

© Коллектив авторов, 2022
УДК 616-092.9:615.015.35:615.099.036.11
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17016>
ISSN – 2073-8137

МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НИОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ВЕЩЕСТВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

И. А. Базиков¹, А. Н. Мальцев¹, В. С. Боташева¹,
Э. В. Бейер¹, А. А. Ефременко¹, Ф. И. Базиков²

¹ Ставропольский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

² Миланский государственный университет, Италия

MACROSCOPIC CHANGES OF THE ORGANS WITH THE APPLICATION OF A NIOSOMAL FORM OF ANTITUMOR MEDICINE IN EXPERIMENT

Bazikov I. A.¹, Maltsev A. N.¹, Botasheva V. S.¹, Beyer E. V.¹, Efremenko A. A.¹, Bazikov P. I.²

¹ Stavropol State Medical University, Russian Federation

² State University of Milan, Italy

Изучены макроскопические изменения в органах при применении ниосомальной формы вещества N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide в соответствии с нормативными документами и регулирующими стандартами. По результатам исследования *in vivo* установлено, что вещество N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide обладает низкой цитотоксичностью по отношению к здоровым тканям. При высоких дозах препарата причиной гибели животного явилась токсическая кардиомиопатия, вызвавшая острую сердечную недостаточность.

Ключевые слова: макроскопические исследования, N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide, ниосомальная форма, глиобластома

We studied macroscopic changes in the organs when using the niosomal form of N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide in accordance with regulatory documents and regulatory standards. According to the results of *in vivo* studies, it was established that the substance N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide has low cytotoxicity with respect to healthy tissues. With high doses of the drug, the cause of death of the animal was toxic cardiomyopathy, which caused acute heart failure.

Keywords: macroscopic studies, N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide, niosomal form, glioblastoma

Для цитирования: Базиков И. А., Мальцев А. Н., Боташева В. С., Бейер Э. В., Ефременко А. А., Базиков Ф. И. МАКРОСКОПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ОРГАНОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ НИОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ВЕЩЕСТВА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2022;17(1):60-63.
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17016>

For citation: Bazikov I. A., Maltsev A. N., Botasheva V. S., Beyer E. V., Efremenko A. A., Bazikov P. I. MACROSCOPIC CHANGES OF THE ORGANS WITH THE APPLICATION OF A NIOSOMAL FORM OF ANTITUMOR MEDICINE IN EXPERIMENT. *Medical News of North Caucasus*. 2022;17(1):60-63. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17016> (In Russ.)

ДМС – диметилсульфоксид
FDA – Food and Drug Administration

LD – летальная доза

Использование наночастиц представляет собой эффективный способ создания новых систем доставки лекарственных веществ при лечении опухолевых заболеваний [1]. Ниосомы изучаются как системы для адресной доставки лекарственных веществ, антигенов, гормонов, пептидов и других лекарственных молекул. Кроме того, при инкапсулировании лекарственных веществ в ниосомы решается проблема, связанная с нестабильностью, нерастворимостью и с их быстрым разложением. Ниосомы используются для доставки широкого спектра лекарственных средств благодаря их способности взаимодействовать с гидро-, липо- и амфифильными веще-

ствами. Использование ниосом позволяет контролировать процесс высвобождения лекарственных веществ. Это обеспечивает пролонгацию их действия в организме и позволяет контролировать направление транспорта в определенные органы и ткани [2]. Группа ученых СКФУ под руководством профессора А. В. Аксенова синтезировала ряд веществ с противоопухолевой активностью. Одно из них – N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide показало *in vitro* высокую цитостатическую активность в отношении раковых клеток [3]. Была разработана ниосомальная форма данного вещества для лечения глиобластомы [4, 5].

Важным элементом оценки безопасности химических противоопухолевых соединений, рассматриваемых в качестве потенциально перспективных для создания новых лекарственных препаратов, являются токсикологические исследования. В частности, важно изучение интегральных показателей, отражающих динамику обменных процессов в организме животных, таких как вес животных и массовые коэффициенты их органов [6, 7].

