

ОСТРАЯ И ХРОНИЧЕСКАЯ ТОКСИЧНОСТЬ НАСТОЙКИ COLURIA GEOIDES (ROSACEAE)

¹Дутова С.В., ¹Неделькина Н.П., ²Карпова М.Р., ¹Чумаков В.Ю., ³Мяделец М.А.

¹ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н.Ф.Катанова», Абакан, Россия (655017, Абакан, ул. Ленина, 90), e-mail: coluria@mail.ru, npnedelkina@mail.ru.

²ГБОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Минздрава России, Томск, Россия (634050, г. Томск, Московский тракт, 2), e-mail: mrkarpova@mail.ru.

³ФГБУН Центральный сибирский ботанический сад СО РАН, Новосибирск, Россия (630090, г. Новосибирск, ул. Золотодолинская, 101).

Проведено исследование острой и хронической токсичности перспективного фитопрепарата – настойки *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (Rosaceae), при доклиническом исследовании проявившей антимикробные, иммуностимулирующие, иммунокорректирующие свойства и протективное действие при стафилококковой инфекции у аутбредных мышей. При однократном и длительном (в течение 14 дней) интрагастральном, введении исследуемый препарат в дозе 2000 мг/кг не оказывал общетоксического действия на организм инбредных мышей линии СВА/СаЛас. Гибели животных не зарегистрировали, динамика изменения веса была положительной, гематологические показатели изменялись незначительно в пределах нормы, поведенческие реакции не отличались от таковых в контрольной группе. Отмечено лишь достоверное снижение вертикальной и горизонтальной двигательной активности и увеличение эпизодов большого груминга у самок при курсовом введении препарата, что, возможно, свидетельствует о наличии седативного эффекта. При макроскопическом и гистологическом исследовании внутренних органов животных не обнаружили патологических и специфических деструктивных изменений, индексы массы внутренних органов не отличались от показателей животных контрольной группы. Отмечали лишь уменьшение относительного веса печени у самцов экспериментальной группы, но при гистологическом исследовании изменений общей гистоархитектоники органа не установили. Полученные результаты дают право утверждать, что исследуемый растительный препарат относится к малотоксичным веществам.

Ключевые слова: острая токсичность, хроническая токсичность, фитопрепарат, *Coluria geoides*.

ACUTE AND CHRONIC TOXICITY OF TINCTURE OF COLURIA GEOIDES

¹Dutova S.V., ¹Nedelkina N.P., ²Karpova M.R., ¹Chumakov V.Y., ³Mjadelec M.A.

¹FGBOU VPO «Khakass state University n.a. N. F. Katanov», Abakan, Russia (655017, Abakan, Lenin street, 90), e-mail: coluria@mail.ru, npnedelkina@mail.ru.

²GBOU VPO Siberian state medical University of the Ministry of health of Russia, Tomsk, Russia (634050, Tomsk, Moscow highway, 2), e-mail: mrkarpova@mail.ru.

³FGBUN Central Siberian botanical garden of the Siberian Branch of the Russian Academy of Science, Novosibirsk, Russia (630090, Novosibirsk, Zolotodolinskaya St., 101).

Conducted a study of the acute and chronic toxicity of a perspective phytopreparation – tincture of *Coluria geoides* (Rosaceae), at the preclinical study proved antibacterial, immunostimulating and immunocorrective properties and protective action for staphylococcal infections in outbred mice. At single and long-term (within 14 days) intragastric, introduction a studied drug at a dose of 2000 mg/kg had no general toxic effect on the organism of mice of the CBA/CaLac line. Death of animals didn't registered, the dynamics of change of weight was positive, hematologic indicators changed slightly in the normal range, behavioural reactions didn't differ from those in control group. Only reliable decrease of vertical and horizontal physical activity and increase of episodes of a lohg-term grooming at females is noted at course introduction of a preparation that, probably, testifies to existence of sedative effect. At macroscopic and histologic research of internal organs of animals didn't find pathological and specific destructive changes, indexes of mass of internal organs didn't differ from indicators of animals of control group. Noted only reduction of relative weight of a liver at males of experimental group, but at histologic research of changes of the general gistoarkhitektonik of body didn't establish. The received results grant the right to claim that the studied drag belongs to low-toxic substances.

