

Исследование острой токсичности комплекса водорастворимых полисахаридов корневищ аира болотного (*Acorus calamus* L.)

Гурьев А.М.¹, Белоусов М.В.¹, Юсубов М.С.¹, Ахмеджанов Р.Р.², Зуева Е.П.³, Лопатина К.А.³

The investigation of acute toxicity of water-soluble polysaccharides extracted from calamus root (*Acorus calamus* L.)

Guriyev A.M., Belousov M.V., Yusubov M.S., Akhmedzhanov R.R., Zuyeva Ye.P., Lopatina K.A.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² Томский политехнический университет, г. Томск

³ НИИ фармакологии СО РАМН, г. Томск

© Гурьев А.М., Белоусов М.В., Юсубов М.С. и др.

Проведено исследование острой токсичности комплекса водорастворимых полисахаридов (ВРПС), выделенного из корневищ аира болотного. При двукратном внутрижелудочном, подкожном и внутривенном введении исследуемых ВРПС в максимально возможных дозах не наблюдалось их токсического влияния на организм экспериментальных животных. По результатам экспериментов не удалось определить среднюю летальную дозу изучаемых ВРПС, так как не наблюдалось гибели животных. Полученные результаты дают основание отнести ВРПС корневищ аира болотного согласно ГОСТ 12.1.007-76 к IV классу опасности (малоопасные вещества).

Ключевые слова: водорастворимые полисахариды, корневища аира болотного, острая токсичность

An investigation for a possible acute toxicity of the complex of water-soluble polysaccharides (WSPS) extracted from calamus root (*Acorus calamus* L.) has been performed. No toxic effect has been observed on the organisms of experimental animals after a twofold intragastric, subcutaneous, and intravenous introduction of the highest maximum dose of the WSPS being investigated. The results of the experiments did not allow detecting the average fatal dose (LD₅₀) of the WSPS being investigated as no deaths among the experimental animals had been observed. The obtained data lead to the conclusion that the WSPS of calamus root are to be added to Substance Hazard Class IV (low hazard substances) in compliance with State Standard GOST 12.1.007-76.

Key words: water-soluble polysaccharides, *Acorus calamus* root, acute toxicity.

УДК 615.322.099:547.458:582.521.41:581.446.2

Введение

В настоящее время растительные полисахариды рассматриваются как перспективный комплекс биологически активных веществ для создания новых лекарственных средств коррекции различных нарушений иммунной системы, а также комплексной терапии злокачественных новообразований [2, 6]. Химический состав, биологическая активность и токсические свойства растительных полисахаридов во многом зависят от источника и методов выделения. На кафедре химии Сибирского государственного медицинского университета (СибГМУ) из корневищ аира болотного был

выделен комплекс водорастворимых полисахаридов (ВРПС), обладающий, по данным предварительных исследований [4, 7], выраженными иммуностропными свойствами. Необходимым этапом разработки нового лекарственного средства является изучение его безвредности, в частности острой токсичности.

Цель работы — экспериментальное исследование острой токсичности комплекса ВРПС корневищ аира болотного при различных способах введения.

Материал и методы

Полученные образцы ВРПС были стандартизованы по содержанию углеводов спектрофотометриче-

ским методом [5], содержанию белка по методу Брэдфорда и нуклеиновых кислот по методу Спирина (табл. 1). Компонентный состав и молекулярно-массовое распределение (ММР) исследуемых образцов определялись методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) на жидкостном хроматографе Agilent 1100 со спектрофотометрическим детектором (детекция при длине волны 190 нм), разделение проводилось на эксклюзионной колонке TSK-gel GMP_{XL} 300 × 7,8 мм (Supelco), подвижная фаза — вода, 1,0 мл/мин. Молекулярная масса полисахаридов, входящих в состав исследуемых образцов, устанавливалась по времени удерживания в соответствии с калибровочными значениями, выявленными по стандартным образцам декстранов с молекулярной массой 15—20, 40, 60—90, 110, 250 и 500 кДа (Sigma-Aldrich, США). На спектре ВЭЖХ ВРПС из корневищ айра болотного (*Acorus calamus* L.) присутствует пять пиков, соответствующих молекулярной массе 720, 460, 370, 290 и 40 кДа (рис. 1).

