

Л. В. Бойцова, Г. М. Шаяхметова, Л. Б. Бондаренко,
Т. А. Карацуба, **А. В. Матвієнко**, І. С. Блажчук, Н. В. Добреля,
В. М. Коваленко, О. С. Хромов

Дослідження токсикологічних властивостей нового ліпосомального засобу «Ліпохром»

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології
Національної академії медичних наук України», м. Київ

Ключові слова: Ліпохром, гостра
токсичність, токсичність при повторних
уведеннях

Гостра масивна крововтрата (ГМК) призводить до зниження об'єму циркулюючої крові, компенсаторного периферичного ангіоспазму, порушення мікроциркуляторного кровотоку, численних пошкоджень метаболізму, у тому числі метаболічного ацидозу. У разі декомпенсації перебіг ускладнюється синдромом дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові (ДВЗ-синдром), поліорганної недостатності, що сприяє високій летальності. Сучасна терапія гострої крововтрати спрямована на зупинку кровотечі, ліквідацію гіповолемії, забезпечення адекватного газообміну, боротьбу з тканинною гіпоксією й гіпокоагуляцією та їхніми наслідками.

За результатами численних досліджень показано, що ліпосоми виявляють антигіпоксичну, антиоксидантну дію й сприяють підтримці енергетичного метаболізму гіпоксигенованих тканин [1–3]. Натепер були зроблені лише поодинокі спроби використання ліпосом як самостійно, так і в поєднанні з іншими лікарськими засобами для лікування гіповолемічного шоку. Введення лецитинових ліпосом в інфузійне середовище сприяє більш повноцінній корекції крововтрати. Це проявляється в попередженні розвитку лактат-аци-

дозу та надлишкової активації вільнорадикального окиснення, нормалізації й тривалій стабілізації центральної гемодинаміки без розвитку синдрому «централізації кровообігу» [4, 5]. Разом з цим, ліпосоми, взаємодіючи з ліпідним бішаром пошкоджених клітинних мембран, призводять до відновлення функціональної активності останніх [6], виявляють здатність впливати на електричну і скоротливу активність гладеньких м'язів судин [7], за гіпоксії відновлюють іонну проникність плазматичних мембран гладеньких м'язів судин [8], сприяють значному зниженню токсичних властивостей крові та нормалізації параметрів системної гемодинаміки [9].

Останнім часом з'явилась низка публікацій, що підтверджують зацікавленість у створенні ліпосомального засобу, до складу якого входить цитохром С. У літературі описані приклади використання ліпосом для розробки лікарських форм, що містять цитохром С у складі очних крапель [10, 11] і інгаляцій [12]. Показано, що введення тваринам після гострої ішемії міокарда ліпосомальної форми цитохрому С сприяло попередженню розвитку важких порушень енергетичного обміну в серці та гальмувало активацію перекисного окиснення ліпідів. У тварин, яким вводили ліпосомальну форму цитохрому С, вміст у серці фосфокреатиніну та АТФ був значно вищим, ніж

у тварин, які отримували вільну форму цитохрому С, а структурні пошкодження міокарда менш виразні. На думку авторів [13], ефективність ліпосомальної форми цитохрому С може бути пов'язана з пролонгованістю дії його ліпосомальної форми, що підтверджується й нормалізацією мітохондріального дихання [14].

Доклінічне дослідження специфічної активності нового фармакологічного засобу «Ліпохром» (порошок ліофілізований для ін'єкцій, виробництва ТОВ «Нано Технології в Медицині», Україна) показало, що введення останнього в ізоволемічному об'ємі фізіологічного розчину через 30 хв після ГМК призводить до помірної гемодинамічної дії та запобігає розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу та розвитку ДВЗ-синдрому [15].

Важливим етапом у комплексному доклінічному дослідженні нових потенційних лікарських засобів є вивчення їхніх токсикологічних параметрів.

Мета дослідження – експериментальне вивчення токсикологічних властивостей нового фармакологічного засобу «Ліпохром» для обґрунтування безпеки його застосування в клінічній практиці.

Матеріали та методи. Досліджуванний ліпосомальний засіб «Ліпохром», порошок ліофілізований для ін'єкцій для лікування гострої масивної кровотрати, був розроблений ТОВ «Нано Технології в Медицині», Україна. Для створення технологічного способу отримання ліпосомального засобу, що містить цитохром С з високою відтворюваністю, були використані відомі підходи [16, 17] та розроблено спосіб отримання ліпосомальної композиції на основі взаємодії цитохрому С та іонних фосфоліпідів.

Дослідження гострої токсичності та токсичності при повторних введеннях

тест-зразка Ліпохрому було проведене відповідно до «Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів» [18] в обсязі вимог ДП «Державний експертний центр МОЗ України» [19]. Маніпуляції з тваринами здійснювались відповідно до законодавства України [20], правил Європейської Конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних дослідженнях та з іншою науковою метою [21].