Keywords: acute toxicity, chronic toxicity, herbal drug, *Coluria geoides*.

При изучении новых лекарственных препаратов, в том числе и растительного происхождения, необходимым условием является изучение их безопасности. *Coluria geoides* (Pall.) Ledeb. (Rosaceae) является перспективным источником биологически активных веществ с противомикробной, иммуностимулирующей и иммунокорректирующей активностью, протективным действием при стафилококковой инфекции [3-5, 7]. Исследование острой и хронической токсичности настойки *C. geoides* при пероральном введении в дозе 100 мг/кг аутбредным мышам показало отсутствие токсичности [6]. Необходимым явилось исследование безвредности этого препарата для инбредных животных линии СВА/СаЛас, на которых была доказана фармакологическая активность. В связи с этим, целью данной работы явилась экспериментальная оценка острой и хронической токсичности настойки *C. geoides* для инбредных животных.

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на базе вивария Медико-психолого-социального института Хакасского государственного университета на инбредных мышках линии СВА/СаЛас обоего пола в возрасте 2 месяцев, полученных из отдела экспериментального биомедицинского моделирования ФГБУ «НИИ фармакологии им. Е.Д. Гольдберга» СО РАМН (г. Томск). Исследование проводили в соответствии с международными этическими и научными стандартами качества проведения исследований на животных, самцов и самок содержали отдельно. В эксперименте было задействовано 60 животных (30 самок и 30 самцов). Исследуемый препарат получали из воздушно-сухого сырья *C. geoides* методом перколяции, высушивали, стандартизовали по выходу экстрактивных веществ, перед введением животным растворяли в дистиллированной воде. Токсичность препарата оценивали согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» [10]. Раствор препарата вводили внутрь желудка однократно (при исследовании острой токсичности) и в течение 14 дней один раз в сутки (при исследовании хронической токсичности) в дозе 2000 мг/кг веса. Животные контрольных групп получали соответствующий объем растворителя. При оценке острой токсичности наблюдение за животными вели в течение 6 часов после введения препарата в первые сутки, затем дважды в день в течение 14 дней. При изучении хронической токсичности наблюдение за животными проводили ежедневно в течение 2-х месяцев. Оценивали общее состояние животных, динамику изменения массы тела (еженедельно). Гематологические показатели (общее количество лейкоцитов, эритроцитов, лейкоцитарную формулу) оценивали стандартными методами [9]. Патоморфологические проявления токсичности оценивали при макроскопическом исследовании внутренних органов в конце эксперимента после эвтаназии (цервикальной дислокацией под легким эфирным наркозом), а также по изменению индекса

массы печени, селезенки, почек. Влияние препарата на ориентировочно-исследовательское поведение животных оценивали с помощью теста «Открытое поле» [1, 10].

Полученные результаты обрабатывали с использованием пакета программ IBM SPSS Statistics 19, результаты представляли в виде медианы с 25% и 75% квантилями. Независимые группы сравнивали с помощью непараметрического U-теста Манна-Уитни, связанные - при помощи непараметрического критерия Вилкоксона, различия считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования

В эксперименте установили, что однократное введение настойки *C. geoides* в дозе 2000 мг/кг не влияет на общее состояние животных, симптомы острого отравления не регистрировали, падеж животных отсутствовал. Так как исследуемая доза препарата не привела к гибели ни одного животного, сделали вывод, что $LD_{50} > 2000$ мг/кг и, согласно классификации И. В. Санюцкого, настойка *C. geoides* относится к IV классу опасности (малотоксичные вещества) [11], как и практически все суммарные фитопрепараты [8].