Целью исследования явилось изучение в сравнительном аспекте динамики веса (г), массовых коэффициентов органов крыс, макроскопических изменений в органах животных, а также летальной дозы (LD) противоопухолевого вещества и его ниосомальной формы.

Материал и методы. Для формирования ниосом в качестве поверхностно активного соединения применяли ПЭГ-12 диметикон (DC 5329 Dow Corning Corporation, United States). На первом этапе точную навеску 500 мг N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide вносили в диметилсульфоксид (ДМС) и добавляли 40 мл воды. Для формирования ниосом в полученный раствор лекарственного средства, содержащего 0,5 г противоопухолевого вещества в 1 мл средства, добавляли 10 мл ПЭГ-12 диметикона. Процесс образования везикул и инкапсулирование в них лекарственного вещества проводили при перемешивании на шейкере в течение 5 минут с постепенным доведением общего объема до 100 мл физиологическим раствором. Конечная концентрация лекарственного средства составила 50 мг/мл. В последующем для получения нановезикул применялся гомогенизатор (APV, Швеция). Формирование ниосом проводили следующим образом. Дисперсию кремнийорганических везикул с инкапсулированным в них лекарственным веществом в течение 30 минут обрабатывали ультразвуком с частотой 20 Гц и мощностью 200 Вт.

Токсичность изучаемых форм противоопухолевого вещества и LD₅₀ определяли в соответствии с правилами OECD, позволяющими классифицировать противоопухолевое вещество и оценить его согласно классификации GHS.

Эксперименты были проведены на 70 белых нелинейных крысах весом 220–250 г. Опытная группа была разделена на 6 подгрупп по 10 животных в каждой, которые получали изучаемое лекарственное средство и его ниосомальную форму внутрибрюшинно в дозах: 50, 100, 150, 200, 250, 300 мг/кг ежедневно. Контрольным животным внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в аналогичных объемах. В течение 2 недель регистрировали учет погибших и выживших животных. Изучались стандартные параметры в соответствии с общепринятыми методами [8, 9]. Токсикометрические параметры острой токсичности устанавливали, используя метод пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона [10].

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программы Primer of Biostatistics 4.03 для Windows. Количественные переменные были проверены на нормальность при помощи критерия Шапиро – Уилка. Сравнение количественных значений было выполнено при помощи t-теста или U-теста Манна – Уитни в зависимости теста Шапиро – Уилка. Результаты представляли в виде среднего значения M и стандартного отклонения (M±SD) либо в виде медианы (Me), нижнего (25 %) и верхнего (75 %) квартилей (Me(Q₁/Q₃)). Для всех видов анализа статистически значимыми считали различия при p<0,05.

При проведении эксперимента на животных учитывались общие принципы, изложенные в националь-

ном стандарте «Принципы надлежащей лабораторной практики» [11].

Результаты и обсуждение. В ходе «острого» эксперимента наблюдали, что после введения противоопухолевого вещества и его ниосомальной формы снижается двигательная активность крыс. Зафиксировано снижение физиологических потребностей по употреблению пищи и воды. У экспериментальных животных учащалось сердцебиение и дыхание. При введении максимальных доз отмечалось появление бледности слизистых оболочек, угнетение локомоции, снижение реакции на различные раздражители. LD противоопухолевого вещества и его ниосомальной формы коррелировала с дозой введения (табл. 1).

Таблица 1
Определение LD противоопухолевого вещества и его ниосомальной формы у крыс (мг/кг) (Me (Q₁/Q₃))

Летальная доза	Противоопухолевое вещество	Ниосомальная форма препарата
LD10	150 (125/180)	100 (86/118)
LD16	200 (178/232)	150 (138/167)
LD50	300 (291/314)	250 (226/282)
LD84	350 (321/378)	300 (268/312)