Гостру токсичність фармакологічного засобу «Ліпохром» вивчали на двох видах лабораторних тварин: самицях білих мишей ($n = 10$) масою тіла 18–20 г і самицях щурів ($n = 10$) масою тіла 200–210 г на момент рандомізації (самиці тварин більш чутливі до хімічних чинників). Тварин, залучених до експерименту, утримували в стандартних умовах віварію ДУ «ІФТ НАМН України» за температури повітря – 20–24 °С, вологості – 30–70 %, циклу освітлення – 12 год світло/12 год темрява, з вільним доступом до корму та води. За вивчення гострої токсичності та токсичності при повторних введеннях у дослідах на мишах і щурах було застосовано внутрішньовенний (в/в) шлях введення тест-зразка, як такий, що, в основному, буде використано за очікуваного клінічного застосування. Емульсію Ліпохрому для в/в введення готували безпосередньо перед застосуванням шляхом додавання води для ін'єкцій до флакона з тест-зразком, що містив 2 мг Ліпохрому. Тест-зразок було введено експериментальним тваринам в/в у латеральну хвостову вену одноразово за допомогою індивідуального шприца в дозі 50 мг/кг маси тіла в об'ємі, що є максимальним для в/в введення мишам, – 0,5 мл і щурам у дозі 20 мг/кг маси тіла за максимально допустимого об'єму тест-зразка (2 мл

на тварину) [18]. Тваринам контрольної групи аналогічним чином вводили воду для ін'єкцій.

Дослідження токсичності тест-зразка Ліпохрому при повторних внутрішньочеревинних (в/о) уведеннях було проведено на щурах обох статей протягом 14 днів за аналогічних умов утримання тварин, що й при дослідженні гострої токсичності. Тривалість повторних уведень фармакологічного засобу за проведення токсикологічних досліджень визначалась тривалістю його потенційного використання в клінічній практиці (1–3 введення) [22]. Тварини були розділені на 6 груп по 6 особин у кожній групі – 2 контрольні (вода для ін'єкцій) та 4 дослідні групи, яким вводили Ліпохром у терапевтичній дозі (10 мг/кг) або в дозі, що вища за терапевтичну в 5 разів (50 мг/кг), щоденно протягом 14 днів.

Протягом 14 днів після одноразового та повторних уведень проводили спостереження за тваринами всіх експериментальних груп за загальноприйнятими параметрами для цих досліджень [22]. Загальноповедінкові реакції вивчали в тесті «відкрите поле» [23], аналіз сечі було проведено з використанням діагностичних смужок Medi-Test Combi 11, Німеччина протягом 5 год після отримання зразків. Мікроскопію осаду сечі проводили на мікроскопі MBL 2000 (Krus, Німеччина) за збільшення $\times 40$. Зразки крові були досліджені в день отримання за допомогою автоматичного гематологічного аналізатора Mythic 22, Швейцарія. Біохімічні показники сироватки крові були вивчені за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Prestige 24i, Японія. Тварини контрольних і дослідних груп, які були піддані евтаназії шляхом цервікальної дислокації під легким ефірним наркозом у кінці досліджен-

ня, підлягали повному зовнішньому огляду, розтину з урахуванням зареєстрованих клінічних порушень, вилученню органів для визначення їхньої маси та мікроскопічного аналізу. Зразки тканин фіксували в 10 % нейтральному формаліні, піддавали дегідратації в етанолі зростаючих концентрацій і поміщали в парафін. Гістологічні зрізи з парафінових блоків товщиною (5–6) мкм фарбували гематоксиліном і еозином. Препарати вивчали за допомогою мікроскопа Olympus BX 41 (Японія).

Перевірку вибірок на їхню належність до нормально розподілених здійснювали за допомогою критерію Шапіро-Уїлка. Наведені дані представлені у вигляді середнього арифметичного (M) та стандартної похибки середнього арифметичного (m) для певної вибірки (n). Порівняння величин незалежних вибірок проводили за допомогою t-тесту Стьюдента. Для порівняння залежних вибірок використовували парний критерій Вілкоксона. Відмінності вважалися статистично значущими, якщо величина $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. Після одноразового в/в введення тест-зразка в дозі 50 мг/кг мишам та в дозі 20 мг/кг щурам у ході спостережень за станом тварин протягом 14 днів не було зареєстровано випадків загибелі та будь-яких відхилень щодо зовнішнього вигляду та поведінки, які могли б свідчити про токсичну дію тест-зразка: усі тварини були активні, мали гладеньку шерсть і чисту шкіру без слідів розчісування. У ділянці ін'єкції не спостерігалась алергічна реакція та кровотеча.

Через 3, 7 і 14 днів після в/в введення тест-зразка в тварин дослідної та контрольної групи реєстрували масу тіла. Отримані дані свідчать про

те, що одноразове в/в введення фармакологічного засобу «Ліпохром» білим мишам у дозі 50 мг/кг і щурам у дозі 20 мг/кг жодним чином не вплинуло на динаміку маси тіла. Дослідні та контрольні тварини набирали вагу відповідно до фізіологічної норми.

Абсолютна та відносна маса внутрішніх органів у мишей і щурів дослідної групи не зазнала змін порівняно з даними показниками в тварин відповідної контрольної групи.