В течение всего периода наблюдения поведенческие реакции животных экспериментальной группы были в пределах физиологической нормы: отмечались обычное питьевое и пищевое поведение, нормальная координация движений, обычная частота и глубина дыхательных движений, нормальная консистенцию фекальных масс, частота мочеиспускания и окраска мочи. За это время мыши прибавили в весе.

Гематологические показатели периферической крови в процессе эксперимента изменялись незначительно в пределах нормы: у самцов контрольной и экспериментальной групп одинаково увеличилось число лейкоцитов. У самок экспериментальной группы число эритроцитов изначально было ниже, чем у самок контрольной группы, к концу периода наблюдения эта тенденция сохранилась (табл. 1).

Таблица 1 – Гематологические показатели животных при однократном введении настойки *C. geoides*, $M \pm m$ (n=10)

Группа животных	Абсолютное число лейкоцитов, $*10^9/л$		Абсолютное число эритроцитов, $*10^{12}/л$	
	до введения препарата	в конце эксперимента	до введения препарата	в конце эксперимента
Контрольная самки	6,03 (5,00÷7,25)	4,28 (3,50÷4,84)	9,05 (8,84÷9,28)	8,48 (8,08÷8,94)
Экспериментальная самки	6,03 (5,66÷8,64)	5,20 (3,80÷6,36)	6,84 (6,18÷7,50)*	7,88 (7,07÷8,30)*

Контрольная самцы	5,20 (4,60÷8,85)	8,35 (7,34÷9,85)#	7,72 (6,70÷8,87)	6,92 (5,72÷8,05)
Экспериментальная самцы	5,55 (4,30÷6,08)	8,20 (7,66÷9,96)#	7,69 (6,70÷8,82)	6,89 (6,30÷8,69)

Примечание: различие достоверно при $p \leq 0,05$ для показателей

* - контрольных и экспериментальных групп,

- внутри групп в начале и в конце эксперимента.

Морфологический состав крови животных экспериментальных групп в конце эксперимента (на 14 день) достоверно не отличался от показателей животных контрольных групп (рис. 1).

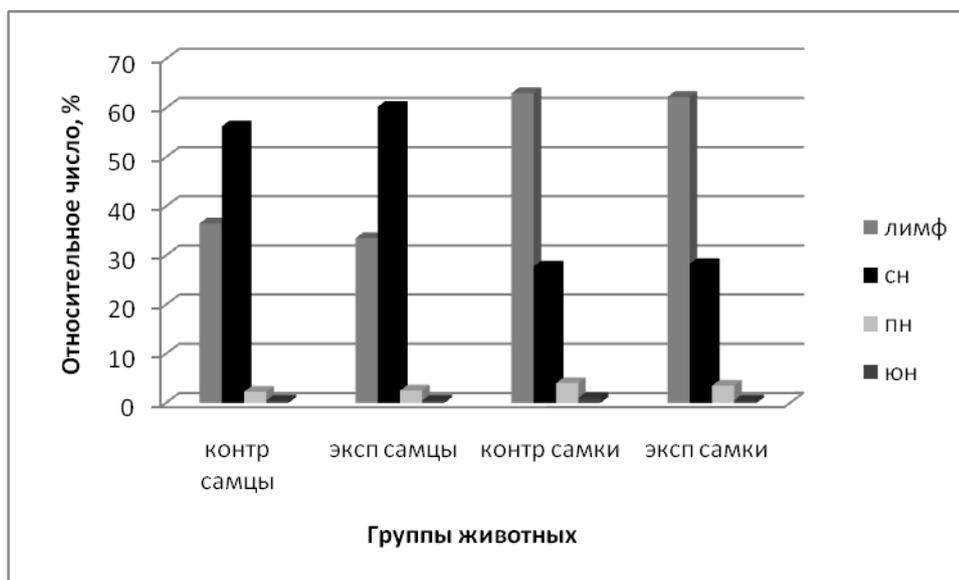


Рисунок 1 – Морфологический состав лейкоцитов при однократном введении настойки *C. geoides* (лимф – лимфоцитов, сн – сегментоядерных нейтрофилов, пн – палочкоядерных нейтрофилов, юн – юных нейтрофилов)

Макроскопическое исследование внутренних органов животных показало, что однократное введение настойки *C. гравилатовидной* не вызывает патологических и специфических деструктивных изменений в органах и тканях животных. Внутренние органы животных экспериментальных групп были анатомически правильной формы, их положение анатомически правильно, сосуды кровенаполнены. Индексы массы внутренних органов животных контрольных и экспериментальных групп достоверно не различались (рис. 2).