У погибших животных проводили макроскопические исследования. Выявлены повреждения кожных покровов, отмечены скарификации от расчесов. При отсутствии телеангиэктазий отмечались язвенные поражения и петехии, в остальном шерстный покров был гладким. Бледно-голубая окраска превалировала на слизистой поверхности носоглотки. Для кожных покровов были характерны синюшный оттенок, отсутствие геморагий и очагов альтераций. Отмечено отсутствие экссудата в просветах воздухоносных путей. В плевральной полости умерших животных отмечалось скопление серозной жидкости. Сердце на разрезе было упруго-эластичным, темно-красного цвета, листки перикарда тонкие и прозрачные. Отмечено выраженное полнокровие вен коронарного бассейна. Остановка сердца у погибших животных происходила в период систолы. Печень красно-вишневого цвета, увеличена в размерах по сравнению с контролем. При макроскопическом исследовании было обнаружено полнокровие воротной вены, трупный венозный гипостаз. У погибших животных отмечалось сильное вздутие желудка и кишечника, серозная оболочка была сероватого цвета. Обнаружено истончение стенок желудка, складки желудка были разглажены. Ревизия селезенки обнаружила увеличение её размеров и массы до 6 г. У погибших животных селезенка имела серповидную форму, надпочечники серовато-кремоватого цвета были круглой формы и прилежали к верхнему полюсу почек. При разрезе почки имели границу между корковым и мозговым веществом.

Вес крыс к завершению эксперимента как в контрольной, так и в экспериментальных группах увеличился на 0,3–5,3 %. Статистически достоверной разницы между показателями не наблюдалось (табл. 2). У крыс из статистически значимых изменений можно отметить увеличение массового коэффициента селезенки под действием противоопухолевого вещества в дозе 300 мг/кг (табл. 3). При курсовом введении противоопухолевых веществ значимых изменений массового коэффициента в других органах не выявлено.

Таблица 2

Динамика веса (г) крыс при введении противоопухолевого вещества
(Me (Q₁/Q₃))

Группы	Исходная	Через 14 дней	Прирост, %
Доза противоопухолевого вещества 50 мг/кг, n=10	201,3 (199,4/203,6)	209,3 (203,6/214,2)	5,2 (3,4/7,1)
Доза противоопухолевого вещества 100мг/кг, n=10	192,9 (188,9/194,3)	197,1 (190,7/205,4)	3,2 (1,2/5,9)
Доза противоопухолевого вещества 150 мг/кг, n=10	199,5 (195,8/203,2)	208,7 (203,4/212,7)	4,3 (2,2/6,4)
Доза противоопухолевого вещества 200 мг/кг, n=10	209,5 (206,8/213,1)	218,1 (215,8/222,4)	4,2 (2,5/5,9)
Доза противоопухолевого вещества 250 мг/кг, n=10	199,8 (196,2/202,8)	200,6 (195,2/204,8)	0,7 (0,3/1,9)
Доза противоопухолевого вещества 300 мг/кг, n=10	193,6 (189,2/195,4)	205,9 (197,2/213,6)	7,7* (3,3/10,9)
Контроль, n=12	199,6 (195,2/204,0)	199,9 (195,1/204,9)	0,4 (0,2/2,2)

* p<0,05 относительно контроля.

Таблица 3

Массовые коэффициенты органов крыс при введении противоопухолевого вещества
(Me (Q₁/Q₃) · 10⁻²)