За даними зовнішнього огляду, проведеної автопсії та макроскопічного дослідження самиць білих мишей і щурів через 14 днів після одноразового в/в введення тест-зразка Ліпохрому в дозі 50 мг/кг і 20 мг/кг відповідно, не виявлено альтеративних змін, ознак порушень гемодинаміки, запалення чи дисрегенераторних явищ. У місці введення тест-зразка ознак патологічних змін навколишніх тканин не виявлено.

За умови повторних в/о введень (аналог внутрішньовенних ін'єкцій) тест-зразка статевозрілим щурам обох статей протягом 14 днів у 2 дозах (очікуваній для застосування в клініці (10 мг/кг маси тіла) та такій, що перевищує її в п'ять разів (50 мг/кг маси тіла) не було зареєстровано випадків загибелі експериментальних тварин; щури мали охайний вигляд, були активні, споживали корм та воду, мали рівну блискучу шерсть, шкіру без слідів розчухування, виразкоутворення та облісіння. У місці введення тест-зразка місцево-подразнюючої дії не спостерігалось.

Статистична обробка результатів зважування щурів показала, що експериментальні тварини всіх дослідних груп протягом двотижневого періоду експозиції тест-зразка нормально набирали вагу. За умов введення тест-зразка в терапевтичній

дозі та дозі, що перевищує терапевтичну в 5 разів, відмінностей щотижневого приросту маси тіла щурів самців від контролю не виявлено.

Метод дослідження стану центральної нервової системи «відкрите поле» дозволяє виявити вплив досліджуваної сполуки на показники, що характеризують психоемоційну та рухову активність тварин за умов повторного введення фармакологічного засобу. Рухова активність, яка характеризується тривалістю латентного періоду та кількістю пересічених периферичних квадратів у самиць і самців, була на рівні контрольних груп незалежно від уведених доз фармакологічного засобу «Ліпохром». Дослідницька активність за показником пересічених центральних квадратів, кількістю «стійок» і «зазирань у нірки» незначно коливалася в дослідних групах і статистично не відрізнялася від проявів даного виду активності в тварин контрольних груп. Емоційний стан, який характеризується кількістю «умивань», уринацій і дефекацій достовірно не відрізнявся від проявів даного виду активності в контрольних тварин.

У крові щурів обох статей, яким вводили Ліпохром у терапевтичній дозі, не відмічено змін кількості лейкоцитів, еритроцитів, змін лейкоцитарної формули, показників червоної крові порівняно зі зазначеними параметрами в тварин контрольних груп (табл. 1). Кількість тромбоцитів у крові самиць була на рівні контрольної групи, а в самців цей показник був достовірно знижений, але знаходився в межах фізіологічної норми для даного виду тварин [24]. За аналізу лейкоцитарної формули крові щурів самців після застосування тест-зразка Ліпохрому в дозі, що перевищує терапевтичну в 5 разів, відмічено збільшення відсотку моно-

Гематологічні показники крові самців щурів за умов внутрішньоочередового введення тест-зразка Ліпохрому протягом 14 днів ($M \pm m$, $n = 6$)

| Показник | Експериментальна група | | |
|---|------------------------------|----------------------|---------------------|
| | контроль (вода для ін'єкцій) | Ліпохром | |
| | | 10 мг/кг | 50 мг/кг |
| Лейкоцити, 10^3 /мкл | $6,27 \pm 0,85$ | $6,07 \pm 0,65$ | $4,27 \pm 0,25$ |
| Лімфоцити, % | $73,35 \pm 2,54$ | $71,80 \pm 2,05$ | $72,65 \pm 1,80$ |
| Моноцити, % | $1,88 \pm 0,25$ | $2,42 \pm 0,71$ | $3,87 \pm 0,38^*$ |
| Нейтрофіли, % | $20,18 \pm 1,87$ | $21,55 \pm 1,53$ | $17,32 \pm 0,44$ |
| Еозинофіли, % | $0,25 \pm 0,08$ | $0,30 \pm 0,09$ | $0,62 \pm 0,08^*$ |
| Базофіли, % | $4,33 \pm 0,59$ | $3,93 \pm 0,29$ | $3,60 \pm 0,22$ |
| Еритроцити, 10^6 /мкл | $7,90 \pm 0,19$ | $7,43 \pm 0,13$ | $7,70 \pm 0,17$ |
| Гемоглобін, г/дл | $14,63 \pm 0,16$ | $14,28 \pm 0,25$ | $14,53 \pm 0,45$ |
| Гематокрит, % | $40,83 \pm 0,39$ | $40,05 \pm 0,69$ | $40,02 \pm 0,94$ |
| Середній об'єм еритроциту, фл | $51,85 \pm 1,21$ | $53,95 \pm 0,60$ | $51,93 \pm 0,38$ |
| Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, пг | $18,60 \pm 0,42$ | $19,23 \pm 0,23$ | $18,87 \pm 0,29$ |
| Тромбоцити, 10^3 /мкл | $701,33 \pm 19,78$ | $542,67 \pm 43,10^*$ | $622,0 \pm 17,09^*$ |

Примітка. Тут і в табл. 2, 3: *зміни статистично достовірні ($p < 0,05$) порівняно з відповідним показником у тварин контрольної групи.

