

ПОКАЗНИКИ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПЕГ-ВМІСНОГО ПОЛІМЕРНОГО НАНОНОСІЯ У БІЛИХ ЛАБОРАТОРНИХ МИШЕЙ І ЩУРІВ

Л.І. Кобилінська¹, кандидат мед. наук, І.П. Патерега³, кандидат вет. наук,
А.О. Рябцева², кандидат хім.наук, Н.Є. Мітіна², кандидат хім. наук,
О.С. Заїченко², кандидат хім. наук, І.Я. Коцюмбас³, доктор вет. наук, професор,
член-кор. НААН України, Б.С. Зіменковський¹, доктор фарм. наук, професор, член-кор.
НАМН України, Р.С. Стойка⁴, доктор біол. наук, професор, член-кор. НАН України

¹Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького, м. Львів

²Національний університет „Львівська Політехніка”, м. Львів

³ДНДКІ ветпрепаратів і кормових добавок, м. Львів

⁴Інститут біології клітини НАН України, м. Львів

РЕЗЮМЕ. Метою наших досліджень було встановлення гострої токсичності поліетиленглікольвмісного наноносія у лабораторних тварин (білі щури і миші) за умови його одноразового введення. Носієм є водорозчинний гребенеподібний полімер полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-ПЕГ із основним ланцюгом на основі кополімеру ненасиченого пероксиду 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін (ВЕР) і гліцидил метакрилату (ГМА) та поліетиленгліколевіми (ПЕГ) бічними ланцюгами. Носій сконструйований і синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська Політехніка». Встановлено, що носій А24РЕГ, за умов його доочеревинного введення, не має токсичного впливу на білих лабораторних щурів (доза 440 мг/кг ваги, об'єм — 10 мл) та на білих лабораторних мишей (доза 470 мг/кг ваги, об'єм — 1 мл). ПЕГ-вмісний наноносіє А24РЕГ можна віднести до 4-го класу токсичності (малотоксичні речовини).

Ключові слова: наноносіє, полімер, поліетиленгліколь, гостра токсичність.

На сьогодні гостро стоїть завдання усунення чи хоча б зниження негативних побічних ефектів низки фармацевтичних препаратів, зокрема протипухлинних, які характеризуються загальною токсичною дією в організмі та значно обмежують застосування деяких фармакологічних засобів [1,2,3,4,5]. Одним із ефективних шляхів розв'язання цієї проблеми є використання багатофункціональних носіїв лікарських засобів, здатних зв'язувати токсичну субстанцію до моменту її адресної доставки до точки прикладання у клітинах-мішенях специфічних органів чи тканин [4,6,7]. Перспективними для цього сьогодні вважають наночастинки (розміром від 0,1 до 100 нм), малий розмір яких, структура, велика площа поверхні та форма — це ті властивості, які надають наноносіям переваг над іншими матеріалами [5,8,9]. За допомогою наночастинок можливо оптимізувати ефективність, звести до мінімуму побічні ефекти та покращити комплайєнс [8,9]. Ті ліки, які не мали успіху раніше через високу токсичність, сьогодні можуть отримати шанс на друге життя, завдяки включенню у системи доставки з покращеною біодоступністю та їх контрольованим вивільненням. Такі комплекси легко проникають крізь природні бар'єри чи навіть мем-

брани окремих клітин. Велика площа поверхні наночастинок зумовлює можливість утворювати комплекси з чисельними біомолекулами, що робить реальністю цільову доставку лікарського препарату до органа-мішені, призводить до значного обмеження або навіть повної відсутності побічних ефектів, дає змогу збільшити разову дозу медикаменту, підвищує ефективність препаратів, надає нового поштовху в розвитку так званої персоналізованої фармакотерапії. Окрім цього, наночастинки можуть інкапсулювати або зв'язувати молекули, що підвищує розчинність, стабільність, а також абсорбцію деяких препаратів [9,10,11,7]. До систем доставки ліків висувають такі вимоги, як пролонгована циркуляція у крові, здатність до акумуляції у зоні патологічного процесу, ефективно переносити молекули діючої речовини в клітину та окремі органели. Вони повинні бути стабільними і зберігати хімічну структуру протягом певного періоду часу і водночас бути здатними до біодеградації [12,13].

