УДК 615.322:615.451.232

Изучение острой токсичности водных извлечений из травы галеги лекарственной

Бакун А. С., Гурина Н. С.

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Статья посвящена изучению безопасности водных извлечений из травы галеги лекарственной. Острые опыты проводили на двух видах грызунов: белых мышах самках и белых рандомбредных крысах самках, поскольку в соответствии с литературными данными они являются более чувствительными (FDA 2003). Острую токсичность изучали при двух способах введения: пероральном (рекомендован для клинического применения) в дозировке 8000 мг/кг

Репоз

(по сухому остатку) и внутрибрюшинном в дозировке 1000,0 мг/кг (по сухому остатку). В эксперименте соблюдены требования гуманности обращения с животными.

Установлено, что водное извлечение (отвар) из травы галеги лекарственной в соотношении 1:10 при однократном внутрижелудочном введении (8000 мг/кг) и однократном внутрибрюшинном введении (1000 мг/кг) не вызывает интоксикации и гибели лабораторных крыс и мышей. По классификации токсичности веществ Организации экономического содействия и развития (OECD) водные извлечения из травы галеги лекарственной можно отнести к относительно безвредным веществам (VI класс опасности) — при интрагастральном способе введения, в случае внутрибрюшинного введения — к V классу опасности (практически нетоксичные вещества).

Ключевые слова: галега лекарственная, безопасность, острая токсичность.

Введение. Лекарственные средства растительного происхождения широко применяются населением для профилактики и лечения различных заболеваний, что обусловлено разнообразным химическим составом лекарственных растений, мягким действием, простотой использования. Существенным аргументом в пользу использования лекарственных растений является их доступность, сравнительная дешевизна, а также доверие больных к фитотерапии как к традиционному методу лечения. Кроме этого возможно их длительное применение, а также комбинирование с синтетическими лекарственными средствами.

Все этапы производства фитопрепаратов должны быть строго стандартизированы, начиная с качества семян, климатических условий, особенностей почвы, способа заготовки растений и контроля качества конечного продукта. Данный подход позволяет производить лекарственные средства, содержащие строго дозированное количество фармакологически активных веществ, а также соответствовать требованиям доказательной медицины и международным стандартам — GMP. Для регистрации лекарственного средства (в том числе растительного происхождения) необходимо провести комплекс исследований, доказывающих его безопасность, эффективность и качество[1].

Объем, схема и процедура проведения исследований по безопасности лекарственных средств природного происхождения (далее — ЛСПП) должны соответствовать международным стандартам — Европейской директиве 2004/24/ЕС. Документ обеспечивает основу для использования растительных лекарственных средств в Европе. Лекарственные средства природного происхождения должны иметь признанный уровень эффективности и безопасности, который должен быть оценен на основе данных доклинических и клинических исследований [2].

Проведение доклинических исследований — основной этап доказательства безопасности лекарственных средств. Доклинические токсикологические исследования устанавливают характер и выраженность повреждающего действия лекарственного средства на организм экспериментальных животных.

Изучение общетоксического действия является обязательным требованием при оценке безопасности и позволяет решить следующие задачи:

1. Определить переносимые и токсические дозы лекарственных средств.

2. Выбрать наиболее чувствительные к изучаемому веществу органы и системы, изучить характер и степень патологических изменений в них, а также исследовать обратимость вызываемых повреждений.

3. Изучить зависимость токсических эффектов от дозы и длительности применения лекарственных средств [2, 3].

Все испытуемые объекты подразделяются на шесть классов токсичности: от I класса (чрезвычайно токсичные; доза, вызывающая гибель половины животных, составляет менее 5 мг/кг при интрагастральном (внутрижелудочном) введении) до VI класса (относительно безвредные: доза, вызывающая гибель половины животных, составляет более 5000 мг/кг при внутрижелудочном введении) [4].

Обязательным условием при проведении токсикологических исследований лекарственных средств на основе лекарственного растительного сырья является соблюдение всех правил приготовления изучаемого образца в соответствии с инструкцией по медицинскому применению или государственной фармакопеей. Это связано с установленной нормой содержания в исследуемом образце биологически активных веществ в виде сухого остатка или количества экстрактивных (действующих) веществ.

Общепринятым является разделение токсикологических исследований на изучение общетоксического действия и исследование специфических видов токсичности (аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность, мутагенность, канцерогенность). Первый этап исследования общетоксичности — определение параметров острой токсичности. Острая токсичность — вредное действие лекарственного средства, проявляющееся после его однократного применения или повторного введения через короткие (не более 6 ч) интервалы в течение суток.