цитів, еозинофілів, зменшення кількості тромбоцитів. Незважаючи на достовірність зазначених змін порівняно з контрольними тваринами, ці показники залишаються в межах фізіологічної норми для даного виду тварин відповідно їхнього віку [24]. Інші гематологічні показники крові щурів обох статей не зазнали змін порівняно з показниками крові тварин контрольних груп.

Отримані дані біохімічного аналізу сироватки крові щурів обох статей, яким вводили Ліпохром у терапевтичній дозі протягом 14 днів, фактично не відрізнялись від показників, які були зареєстровані в тварин контрольної групи (альбумін, г/л; загальний білок, г/л; загальний білірубін, мкмоль/л; холестерин, ммоль/л; креатинін, ммоль/л; сечовина, ммоль/л; тригліцериди, ммоль/л; АлАТ, МО/л; АсАТ, МО/л; лужна фосфатаза, МО/л; гамаглутамілтрансфераза, МО/л).

Не зважаючи на те, що в сироватці крові самиць, в яких за введення

тест-зразка Ліпохрому в терапевтичній дозі (10 мг/кг маси тіла) реєстрували вірогідне збільшення рівня глюкози, він залишався в межах фізіологічних коливань для даного виду тварин. Проте нами виявлено вірогідне збільшення активності лактатдегідрогенази за введення Ліпохрому в терапевтичній дозі самцям щурів (табл. 2).

Аналіз результатів біохімічного дослідження сироватки крові щурів обох статей у разі застосуванні тест-зразка Ліпохрому протягом 14 днів у п'ятиразовій терапевтичній дозі показав, що більшість показників суттєво не відрізнялись від контролю (креатинін, ммоль/л; сечовина, ммоль/л; тригліцериди, ммоль/л; лактатдегідрогеназа, МО/л; АсАТ, МО/л; гамаглутамілтрансфераза, МО/л). Незважаючи на достовірні зміни порівняно з контрольними тваринами вмісту загального білірубину та активності лужної фосфатази в самців щурів і вмісту альбуміну,

**Біохімічні показники сироватки крові самців і самиць щурів
за умов внутрішньоочеревинного введення тест-зразка Ліпохрому
протягом 14 днів ($M \pm m$, $n = 6$)**

| Показник | Експериментальна група | | |
|-------------------------------|---------------------------------|--------------|---------------|
| | контроль (вода для ін'єкцій) | Ліпохром | |
| | | 10 мг/кг | 50 мг/кг |
| <i>Самці</i> | | | |
| Загальний білірубін, мкмоль/л | 0,26 ± 0,17 | 0,52 ± 0,05 | 1,21 ± 0,29* |
| Холестерин, ммоль/л | 1,52 ± 0,26 | 2,15 ± 0,10 | 2,85 ± 0,16* |
| Аланінамінотрансфераза, МО/л | 38,0 ± 3,22 | 41,67 ± 2,32 | 47,83 ± 1,19* |
| Лактатдегідрогеназа, МО/л | 1720 ± 150 | 2227 ± 70* | 1895 ± 114 |
| Лужна фосфатаза, МО/л | 152,6 ± 9,4 | 156,5 ± 5,2 | 197,1 ± 14,7* |
| <i>Самиці</i> | | | |
| Альбумін, г/л | 45,10 ± 1,12 | 44,58 ± 0,55 | 38,92 ± 0,07* |
| Загальний білок, г/л | 74,17 ± 1,51 | 76,25 ± 0,48 | 66,50 ± 1,19* |
| Холестерин, ммоль/л | 1,62 ± 0,08 | 1,89 ± 0,15 | 2,78 ± 0,19* |
| Глюкоза, моль/л | 7,63 ± 0,36 | 6,10 ± 0,46* | 6,20 ± 0,45* |

загального білка та глюкози в самиць, зазначені показники залишаються в межах фізіологічної норми для даного виду тварин відповідно до їхнього віку [24]. Встановлено, що в сироватці крові самців щурів, яким вводили тест-зразок у дозі, яка перевищує терапевтичну в 5 разів, вірогідно збільшилась аланінамінотрансферазна активність, а саме на 26 % порівняно з контрольною групою, що свідчить про активацію маркерного ферменту цитолізу. За повторних введення Ліпохрому внутрішньоочеревинно в дозі, що перевищує терапевтичну в 5 разів, реєстрували зростання вмісту холестерину в сироватці крові щурів обох статей, що перевищило максимальне значення фізіологічної норми для даного показника в середньому на 80 % (табл. 2).