Таблица 1

Характеристика ВРПС из корневищ айра болотного (*Acorus calamus* L.)

Выход ВРПС, % от массы воздушно-сухого сырья	Характеристика образцов ВРПС		
	Содержание углеводов, %	Содержание белка, %	Содержание нуклеиновых кислот, %
3,68 ± 1,06	99,8 ± 3,22	0,12 ± 0,02	0,062 ± 0,012

Эксперименты проведены на 40 половозрелой беспородной мыши (20 самках и 20 самце) массой 25—26 г (возраст 2—2,5 мес) и на 40 половозрелой беспородной крысе (20 самках и 20 самцах) массой

180—200 г, предоставленных из лаборатории экспериментального биомоделирования НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск). Экспериментальные животные находились в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде, нормальном температурном и световом режиме в пластиковых клетках по 10 особей в каждой с мелкой древесной стружкой и получали гранулированный корм ПК 120-3. В день проведения эксперимента животных лишали воды в связи с большим объемом введения исследуемого препарата.

Исследовали токсичность ВРПС при трех видах введения. Контрольная (интактная) и каждая из трех опытных групп состояли из 10 животных. ВРПС вводили мышам в виде суспензии внутрижелудочно в суммарной дозе 4 г/кг массы тела для самок и 4 г/кг массы тела для самцов (0,5 мл на 1 мышшь дважды с интервалом 3 ч); подкожно в виде суспензии в суммарной дозе 4 г/кг массы тела для самок и для самцов (0,5 мл на 1 мышшь дважды с интервалом 3 ч); внутривенно в виде 2%-го водного раствора в суммарной дозе 769 мг/кг массы тела для самцов и 800 мг/кг массы тела для самок (0,5 мл на 1 мышшь дважды с интервалом 3 ч).

Крысам ВРПС вводили в виде суспензии внутрижелудочно в суммарной дозе 4 г/кг массы тела для самок и для самцов (5 мл на 1 крысу дважды с интервалом 3 ч); подкожно в виде суспензии в суммарной дозе 4 г/кг массы тела для самок и для самцов (5 мл на 1 крысу дважды с интервалом 3 ч); внутривенно в виде

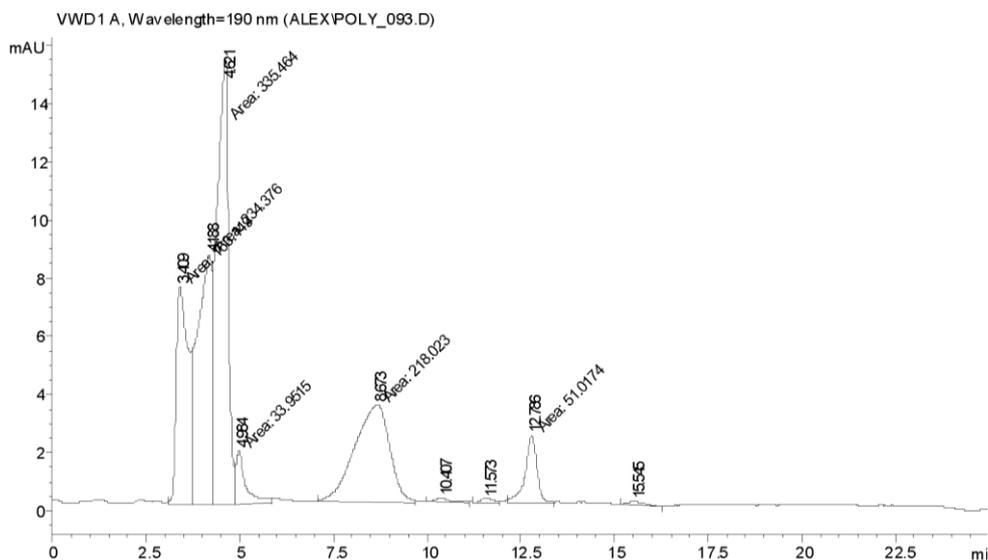


Рис. 1. Спектры ВЭЖХ ВРПС из корневищ айра болотного (*Acorus calamus* L.)

