,0 см³ з автома-

тичною реєстрацією перебігу процесу самопишучим потенціометром; відновну активність – потенціометрично (mV/0,1 см³ СЧхв) з використанням системи відкритих мікроелектродів, які вставляли в термостатовану полярографічну комірку [8]. Статистичний аналіз отриманого матеріалу проведено за М. О. Плохінським [9].

Результати досліджень та їх обговорення. Динаміка загибелі *D. magna* упродовж біотестування L-лізину есцинату наведена у табл. 1.

Смертність обраховано за співвідношенням загиблих особин у досліді до загиблих особин у контролі. Встановлено, що в порівнянні з контролем, порогова смертність особин дафній проявляється в концентраціях від 0,12 до 0,2 мг/дм³. Проте у цьому випадку смертність особин є невисокою (7% за 96 год.) і не достовірно відрізняється від рівня смертності у контролі (0% за 96 год.), вказуючи на низьку токсичну дію. Достовірна різниця між смертністю особин в експерименті (33%) й контролі (0%) відзначена після 24 год. дії препарату в концентрації 30 мг/дм³ (табл. 2).

За часом проведення експерименту та смертністю 50% особин і більше встановлено, що концентрація L-лізину есцинату 15 мг/дм³

Таблиця 1

Динаміка загибелі *D. magna* упродовж біотестування L-лізину есцинату

Час	Концентрація мг/л						
	0 (контроль)	0,06	0,12	0,2	7,2	15,0	30,0
1 год.	10	10	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10	10
6 год.	10	10	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10	10
	10	10	10	10	10	10	10
24 год.	10	10	10	10	10	10	6
	10	10	10	10	10	10	7
	10	10	10	10	10	10	7
48 год.	10	10	10	10	10	6	2
	10	10	10	10	10	4	0
	10	10	10	10	10	7	1
72 год.	10	10	10	10	9	4	0
	10	10	10	10	9	2	0
	10	10	10	10	9	3	0
96 год.	10	10	9	9	8	3	0
	10	10	9	10	8	1	0
	10	10	10	9	9	1	0

Смертність особин *D. magna* відносно контролю (%)

Концентрація, Мг/л	Час					
	1 год.	6 год.	24 год.	48 год.	72 год.	96 год.
0,06	0	0	0	0	0	0
0,12	0	0	0	0	0	7
0,2	0	0	0	0	0	7
7,2	0	0	0	0	10	17
15,0	0	0	0	43	70	83
30,0	0	0	33	90	100	100

є слаботоксичною й належить до другого класу токсичності; концентрація 30 мг/дм³ – помірно токсична, 3 клас токсичності. Менші концентрації не є токсичними чи мають статистично невідтверджену опосередковану дію на життєвість дафній.

Показники смертності було переведено у статистичні пробітні величини (пробіти), а концентрації речовини – у їхній десятковий логарифм, при цьому використовувалися показники смертності, більші за нуль і менші за 100%. За пробітами та десятковим логарифмом концентрацій побудовано графіки (рис. 1–3) для розрахунку ЛК₅₀ за антилогарифмом концентрації до пробіти зі значенням 5. Також визначено середнє квадратичне відхилення (σ) ЛК₅₀ за трьома повторностями кожного досліджу.

Виявлено, що ЛК₅₀ 48 год. становить 16,6 ± 2,1 мг/дм³, ЛК₅₀ 72 год. – 11,8 ± 0,8 мг/дм³, ЛК₅₀ 96 год. – 8,3 ± 4,6 мг/дм³. З урахуванням відхилення середнього квадратичного (σ), токсичність препарату, яка призводить до смертності 50% тест-об'єктів, проявляється у межах 3,7–18,7 мг/дм³ і залежно від часу дії та концентрації.

