

ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ЭКСТРАКТА ТОРИЛИСА ПОЛЕВОГО В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹ Грибко А.С., ¹Савенко И.А., ¹Сергиенко А.В., ¹Ивашев М.Н., ¹Арльт А.В.

Пятигорский филиал ГБОУ ВПО «Волг ГМУ» Минздрава России, Пятигорск, Россия (357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11), e-mail: ivashev@bk.ru

Проведено экспериментальное исследование безопасности экстракта торилиса полевого (раздражающая активность, острая токсичность). Исследования на хорион-аллантоисной оболочке куриного эмбриона свидетельствуют о том, что тестируемый экстракт торилиса полевого в разведениях, соответствующих концентрации этилового спирта 17,5% и 8,75%, может не обладать раздражающим действием на слизистые оболочки млекопитающих. Экспериментальные данные позволили сделать вывод о том, что экстракт торилиса полевого при разбавлении в два раза (35%) обладает умеренным раздражающим действием на слизистую оболочку глаза морских свинок. Экстракт, разведенный водой в четыре и восемь раз, обладает слабым раздражающим действием. Неразведенный экстракт 70% применять не рекомендуется ввиду сильного раздражающего действия. По таблице Сидорова К.К. при способе введения per os острая токсичность экстракта торилиса полевого соответствует классу IV – малоопасное средство.

Ключевые слова: торилис полевой, острая токсичность, раздражающее действие, экспериментальная фармакология.

SAFETY STUDY OF EXTRACT TORILISA FIELD IN THE EXPERIMENT

¹Gribko A.S., ¹Savenko I.A., ¹Sergienko A.V., ¹Ivashev M.N., Arlt A.V.

¹ Pyatigorsk branch of the Volgograd state medical university, Pyatigorsk, Russia (357 532, Pyatigorsk, etc. Kalinina, 11), e-mail: ivashev@bk.ru

The pilot research of safety of extract torilis field (irritating activity, acute toxicity) is conducted. Researches on a horion-allantoisny cover of a chicken embryo testify that tested extract torilis field in the cultivations corresponding to concentration of ethyl alcohol of 17,5% and 8,75% can not possess an irritant action on mucous membranes of mammals. Experimental data allowed to draw a conclusion that extract torilis field at dilution twice (35%) possess a moderate irritant action on a mucous membrane of an eye of guinea pigs. The extract divorced with water in four and eight times, possesses a weak irritant action. Not divorced extract of 70% isn't recommended to be applied in a type of a strong irritant action. According to Sidorov K.K. table, at a way of introduction of per os acute toxicity of extract torilis the field corresponds to a class IV – low-dangerous means.

Keywords: torilis field, acute toxicity, irritant, experimental pharmacology.

Введение

Торилис полевой (*Torilis arvensis* Link.) семейства зонтичные (Ariaceae) – однолетнее травянистое растение, произрастающее в европейской части России и на Северном Кавказе. Большое содержание в торилисе полевом биологически активных соединений, аминокислот, микроэлементов — позволяет использовать это сырье для нужд современной фармакологии и фармации в качестве сырья для лекарственных средств различного спектра биологического действия [1; 3; 4; **Ошибка! Источник ссылки не найден.**; 7; 9; 10].

Цель исследования

Изучение раздражающего действия и острой токсичности экстракта торилиса полевого.