Полімерні наноносіє — одні з найперспективніших у сучасній нанофармакології, оскільки вони володіють цілою низкою специфічних фізико-хімічних і біологічних властивостей, які забезпечують їхню біосумісність, біодеградабельність, можливість додаткової

функціоналізації спеціальними біоелементами, необхідними для доставки фармацевтичних препаратів в організмі [6,7,8,11]. Встановлено, що лікарські форми, у яких активна діюча речовина кон'югована з полімерним носієм, мають нижчу токсичність, покращені фармакокінетичні параметри і вищу ефективність терапевтичної дії [6,12]. Тому одним із головних завдань сучасної біофармацевтики є розробка безпечних нанорозмірних носіїв із заданим розміром, низькою токсичністю, фізичною стабільністю у крові, сумісністю з метаболітами організму, регульованим впливом на пошкодження, можливостями спрямованої доставки ліків до мішені дії [8,12,13,14]. Важливим є також конструювання водорозчинних комплексів полімерів, які були б універсальними носіями лікарських засобів і водночас безпечними для організму. Найчастіше для цього використовують нейонний поліетиленгліколь (ПЕГ) [6,7,8]. Його приєднання підвищує розчинність гідрофобних лікарських засобів, продовжує час циркуляції, мінімізує неспецифічне поглинання, забезпечує конкретне цільове фокусування пухлини і тенденцію до акумулювання ліків у тканині пухлини [6,7,8].

Токсикологічні аспекти застосування полімерних наноносіїв у фармації та медицині залишаються недостатньо вивченими. Тому стадії клінічного застосування досягли лише носії протипухлинних препаратів на основі ліпосом [9]. Лікарський комплекс Doxil містить у своєму складі, крім відомого протипухлинного препарату доксорубіцину, ще й поліетиленгліколь (ПЕГ), який перешкоджає передчасному видаленню названого комплексу фагоцитуючими клітинами, зокрема макрофагами [13,15]. Прикладами розроблених на сьогодні нанопрепаратів із протипухлинною активністю є Caelyx (ліпосомний доксорубіцин), Atragen (ліпосомний третиноїн), DaunoXome (ліпосомний даунорубіцин) [8, 13]. Яскравим прикладом сумісного застосування наночастинок з протипухлинними препаратами є кон'югат доксорубіцину з біодеградувальним дендримером, ефективність якого вивчали на прищепленій мишам карциномі С-26 товстої кишки. Під час доведеного введення, цей препарат у 9 разів ефективніше поглинався клітинами пухлини, ніж вільний доксорубіцин. Одноразове його введення у дозі 20 мг/кг викликало повний регрес пухлини і 100% виживання тварин, тоді як максимальна токсична доза вільного доксорубіцину для мишей становить 6 мг/кг і не спричиняє бажаного терапевтичного ефекту [16].

Малодослідженою також є проблема залежності токсичності від форми і розмірів молеку-

ли наноносія та його вплив на метаболічні процеси в організмі. Зазначені вище проблеми є ключовими у контексті безпечності новостворених лікарських засобів та обмежують їх використання у медичній практиці. Тому з'ясування безпечності різних систем доставки ліків, зокрема їхньої гострої токсичності, є одним із важливих етапів розробки нових лікарських засобів.

Мета роботи. Раніше авторами роботи було продемонстровано високу ефективність застосування носія A24PEG для доставки доксорубіцину [14] і рутеній-вмісного протипухлинного препарату КР-1019 [6] з метою пригнічення росту пухлинних клітин *in vitro* та у лабораторних мишей. Метою наших досліджень було встановлення гострої токсичності ПЕГ-вмісного носія A24PEG у лабораторних тварин (білі щури і миші) за умови його одноразового введення.