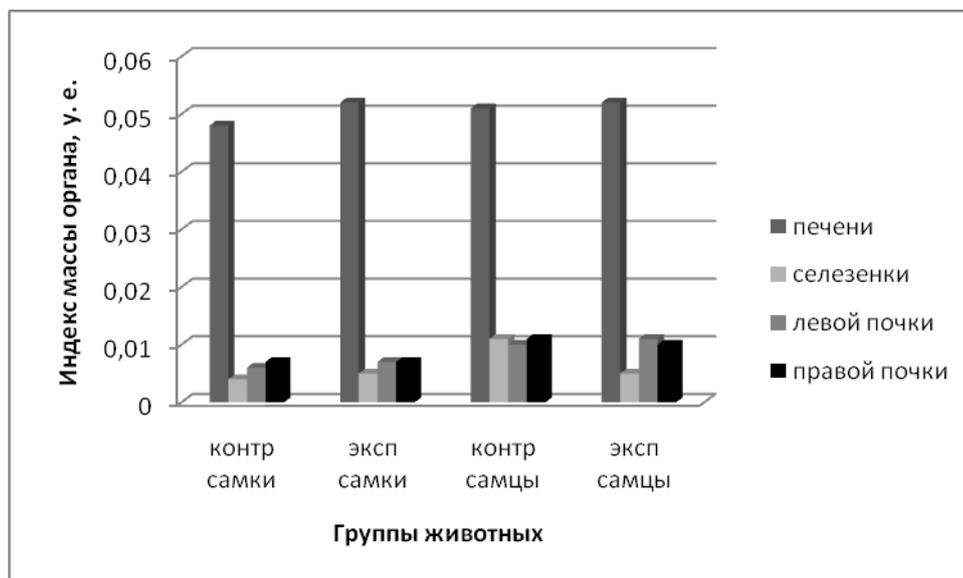


Рисунок 2 – Индексы массы внутренних органов при однократном введении настойки *C. geoides*.

При проведении теста открытое поле (ОП) перед введением препарата отмечали активное ориентировочно-исследовательское поведение животных, наибольшее в центральной части камеры (куда первоначально помещали животных), ярко выраженный «норковый рефлекс» (обследование отверстий) и умеренную эмоциональность, характеризуемую небольшим числом болюсов и эпизодов груминга. В конце периода наблюдения (на 14 день) при повторном проведении теста ОП между показателями животных контрольной и экспериментальной групп достоверных различий не обнаружили (рис. 3). Сохранилась тенденция к преобладанию горизонтальной двигательной активности в центре камеры и повышенный интерес к обследованию отверстий. Эмоциональность животных также была умеренной.