Материалы и методы исследования

Оценку раздражающего действия экстракта торилиса полевого (ЭТП) проводили тестом на хорион-аллантаисной оболочке куриного эмбриона, HET – SAM test. ЭТП тестировали в 48 повторностях (24 – опыт, 24 - контроль). Эмбрионы выдерживали в инкубаторе при $t\ 37,8\ ^\circ\text{C}$ и влажности 62,5%. Перед началом работы яйцо укрепляли на фиксирующей подставке тупым концом вверх; скорлупу вскрывали в центре тупого конца, освобождали от скорлупы всю воздушную камеру, после чего поверхность открытой воздушной камеры смачивали изотоническим раствором натрия хлорида (0,89%) с $t\ 37\ ^\circ\text{C}$. После этого яйцо помещали в термостат на 30 минут, затем раствор отсасывали микропипеткой, удаляли увлажненную жесткую подскорлуповую оболочку, без повреждения нежной хорион-аллантаисной оболочки. Наносили подогретый до $37\ ^\circ\text{C}$ ЭТП в объеме 0,3 мл и наблюдали за действием вещества 240 секунд. По результатам наблюдения определяли, к какому классу веществ по степени раздражения относится ЭТП, и может ли быть он допущен к экспериментам на животных без повреждающего воздействия на слизистые оболочки млекопитающих. Исследование раздражающей активности на животных (тест Драйза) проводили по схеме, используемой в настоящее время в Германии (Spielmann и соавт., 1996). ЭТП испытывали на слизистой оболочке глаза морских свинок, нанося на передний сегмент глаза, после чего делали окончательное заключение. Индекс раздражающего действия оценивали интегрально: суммировали степень отека и покраснения (гиперемии). Соотношение между площадью, захваченной эритемой и отеком, на опытной слизистой оболочке конъюнктивы и площадью контрольной определяло индекс первичного раздражения. Препараты, вызывающие реакцию с индексом 1-2, являются слабыми раздражителями кожи и слизистой оболочки, препараты с индексом 3-5 – умеренными, а с индексом 6-8 – сильными. Время оценки: 30 секунд, 2 минуты, 6 часов, 24 часа. Контролем в данном случае служил второй глаз животного. Результаты раздражения конъюнктивы млекопитающих регистрировали в баллах по 5-балльной шкале, согласно рекомендациям П. Михайлова (1985). При определении раздражающей активности ЭТП наносили на передний сегмент глаза морских свинок в количестве 0,3 мл в теплом виде, $t\ 37,0\pm 0,2\ ^\circ\text{C}$. При определении острой токсичности ЭТП вводили мышам *per os* в разных дозах в объеме введения 0,5 мл; для чего ЭТП разводили водой. Мыши получали ЭТП в объемных дозах: 25, 12,5, 6,25, 3,12 мл/кг. Для достижения одинакового объема вводимой жидкости ЭТП разбавляли водой до конечного объема 25 мл/кг. Определение острой токсичности проводили по методу Кербера, описанному в официальном руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ под редакцией Р.У. Хабриева (Москва, 2005 г.). После введения внутрь ЭТП в разных дозах оценивали состояние мышей. Критериями оценки острой токсичности служили картина

интоксикации и выживаемость животных в течение 48 часов. Дальнейшее наблюдение проводили в течение двух недель, причем в первый день после введения животные находились под непрерывным наблюдением. Для определения действия экстрагента на организм мышей проводили параллельные исследования с использованием экстрагента в эквивалентном объеме и концентрации. Проведено 8 серий экспериментов (4 серии на мышах – ЭТП в разных дозах, 4 серии – экстрагент в разных дозах). Рассчитывали острую токсичность, соблюдая рекомендации государственного фармакологического комитета по изучению общетоксического действия биологически активных веществ. При переносе доз с человека на белых мышей и обратно использовали коэффициент межвидового переноса доз, который составляет 11,8. Экспериментальные животные, используемые в исследовании, содержались в стандартных условиях вивария Пятигорского филиала ГБОУ ВПО «Волг ГМУ» Минздрава России: температура окружающего воздуха 22 ± 2 °С. Комбинированный корм и воду животные получали *ad libitum*. Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием t-критерия Стьюдента, с поправкой Бонферрони для множественных рядов в пакете компьютерной программы Microsoft Excel 2000 [2; 5; 8].

Результаты исследования и их обсуждение

Для исследования раздражающего действия на хорион-аллантаисную оболочку куриного эмбриона экстенпорально из основного (матричного) ЭТП были приготовлены 4 образца экстракта методом половинного разбавления. При нанесении на хорион-аллантаисную оболочку куриного эмбриона ЭТП в чистом виде (70%) в пяти случаях из шести отмечался тромбоз в мелких сосудах с остановкой кровотока и мелкие точечные кровоизлияния по всей обработанной поверхности. В одном случае из шести наблюдалась коагуляция и лизис мелких и средних сосудов, множественные кровоизлияния и тромбоз с остановкой кровотока. Это позволило согласно классификации веществ по степени раздражения отнести исследуемый ЭТП в чистом виде к 5-му классу соединений, коэффициент раздражающего воздействия $4,17\pm 0,41$. Экстрагент (спирт этиловый 70%) - отнесен к 5-му классу соединений, коэффициент составил $4,33\pm 0,516$. При нанесении ЭТП в разведении водой 1:1 (концентрация в этом случае составила 35%) в трех случаях из шести наблюдалось покраснение хорион-аллантаисной оболочки и тромбоз в отдельных капиллярах, а в трех случаях наблюдалось сужение сосудов с временной остановкой кровообращения в отдельных капиллярах. Это позволило согласно классификации веществ по степени раздражения ЭТП отнести к 3-му классу соединений, коэффициент раздражающего воздействия $2,67\pm 0,516$. Экстрагент (спирт этиловый 35%) - отнесен к 3-му классу соединений, коэффициент составил $2,67\pm 0,516$. В трех случаях из шести исследований в концентрации 17,5 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаисной оболочки, а в

