

СТАТЬЯ

УДК 615.322:57.084.1

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ
НОВОГО ЭЛЕКТРОИМПУЛЬСНОГО ЭКСТРАКТА
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ
РАСТИТЕЛЬНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ****Жукова О.Б., Зайцев К.В., Гостюхина А.А., Дорошенко О.С.,
Кожемякина А.Д., Степанова А.М., Гамеева Е.В.***ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр медицинской реабилитации
и курортологии Федерального медико-биологического агентства»,
Солнечногорск, e-mail: niikf@med.tomsk.ru*

Цель исследования: оценить острую токсичность нового электроимпульсного экстракта биологически активных веществ растительного происхождения, предназначенного для применения в клинической практике, при внутреннем введении лабораторным крысам. Экспериментальные испытания проводили на 60 половозрелых крысах линии Wistar обоего пола. 48 животным опытных групп тестируемый экстракт вводился однократно интражелудочно через зонд в разных дозах. Контрольную группу составили 12 крыс, получавших перорально эквивалентный объем воды очищенной. Через 14 суток наблюдения у грызунов оценивали наличие внешних признаков интоксикации, поведенческие реакции в тесте «открытое поле», в сыворотке крови измеряли концентрации общего белка, креатинина, глюкозы и холестерина, проводили некропсию внутренних органов. За весь период наблюдения гибели животных не зафиксировано. На основе сравнительной оценки результатов клинического наблюдения, измерения температуры тела, массы тела, определения показателей теста «открытое поле», биохимического анализа сыворотки крови, а также макроскопического осмотра состояния внутренних органов было установлено, что новый электроимпульсный экстракт биологически активных веществ растительного происхождения при интражелудочном введении не оказывает острого токсического действия на самок и самцов лабораторных крыс. Исследуемый экстракт соответствует умеренно опасным веществам.

Ключевые слова: доклинические исследования, токсичность, эксперимент, животные, электроимпульсный экстракт, класс опасности

**STUDY OF ACUTE TOXICITY OF A NEW ELECTROPULSE EXTRACT
OF BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES OF PLANT ORIGIN****Zhukova O.B., Zaitsev C.V., Gostyuhina A.A., Doroshenko O.S.,
Kozhemyakina A.D., Stepanova A.M., Gameeva E.V.***Federal Scientific and Clinical Center of Medical Rehabilitation and Balneology
of the Federal Medical and Biological Agency of Russia, Solnechnogorsk,
e-mail: niikf@med.tomsk.ru*

The purpose of the study: to evaluate the acute toxicity of a new electropulse extract of biologically active substances of plant origin, intended for use in clinical practice, when administered orally to laboratory rats. Experimental tests were conducted on 60 mature Wistar rats of both sexes. The test extract was administered to 48 animals of the experimental groups once intragastrically through a tube in different doses. The control group consisted of 12 rats that received an equivalent volume of purified water orally. After 14 days of observation, the rodents were assessed for external signs of intoxication, behavioral reactions in the open field test, the concentrations of total protein, creatinine, glucose and cholesterol were measured in the blood serum, and necropsy of internal organs was performed. No animal deaths were recorded during the entire observation period. Based on a comparative assessment of the results of clinical observation, measurement of body temperature, body weight, determination of the open field test parameters, biochemical analysis of blood serum, as well as macroscopic examination of the state of internal organs, it was established that the new electropulse extract of biologically active substances of plant origin, when administered intragastrically, does not have an acute toxic effect on female and male laboratory rats. The extract under study corresponds to moderately hazardous substances.