Досліджували сечу, зібрану протягом ночі, у щурів обох статей, яким вводили в/о тест-зразок Ліпохрому протягом 14 днів у терапевтичній дозі та дозі, що вища за терапевтичну в 5 разів. Сеча в більшості випадків була прозорою та забарвленою в світ-

ло-жовтий колір. Об'єм сечі (нічний діурез), її питома вага в усіх експериментальних групах тварин залишалися в межах фізіологічної норми для щурів [24, 25]. У досліджуваних груп тварин рН сечі була слабкокислою. Білки в сечі спостерігали в слідових кількостях, уробіліноген, глюкоза та аскорбінова кислота були відсутні або знаходилися в межах норми для всіх груп тварин. Нітрити були присутні в одній тварині кожної групи. Білірубін у невеликій кількості спостерігали у тварин дослідних і контрольних груп. Мікроскопія осаду сечі показала, що у щурів контрольних і дослідних груп сеча була солевого типу. В осаді сечі спостерігали кристали амоніє-магнієвого фосфату (трипельфосфату) у значній кількості та сліди фосфорно-кислого кальцію. Іноді зустрічалися кристали аморфних фосфатів у слідових кількостях. З елементів організованого осаду спостерігали поодинокі еритроцити. Кількість лейкоцитів була на рівні (1–2) в полі зору. Циліндри були відсутні в усіх групах

дослідження. В осадах сечі тварин не відмічено наявності епітелію нирок і сечового міхура, а плоский епітелій був представлений поодинокими клітинами в полі зору [26]. Отже, за результатами дослідження сечі за повторних уведень Ліпохрому протягом 14 днів у терапевтичній дозі та дозі, що перевищує терапевтичну в 5 разів, не виявлено токсичного впливу на функціональний стан нирок щурів незалежно від статі.

Зовнішній і патологоанатомічний огляд розтину тварин усіх експериментальних груп після повторних уведень тест-зразка протягом 14 днів в обох дозуваннях не виявив ознак наявності патологічних процесів. Шерсть і шкірні покриви чисті, ознак ушкоджень, запальних і гіперпластичних процесів на шкірі не спостерігалось. Підшкірний шар жирової тканини виражений помірно, на слизових оболонках ознаки альтеративних і запальних уражень відсутні.

На розтині серозні оболонки плевральної, навколосерцевої та черевної порожнини, тканини мозку, серця, легень, трахеї та великих бронхів, печінки, органів кишково-шлункового тракту, підшлункової залози, нирок, сечового міхура, сім'яників,

яєчників, тимусу, селезінки, регіональних лімфатичних вузлів були без проявів патологічних змін, ознак порушення гемоциркуляції та запалення.

Проведено визначення маси тварин та їхніх органів, обчислення масових коефіцієнтів внутрішніх органів і головного мозку контрольних і дослідних тварин. Як свідчать отримані дані, відносна маса внутрішніх органів у щурів обох статей дослідних груп, які отримували терапевтичну дозу тест-зразка, та самиць, яким вводили дозу Ліпохрому, що перевищує терапевтичну в 5 разів протягом 14 днів, не зазнала змін порівняно з відносною масою внутрішніх органів щурів контрольних груп. За умов збільшення дози досліджуваного препарату до 50 мг/кг у самців щурів масовий коефіцієнт селезінки та тимусу був дещо збільшений порівняно зі зазначеними показниками тварин контрольної групи, але ці зміни не виходять за межі фізіологічної норми для щурів даного віку, статі та маси тіла [25] (табл. 3).

Проведені макроскопічні та гістологічні дослідження органів і тканин щурів обох статей дослідних груп

Таблиця 3

Відносна маса внутрішніх органів білих щурів самиць за умов повторних внутрішньоочеревинних введень протягом 14 днів тест-зразка Ліпохрому ($M \pm m$, $n=6$)

| Орган | Експериментальна група | | |
|------------|---------------------------------|---------------|---------------|
| | контроль (вода для ін'єкцій) | Ліпохром | |
| | | 10 мг/кг | 50 мг/кг |
| Серце | 0,34 ± 0,01 | 0,33 ± 0,01 | 0,37 ± 0,02 |
| Нирки | 0,68 ± 0,01 | 0,65 ± 0,02 | 0,69 ± 0,01 |
| Наднирники | 0,020 ± 0,001 | 0,020 ± 0,002 | 0,024 ± 0,001 |
| Печінка | 2,99 ± 0,04 | 2,87 ± 0,06 | 3,02 ± 0,13 |
| Легені | 0,50 ± 0,02 | 0,58 ± 0,06 | 0,59 ± 0,03 |
| Мозок | 0,79 ± 0,03 | 0,77 ± 0,02 | 0,79 ± 0,03 |
| Тимус | 0,19 ± 0,02 | 0,27 ± 0,04 | 0,29 ± 0,02* |
| Селезінка | 0,24 ± 0,01 | 0,35 ± 0,05 | 0,47 ± 0,02* |

порівняно з контролем не виявили альтеративних дисциркуляторних і запальних змін у місці введення тест-зразка Ліпохром, у головному мозку й внутрішніх органах тварин при введенні тест-зразка Ліпохром в терапевтичній дозі та дозі, що перевищує терапевтичну в 5 разів протягом 14 днів.