Матеріали і методи дослідження. Синтез, структура і коротка характеристика ПЕГ-вмісного носія A24PEG. У роботі використовували носій, сконструйований і синтезований на кафедрі органічної хімії Національного університету «Львівська Політехніка». Носієм є водорозчинний гребенеподібний полімер полі(ВЕР-ко-ГМА)-графт-ПЕГ (позначений як A24PEG) із основним ланцюгом на основі кополімеру ненасиченого пероксиду 2-третбутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ін (ВЕР) і гліцидил метакрилату (ГМА) та поліетиленгліколевими (ПЕГ) бічними ланцюгами [7]. На рис. 1 представлено структурну формулу носія A24PEG.

Синтез полімерного носія A24PEG здійснювали у дві стадії. На першій стадії шляхом радикальної полімеризації ВЕР та ГМА отримували лінійний кополімер полі(ВЕР-ко-ГМА). На другій стадії синтезу даний кополімер був модифікований монометиловим етером поліетиленгліколю (мПЕГ) молекулярної маси 750 г/моль, завдяки взаємодії епоксидних груп кополімеру із гідроксильними групами мПЕГ. Молекулярну масу кополімеру полі(ВЕР-ко-ГМА) визначали за допомогою гель-проникної хроматографії, використовуючи для цього стирогелеві колонки на рідинному хроматографі „Waters GPC/HPLC”. Елюентом слугував тетрагідрофуран, швидкість елюцій під час хроматографії становила 0,3 мл/хв.

Водний препарат носія A24PEG готували шляхом переводу полімеру з органічної фази у неорганічну, для чого наважку кополімеру розчиняли у диметилсульфоксиді (ДМСО) і додавали краплинами при перемішуванні до фізіологічного розчину. Отриманий розчин піддавали дії ультразвуку протягом 20 с.

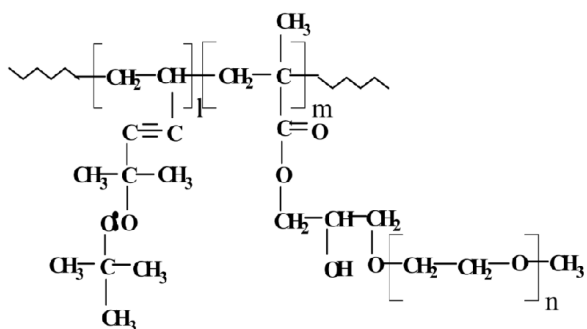


Рис. 1. Формула ПЕГ-вмісного носія А24РЕГ, де "n", "l" і "m" означають кількість відповідних структурних компонентів, вміст яких у молекулі носія наведено у табл. 1.

Молярна маса носія А24РЕГ розрахована, виходячи з молярної маси вихідного кополімеру полі(ВЕП-ко-ГМА) (61 000 г/моль) і ступеня конверсії епоксидних груп, наявних на початку реакції полімеризації, і становить 245 000 г/моль. Відсутність в отриманому продукті залишкових епоксидних груп було підтверджено за допомогою ¹H-ЯМР спектроскопії. Склад і молекулярно-масові характеристики синтезованого гребенеподібного полімеру А24РЕГ наведено у табл. 1.

Діаметр частинок носія А24РЕГ за даними трансмісивної електронної мікроскопії (ТЕМ) становив 61 нм (рис. 2). ТЕМ-зображення міцелоподібних структур у водних препаратах полімеру одержано на електронному мікро-

скопі JEM-200A фірми "JEOL" при прискорювальній напрузі 200 кВ. Як підкладку використовували тонку аморфну вуглецеву плівку, нанесену на мідну сітку.

Вказаний розмір міцелоподібних частинок у їх водному препараті підтверджено за допомогою методу динамічного світлорозсіяння із використанням приладу Zetasizer Nano (Malvern) і технології неінвазивного зворотного розсіяння за температури 25 °С. Застосування цього методу також дозволило визначити ζ-потенціал (дзета-потенціал) частинок носія А24РЕГ у його водному препараті, що дорівнював 0,11 мВ [7].