трех случаях наблюдалось сужение сосудов с временной остановкой кровообращения в отдельных капиллярах. Это соответствует 2 классу по степени раздражения, коэффициент раздражающего воздействия $2,0 \pm 0,548$. Экстрагент (спирт этиловый 17,5%) - отнесен к 2-му классу соединений, коэффициент составил $1,5 \pm 0,548$. В шести случаях исследований в разведениях 1:5 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаисной оболочки. Это соответствует 1 классу по степени раздражения, коэффициент раздражающего воздействия $1,0 \pm 0,0$. Экстрагент (спирт этиловый 17,5%) - отнесен к 1-му классу соединений, коэффициент составил $1,0 \pm 0,0$. Полученные результаты свидетельствуют о том, что тестируемый ЭТП в разведениях, соответствующих концентрации этилового спирта 17,5% и 8,75%, может не обладать выраженным токсическим и раздражающим действием на слизистые оболочки млекопитающих и может быть допущено к дальнейшим исследованиям на теплокровных животных по схеме Spielmann и соавт (1996). Обсуждая полученные результаты эксперимента, следует отметить, что раздражающее действие обеспечивает экстрагент. Биологически активные вещества, входящие в состав ЭТП, несколько уменьшают этот негативный эффект. Для полного устранения раздражения тканей рекомендовано при использовании ЭТП на биологические системы устранить присутствие экстрагента путем разбавления либо отгона. Исследования по раздражающему действию было продолжено *in vivo* на слизистой оболочке глаза морских свинок. Значение раздражающего действия ЭТП 35% было следующим: отек и гиперемия в сумме составили 3,34 балла на 30 секунде, что соответствует параметрам слабого раздражающего действия. Через 2 минуты раздражающее действие составило в сумме 4,66 балла, что соответствует умеренному раздражающему действию. Значение раздражающего действия ЭТП 17,5% было следующим: отек и гиперемия на 30 секунде в сумме составили 2 балла, что соответствует параметрам слабого раздражающего действия. Через 2 минуты раздражающее действие составило 4,33 балла, что соответствует умеренному раздражающему действию. Значение раздражающего действия ЭТП 8,75% через 30 секунд (на 1 минуте) в сумме 0,66 балла, что соответствует параметрам слабого раздражающего действия. Через 2 минуты раздражающее действие составило 2 балла, что соответствует слабому раздражающему действию. Таким образом, экспериментальные данные позволили сделать вывод о том, что ЭТП при разбавлении в два раза (35%) обладает умеренным раздражающим действием. ЭТП, разведенный водой в четыре и восемь раз (17,5% и 8,75%), при применении на слизистую оболочку глаза морских свинок обладает слабым раздражающим действием. Неразведенный ЭТП 70% применять не рекомендуется ввиду сильного раздражающего действия. Острую токсичность ЭТП сравнивали с контрольной группой животных, получавших экстрагент в эквивалентной концентрации и объеме. При изучении токсического действия *per os*

исследуемый ЭТП вводили интрагастрально мышам в дозах: 0,5 мл (70%), 0,25 мл (35%), 0,125 мл (17,5%), 0,0625 мл (8,75%) - доведенный до общего количества 0,5 мл водой очищенной. Запайвали мышей методом принудительного зондирования per os в теплом ($37,0 \pm 0,1$ °C) виде. Контролем служили животные, получавшие в той же дозе экстрагент – спирт этиловый эквивалентного разведения. О степени токсичности ЭТП и экстрагента судили по изменению общего состояния мышей (внешний вид, поведенческая реакция, их активность, частота дыхания, состояние рефлекторной деятельности, пробы на болевое раздражение, потребление пищи) и гибели животных. Общая длительность наблюдения составила 14 дней. В первые 6 часов животные находились под непрерывным наблюдением. Следует отметить, что в первый час после введения ЭТП у всех животных отмечалась вялость, заторможенность, учащенное дыхание и отказ от воды и пищи. В группе животных, получивших неразведенный ЭТП 70%, отмечалась гибель всех животных 100%. В группе животных, получивших ЭТП, разведенный водой в 2 раза, отмечалась гибель 50% животных. В группе получивших ЭТП, разведенный водой в 4 раза, отмечалась гибель 16,7% животных. В группе получивших ЭТП, разведенный водой в 8 раз, гибели животных не отмечалось. При вскрытии погибших животных не наблюдалось патологических видимых изменений со стороны внутренних органов, остановка сердца произошла в диастолу. Вероятно, гибель животных произошла от остановки дыхательного и сосудодвигательного центров. Это объясняется нейродепрессивным действием экстрагента – спирта этилового, поскольку в контрольной группе животных отмечались те же проявления, что и в опытных группах. У выживших животных по истечении 6 часов указанные выше явления проходили, и животные чувствовали себя нормально. В течение двух последующих недель не наблюдалось гибели ни одного животного. Данное обстоятельство указывает на острое токсическое действие на центральную нервную систему. Обсуждая результаты полученных экспериментальных данных, следует отметить, что токсичность ЭТП при применении per os объясняется и напрямую зависит от концентрации экстрагента. Летальная доза, обеспечившая гибель всех экспериментальных животных, составила 25 мл/кг. Доза летальная LD₅₀ исследуемого экстракта составила 16,15мл/кг. Для дальнейших исследований рекомендовано использовать дозу 1:10 от LD₅₀, т.е. 1,615 мл/кг или 1:20 от LD₅₀, т.е. 0,81 мл/кг. При пересчете объема введенного экстракта на массу установлено, что LD₅₀ составляет 14,3 г/кг. По таблице Сидорова К.К. при способе введения per os этот показатель соответствует классу IV – малоопасное средство.