Таким чином, встановлено, що L-лізину есцинат впливає на життєздатність особин *D. magna* прямопропорційно до збільшення його концентрацій та часу дії на ювенільні особини

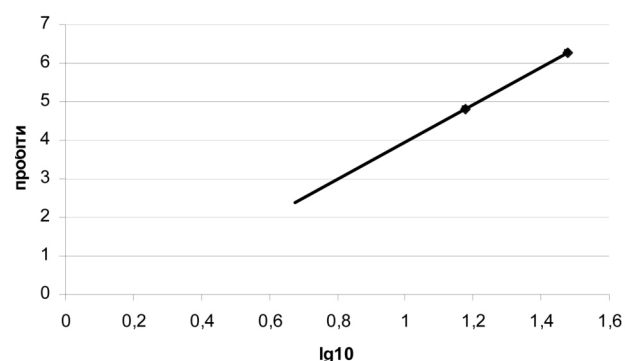


Рис. 1. Графік для розрахунку летальної концентрації L-лізину есцинату – 48 год. (пробіти 5 відповідає lg10 1,22); ЛК₅₀ за антилогарифмом дорівнює 16,6 мг/дм³

(рис. 4), тобто за умови тривалої дії препарату і більшої його концентрації, зростає відсоток смертності тест-об'єктів.

L-лізину есцинат з подібним ефектом викликає негативні зміни у функціонуванні

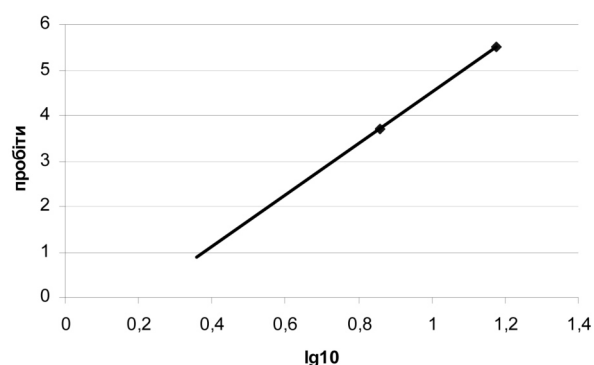


Рис. 2. Графік для розрахунку летальної концентрації L-лізину есцинату – 72 год. (пробіти 5 відповідає lg10 1,07); ЛК₅₀ за антилогарифмом дорівнює 11,8 мг/дм³

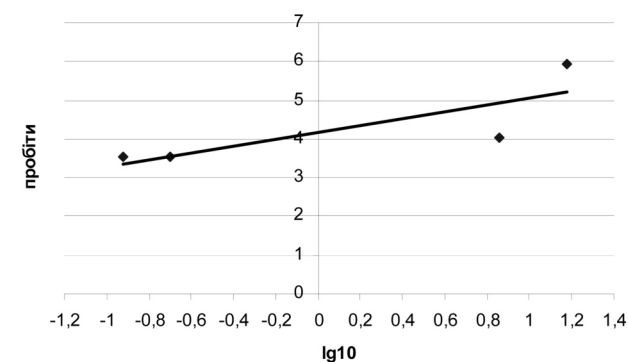


Рис. 3. Графік для розрахунку летальної концентрації – 96 год. (пробіти 5 відповідає lg10 0,92); ЛК₅₀ за антилогарифмом дорівнює 8,3 мг/дм³

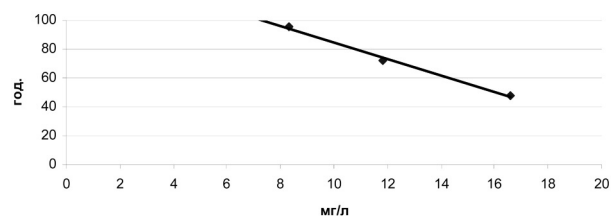


Рис. 4. Залежність ЛК₅₀ L-лізину есцинату від часу дії речовини

Вживання спермій та інтенсивність окисних процесів у спермі бугаїв за дії L-лізину есінат, n = 3; M ± m

Показники	Умови інкубування сперми			Кореляційне відношення, η^2
	Контроль (ФСБ)	ФСБ + 1/250 ЛД ₅₀	ФСБ + ЛД ₅₀	
Вживання спермій, год	144,0 ± 19,60	136,0 ± 26,13	120,0 ± 19,65	0,064
Споживання кисню, нг-атом O/(0,1 см ³ C × хв)	3,7 ± 1,19	2,2 ± 0,50	0,9 ± 0,14	0,427
Відновна активність, mV/(0,1 см ³ C × хв)	5,0 ± 1,18	0,7 ± 0,35*	1,2 ± 0,14*	0,709

Примітка: різниця статистично вірогідна порівняно до контролю — * p < 0,05

різних особин дафній, оскільки найбільша різниця між кількістю живих і загиблих дафній у паралельних дослідах з однаковими концентраціями сягала лише трьох особин. Тобто при тривалій дії препарату смертність особин істотніше відрізняється у ємностях з однаковими концентраціями, ніж за його короткотривалої порогової дії.