Вивчення гострої токсичності ПЕГ-вмісного носія А24РЕГ. Досліди проводили на білих лабораторних мишах 3-4-місячного віку з масою тіла 20-22 г і на білих щурах лінії Вістар

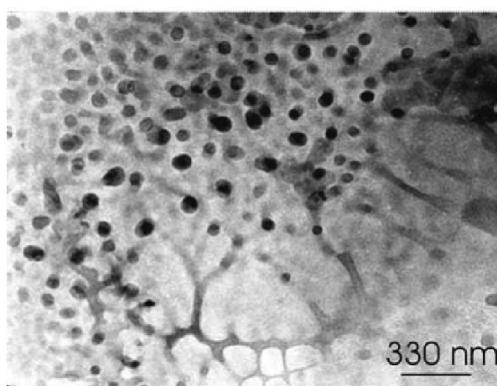


Рис. 2. ТЕМ-зображення міцелоподібних структур, утворених ПЕГ-вмісним полімерним носієм А24РЕГ.

Таблиця 1

Молекулярно-масові характеристики ПЕГ-вмісного носія А24РЕГ

Склад вихідного кополімеру, % мол.		Склад модифікованого кополімеру А24РЕГ, % мол.			Mn А24РЕГ, г/моль
ВЕП	ГМА	ВЕП	ГМА	ПЕГ	
2,0	98,0	1,4	69,1	29,5	245 000

Таблиця 2

Показники токсичності ПЕГ-вмісного носія А24РЕГ на щурах лінії Вістар (14-та доба)

Кількість тварин у групі	Доза препарату, мл (мг/кг ваги)	Маса тіла тварин, г		Число загиблих тварин		
				всього	у %	середній час загибелі
6	1 (57,7)	155-178 (171,5±11,2)	143-180 (161,5±12,4)	0	0	0
6	3 (135)	190-250 (220±23)	180-255 (217,5±30,7)	0	0	0
6	5 (225)	210-230 (220±9,4)	210-235 (222,5±9,8)	0	0	0
6	10,0 (440)	210-240 (225±14,7)	210-250 (230±18,2)	0	0	0
6 (повтор)	10,0 (440)	210-240 (225±14,7)	210-250 (230±18,2)	0	0	0

3-4-місячного віку з масою тіла 170-190 г. У роботі дотримувалися Наказу МОЗ України №944 від 14.12.2009 р. «Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів», а також Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986) і Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» [1,2,5,17,18,19,20].

Носій А24РЕG вводили піддослідним тваринам щоденно, ін'єкційно, доочеревинно. Всього було використано 24 білих щурів і 24 білих мишей. Мишам наносій вводили в дозі 0,1, 0,3, 0,5 і 1,0 мл, а щурам – 1,0, 3,0, 5,0 та 10,0 мл. Найвищу дозу препарату (10,0 мл) вводили повторно 6-ти щурам і 1,0 мл – 6-ти мишам. 1 мл препарату містив 9,9 мг полімерного носія А24РЕG. Контрольній групі тварин вводили фізіологічний розчин в аналогічному об'ємі.

Зважування піддослідних тварин проводили на 5, 8 і 14 добу за допомогою ваги ВР-02 МСУ. Після введення носія А24РЕG лабораторним тваринам спостереження за ними вели протягом 14 діб. При цьому враховували такі показники: зовнішній вигляд, особливості поведінки тварин, інтенсивність і характер рухової активності, а також оцінювали прийом корму і води, визначали масу тварин, стан шерсті, видимих слизових оболонок, ритм, частоту дихання, час виникнення та характер інтоксикації, її важкість, перебіг, час загибелі тварин або їх видужування. Під час досліду реєстрували загибель лабораторних тварин.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили, використовуючи загальноприйнятій методі варіаційної статистики за допомогою комп'ютерної програми MS Excel із визначенням t-критерію Стьюдента.

Статистично вірогідною вважали різницю за умови, що $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. За умов доочеревинного введення полімерного наносія А24РЕG встановлено короткочасне пригнічення фізіологічної активності лабораторних тварин, які одержували цей препарат у найвищих дозах (1 мл і 10 мл, відповідно), що можливо пов'язане із надходженням в організм тварин великого об'єму препарату. Проте вже на наступну добу після ін'єкції змін у поведінці та фізіологічному стані тварин дослідних груп не спостерігали. Такі ж результати були одержані при повторному введенні наносія А24РЕG щурам (доза 10,0 мл, що відповідає 99 мг препарату А24РЕG) і мишам (доза 1,0 мл, що відповідає 9,9 мг препарату А24РЕG).