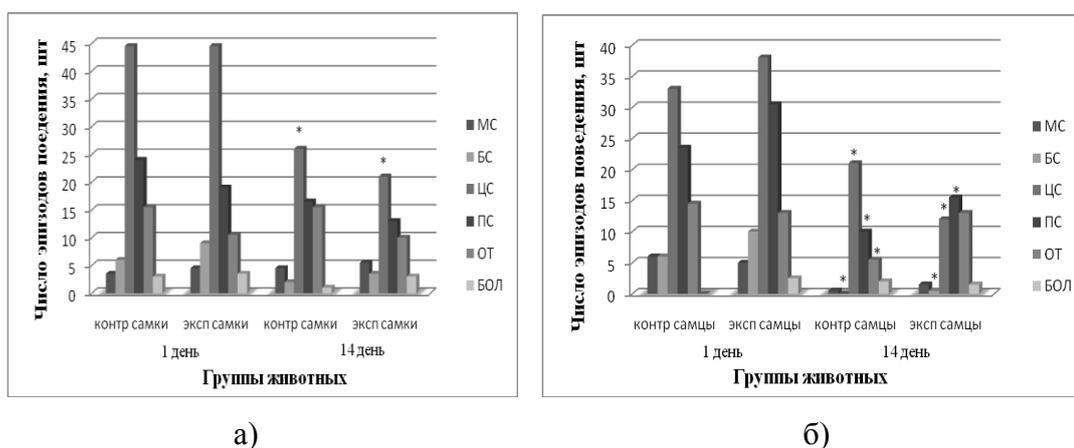


Рисунок 3 – Ориентировочно-исследовательское поведение при однократном введении настойки *C. geoides*: а) самок, б) самцов (мс – малые стойки, бс – большие стойки, цс – пересечение секторов в центральном секторе камеры, пс – пересечение секторов в периферической части камеры, от – обследование отверстий, бол – число болюсов; * – достоверные различия).

помечены данные, достоверно отличающиеся от показателей животных до введения препарата)

При сравнении показателей двигательной активности по группам в начале и конце наблюдения, у самок обнаружили достоверное снижение двигательной активности в центральном секторе с 44,5 (34,5÷53,3) пересеченных секторов на 1-й день до 26,0 (20,0÷32,3) на 14 день в контрольной группе и с 44,5 (37,8÷56,5) до 21,0 (16,0÷29,3) пересеченных секторов в экспериментальной группе. Кроме того, у самок экспериментальной группы произошло увеличение числа эпизодов большого груминга. У самцов контрольной и экспериментальной групп наблюдали достоверное снижение горизонтальной двигательной активности в центральной и периферической части камеры, уменьшение числа больших стоек. У самцов экспериментальной группы, кроме того, снизилась эмоциональность, оцениваемая по числу болюсов. Перед введением препарата этот показатель у экспериментальных животных был достоверно выше ($p=0,029$) показателя животных контрольной группы, а в конце эксперимента достоверно от них не отличался. Произошедшие изменения горизонтальной и вертикальной двигательной активности можно объяснить снижением интереса животных к уже знакомому объекту, а снижение эмоциональности и увеличение эпизодов груминга, возможно, свидетельствуют о наличии у препарата седативной активности.

Курсовое введение настойки *C. geoides* в течение 14 дней также не оказало заметного влияния на общее состояние экспериментальных животных. Симптомы отравления отсутствовали, животные в течение двух месяцев были активны, подвижны, изменений поведенческих реакций не отмечали, гибели животных не зарегистрировали. Динамика изменения веса была положительной.

Курсовое введение исследуемого препарат не оказало влияния на абсолютное число лейкоцитов и эритроцитов (табл. 2), а также на морфологический состав лейкоцитов.

Таблица 2 – Гематологические показатели животных при курсовом введении настойки *C. geoides*, $M \pm m$ ($n=10$)

Группа животных	Абсолютное число лейкоцитов, $\cdot 10^9/\text{л}$		Абсолютное число эритроцитов, $\cdot 10^{12}/\text{л}$	
	до введения препарата	в конце эксперимента	до введения препарата	в конце эксперимента
Экспериментальная самки	7,30 (6,45÷8,41)	10,03 (8,80÷10,80)#	6,42 (6,33÷6,91)	8,47 (8,13÷8,91)#
Экспериментальная самцы	7,13 (6,55÷9,71)	7,38 (4,30÷8,13)	6,47 (6,27÷7,29)	8,35 (6,95÷8,90)#

Примечание: различие достоверно при $p \leq 0,05$ для показателей

- внутри групп в начале и в конце эксперимента.

Курсовое введение настойки *C. geoides* в течение 14 дней не вызывало общепатологических и специфических деструктивных изменений в органах и тканях животных. Отмечено лишь достоверное уменьшение индекса массы веса печени (рис. 4) у самцов экспериментальной группы. При гистологическом исследовании печени изменений общей гистоархитектоники, признаков дистрофии органа не установили.