Органы	Контроль, n=10	Доза вещества 50 мг/кг, n=10	Доза вещества 50 мг/кг, n=10	Доза вещества 150 мг/кг, n=10
Сердце	0,328 (0,306/0,351)	0,322 (0,302/0,361)	0,328 (0,302/0,349)	0,336 (0,282/0,375)
Легкие	0,620 (0,564/0,688)	0,660 (0,603/0,697)	0,660 (0,631/0,692)	0,624 (0,588/0,664)
Желудок	0,520 (0,486/0,559)	0,542 (0,498/0,593)	0,544 (0,494/0,591)	0,562 (0,532/0,596)
Печень	3,246 (3,156/3,308)	3,253 (3,226/3,290)	3,259 (3,235/3,298)	3,278 (3,240/3,299)
Селезенка	0,424 (0,384/0,464)	0,481 (0,436/0,532)	0,483 (0,472/0,495)	0,498* (0,454/0,526)
Левая почка	0,300 (0,201/0,312)	0,309 (0,214/0,402)	0,342 (0,306/0,381)	0,362 (0,332/0,384)
Правая почка	0,320 (0,296/0,351)	0,324 (0,301/0,352)	0,344 (0,232/0,386)	0,366 (0,331/0,388)
Левый над-почечник	0,011 (0,006/0,022)	0,012 (0,008/0,017)	0,014 (0,010/0,022)	0,016 (0,010/0,018)
Правый надпочечник	0,011 (0,006/0,022)	0,012 (0,008/0,018)	0,014 (0,009/0,017)	0,016 (0,009/0,018)
Мозг	0,888 (0,804/0,939)	0,890 (0,789/0,906)	0,902 (0,856/0,942)	0,838 (0,814/0,861)
	Контроль, n=10	Доза вещества 200 мг/кг, n=10	Доза вещества 250 мг/кг, n=10	Доза вещества 300 мг/кг, n=10
Сердце	0,340 (0,328/0,394)	0,344 (0,312/0,402)	0,340 (0,327/0,349)	0,352 (0,341/0,369)
Легкие	0,626 (0,606/0,648)	0,634 (0,601/0,659)	0,670 (0,651/0,720)	0,690 (0,594/0,761)
Желудок	0,524 (0,511/0,542)	0,525 (0,514/0,539)	0,546 (0,487/0,593)	0,565 (0,505/0,588)
Печень	3,240 (3,115/3,306)	3,480 (3,401/3,523)	3,522 (3,493/3,541)	3,620 (3,554/3,682)
Селезенка	0,496 (0,404/0,536)	0,508 (0,458/0,548)	0,548 (0,502/0,578)	0,596* (0,533/0,622)
Левая почка	0,306 (0,288/0,316)	0,308 (0,266/0,392)	0,312 (0,289/0,348)	0,325 (0,262/0,384)
Правая почка	0,307 (0,300/0,315)	0,308 (0,256/0,379)	0,312 (0,302/0,364)	0,322 (0,292/0,347)
Левый над-почечник	0,011 (0,008/0,019)	0,012 (0,010/0,029)	0,014 (0,007/0,019)	0,015 (0,009/0,032)
Правый надпочечник	0,012 (0,010/0,015)	0,013 (0,009/0,017)	0,014 (0,012/0,019)	0,015 (0,009/0,038)
Мозг	0,820 (0,778/0,841)	0,824 (0,756/0,898)	0,827 (0,801/0,844)	0,830 (0,812/0,839)

* p<0,05 относительно контроля.

Заключение. По результатам исследования *in vivo* установлено, что вещество N-hydroxy-2-(2-(naphthalen-2-yl)-1H-indol-3-yl)-2-phenylacetamide в ниосомальной форме обладает низкой цитотоксичностью по отношению к здоровым тканям. При вы-