Keywords: preclinical studies, toxicity, experiment, animals, electropulse extract, hazard class

Введение

На современном этапе научно-технического прогресса с помощью высокотехнологических методов, включая использование технологии искусственного интеллекта, появились возможности масштабированного создания уникальных субстанций и синте-

тических молекул узконаправленного действия за достаточно краткосрочный период, не доступные разработчикам ранее. Однако клиническое применение новых фармакологических средств и материалов медицинского назначения по-прежнему требует научно обоснованных экспертиз и доказа-

тельств их безопасности и эффективности. В соответствии с действующими нормативно-правовыми актами для формирования доказанной в достаточной степени безопасности и эффективности необходимо многоэтапное научное исследование. При соблюдении установленного порядка на первоначальном этапе выполняется доклиническая оценка общей (острой и хронической) токсичности в условиях *in vitro* и *in vivo* на лабораторных животных.

Установление фактов наличия интоксикации и определение степени её выраженности при взаимодействии тестируемого вещества или изделия с живым организмом является важнейшей задачей доклинических токсикологических испытаний. Согласно Федеральному закону № 61 от 12 апреля 2010 года «Об обращении лекарственных средств» в ходе доклинических испытаний должна быть достигнута цель в получении достаточной доказательной базы о безопасности и эффективности применения новых средств и субстанций, с обязательной оценкой возможности и риска проведения на последующих этапах клинической апробации [1]. Доклинические исследования проводятся в строгом соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01 апреля 2016 года № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» [2].

В рамках выполнения прикладной научно-исследовательской работы «Разработка персонализированных технологий применения лечебных физических факторов и герпротекторов природного происхождения в коррекции биомаркеров старения» по государственному заданию № 84.002.24.800 авторами была разработана биологически активная добавка к пище на основе электроимпульсного экстракта из сырья растительного происхождения. Состав и технологическая схема извлечения данного экстракта (*ноу-хау*) подобраны таким образом, чтобы полученная композиция обладала выраженной адаптогенной активностью при внутреннем применении у лиц с факторами риска преждевременного старения организма и возраст-ассоциированных заболеваний.

В связи с вышеизложенным **целью данного исследования** явилась оценка острой токсичности нового электроимпульсного экстракта биологически активных веществ растительного происхождения, предназначенного для применения в клинической практике, при внутреннем введении лабораторным крысам.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на 60 половозрелых крысах линии Wistar обоего пола массой 240–300 г, полученных из сертифицированного питомника, которые после периода карантина (14 суток) содержались в стандартных условиях вивария Филиала ТНИИКиФ ФГБУ «ФНКЦ МРиК ФМБА» России при естественном световом режиме и на стандартном рационе со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры с животными выполняли в соответствии с правилами и рекомендациями гуманного обращения с животными, используемыми для экспериментальных и иных научных целей (Приказ Минздрава России от 18 мая 2021 г. № 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований») [3]. Исследование проводили согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» под редакцией А.Н. Миронова [4, с. 20–25]. Содержание животных и дизайн экспериментов одобрены Локальным этическим комитетом ФГБУ «ФНКЦ МРиК ФМБА» России после проведения независимой экспертизы на соответствие этическим нормам и принципам биомедицинских исследований (протокол № 3 от 28 марта 2024 г.).

Животных рандомизировали на контрольную и три опытные группы по 6 особей каждого пола. 48 животным опытных групп тестируемый экстракт вводился однократно внутривенно через зонд в разных дозах. В соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [4, с. 21] «...полученные результаты должны адекватно обеспечить возможность вычисления LD50 (доза, вызывающая гибель 50% особей), что предполагает наличие среди изучаемых групп одной группы со 100% летальностью и одной, в которой гибель животных отсутствует. Если из-за низкой токсичности фармакологического вещества нельзя определить LD50, следует указать максимальную дозу, которая была введена животным, но не менее 2 г/кг». Действуя согласно данному руководству, сначала животным ввели тестируемый экстракт в количестве 50 мг/кг и наблюдали за ними в течение трех суток. У этой группы крыс летальный исход и внешние признаки интоксикации отсутствовали. Далее для остальных групп последовательно применяли следующие дозы: 250, 500 и 2000 мг/кг. Контрольную группу составили 12 крыс, получавших перорально эквивалентный объем воды очищенной.