Репозиторий БГМУ

Цель изучения — определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели с анализом клинической картины интоксикации [4].

В соответствии с Директивой все ЛСПП делятся на две группы. Первая — ЛСПП с научно установленной эффективностью и безопасностью. Вторая — традиционные ЛСПП, не имеющие научного подтверждения эффективности, но малотоксичные. В эту группу включаются только те лекарственные средства, которые имеют 30-летнее широкомасштабное использование, из этого срока — не менее 15 лет в пределах стран Европейского союза. Для решения вопроса о регистрации ЛСПП первой группы требуется полный объем токсикологических доклинических исследований. ЛСПП второй группы могут быть зарегистрированы на основании данных литературы, характеризующих острую и хроническую токсичность, а также специфических видов токсичности, в тех же качественных стандартах, что и для препаратов первой группы [2].

Фитотерапия сахарного диабета — актуальное направление в медицине. Основными задачами лечения больных сахарным диабетом являются максимальная нормализация углеводного, жирового, белкового обмена и энергетического дисбаланса, профилактика острых и хронических осложнений, диабетических ангиопатий и нейропатий. Использование сахароснижающих лекарственных растений способствует стабилизации течения сахарного диабета и позволяет во многих случаях уменьшить дозировку пероральных лекарственных средств, необходимую для достижения компенсации заболевания [5].

Расширение перечня эффективного и доступного для пациентов лекарственного растительного сырья за счет растений отечественной флоры является необходимым условием повышения качества лекарственного обеспечения населения нашей страны. Лекарственное сырье и фитопрепараты из него, как правило, совместимы между собой и с другими лекарственными средствами, что особенно важно в лечении таких заболеваний, как сахарный диабет.

Галега лекарственная — перспективный объект растительного происхождения, обладающий рядом полезных фармакологических свойств, среди которых следует отметить гипогликемический эффект, а также антиоксидантный, противомикробный, гиполипидемическийи др.) [6]. Растение распространено в Западной и Южной Европе (Средиземноморье), Великобритании, на севере Скандинавии, в Западной и Юго-Западной Азии (на востоке Ирана), на Кавказе, на Украине, в горном Крыму, в США. Культивируется в Средней и Южной Европе, на Украине. На территории Республики Беларусь климатические условия позволяют культивировать галегу лекарственную, что в будущем позволяет использовать данное лекарственное растение в промышленных масштабах.

В качестве лекарственного растительного сырья используют надземную часть растения (траву), которая обладает разнообразным химическим составом и содержит флавоноиды, дубильные вещества, алкалоиды, микро- и макроэлементы и т. д. [6]. Галега лекарственная не является фармакопейным растением, что послужило причиной для его изучения.

Цель работы — изучение параметров острой токсичности водных извлечений из травы галеги лекарственной.

Задачи исследования:

1. Изучение острой токсичности и переносимости водного извлечения из травы галеги лекарственной при однократном пероральном введении крысам.

2. Изучение острой токсичности и переносимости водного извлечения из травы галеги лекарственной при однократном парентеральном введении мышам.

В эксперименте с лабораторными животными соблюдены рекомендации Конвенции Совета Европы по охране позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [7].

Материалы и методы. Объектом исследования служило водное извлечение из травы галеги лекарственной. Ранее было установлено, что содержание суммы фенольных соединений в отваре галеги лекарственной выше, чем в настое. Таким образом, в качестве лекарственной формы водного извлечения из травы галеги лекарственной нами рекомендован отвар. Отвар готовили в соответствии со статьей «Настои, отвары, чаи» Государственной фармакопеи Республики Беларусь II, том 1: измельченное лекарственное растительное сырье в соотношении 1:10 заливали водой комнатной температуры, настаивали в соответствующей емкости в водяной бане при частом помешивании в течение 30 мин, затем охлаждали при комнатной температуре 10 мин, процеживали (отжимая растительное сырье). Далее упаривали до сухого остатка, взвешивали и растворяли в воде (изотоническом растворе натрия хлорида при внутрибрюшинном введении) для дальнейшего использования в эксперименте.

В эксперимент отбирались животные, прошедшие 14-дневный карантин, в течение которого проводили ежедневный осмотр каждого животного (оценивали поведение и общее состояние). Перед

Репозиторий БГМУ

началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы с помощью метода рандомизации. Содержание животных и проведение эксперимента соответствовали требованиям Надлежащей лабораторной практики [4].