Маса тіла тварин, яким вводили наносій А24РЕG у вказаних дозах, практично не відрізнялася від маси тіла тварин перед введенням препарату і після закінчення експерименту (табл. 2 і 3). З даних таблиць 2 і 3 видно, що за використаних доз наносія А24РЕG він не володів вираженою токсичною дією щодо лабораторних тварин (у визначеному інтервалі доз не відбулося загибелі жодної тварини).

Оскільки нам не вдалося встановити ЛД₅₀ ПЕГ-вмісного наносія А24РЕG ні у лабораторних щурів, ні у лабораторних мишей, то враховуючи шлях введення і відповідно до класифікації речовин за токсичністю, цей полімерний наносій можна віднести до 4-го класу токсичності, а саме до малотоксичних сполук [1,2,5,18]. Необхідно зазначити, що використані нами дози препарату наносія (1 і 10 мл на щура) і у випадку його дії на мишей (0,1 і 1 мл на мишу) перевищували дози, які ми раніше застосовували під час лікування мишей із лімфоною NK/Ly чи з лейкозом L1210 доксорубіцином, іммобілізованим на цьому ж наносії [6,14].

Таблиця 3

Показники токсичності ПЕГ-вмісного носія А24РЕG на лабораторних мишах (14-та доба)

Кількість тварин у групі	Доза препарату, мл (мг/кг ваги)	Маса тіла тварин, г		Число загиблих тварин		
				всього	у %	середній час загибелі
6	0,1 (48,3)	19-22 (20,5±1,5)	19-22 (20,5±1,5)	0	0	0
6	0,3 (148,5)	18-22 (20±2,0)	18-22 (20±2,0)	0	0	0
6	0,5 (235,7)	18-24 (21±3,0)	18-24 (21±3,0)	0	0	0
6	1,0 (471,4)	19-23 (21±2,0)	19-23 (21±2,0)	0	0	0
6 (повтор)	1,0 (471,4)	20-22 (21±1,0)	20-22 (21±1,0)	0	0	0

Наявність хімічного зв'язку —О— у структурі бічних ланцюгів полімерного наноносія A24PEG дозволяла нам припускати відщеплення ПЕГ внаслідок ензиматичних реакцій в організмі піддослідних тварин [7]. Відомо, що етиленгліколь викликає гостру інтоксикацію у людей при перевищенні рівня 500 мг/л у крові, а мінімальна смертельна доза для людини становить 50 г чистого етиленгліколю per os [21]. У той же час ПЕГ (полімерна форма етиленгліколю) є малотоксичною і його допустимою дозою для тварин вважають 10 мг/кг ваги [21]. Етиленгліколь швидко всмоктується у кишці, у крові виявляється через 1–2 год, а період його напіврозпаду — близько 3 год. Він підлягає метаболічним перетворенням у печінці за участю алкогольдегідрогенази, тоді як решта (20–50%) виділяється із сечею у незміненому вигляді [21]. Основними токсичними метаболітами етиленгліколю є органічні кислоти (гліколева, гліоксалева, шавлева, мурашина), дія яких призводить до метаболічного ацидозу і нефротоксичних ефектів [21]. Окрім цього, під впливом етиленгліколю знижується співвідношення НАД⁺/НАДН, пригнічується активність глюконеогенезу у печінці, що призводить до зростання рівня лактату і поглиблення метаболічного ацидозу [21]. За дії етиленгліколю в організмі порушується електролітний баланс, зокрема отруєння етиленгліколем часто супроводжує гіпокальціємія, яка розвивається внаслідок хелатного ефекту шавелевої кислоти щодо йонів кальцію. При цьому утворюється малорозчинний оксалат кальцію, який кристалізується у нирках, що обумовлює зниження концентрації катіонів Са у плазмі крові [21].