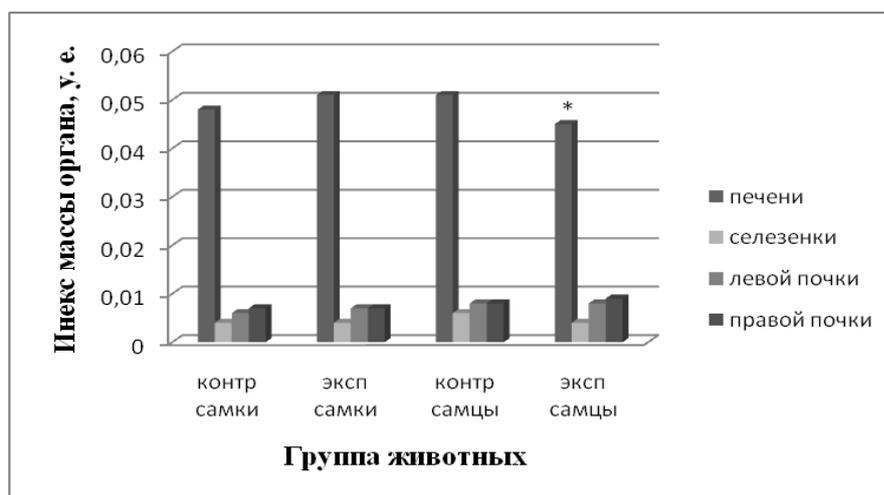


Рисунок 4 - Индексы массы внутренних органов

при курсовом введении настойки *C. geoides* (* помечены данные, достоверно отличающиеся от показателей животных контрольной группы).

При изучении хронической токсичности наблюдение за поведенческими реакциями в тесте ОП проводили до первого введения препарата и на 60-е сутки. При курсовом введении настойки *C. geoides* у самок статистически достоверно снизились число больших стоек с 4,0 (3,0÷8,5) до 0,0 (0,0÷1,75) и горизонтальная двигательная активность по периферии камеры с 13,5 (8,5÷17,8) до 2,5 (1,0÷7,3) (рис. 5). Уменьшение числа вертикальных стоек у подопытных животных под влиянием препарата свидетельствует о наличии у него седативной активности [2]. Кроме того у самок экспериментальной группы произошло достоверное ($p=0,004$) увеличение числа эпизодов длительного груминга с 0,0 (0,0÷0,0) до 1,0 (1,0÷2,0), что также свидетельствует о наличии седативной активности у настойки *C. geoides* при курсовом введении. В экспериментальной группе самцов отмечалась подобная тенденция, но различия не были достоверны.

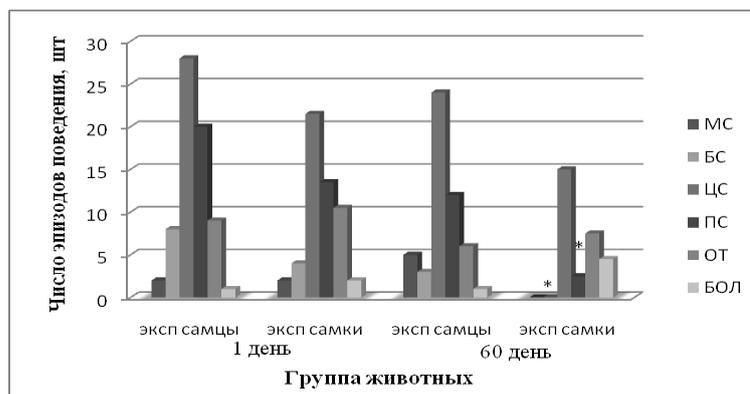


Рисунок 5 - Ориентировочно-исследовательское поведение животных при курсовом введении настойки *C. geoides* (мс – малые стойки, бс – большие стойки, цс - пересечение секторов в центральном секторе камеры, пс – пересечение секторов в периферической части камеры, от – обследование отверстий, бол – число болусов; * помечены данные, достоверно отличающиеся от показателей животных до введения препарата).