Общая продолжительность наблюдения за животными составила 14 суток. Ежедневно в ходе всего периода эксперимента фиксировали общее состояние животных, особенности их поведения, наличие и характер судорог, координации движений, тонус скелетных мышц, состояние шерстного и кожного покровов, окраску слизистых оболочек, количество и консистенцию фекальных масс, потребление корма и воды, изменение массы тела и температуры тела, с обязательной регистрацией сроков развития интоксикации и гибели животных. Через 14 суток наблюдения у крыс оценивали поведенческую активность в тесте «открытое поле» по методу C.S. Hall [5]. Далее животных выводили из эксперимента одномоментным декапитированием под CO_2 -наркозом, осуществляли забор крови для исследования, некропсию внутренних органов. В сыворотке крови проводили аналитические измерения концентраций общего белка, креатинина, глюкозы и общего холестерина с применением стандартных колориметрических методов согласно инструкциям производителя диагностических наборов (ООО «Ольвекс Диагностика», РФ) с помощью полуавтоматического фотометра «Biochem SA» (High Technology, США).

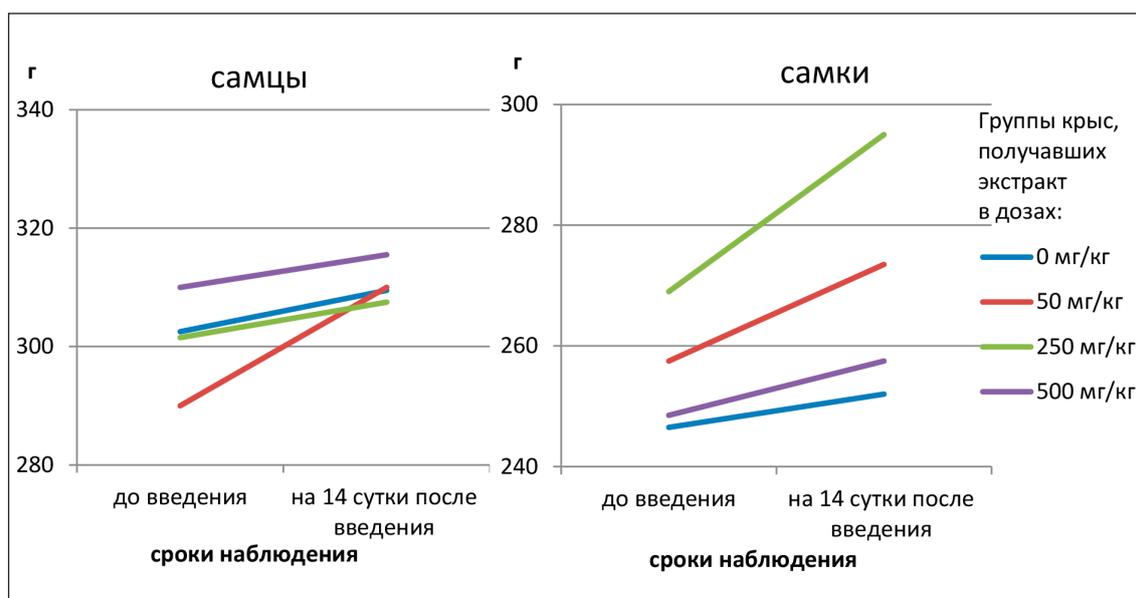
При обработке полученных данных были использованы автоматизированные методы статистического описания, включающие проверку на нормальность распре-

деления исследуемого признака по критерию Шапиро – Вилка, расчет медианы (M), верхнего и нижнего квартилей (Q_1 ; Q_3), а также методы проверки статистических гипотез при межгрупповом сравнении показателей с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе выполнения экспериментального исследования введение тестируемого вещества не привело к нарушению здоровья и гибели животных. Электроимпульсный экстракт биологически активных веществ растительного происхождения при внутрижелудочном однократном введении крысам в дозах 50, 250, 500 и 2000 мг/кг не вызывал смертность. Таким образом, установлена LD50 тестируемого экстракта более 2000 мг/кг, что согласно классификации [6] относится к умеренно опасным веществам (LD50 в диапазоне 151–5000 мг/кг).