В исследовании использовали тест-системы, рекомендованные ТКП 125-2008. Изучение острой токсичности проводили на 2-х видах грызунов: белые мыши самки и белые рандомбредные крысы самки. В эксперименты включали здоровых половозрелых особей с чистым и гладким шерстным покровом, с нормальной двигательной активностью, массой 19–21 г для мышей, 180–200 г для крыс, при этом число животных в группе составляло 7 особей для крыс и 8 особей для мышей. Возраст мышей — 2,0–2,5 месяца, возраст крыс — 2,0–2,5 месяца.

Токсичность исследуемых образцов изучали при пероральном пути введения, который рекомендован для клинического использования, и парентерально (внутрибрюшинно). В обоих случаях вводились максимальные возможные дозы, которые составляют: 8000,0 мг/кг (по сухому остатку) для перорального введения и 1000,0 мг/кг (по сухому остатку) для парентерального введения. Введение животным осуществлялось однократно. Внутрижелудочное введение проводили с помощью шприца с атравматичным металлическим зондом, внутрибрюшинное — с помощью одноразового шприца в правую паховую область.

Для внутрижелудочного введения крысам в остром эксперименте соблюдалось соотношение: 800,0 мг сухого остатка / дистиллированная вода до объема 1,5 мл. Группе контроля (7 самок) таким же способом вводили воду очищенную.

Для внутрибрюшинного введения мышам в остром эксперименте соблюдалось соотношение: 20,0 мг сухого остатка / 0,9%-ный водный раствор хлорида натрия до объема 0,5 мл. В качестве контроля использовали растворитель — 0,9%-ный водный раствор хлорида натрия. Группе контрольных животных его вводили внутрибрюшинно в том же объеме — 0,5 мл на мышь весом 20 ± 1 г.

После введения водных извлечений из травы галеги лекарственной проводили непрерывное наблюдение в течение 6 ч.

Экспериментальная программа изучения острой токсичности включала:

– ежедневную регистрацию общего состояния всех животных;

– взвешивание на 7-е и 14-е сутки.

Оценку общего состояния и поведения животных проводили по следующим показателям: характер двигательной активности, координация движений, наличие судорог и их характер, наличие тремора, рефлекторных реакций на внешние раздражители — звуковые (постукивание по клетке), тактильные (прикосновение к коже), состояние шерстяного покрова (шерсть взъерошенная или гладкая, блестящая или тусклая), положение хвоста, количество и консистенция фекальных масс, частота мочеиспускания, потребление корма и воды, изменение массы тела и другие показатели, которые могли быть использованы для выявления токсического эффекта. Каждые сутки в течение двух недель отмечали количество погибших и выживших животных.

Статистическую обработку результатов проводили при помощи программы *Statistica* 7.0. Полученные результаты представлены

$$\bar{x} \pm S_x,$$

где $\bar{x}$ — среднее арифметическое в выборочной совокупности, S_x — стандартная ошибка средней арифметической.

Достоверность различий исследуемых несвязанных выборочных данных определяли при помощи метода непараметрической статистики (*U*-критерий Манна – Уитни).

Результаты и их обсуждение. Установлено, что извлечение из травы галеги лекарственной при однократном интрагастральном введении крысам-самкам в максимально возможной дозе (с учетом технических возможностей) — 8000,0 мг/кг, не вызывает обнаруживаемых токсических эффектов и гибели животных при 14-суточном наблюдении.

В первые часы после введения отмечалась незначительная заторможенность животных и снижение потребления корма, что обусловлено стрессом, связанным с процедурой введения исследуемого образца в больших объемах.

В течение последующих двух недель ежедневного мониторинга состояния подопытных крыс не отмечалось изменений в поведении, спонтанной двигательной активности, признаков интоксикации и вегетативных расстройств.

Подопытные животные потребляли обычное количество корма и воды, соответствующее весовому приросту. Динамика нарастания массы тела оставалась в пределах нормы для данного периода времени.

Данные эксперимента представлены в таблице 1.

Репозиторий БГМУ

Таблица 1 — Летальность и динамика массы тела крыс после однократного внутрижелудочного введения извлечения из травы галеги лекарственной ($\bar{x} \pm S_x$)

Группа, доза (мг/кг)	Масса тела, г (n = 7)			Летальность, число погибших животных из 7
	Исходная	7-е сутки	14-е сутки	
Контрольная	187,2 ± 6,5	190,0 ± 7,6	210,0 ± 8,3	0/7
Опытная 8000,0	184,0 ± 2,3	195,4 ± 5,6	207,8 ± 10,9	0/7

Учитывая полученные данные, максимальная переносимая доза извлечения из травы галеги лекарственной при однократном внутрижелудочном введении для крыс может быть принята равной 8000,0 мг/кг, что позволяет отнести извлечение из травы галеги лекарственной по классификации токсичности веществ OECD к относительно безвредным веществам (VI класс опасности).