Выводы

1. По результатам исследования раздражающего действия на хорион-аллантаоисную оболочку и на передний сегмент глаза морских свинок установлено, что неразведенный

экстракт торилиса полевого обладает сильным раздражающим действием, разведенный в два раза экстракт обладает умеренным, и в четыре раза - слабым раздражающим действием.

2. Экстракт из торилиса полевого малоопасен для млекопитающих: $LD_{50} = 14,3\text{г/кг}$ – 4 класс токсичности.

Список литературы

1. Арльт А.В. Влияние предуктала и триметазидина на мозговой кровоток / А.В. Арльт, А.М. Салман, М.Н. Ивашев // Фармация. – 2007. - № 2. – С. 32–34.
2. Бондаренко Д.А. Моделирование патологических состояний кожи у крыс и мышей / Д.А. Бондаренко [и др.] // Цитокины и воспаление. – 2010. – Т. 9. - № 4. - С. 28-31.
3. Дугин С.Ф. Исследование роли нейрогуморальных систем в патогенезе экспериментальной хронической сердечной недостаточности / С.Ф. Дугин, Е.А. Городецкая, М.Н. Ивашев, А.Н. Крутиков // Информационный бюллетень РФФИ. – 1994. - Т. 2. - № 4. - С. 292.
4. Ивашев М.Н. Антигипоксический эффект производного фенотиазина МИКС-8 / М.Н. Ивашев, Г.В. Масликова, К.Х. Саркисян // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2012. - № 2. – С. 74-76.
5. Ивашев М.Н. Особенности кардиогемодинамики при применении золетила у лабораторных животных / М.Н. Ивашев [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. – 2012. - № 4 (123). – Выпуск 17/1. – С. 168 – 171.
6. Масликова Г.В. Роль селена и его соединений в терапии цереброваскулярных заболеваний / Г.В. Масликова, М.Н. Ивашев // Биомедицина. – 2010. - № 3. – С. 94 – 96.
7. Савенко И.А. Фармакологическое исследование влияния когитума на моделированную патологию желудка крыс / И.А. Савенко, А.В. Крищенко, А.В. Сергиенко, М.Н. Ивашев // Биомедицина. – 2010. - № 5. – С. 123 – 125.
8. Савенко И.А. Возможность применения ветеринарного препарата в экспериментальной фармакологии / И.А. Савенко [и др.] // Фундаментальные исследования. – 2012. - № 5. – Ч. 2. – С. 422 – 425.
9. Саркисян К.Х. Фармакотерапия аритмий / К.Х. Саркисян, М.Н. Ивашев // Новая аптека. Аптечный ассортимент. – 2009. - № 8. – С. 43 – 45.
10. Сергиенко А.В. Фармакологическое изучение алфлутопа, как хондропротектора в эксперименте / А.В. Сергиенко, М.Н. Ивашев // Научно-практическая ревматология. - 2004. - № 2. – С. 140.

Рецензенты:

Юшков В.В., д.м.н., профессор кафедры фармакологии ГБОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздравсоцразвития РФ, г. Пермь.

Покровский М.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии и фармдисциплин ИМПО ФГАОУ ВПО «Белгородский государственный национальный университет», г. Белгород.