Результати проведеного експерименту є статистично достовірними, оскільки в контролі не загинула жодна особина, а смертність в експериментальних ємностях перевищила 50%.

Вживання спермій у спермі за дії L-лізину есінату було понижене. При цьому, препарат в дозі 1/250 ЛД₅₀ на 5,6 % знижував вживання спермій, а на рівні ЛД₅₀ L-лізину есінату зниження досягало 16,7%, порівняно з контролем (табл. 3). Вплив застосованих доз L-лізину есінату на вживання спермій був слабкий за силою ($\eta^2 = 0,064$).

Більшими змінами характеризувалися показники дихальної та відновної активностей сперми за впливу препарату. Так, інтенсивність споживання кисню спермою за додавання L-лізину есінату знижувалася на 40,6% за дози 1/250 ЛД₅₀ і на 75,7% за дози ЛД₅₀, в порівнянні з контролем. Гальмування дихаль-

ної активності супроводжувалося зменшенням транспорту протонів і електронів зі спермій в позаклітинне середовище, що проявлялось зниженням відновної активності за дози 1/250 ЛД₅₀ L-лізину есінату на 86,0 % і за ЛД₅₀ — на 76,0 % (p < 0,05). Вплив наростаючих доз L-лізину есінату на дихальну і відновну активність сперми був відповідно середнім за силою ($\eta^2 = 0,427$) та сильним ($\eta^2 = 0,709$).

Висновки

1. Токсичність L-лізину есінату, яка призводить до смертності 50% гіллястовусих рачків *Daphnia magna* Straus, проявляється у межах 3,7-18,7 мг/дм³, у залежності від часу дії та концентрації. Концентрація L-лізину есінату 15 мг/дм³ є слаботоксичною й належить до другого класу токсичності. Концентрація L-лізину есінату 30 мг/дм³ — помірно токсична, 3 клас токсичності.

2. L-лізину есінат в дозах 1/250 ЛД₅₀ та ЛД₅₀ чинить вплив на спермі бугаїв, який характеризується пониженою інтенсивністю окисних процесів, ймовірно, зниженим функціонуванням ланцюга дихання мітохондрій і ресинтезом АТФ, що зумовлює втрату рухливості та зменшення тривалості вживання.

ЛІТЕРАТУРА

1. Шовковий А.В. Розробка методів аналізу нових біологічно активних сполук у ряду похідних амінокислот за стандартизації лікарських засобів на їх основі: автореф. дис. на здобуття наук.ступеня канд. фарм. наук: спец.15.00.03 "Стандартизація та організація виробництва лікарських засобів" / А.В.Шовковий. — Харків, 1999. — 28 с.
2. Куцик Р.В. Каштан конський (*Aesculus hippocastanum* L.) / Р.В. Куцик, Б.М. Зузук, В.В. Дьячок // Провізор. — 2002. — №5. — С. 36–40.
3. Поворознюк В.В. Использование L-лизина эсцината в реабилитации больных с остеохондрозом пояснично-крестцового отдела позвоночника / В.В. Поворознюк, О.Б. Шеремет // Вісник ортопедії, травматології та протезування. — 2003. — №3. — С.25–29.
4. Спасиченко П.В. Лечение больных с тяжелой черепно-мозговой травмой с применением L-лизина эсцината / П.В. Спасиченко // Український нейрохірургічний журнал. — 2003. — №4 (24). — С. 33–41.
5. Сапон Н.А. Применение препарата L-лизина эсцината в нейрохирургии, неврологии, травматологии и ортопедии / Н.А.Сапон, П.В.Спасиченко // Новости медицины и фармации. — 2004. — №10–11(150-151). — С.3–5.
6. Кузьмінов Б.П. Обгрунтування орієнтовно безпечного рівня впливу L-лізину есінату у повітрі робочої зони / Б.П. Кузьмінов, О.І. Грушка, Т.С. Зазуляк // Вестник гигиены и эпидемиологии. — 2009. — Том 13. — №1. — С.143–146.
7. Профілактична токсикологія та медична екологія. Вибрані лекції для науковців, лікарів та студентів за загальною редакцією академіка НАМН України І.М. Трахтенберга. К.: ВД "АВІЦЕНА", 2011. — 320 с.