Висновки

1. Одноразове внутрішньовенне введення ліпосомального засобу «Ліпохром» (порошок ліофілізований для ін'єкцій, виробництва ТОВ «Нано Технології в Медицині», Україна) як самицям білих мишей, так і самицям білих щурів у дозах 50 мг/кг маси тіла та 20 мг/кг маси тіла відповідно у максимальних об'ємах для даного шляху введення не призвело до загибелі тварин і за даними клінічних спостережень, інтегральних показників стану тварин, морфологічного аналізу не справило токсичного впливу на їхній організм.
2. За умов повторних в/о введень щурам обох статей тест-зразка

Ліпохром протягом 14 днів в умовно терапевтичній дозі (10 мг/кг маси тіла) та дозі, що перевищує терапевтичну в 5 разів (50 мг/кг маси тіла), не зареєстровано загибелі тварин, клінічних ознак токсичної дії, впливу на динаміку маси тіла, загальноповедінкові реакції не виявлено, негативного впливу на гематологічні показники периферичної крові, порушень основних ланок метаболізму (білкового, вуглеводного, ліпідного), змін структурно-функціональних властивостей печінки та нирок за межі фізіологічної норми, а також до макро- і мікроскопічних змін основних інтегральних показників, гемодинамічних порушень, запальної реакції та дистрофічних ушкоджень внутрішніх органів і тканин.

3. Отримані результати дослідження свідчать про доцільність і перспективність проведення подальшого вивчення фармакологічних властивостей і терапевтичної ефективності нового ліпосомального засобу «Ліпохром».

1. Phospholipid vesicle (liposomes) possess the ability to support vascular smooth muscle contractive activity under hypoxia. A. I. Soloviev, O. V. Baziluk, A. V. Stefanov, V. K. Lishko. *Biol. Membr.* 1993. V. 6, № 5. P. 667–675.
2. Хромов О. С., Стефанов О. В. Протигіпоксична та антиоксидантна дія різних фосфоліпідів у ліпосомальній формі. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2010. № 5 (18). С. 24–32.
3. Швець В. І., Лютик А. І. Исследования в области создания эффективных лекарственных препаратов нового поколения включением классических субстанций в наноконтейнеры. *Вестник МИТХТ*. 2014. Т. 9, № 3. С. 11–20.
4. Хромов О. С., Стефанов О. В., Пожаров В. П. Корекція за допомогою ліпосом (ліпіну) порушень центральної гемодинаміки у щурів під час геморагічного шоку. *Ліки*. 1995. № 4. С. 54–60.
5. Патент № 2191583 Российская Федерация (А61К31/66, А61К9/127, А61Р3/00). Способ коррекции геморрагического шока. Г. Ф. Лескова, Г. Н. Крыжановский, Ю. В. Архипенко и др.; заявитель и патентообладатель Г. Ф. Лескова, Г. Н. Крыжановский, Ю. В. Архипенко и др. № 2001107996/14; заявл. 28.03.2001; опубл. 27.10.2002. Бюл. № 1. 25 с.
6. Gregoriadis G. The physiology of the liposome. *NIPS*. 1989. V. 4. P. 146–152.
7. Стефанов А. В., Соловьев А. И. Влияние липосом на электрическую и сократительную активность сосудистых гладких мышц. *Докл. АН СССР*. 1983. Т. 273, № 1. С. 227–230.
8. Changes in plasma membrane ionic permeability and related contractile responses in vascular smooth muscle at hypoxia. A. Soloviev, A. Stefanov, O. Bazilyuk et al. *Pathophysiology*. 1996. V. 3. P. 11–20.
9. Хромов О. С., Жукова А. В., Стефанов О. В. Корекція ендотоксемії при критичних станах в експерименті за допомогою ліпосом. *Ліки*. 2005. № 1–2. С. 22–26.
10. Guan P., Wang P., Wang S. Cytochrome C in ophthalmic Drug delivery system. *Azian J. Pharm. Sci.* 2006. V. 1, № 2. P. 118–125.

11. Freeze-dried liposomes as potential carriers for ocular administration of Cytichrome C against selenite cataract formation. J. Zhang, P. Guan, P. Wang et al. *J. Pharmacy and Pharmacology*. 2009. V. 61, № 9. P. 1171–1178.
12. Study of respiratory Cytochromas in liposomes. I. I. Nantes, C. Kawai, F. S. Pessoto, K. C. Muqno. *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 606. P. 147–165.
13. Шанская А. И, Пучкова С. М. Липосомальные наносистемы на основе соевых фосфолипидов как контейнеры лекарственных средств. *Трансфузиология*. 2013. № 2. С. 68–74.
14. Кривцова И. М., Алексеева Н. Н. Цитохром С – фосфолипидный комплекс. Сборник научных трудов ЛЕННИИ гематологии и переливания крови. 1990. С. 74–76.
15. Перспективи використання ліпосомальної форми цитохрому С для поповнення гострої масивної крововтрати. Н. В. Добреля, Н. С. Гула, Т. А. Карацуба, О. С. Хромов. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2018. № 2 (58). С. 14–24.
16. Краснопольский Ю. М., Швец В.И. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов и их применение в клинике. *Нанотехнология и охрана здоровья*. 2013. № 2. С. 125–135.
17. Carroel R. G., Jams S. G. Prevention of «irreversible» hemorrhagic shock by the preservation of cellular integrity. *Med. Hypotheses*. 1987. V. 24, № 1. P. 69–75.
18. Про затвердження порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів: Наказ МОЗ України від 14.12.2009 № 944. Офіційний вісник України. 2010. 4, 1 лютого. С. 61. стаття. 176.
19. Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use. *Official Journal L 311*. 2001. V. 28. № 11. P. 67–128.
20. Закон України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження». Відомості Верховної Ради України. Офіц. вид. 2006. № 27. С. 990, стаття 230. (Бібліотека офіційних видань).
21. Європейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідницьких або інших наукових цілей від 18.03.1986: Верховна Рада України, офіційний веб-портал: Міжнародні документи (Рада Європи) [Електронний ресурс]. URL: <http://zakon4.rada.gov.ua/laws/main?find=1&sp=i&user=c393&text=%F2%E2%E0%F0%E8%ED&x=10&y=5>.
22. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації; ред. О. В. Стефанов. Київ : ВД «Авіцена», 2001. 527 с.
23. Калуев А. В. Стресс, тревожность и поведение (актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных). Киев : Энигма, 1998. 96 с.
24. Giknis M. L. A., Clifford J. B. Clinical laboratory parameters for CrI: WI (Han) Charles river. 2008. URL: www.criver.com/SiteCollectionDocuments.
25. Камышников В. С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва : МЕДпресс-информ. 2004. 912 с.
26. Краевский В. Я. Атлас микроскопии осадков мочи. Москва : Медицина, 1976. 167 с.