Інший потенційно небезпечний хімічний компонент у структурі носія A24PEG — це пероксидна група —О—О— у частині бічних ланцюгів полімера (рис. 1). Раніше автори роботи показали високу термостабільність дитретинної пероксидної групи, яка входить до складу структури носія A24PEG, причому її вміст не перевищує 1% [22]. Якщо б такої стабільності цього пероксиду не існувало, це неминуче призвело б до змін на ензиматичному рівні, тоді як ми їх не спостерігали [4]. Навпаки, перебування доксорубіцину у комплексі з наноносієм A24PEG запобігало проявам кардіотоксичної дії цього протипухлинного препарату в організмі лабораторних щурів. Адже відомо, що саме активні форми кисню є відповідальними за значну кардіотоксичну дію доксорубіцину, що є серйозною перешкодою у збільшенні масштабів його використання у протипухлинній хіміотерапії [4,23].

Висновки. ПЕГ-вмісний наноносій A24PEG, за умов його доочеревиного введення, не має токсичного впливу на білих лабораторних щурів (доза 440 мг/кг ваги, об'єм — 10 мл) та білих лабораторних мишей (доза 470 мг/кг ваги, об'єм — 1 мл). На цій підставі вказаний полімерний наноносій можна віднести до 4-го класу токсичності (малотоксичні речовини).

Раніше авторами роботи було продемонстровано високу ефективність доставки протипухлинних препаратів наноносієм A24PEG у злоскісні клітини мишей, що разом з результатами даного дослідження, вказує на перспективність його подальшого використання [6,14].

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / за ред. І.Я. Кошомбаса— Львів, 2006. — 359 с.
2. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / за ред. О.В. Стефанова— К., 2001. — 527 с.
3. Дослідження гострої токсичності та кумулятивних властивостей у щурів нових похідних 4-тіазолідонів із потенційною антинеопластичною активністю / Л.І. Кобилінська, Д.Я. Гаврилук, І.П. Патерега [та ін.] // Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки. — 2013. — №4 (63). — С. 38–43.
4. Дослідження біохімічних показників кардіотоксичної дії нових протипухлинних похідних 4-тіазолідонів і доксорубіцину у комплексах із поліетиленглікольвмісним полімерним носієм у сироватці крові щурів / Л.І. Кобилінська, Д.Я. Гаврилук, А.О. Рябцева [та ін.] // Укр. біохім. журн. — № 3. — 2014.
5. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических средств / Е.В. Арзамасцев, Т.А. Гуськова, И.В. Березовская [и др.] // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ — М., 2000. — С.18–26.
6. Nanof ormulation Improves Activity of the (pre)Clinical Anticancer Ruthenium Complex KP1019 / P. Heffeter, A. Riab tseva, Y. Senkiv [et al.] // J. Biomed. Nanotechnol. — 2013. — Vol. 9. — P. 1–8.
7. Structural and Colloidal-Chemical Characteristics of Nanosized Drug Delivery Systems Based on Pegylated Comb-like Carriers / A. Riab tseva, N. Mitina, N. Boiko [et al.] // Chemistry and Chem. Technol. — 2012. — Vol. 6, №3. — P. 291–295.
8. Нанолікарства. Концепції доставки лікарств в нанонауку / гл. ред. А. Лампрехт. — М.: Научний мир, 2010. — 232 с.
9. Buse J. Properties, engineering and applications of lipid-based nanoparticle drug-delivery systems: current research and advances / J. Buse, A. El-Aneed // Nanomedicine (Lond). — 2010. — Vol. 5, № 8. — P. 1237–1260.
10. Jin S. E. Multiscale observation of biological interactions of nanocarriers: from nano to macro / S. E. Jin, J. W. Bae, S. Hong // Microsc. Res. Tech. — 2010. — Vol. 73, № 9. — P. 813–823.
11. Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferring as gene carriers: preparation and in vitro evaluation / Y. Li, M. Ogris, E. Wagner [et al.] // Int. J. Pharm. — 2003 — Vol. 259. — P. 93–101.
12. Igarashi E. Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines // Toxicology and Applied Pharmacology. — 2008. — Vol. 229. — P. 121–134.