2%-го водного раствора в суммарной дозе 400 мг/кг массы тела для самцов и 421 мг/кг массы тела для самок (2 мл на 1 крысу дважды с интервалом 3 ч) [3]. Различие в суммарных дозах препаратов для самок и самцов при одинаковом пути введения обусловлено неодинаковой массой тела животных. Для внутрижелудочного и подкожного путей введения была выбрана максимально возможная доза 4 г/кг массы тела, при использовании которой отсутствие токсического влияния на организм животных позволяет отнести препарат согласно ГОСТ 12.1.007-76 к IV классу опасности (малоопасные вещества). При выборе дозы для внутривенного пути введения исходили из возможностей растворимости ВРПС в физиологическом растворе, что составляло 100 мг в 5 мл раствора и позволяло достичь постоянства концентрации испытуемого средства. Двукратное введение осуществлялось в связи с невозможностью введения большого объема препарата за один раз. Очередное кормление животных производили через 6 ч после второго введения препарата. Далее животных переводили на обычный режим питания.

Наблюдение за животными осуществляли в течение 14 сут. В ходе эксперимента следили за поведением, внешним видом, двигательной активностью, реакцией животных на внешние раздражители, а также измеряли массу тела до введения изучаемого препарата и после окончания периода наблюдения. В случаях летальных исходов должна была фиксироваться кли-

ническая картина отравления и проводиться вскрытие погибших крыс и мышей. Среднюю летальную дозу (ЛД₅₀) определяли по методу Беренса путем построения графика.

При обработке полученных результатов использовали непараметрические критерии Вилкоксона—Манна—Уитни и углового преобразования Фишера [1]. Данные представлены в виде среднего арифметического X и среднего квадратичного отклонения m . Достоверными считались различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В эксперименте выявлено, что введение исследуемых препаратов мышам и крысам в максимально допустимой дозе внутривенно, подкожно и внутривенно не влияло на общее состояние животных. Симптомы острого отравления отсутствовали. В последующем все животные были активны, подвижны, с нормальной координацией движений, стандартной реакцией на внешние раздражители, обычной частотой и глубиной дыхательных движений, нормальной консистенцией фекальных масс, частотой мочеиспускания и окраской мочи, с хорошим аппетитом и нормальным внешним видом. В течение 14 сут эксперимента гибели животных не отмечено. За это время мыши (самки и самцы), крысы (самки и самцы) прибавили в массе тела (табл. 2—5). Результаты опытов не позволили опреде-

лить ЛД₅₀ изучаемого препарата, так как все животные были живы.

Таблица 2

Изменение массы тела беспородных мышей-самок до и через 14 сут после введения ВРПС корневищ айра болотного ($X \pm m$)

Путь введения препарата, доза на 1 кг массы тела	Масса животных		Прирост массы тела, г
	до введения препарата, г	на 14-е сут наблюдения, г	
Внутрижелудочно, 4 г (n = 10)	24,96 ± 0,60	26,77 ± 0,62 <i>p</i> < 0,01	1,82 ± 0,31
Подкожно, 4 г	25,02 ± 0,65	27,41 ± 0,74 <i>p</i> < 0,01	2,39 ± 0,15
Внутривенно, 0,8 г (n = 10)	25,36 ± 0,54	27,86 ± 0,65 <i>p</i> < 0,01	2,50 ± 0,43

Примечание. Здесь и далее *p* — уровень значимости между массой животных на 14-е сут наблюдения и массой животных до введения препарата.

Таблица 3

Изменение массы тела беспородных мышей-самцов до и через 14 сут после введения ВРПС корневищ айра болотного ($X \pm m$)

Путь введения препарата, доза на 1 кг массы тела	Масса животных		Прирост массы тела, г
	до введения препарата, г	на 14-е сут наблюдения, г	
Внутрижелудочно, 4 г (n = 10)	26,50 ± 0,43	30,37 ± 0,86 <i>p</i> < 0,01	3,85 ± 0,63
Подкожно, 4 г (n = 10)	26,68 ± 0,44	31,09 ± 0,53 <i>p</i> < 0,01	4,41 ± 0,17
Внутривенно, 0,769 г (n = 10)	26,06 ± 0,59	29,92 ± 0,74 <i>p</i> < 0,01	3,86 ± 0,31

Таблица 4

Изменение массы тела беспородных крыс-самцов до и через 14 сут после введения ВРПС корневищ айра болотного ($X \pm m$)