Л. В. Бойцова, Г. М. Шахметова, Л. Б. Бондаренко, Т. А. Карацуба, А. В. Матвієнко, І. С. Блажчук, Н. В. Добреля, В. М. Коваленко, О. С. Хромов
Дослідження токсикологічних властивостей нового ліпосомального засобу «Ліпохром»

Доклінічне дослідження специфічної активності нового фармакологічного засобу «Ліпохром» (порошок ліофілізований для ін'єкцій, виробництва ТОВ «Нано Технології в Медицині», Україна) показало, що введення останнього в ізоволемічному об'ємі фізіологічного розчину через 30 хв після гострої масивної крововтрати призводить до помірної гемодинамічної дії та запобігає розвитку декомпенсованого метаболічного ацидозу та розвитку дисемінованого внутрішньосудинного згортання крові.

Важливим етапом у комплексному доклінічному дослідженні нових потенційних лікарських засобів є вивчення їхніх токсикологічних параметрів.

Мета дослідження – експериментальне вивчення токсикологічних властивостей нового фармакологічного засобу «Ліпохром» для обґрунтування безпеки його застосування в клінічній практиці.

Гостра токсичність тест-зразка Ліпохрому була вивчена на двох видах лабораторних тварин: самицях білих мишей масою тіла 18–20 г і самицях щурів масою тіла 200–210 г. Одноразове внутрішньовенне введення Ліпохрому мишам у дозі 50 мг/кг маси тіла та щурам у дозі 20 мг/кг в об'ємах, що є максимальними за внутрішньовенного введення для цих видів тварин, не призвело до їхньої загибелі, розвитку клінічних ознак токсичної дії, змін у динаміці маси тіла, абсолютної та відносної маси внутрішніх органів. За даними зовнішнього огляду, проведеної автопсії та макроскопічного дослідження самиць білих мишей і щурів через 14 днів після одноразового введення тест-зразка Ліпохрому не виявлено альтеративних змін, ознак порушень гемоциркуляції, запалення чи дисрегуляторних явищ. У місці введення тест-зразка ознак патологічних змін навколишніх тканин не виявлено.

За умов повторних внутрішньоочеревинних введень щурам обох статей тест-зразка Ліпохром протягом 14 днів в умовно терапевтичній дозі 10 мг/кг і в дозі, що перевищує терапевтичну в 5 разів (50 мг/кг), не зареєстровано загибелі тварин, клінічних ознак токсичної дії, впливу на динаміку маси тіла та загальноповедінкові реакції. Не виявлено негативного впливу на гематологічні показники периферичної крові, порушень основних ланок метаболізму, а також змін структурно-функціональних властивостей печінки та нирок за межі фізіологічної норми. За цих умов не виявлено макро- і мікроскопічних змін основних інтегральних показників, гемодинамічних порушень, запальної реакції та дистрофічних ушкоджень внутрішніх органів і тканин.

Таким чином, отримані результати дослідження свідчать про доцільність і перспективність проведення подальшого вивчення фармакологічних властивостей і терапевтичної ефективності нового ліпосомального засобу «Ліпохром».

Ключові слова: Ліпохром, гостра токсичність, токсичність за повторних уведень

**Л. В. Бойцова, А. М. Шаяхметова, Л. Б. Бондаренко, Т. А. Карацуба,
А. В. Матвиенко, І. С. Блажчук, Н. В. Добреля, В. Н. Коваленко, А. С. Хромов**
**Исследование токсикологических свойств нового липосомального средства
«Липохром»**

Доклиническое исследование специфической активности нового фармакологического средства «Липохром», порошок лиофилизированный для инъекций (производства ООО «Нано Технологии в Медицине», Украина) показало, что его введение в изоволевическом объеме физиологического раствора через 30 мин после острой массивной кровопотери приводит к умеренному гемодинамическому действию и предупреждает развитие декомпенсированного метаболического ацидоза и диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови.