Измерение температуры тела в динамике показало отсутствие пирогенной реакции у всех животных опытных групп на 1-е и 14-е сутки после однократного введения экстракта. Определение массы тела экспериментальных животных показало прибавку данного показателя в течение 14 суток эксперимента у крыс всех исследуемых групп (рисунок).



Динамика массы тела у крыс на 14-е сутки после однократного введения электроимпульсного экстракта биологически активных веществ растительного происхождения в разных дозах

Биохимические показатели сыворотки крови у крыс на 14-е сутки после введения электроимпульсного экстракта биологически активных веществ растительного происхождения, Me (Q₁; Q₃)

Исследуемые показатели		Контрольные крысы, получавшие очищенную воду	Опытные крысы, получавшие тестируемый экстракт в разной дозе:		
			50 мг/кг	250 мг/кг	500 мг/кг
Общий белок, г/л	самцы	71,0 (67,8; 94,5)	84,0 (80,8; 93,9) p≥0,05	73,2 (60,2; 83,1) p≥0,05	76,4 (63,8; 86,9) p≥0,05
	самки	71,5 (59,8; 85,0)	79,9 (76,6; 82,5) p≥0,05	77,3 (74,1; 79,8) p≥0,05	80,5 (47,8; 95,9) p≥0,05
Креатинин, мкмоль/л	самцы	42,0 (39,8; 54,8)	50,1 (43,1; 61,9) p≥0,05	49,8 (42,2; 57,3) p≥0,05	44,3 (40,9; 56,9) p≥0,05
	самки	48,0 (44,5; 60,0)	48,2 (45,2; 62,5) p≥0,05	55,3 (51,8; 70,6) p≥0,05	49,5 (40,7; 61,7) p≥0,05
Глюкоза, ммоль/л	самцы	5,3 (5,0; 5,9)	5,6 (5,3; 5,6) p≥0,05	4,3 (4,0; 4,7) p=0,011	5,3 (4,6; 6,0) p≥0,05
	самки	5,2 (4,7; 5,5)	4,9 (4,8; 5,0) p≥0,05	4,4 (3,9; 5,1) p=0,009	4,7 (4,0; 6,7) p≥0,05
Общий холестерин, ммоль/л	самцы	1,8 (1,7; 2,2)	2,5 (2,3; 2,7) p≥0,05	2,7 (2,5; 3,0) p=0,036	2,4 (1,6; 2,9) p≥0,05
	самки	1,9 (1,8; 2,0)	2,3 (2,2; 2,5) p≥0,05	3,0 (2,8; 3,3) p=0,019	2,7 (2,5; 3,1) p≥0,05

Примечание: p – уровень статистической значимости по сравнению с контрольной группой.

Сравнительный анализ показателей поведенческих реакций в тесте «открытое поле» на 14-е сутки после перорального применения экстракта выявил только учащение регистрации горизонтальной активности у самцов крыс, получавших 500 мг/кг тестируемого экстракта, на 60% (41,5 (34,3; 45,8) усл. ед., p=0,038) по сравнению со значением данного параметра у самцов контрольной группы (26,0 (13,5; 29,3) усл. ед.). Изменений других показателей, которые характеризуют ориентировочно-исследовательскую активность, зафиксировано не было. Тестирование самок крыс опытных групп в установке «открытое поле» на 14-е сутки после приема оцениваемого средства растительного происхождения не выявило изменений их поведенческих реакций относительно самок контрольной группы. Двигательная активность животных при помещении их в новые условия установки «открытое поле» свидетельствует об отсутствии у них стрессового состояния [7].