Путь введения препарата, доза на 1 кг массы тела	Масса животных		Прирост массы тела, г
	до введения препарата, г	на 14-е сут наблюдения, г	
Внутрижелудочно, 4 г (n = 10)	198,71 ± 3,21	254,86 ± 9,24 <i>p</i> < 0,01	56,14 ± 6,83
Подкожно, 4 г (n = 10)	200,00 ± 6,87	249,43 ± 7,56 <i>p</i> < 0,01	49,43 ± 2,96
Внутривенно, 0,400 г (n = 10)	206,83 ± 9,45	251,00 ± 7,38 <i>p</i> < 0,01	44,17 ± 4,16

Таблица 5

Изменение массы тела беспородных крыс-самок до и через 14 сут после введения ВРПС корневищ айра болотного ($X \pm m$)

Путь введения препарата, доза на 1 кг массы	Масса животных		Прирост массы
	до введения	на 14-е сут	

сы тела	препарата, г	наблюдения, г	тела, г
Внутрижелудочно, 4 г (n = 10)	188,29 ± 3,46	218,71 ± 3,37 <i>p</i> < 0,01	30,43 ± 0,65
Подкожно, 4 г (n = 10)	189,14 ± 5,41	220,57 ± 4,35 <i>p</i> < 0,01	31,43 ± 1,45
Внутривенно, 0,421 г (n = 10)	185,14 ± 4,67	218,29 ± 3,05 <i>p</i> < 0,01	33,14 ± 1,77

Заключение

При анализе результатов изучения острой токсичности ВРПС корневищ айра болотного симптомов острого отравления у всех экспериментальных животных не обнаружено, летальность отсутствовала. Препарат хорошо переносился животными. Исследования влияния более высоких доз ВРПС (свыше 4 000 мг/кг массы тела) было ограничено возможными объемами введения препарата лабораторным животным или пределами растворимости ВРПС.

Двукратное внутрижелудочное, подкожное и внутривенное введение препарата в максимально возможных дозах не вызвало токсического влияния на организм животных, что позволяет сделать вывод об его безвредности (согласно классификации токсических веществ, Сидоров К.К., 1973). Полученные результаты дают основание ВРПС корневищ айра болотного отнести согласно ГОСТ 12.1.007-76 к IV классу опасности (малоопасные вещества).

Литература

1. Лакин Г.Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1980. 293 с.
2. Лопатина К.А., Разина Т.Г., Зуева Е.П. и др. Растительные полисахариды в комплексной терапии перевиваемых опухолей // Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2006. Приложение, № 1. С. 30—35.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Медицина, 2005. 832 с.
4. Bains J.S., Dhuna V., Singh J. et al. // Int. Immunopharmacol. 2005. V. 5, № 9. P. 1470—1478.
5. Dubois M., Gilles K.A., Hamilton J.K. et al. Colorimetric method for determination of sugar and related substances // Anal. Chem. 1956. V. 28, № 3. P. 350—356.
6. Furusawa E., Hirasumi A., Story S. et al. // Phytother. Res. 2003. V. 17, № 10. P. 1158.
7. Popov S.V., Popova G.Y., Ovodova R.G. et al. // Fitoterapia. 2005. V. 76, № 3—4. P. 281—287.

Поступила в редакцию 03.11.2009 г.

Утверждена к печати 22.12.2009 г.

Гурьев А.М., Белоусов М.В., Юсубов М.С. и др. Исследование острой токсичности комплекса ВРПС корневищ айра болотного

Сведения об авторах

А.М. Гурьев — канд. фарм. наук, доцент кафедры фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

М.В. Белоусов — д-р фарм. наук, профессор, зав. кафедрой фармации ФПК и ППС СибГМУ (г. Томск).

М.С. Юсубов — д-р хим. наук, профессор, зав. кафедрой химии СибГМУ (г. Томск).

Р.Р. Ахмеджанов — д-р биол. наук, профессор кафедры экологии и основ безопасности жизнедеятельности ТПУ (г. Томск).

Е.П. Зуева — д-р биол. наук, профессор, руководитель лаборатории онкофармакологии НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

К.А. Лопатина — канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории онкофармакологии НИИ фармакологии СО РАМН (г. Томск).

Для корреспонденции

Белоусов Михаил Валерьевич, тел. 8-913-825-1771, e-mail: mvb63@mail.ru