Важным этапом в комплексном доклиническом исследовании новых потенциальных лекарственных средств является изучение их токсикологических параметров.

Цель исследования – экспериментальное изучение токсикологических свойств нового фармакологического средства «Липохром» для обоснования безопасности его применения в клинической практике.

Острая токсичность тест-образца Липохрома была изучена на двух видах лабораторных животных: самках белых мышей массой тела 18–20 г и самках крыс массой тела 200–210 г. Однократное внутривенное введение фармакологического средства «Липохром» мышам в дозе 50 мг/кг массы тела и крысам в дозе 20 мг/кг в максимальных объемах при внутривенном введении для этих видов животных не вызывало их гибели, развития клинических признаков токсического действия, изменений в динамике массы тела, абсолютной и относительной массы внутренних органов. Внешний осмотр, аутопсия и макроскопические исследования самок белых мышей и крыс через 14 дней после однократного введения тест-образца Липохрома не выявили альтеративных изменений, признаков нарушения гемоциркуляции, воспаления или дисрегенераторных изменений. В месте введения тест-образца признаков патологических изменений окружающих тканей не выявлено.

При повторных внутрибрюшинных введениях крысам обоего пола тест-образца Липохрома на протяжении 14 дней в условно терапевтической дозе (10 мг/кг) и в дозе, которая превышает терапевтическую в 5 раз (50 мг/кг), не зарегистрировано гибели животных, клинических признаков токсического действия, влияния на динамику массы тела и общеповеденческие реакции. Не отмечено негативное влияние на гематологические показатели периферической крови, нарушений основных звеньев метаболизма, а также изменений структурно-функциональных свойств печени и почек за пределы физиологической нормы. При этих условиях не выявлено макро- и микроскопических изменений основных интегральных показателей, гемодинамических нарушений, воспалительной реакции и дистрофических поражений внутренних органов и тканей.

Таким образом, полученные результаты исследования свидетельствуют о целесообразности и перспективности проведения дальнейшего изучения фармакологических свойств и терапевтической эффективности нового липосомального средства «Липохром».

Ключевые слова: Липохром, острая токсичность, токсичность при повторных введениях

**L. V. Boitsova, G. M. Shayakhmetova, L. B. Bondarenko, T. A. Karatsuba,
A. V. Matvienko, I. S. Blazhchuk, N. V. Dobrelia, V. M. Kovalenko, O. S. Khromov**
New liposomal agent Lipochrome toxicological properties study

A preclinical study of a new pharmacological agent Lipochrome (a lyophilized powder for injection, produced by Nano Technologies in Medicine, Ukraine) specific activity showed that its administration in an isovolemic volume of saline 30 min after acute massive blood loss caused a moderate hemodynamic effect and prevented the development of decompensated metabolic acidosis and disseminated intravascular blood coagulation.

An important stage in new potential drugs complex preclinical studies is their toxicological parameters investigation.

The aim of the study was an experimental investigation of new pharmacological agent Lipochrome toxicological properties to substantiate its safety for clinical use.

Lipochrome test sample acute toxicity was studied in two laboratory animals species: female white mice (18–20 g body weight) and female rats (200–210 g body weight). Intravenous injection of the pharmacological agent Lipochrome in a single dose 50 mg/kg body weight (mice) and 20 mg/kg (rats) (maximum allowable volumes for these species with intravenous injection) did not cause experimental animals death, as soon as the development of any clinical signs of toxic effects, changes in the dynamics of body weight or absolute and relative masses of internal organs. External examination, autopsy and macroscopic examination of female white mice and rats 14 days after Lipochrome test sample single injection did not detect alternate changes, signs of impaired blood circulation, inflammation or dysregenerative changes. No signs of pathological changes in the surrounding tissues were found at the Lipochrome injection site.

Repeated intraperitoneal injections of the Lipochrome test sample to rats of both sexes for 14 days at a dose 10 mg/kg (supposed therapeutic) and 50 mg/kg (five times higher than supposed therapeutic) caused no death of animals, no clinical signs of toxic action, had no influence on the body weight dynamics and general behavioral reactions. There were no negative effects on the peripheral blood hematological parameters, general metabolism violations as well as no changes in the liver and kidneys structural and functional properties in comparison with physiological norm. Under these conditions, there were no macro- and microscopic changes in the main integral indices, no hemodynamic disorders, no inflammatory reactions and degenerative lesions of internal organs and tissues.

Thus, the results obtained confirm the advisability and prospectiveness of further investigation new liposomal agent Lipochrome pharmacological properties and therapeutic efficacy.

Key words: Lipochrome, acute toxicity, toxicity with repeated administrations

Надійшла: 15 березня 2021 р.

Прийнята до друку: 28 квітня 2021 р.

Контактна особа: Бойцова Людмила Василівна, кандидат біологічних наук, старший науковий співробітник, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03057. Тел.: + 38 0 44 456 02 88. Електронна пошта: ludmila.boitsova@gmail.com