Результаты биохимического анализа показали, что у всех экспериментальных животных мужского и женского полов на 14-е сутки после внутреннего однократного приема разработанного нового экстракта в сыворотке крови показатели, характеризующие состояние белкового обмена веществ (концентрации общего белка и креатинина),

сопоставимы с уровнем аналогичных параметров у крыс, принимавших очищенную воду (таблица).

Проведенный биохимический анализ выявил меньшие значения скринингового показателя, характеризующего состояние углеводного обмена – содержание глюкозы в сыворотке крови – у крыс, получавших 250 мг/кг экстракта, вне зависимости от половой принадлежности (табл.). Со стороны липидного обмена отмечено небольшое повышение содержания общего холестерина также у животных данной опытной группы обоего пола (табл.). Считаем это несущественным изменением, т.к. в данном случае установленные уровни показателей не выходят за границы интервала референсных значений [8]. В целом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии грубых метаболических нарушений, сопровождающих токсическое поражение.

При макроскопическом изучении состояния внутренних органов после вскрытия патологических изменений у всех самцов опытных групп не обнаружено. Для половины крыс из группы с дозой тестируемого экстракта в 500 мг/кг отмечен визуально больший объем висцерального жира по сравнению с контрольной группой. При некропии у самок крыс всех групп патологических изменений также не выяв-

лено. Объём висцерального жира у всех животных женского пола был одинаков.

При обследовании желудка установлено, что у всех крыс обоего пола размеры его не изменены, границы ровные, серозная оболочка тонкая, блестящая, гладкая, нормально окрашена. Стенка желудка не изменена. Слизистая оболочка данного органа во всех случаях имела складчатую поверхность, соответствующую нормальному рельефу внутренней поверхности желудка, без эрозий и язв.

Заключение

В ходе проведения доклинических испытаний нового электроимпульсного экстракта биологически активных веществ растительного происхождения, разработанного для внутреннего применения, у 48 половозрелых крыс Wistar обоего пола при внутривенном введении объекта исследования в течение 14 суток наблюдения признаки общей интоксикации организма (летальный исход, нарушения дыхания, сердцебиения, пищеварения, параличи, судороги, тремор, недостаточность сердца, печени, почек, отек мозга, гипоксия и дистрофия тканей внутренних органов) отсутствовали, что свидетельствует о нетоксичности тестируемого экстракта.

На основе сравнительной оценки результатов клинического наблюдения, измерения температуры тела, массы тела, определения показателей теста «открытое поле», электрокардиографии, гематологического и биохимического анализов крови, а также макроскопического осмотра состо-

яния внутренних органов было установлено, что новый электроимпульсный экстракт биологически активных веществ растительного происхождения при внутреннем применении не оказывает острого токсического действия на самок и самцов лабораторных крыс. LD50 нового экстракта определен более 2000 мг/кг, что соответствует умеренно опасным веществам.

Список литературы

1. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 02.08.2019) «Об обращении лекарственных средств» [Электронный ресурс]. URL: https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ (дата обращения: 12.10.2024).
2. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 01 апреля 2016 г. №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». М.: Стандартинформ, 2016. 9 с.
3. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 18 мая 2021 г. N 464н «Об утверждении Правил проведения лабораторных исследований» [Электронный ресурс]. URL: <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001202106010055> (дата обращения: 12.10.2024).
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. Часть I. М.: Гриф и К, 2012. 328 с.
5. Ivinkis A. A study of validity of open-field measures // Austral. J. Psychol. 1970. Vol. 22. P. 175–183.
6. ГОСТ 12.1.007-76 Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. М.: Стандартинформ, 2017. 6 с.
7. Winciewicz D., Price J. Alterations of exploratory patterns induced by repeated stress // European Neuropsychopharmacology. 2019. Vol. 29. Is. 6. P. 361–362. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2019.09.519.
8. Войтенко Н.Г., Макарова М.Н., Зуева А.А. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: крысы // Лабораторные животные для научных исследований. 2020. № 1. С. 47-53. DOI: 10.29296/2618723X-2020-01-06.