Выводы.

Таким образом, настойка *C. geoides* при однократном и длительном пероральном введении в дозе 2000 м/кг не оказывает общетоксического действия, оцениваемого по неврологическому статусу, состоянию вегетативных функций, поведенческой активности, приросту массы тела, гематологическим показателям. Полученные результаты дают право утверждать, что исследуемый растительный препарат не обладает токсическим эффектом при однократном и длительном пероральном введении и относится к классу малотоксичных веществ.

Список литературы

1. Буреш Я. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения / Я. Буреш, О. Бурешова, Дж. Хьюстон. - М.: Наука, 1992. – 250с.
2. Быстрова М. Н. Влияние извлечений седативного сбора на ориентировочно-исследовательское поведение мышей / М.А. Демидова, Г.А. Панина, И.С. Жолобов и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6; URL: www.science-education.ru/100-5000 (дата обращения: 21.05.2014).
3. Водолазова С. В. Антимикробная активность эфирных масел и водных извлечений из лекарственных растений Хакасии / С. В. Водолазова, М. А. Мяделец, М. Р. Карпова и др. // Сибирский медицинский журнал. - 2011. - Т. 26. - № 2.- вып. 2. - С.54-58.
4. Водолазова С. В. Влияние препаратов колюрии гравилатовидной на фагоцитарную активность и цитокинпродуцирующую способность лейкоцитов периферической крови / С.

В. Водолазова, Е. С. Агеева, Ю. В. Саранчина // Дни иммунологии в Сибири: мат-лы Всероссийской научно-практ. конф. с межд. участием (Абакан, 26-27 апреля 2011 г.). - Абакан: Изд-во ГОУ ВПО «Хакасский гос. университет им. Н. Ф. Катанова, 2011. - С. 192-194.

5. Дутова С. В. Иммунокорригирующее действие препаратов коллюрии гравилатовидной при цитостатической болезни / М. Р. Карпова, М. А. Мяделец // Дни иммунологии в Сибири: мат. Всеросс. научно-практ. конф. (г. Кызыл, 20-21 июня 2013 г.). - Красноярск, 2013. - С. 54-56.

6. Дутова С. В. Исследование токсичности настойки Коллюрии гравилатовидной / С. В. Дутова, В. Ю. Чумаков, Н. П. Неделькина, М. Р. Карпова и др. // Фундаментальные исследования. № 9. Ч. 2. 2013. С. 277-280.

7. Дутова С. В. Протективное действие настойки *Coluria geoides* (Rosaceae) на модели генерализованной стафилококковой инфекции / Н. П. Неделькина, М. Р. Карпова, В. Ю. Чумаков // Российский иммунологический журнал. - Т.6 (14). - № 3. - 2012. - С. 74-75.

8. Лобанова И. Ю. Изучение острой токсичности и антиоксидантной активности экстракта листьев осины сухого / И. Ю. Лобанова, В. Ф. Турецкова, Я. Ф. Зверев, О. С. Талалаева // Фундаментальные исследования. – 2012. - № 9. – С. 308-312.

9. Методы клинических лабораторных исследований / Под ред. В. С. Камышникова. - Москва: МЕДпресс-информ, 2011. - С.344-358.

10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р. У Хабриева. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2005. - С.41-54.

11. Саноцкий М. В., Уланова П. Критерии вредности в гигиене и токсикологии при оценке опасности химических соединений. – М.: Медицина, 1970. – С. 123.

Рецензенты:

Килина О.Ю., д.м.н., зам. директора по НР Медико-психолого-социального института Хакасского государственного университета, Минобрнауки РФ, ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», г. Абакан.

Складнева Е.Ю., д.вет.н., доцент кафедры морфологии и физиологии животных Хакасского государственного университета, Минобрнауки РФ, ФГБОУ ВПО «Хакасский государственный университет им. Н. Ф. Катанова», г. Абакан.