13. Zhang J. Polymeric nano-assemblies as emerging delivery carriers for therapeutic applications: a review of recent patents / J. Zhang, S. Li, X. Li // *Recent Pat Nanotechnol.* — 2009. — Vol. 3, № 3. — P. 225–231.
14. Enhanced Anticancer Activity and Circumvention of Resistance Mechanisms by Novel Polymeric/Phospholipidic Nanocarriers of Doxorubicin / Senkiv Yu., Riabtseva A., Heffeter P. [et al.] // *J. of Biomed. Nanotechnol.* — 2014. — Vol. 10, №7. — P. 1–13.
15. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies / Y. Octavia, C.G. Tocchetti, K.L. Gabrielson [et al.] // *J. Mol. Cell. Cardiol.* — 2012. — 52(6). — P.1213–1225.
16. A single dose of doxorubicin-functionalized bow-tie dendrimer cures mice bearing C-26 colon carcinomas / C.C. Lee, E. R. Gillies, M. E. Fox [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 2006. — Vol. 103, № 45. — P. 16649–16654.
17. Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944 — Режим доступу <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=z0053-10/>
18. Европейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18 березня 1986 року). - Режим доступу http://zakon2.rada.gov.ua/laws/show/994_137
19. Закон України «Про захист тварин від жорстокого поводження». — Режим доступу <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/show/3447-15>.
20. Токсикологічний контроль нових засобів захисту тварин: Методичні рекомендації / М.В. Косенко, О.Г. Малик, І.Я. Коцюмбас та ін. — К., 1997. — 34 с.
21. *Топчиева И.Н.* Применение полиэтиленгликоля в биохимии / И.Н. Топчиева // *Успехи химии.* — 1980. — Т. XLIX, вып. 3. — С. 494–517.
22. *Zaichenko A., Voronov S., Shevchuk O., Vasiliev V., Kuzaev A.* Kinetic Features and Molecular - Weight Characteristics of Terpolymerization Products of the Systems Based on Vinyl Acetate and 2-tert-Butyl-peroxy-2-Methyl-5-Hexene-3-ene. // *Journal of Applied Polymer Science.* — 1997. — Vol.67. — P.1061–1066/
23. Mechanisms and management of doxorubicin cardiotoxicity / Shi Y., Moon M., Dawood S. [et al.] // *Herz.* — 2011. — 36(4). — P.296–305.

ПОКАЗАТЕЛИ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПЕГ-СОДЕРЖАЩЕГО ПОЛИМЕРНОГО НАНОНОСИТЕЛЯ У БЕЛЫХ ЛАБОРАТОРНЫХ МЫШЕЙ И КРЫС

Л.И. Кобылинская, И.П. Патерега, А.О. Рябцева, Н.Е. Митина, О.С. Заиченко, И.Я. Коцюмбас, Б.С. Зименковский, Р.С. Стойка

РЕЗЮМЕ. Цель. Цель наших исследований — установление острой токсичности полиэтиленгликольсодержащего наноносителя у лабораторных животных (белых крыс и мышей) при условии его однократного введения.

Материалы и методы. В работе использовали носитель, сконструированный и синтезированный на кафедре органической химии Национального университета «Львовская Политехника». Носителем является водорастворимый гребнеобразный полимер поли(ВЕР-ко-ГМА)-графт-ПЭГ (обозначен как А24РЕГ) с основной цепью на основе кополимера ненасыщенного пероксида 2-трет-бутилперокси-2-метил-5-гексен-3-ин (ВЕР) и глицидил метакрилата (ГМА) и полиэтиленгликолевыми (ПЭГ) боковыми цепями. Водный препарат носителя А24РЕГ готовили путем перевода полимера из органической фазы в неорганическую, полученный раствор подвергали действию ультразвука в течении 20 с. Молярная масса носителя А24РЕГ составляет 245 000 г/моль, диаметр частиц по данным трансмиссивной электронной микроскопии — 61 нм.