При однократном внутрибрюшинном введении мышам-самкам извлечения из травы галеги лекарственной в дозе 1000,0 мг/кг, наблюдали болевую реакцию сразу после инъекции, которая сохранялась непродолжительное время и не приводила к гибели подопытных животных в течение и по окончании 14-суточного мониторинга их состояния.

Наблюдение за экспериментальными животными показало, что динамика массы тела не вызывает признаков интоксикации (таблица 2). Вялость в поведении, отказ от приема пищи и воды наблюдались первые 2–3 суток. Через 2–3 суток после внутрибрюшинного введения все животные приходили к нормальному состоянию и в последующий период их внешние признаки и поведение не отличались от состояния животных контрольной группы, которым вводили стерильный изотонический раствор.

Таблица 2 — Летальность и динамика массы тела мышей-самок после однократного внутрибрюшинного введения извлечения из травы галеги лекарственной ($\bar{x} \pm S_x$)

Группа, доза (мг/кг)	Масса тела, г (n = 8)			Летальность, число погибших животных из 8
	Исходная	7-е сутки	14-е сутки	
Контрольная	19,8 ± 0,4	22,2 ± 0,5	23,6 ± 0,7	0/8
Опытная 1000,0	19,2 ± 0,6	19,3 ± 0,4	20,7 ± 0,8	0/8

Учитывая полученные данные, максимальная переносимая доза водного извлечения из травы галеги лекарственной при однократном внутрибрюшинном введении для мышей может быть принята равной 1000,0 мг/кг, по классификации токсичности веществ OECD — практически нетоксичное вещество (V класс опасности).

Заключение. Водное извлечение (отвар) из травы галеги лекарственной, полученное фармакопейным методом в соотношении 1:10, не обладает острой токсичностью, т. е. не вызывает интоксикации и гибели лабораторных мышей и крыс.

Литература

1. Годовальников, Г. В. Современное лекарствоведение / Г. В. Годовальников.– Брест : Брестская типография, 2008. — 520 с.

2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I / председатель редколлегии А. Н. Миронов. — М. : Гриф и К, 2012. — 944 с.

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. Надлежащая лабораторная практика: Технический кодекс установившейся практики (ТКП) 125-2008 (02040) : утв. постановлением М-ва здравоохр. Респ. Беларусь от 28.03.2008 № 56.

5. Руженкова, И. В. Фитотерапия при сахарном диабете: лечение лекарственными растениями / И. В. Руженкова. — Ростов-н/Д : Феникс, 2014. — 125 с.

6. Бакун, А. С. Фитохимический анализ травы галеги лекарственной / А. С. Бакун, Н. С. Гурина // БГМУ в авангарде медицинской науки и практики : сб. реценз. науч. работ / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Бел. гос. мед. ун-т ; редкол.: А. В. Сикорский, О. К. Доронина. — Минск : РНМБ, 2017. — Вып. 7. — С. 224–227.

7. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals for Experimental and Other Scientific Purposes. — Strasbourg, Council of Europe. — 1986. — № 51. — P. 12

Репозиторий БГМУ

Research of acute toxicity of water extracts from the galega officinalis herbs'

Bakun A. S., Gurina N. S.

Educational Establishment «The Belarusian State Medical University», Minsk, Republic of Belarus

This article focuses on is devoted to the research of the safety of water extracts from the Galegao fficinalis herbs'. The aim of this investigation was to determine the parameters of acute toxicity of water extracts from the Galega officinalis herbs'.

Determined Established that the water extraction of the Galega officinalis herbs' with a single intragastric administration to rats (8000 mg / kg) and a single intraperitoneal administration to mice (1000 mg / kg) does not cause intoxication and death of laboratory rats and mice.

According to the classification of the toxicity of substances of the Organization for Economic Assistance and Development (OECD), water extracts of the Galega officinal's herbs'can be classified as relatively harmless substances (class 6) with the intragastric route of administration, in case of intraperitoneal administration to class 5 (practically non-toxic substances).

Keywords: galega officinalis, safety, acute toxicity.

Поступила 02.10.2019

ий БГМУ