8. Плохинский Н.А. Биометрия 2-е изд. / Н.А. Плохинский – М.: Изд-во МГУ, 1970. – 367 с.
9. Штольц К.Ф. Амперометрическое определение ферроци-

анада в присутствии субклеточных структур / К.Ф. Штольц, И.М. Мосолова, Л.А. Дронова // Биохимические методы. – М.: Наука, 1980. – С. 147–150.

ИССЛЕДОВАНИЕ ТОКСИЧНОСТИ L-ЛИЗИНА ЭСЦИНАТА НА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕСТ-ОБЪЕКТАХ

Б.П. Кузьминов, Д.Д. Остапів, Т.С. Зазуляк, В.А. Туркина, Т.И. Микитчак, А.И. Грушка

РЕЗЮМЕ. Проведена оценка токсичности лекарственного препарата L-лизина эсцинат на ветвистоусых рачках *Daphnia magna* Straus и спермиях быков. Установлено, что токсичность L-лизина эсцинат, которая приводит к смертности 50% ветвистоусых рачков *Daphnia magna* Straus, проявляется в пределах 3,7- 18,7 мг/дм³, в зависимости от времени действия и концентрации. Концентрация L-лизина эсцинат 15 мг/дм³ является слаботоксичной и относится ко второму классу токсичности. Концентрация L-лизина эсцинат 30 мг/дм³ - умеренно токсичная, 3 класс токсичности. L-лизина эсцинат в дозах 1/250 LD₅₀ и LD₅₀ оказывает влияние на спермии быков, которое характеризуется пониженной интенсивностью окислительных процессов, пониженным функционированием цепи дыхания митохондрий и ресинтезом АТФ, что приводит к потере подвижности и уменьшению длительности выживания.

Ключевые слова: L-лизин эсцинат, токсичность, альтернативные тест-объекты.

THE TOXICITY OF L-LYSINE AESCINAT ON ALTERNATIVE TEST OBJECTS

B. Kuzminov, D. Ostapiv, T. Zazulyak, V. Turkina, T. Mykitchak, O.I. Grushka

SUMMARY. Purpose. Evaluation of the toxicity of drug L-lysine aescinat on cladocerans *Daphnia magna* Straus and bull semen.

Methods. The criterion of toxicity for cladocerans *Daphnia magna* Straus was the death of 50% or more test organisms within a specified period of time (over 1 hour, 6 hrs., 24 hrs., 48 hrs., 72 hrs. and 96 hrs. of the experiment). To compare the toxicity of different concentrations of L-lysine aescinat (0.06 mg/dm³, 0.12 mg/dm³, 0.2 mg/dm³, 7.2 mg/dm³, 15 mg/dm³, 30 mg/dm³) the average lethal concentration for a certain duration has used. All of the experiments used 180 organisms *D. magna* under 24 hours and 30 organisms in the control volume.

To assess the toxicity L-lysine aescinat on bull spermatozoa were used the freshly prepared ejaculates with the following physiological characteristics: volume 4.5 cm³, sperm concentration 0,7-0,9×10⁹ cells/cm³, the number of live gametes 70-85%. Sperm samples were divided into control sample which was diluted with phosphate-buffered saline and research samples with the addition of L-lysine aescinat in 1/250 LD₅₀ (3.36 mg) and LD₅₀ (815 mg) doses to phosphate-buffered saline. Survival of spermatozoa (hrs.) until termination of rectilinear translational motion in semen preserved at 2 - 50C, respiratory activity (ex tempore) and recovery activities were determined.

Results. It was found that toxicity of L-lysine aescinat causes the death of 50% of cladocerans *Daphnia magna* Straus, which is manifested within 3,7-18,7 mg/dm, depending on time of action and concentration. L-lysine aescinat in doses 1/250 LD₅₀ and LD₅₀ affects bull semen, that is characterized by low intensity of oxidation processes, reduced functioning of the respiratory chain of mitochondria and the resynthesis of ATP, which leads to loss of mobility and reduce the duration of survival.

Conclusions. The concentration of L-lysine aescinat 15 mg/dm³ is slightly toxic and belongs to the 2nd grade of toxicity. The concentration of L-lysine aescinat 30 mg/dm³ is moderately toxic, 3rd grade of toxicity.

Keyword: L-lysine aescinat, cladocerans *Daphnia magna* Straus, bull semen, toxicity

Надійшла до редакції 19.08.2014 р.