Опыты проводили на белых лабораторных мышах 3-4-месячного возраста с массой тела 18-24 г и на белых крысах линии Вистар 3-4-месячного возраста с массой тела 143-255 г. Носитель А24РЕГ вводили подопытным животным ежедневно, инъекционно, внутривентриально в дозах 0,1, 0,3, 0,5 и 1,0 мл, а крысам — 1,0, 3,0, 5,0 и 10,0 мл. Наивысшую дозу препарата (10,0 мл) вводили повторно 6-ти крысам и 1,0 мл — 6-ти мышам. 1 мл препарата содержал 9,9 мг полимерного носителя А24РЕГ.

Результаты. Установлено, что носитель А24РЕГ при условиях его внутривентриального введения не имеет токсического влияния на белых лабораторных крыс в дозе 440 мг/кг веса и объеме — 10 мл и у белых лабораторных мышей в дозе 470 мг/кг веса и объеме — 1 мл. Носитель можно отнести к 4-му классу токсичности, поскольку нам не удалось установить ЛД50 ПЭГ-содержащего наноносителя А24РЕГ ни у лабораторных крыс, ни у лабораторных мышей.

Выводы. ПЭГ-содержащий наноноситель А24РЕГ при условиях его внутривентриального введения в указанных дозах можно отнести к 4-му классу токсичности (малотоксические вещества) для белых лабораторных крыс и мышей.

Ключевые слова: наноноситель, полимер, полиэтиленгликоль, острая токсичность.

STUDY OF ACUTE TOXICITY OF NANOSIZED DRUG DELIVERY SYSTEM BASED ON PEGYLATED COMB-LIKE CARRIERS IN WHITE LABORATORY RATS AND MICE

L. Kobylinska, I. Patereha, A. Riabtseva, N. Mitina, A. Zaichenko, I. Kotsyumbas, B. Zimenkovsky, R. Stoika

SUMMARY. Specific aim of our study was to evaluate an acute toxicity of nanosized drug delivery system based on PEGylated comb-like carrier in white laboratory rats and mice under single application.

Materials and methods. The applied carrier was designed and synthesized at the Department of Organic Chemistry of Lviv National Polytechnic University. The carrier is a water-soluble comb-like polymer poly(VEP-co-GMA)-graft-PEG designated as A24PEG. It has the main chain on the basis of co-polymer of unsaturated peroxide of 2-tert-butylperoxy-2-methyl-5-hexen-3-in (VEP) and glycidil-metacrylate (GMA) with polyethyleneglycole (PEG) side chains. Water solution of A24PEG carrier was prepared by transferring of the polymer from the organic phase into the inorganic one with its further ultrasound treatment for 20 sec. The molar mass of A24PEG was 245 000 g/mole, and the diameter of the particles was 61 nm according to a transmissive electron microscopy. Experiments were conducted on white laboratory mice of 3-4 months age with 18-24 g body mass and white rats of Wistar line of 3-4 months age with 143-255 g body mass. A24PEG carrier was daily injected to mice intraperitoneally in 0.1, 0.3, 0.5 and 10 ml doses, and to rats — 1.0, 3.0, 5.0 and 10.0 ml doses. The highest dose of the carrier preparation (10.0 ml — for rats and 1.0 ml — for mice) was injected to 6 animals of each species repeatedly. 1 ml of such preparation contained 9.9 mg of A24PEG polymeric carrier.

Results. It was found that A24PEG carrier injected intraperitoneally did not possess toxic effect towards white laboratory rats in 440 mg/kg dose in 10 ml volume and in white laboratory mice in 470 mg/kg dose in 1 ml volume. Thus, the A24PEG PEG-containing carrier can be attributed to the 4th class of toxicity, since we could not define its LC50 neither in the laboratory rats, nor laboratory mice.

Conclusions. A24PEG PEG-containing carrier injected intraperitoneally in noted doses can be attributed to the 4th class of toxicity (low toxic substances) for the laboratory rats and mice.

Key words: nanosized drug delivery system, polyethyleneglycole, polymeric carrier, acute toxicity.

Надійшла до редакції 10.07.2014 р.