соких дозах препарата причиной гибели животного явилась токсическая кардиомиопатия, вызвавшая острую сердечную недостаточность.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Barry B. W. Novel mechanism and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Europ. J. Pharmac. Sci.* 2001;14:101-114. [https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00167-1](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00167-1)
2. Bhardwaj P., Tripathi P., Gupta R. Niosomes: A review on niosomal research in the last decade. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2020;2:56:101581. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101581>
3. Aksenov A. V., Smirnov A. N., Aksenov N. A., Bijieva A. S., Aksenova I. V., Rubin M. Benzimidazoles and benzoxazoles via the nucleophilic addition of anilines to nitroalkanes. *Organ. Biomolec. Chem.* 2015;13:4289-4295. <https://doi.org/10.1039/C5OB00131E>
4. Базиков И. А., Мальцев А. Н., Зеленский В. А., Королькова В. И., Калинкина Н. И., Гоптарева Е. А. Антимикробная активность ниосомального геля с доксорубицином в комплексном лечении меланомы челюстно-лицевой области. *Бактериология.* 2017;2(1):61-65. [Bazikov I. A., Mal'cev A. N., Zelenskij V. A., Korol'kova V. I., Kalinkina N. I., Goptareva E. A. Antimicrobial activity of niosomal gel with doxorubicin in the complex treatment of maxillofacial melanoma. *Bakteriologiya. – Bacteriology.* 2017;2(1):61-65. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.20953/2500-1027-2017-1-61-65>
5. Bazikov I. A., Aksenov A. V., Maltsev A. N., Selimov M. A., Kornienko A. V. [et al.]. Properties of developed niosomal forms of treatment of glioblastoma. *Medical News of North Caucasus.* 2016;11(2):196-199. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2016.11035>
6. Астахова А. В., Андронов А. В., Лепяхин В. К. Неблагоприятные побочные реакции и контроль безопасности лекарственных средств. Москва: Эксмо, 2008. [Astahova A. V., Andronov A. V., Lepahin V. K. Neblagoprijatnye pobochnye reakcii i kontrol' bezopasnosti lekarstvennyh sredstv. Moskva: «Eksmo», 2008. (In Russ.)].
7. Березовская И. В. Прогноз безопасности лекарственных средств в доклинических токсикологических исследованиях. *Токсикологический вестник.* 2010;5(104):17-22. [Berezovskaja I. V. Prognosis of drug safety in preclinical toxicological studies. *Toksikologicheskij vestnik. – Toxicological Bulletin.* 2010;5(104):17-22. (In Russ.)].
8. Домнина Ю. М., Суслов В. В., Кедик С. А., Ахмедова Д. А., Малкова А. П. Изучение острой токсичности и раздражающего действия назального спрея налтрексона гидрохлорида. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2021;10(2):101-105. [Domnina Ju. M., Suslov V. V., Kedik S. A., Ahmedova D. A., Malkova A. P. Study of acute toxicity and irritating effects of naltrexone hydrochloride nasal spray. *Razrabotka i registracija lekarstvennyh sredstv. – Development and registration of medicines.* 2021;10(2):101-105. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-2-101-105>
9. Авдеева Н. В., Покровский М. В., Корокин М. В. Изучение острой токсичности фармацевтической субстанции лекарственного средства, являющегося модулятором MGLUR4 рецепторов, рапиталам. *Современные проблемы науки и образования.* 2017;4. [Avdeeva N. V., Pokrovskij M. V., Korokin M. V. Study of the acute toxicity of the pharmaceutical substance of a drug that is a modulator of MGLUR4 receptors, rapitalam. *Sovremennye problemy nauki i obrazovanija. – Modern problems of science and education.* 2017;4. (In Russ.)]. <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26456>
10. Holzhütter H. G., Genschow E., Diener W., Schlede E. Dermal and inhalation acute toxic class methods: test procedures and biometric evaluations for the Globally Harmonized Classification System Archives of Toxicology. *Arch. Toxicol.* 2003;77(5):243-254. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0424-9>
11. Об утверждении Правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708-н. [Ob utverzhdenii Pravil laboratornoj praktiki: prikaz Ministerstva zdravooohranenija i social'nogo razvitija Rossijskoj Federacii ot 23 avgusta 2010 g. № 708-n. (In Russ.)]. <https://rg.ru/2010/10/10/22/laboratornaya-praktika-dok.html>

Поступила 15.01.2020

Сведения об авторах:

Базиков Игорь Александрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой микробиологии; тел.: (8652)352475, 89188664027; e-mail: bazikov@list.ru

Мальцев Александр Николаевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией нанотехнологий лекарственных средств центра морфологии, фармакологии и биотехнологий; тел.: (8652)352475, 89054172205; e-mail: maltsev7@rambler.ru

Боташева Валентина Салиховна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией патоморфологии; тел.: (8652)713467; e-mail: patanatomy@stgma.ru

Бейер Эдуард Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией фармакологии; тел.: 89624460500; e-mail: karokris@mail.ru

Ефременко Анна Александровна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии; тел.: (8652)352475, 89624434853; e-mail: ania300380@mail.ru

Базиков Филипп Игоревич, студент магистратуры факультета науки и технологий; тел.: +393463589930, e-mail: philippbazikov@gmail.com