

УДК 615.322

<https://www.doi.org/10.34907/JPQAI.2021.63.43.006>

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ЭКСТРАКТА СУХОГО ИЗ ПОДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *RHAPONTICUM UNIFLORUM*

Я.Г. Разуваева, доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (ФГБУН ИОЭБ СО РАН), г. Улан-Удэ, tatur75@mail.ru

А.А. Торопова, канд. биол. наук, старший научный сотрудник, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (ФГБУН ИОЭБ СО РАН), г. Улан-Удэ

Е.А. Убеева, канд. мед. наук, старший преподаватель кафедры инфекционных болезней, Медицинский институт, ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова», г. Улан-Удэ

В.Г. Банзаракшеев, канд. мед. наук, доцент кафедры общей патологии человека, Медицинский институт, ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет им. Доржи Банзарова», г. Улан-Удэ

В.В. Аюшева, ведущий инженер, лаборатория безопасности биологически активных веществ, ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН (ФГБУН ИОЭБ СО РАН), г. Улан-Удэ

В экспериментах на белых крысах линии Wistar исследовали хроническую токсичность и возможное местнораздражающее и мутагенное действие экстракта сухого из корневищ с корнями *Rhaponticum uniflorum* L. DC. Влияние экстракта сухого *R. uniflorum* на морфофункциональное состояние внутренних органов оценивали при его трехмесячном введении (*per os*) в дозах 100 и 500 мг/кг. Возможное местнораздражающее и мутагенное действие исследуемого средства определяли при его однократном введении в дозах 100 и 100 мг/кг. Установлено, что длительное введение экстракта сухого *R. uniflorum* не оказывает отрицательного влияния на морфофункциональное состояние центральной нервной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем, органов желудочно-кишечного тракта, состояние обмена веществ, показатели периферической

крови и системы гемостаза лабораторных животных. Исследуемое средство не вызывает местнораздражающего и мутагенного действия.

Ключевые слова: *Rhaponticum uniflorum* L. DC, *Fornicium uniflorum* (L.) Zuev., экстракт сухой из корневищ с корнями, хроническая токсичность, местнораздражающее действие, мутагенность

Rhaponticum uniflorum L. DC. (син. *Fornicium uniflorum* (L.) Zuev.) – многолетнее растение, произрастающее на территории Восточной Сибири и Дальнего Востока [1]. В подземной части растения содержатся тритерпены (урсоловая кислота), стеролы, флавоноиды (апигенин, лютеолин, кверцетин и др.), аминокислоты (аланин, аргинин, глицин и др.) и другие биологически активные вещества [2–4].

Содержание экдистероидов в пересчете на экдистерон в подземной части составляет 1,19–1,3% [5]. Ранее в исследованиях на животных было установлено, что экстракт сухой, полученный из корневищ с корнями *R. uniflorum*, оказывает выраженное стресспротективное действие при иммобилизационном и эмоциональном стрессе, повышает устойчивость организма к действию интенсивных физических нагрузок и к кислороддефицитным состояниям различного генеза [6]. Данный экстракт увеличивает ориентировочно-исследовательскую активность, снижает уровень эмоциональности и тревоги в условиях ненаказуемого поведения [7], а также оказывает иммуномодулирующее действие, повышая активность основных звеньев иммунной системы при иммуносупрессивном состоянии [8].

Цель исследования: определение хронической токсичности, а также возможного местнораздражающего и мутагенного действия экстракта сухого, полученного из корневищ с корнями *R. uniflorum*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования выполнены на белых крысах линии *Wistar* обоего пола с исходной массой 160–180 г. Содержание животных соответствовало «Правилам надлежащей лабораторной практики» (GLP) и Приказу МЗ РФ №199Н от 01.04.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики». Экспериментальную работу осуществляли в соответствии с Правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Протокол исследования согласован с этическим комитетом ИОЭБ СО РАН (№ 4 от 26.01.2017). Эксперименты проведены в соответствии с действующими требованиями, изложенными в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [9].

Объектом исследования явился экстракт сухой, полученный из корневищ с корнями *R. uniflorum* путем последовательной экстракции 60% этиловым спиртом и двукратной экстракцией водой очищенной измельченного растительного сырья, с последующей фильтрацией, упариванием и вакуумной сушкой. Способ получения экстракта сухого из корневищ с корнями *R. uniflorum* запатентован [10]. Стандартизация экстракта сухого из корневищ с корнями *R. uniflorum* осуществляется по сумме экдистероидов в пересчете на экдистерон, содержание которого должно быть не менее 3,0% [11].

Хроническую токсичность экстракта сухого *R. uniflorum* исследовали в дозах: 100 мг/кг (экспериментально-терапевтическая) и 500 мг/кг. Исследуемое средство вводили внутрижелудочно животным опытных групп ежедневно на протяжении трех месяцев. Крысы контрольной группы получали эквивалентное количество воды очищенной по аналогичной схеме. Функциональное состояние центральной нервной системы оценивали с использованием метода «открытое поле» [9], сердечно-сосудистой системы – по величине систолического артериального давления (кардиомонитор СМ-42115, Польша) и биоэлектрической активности миокарда (электрокардиограф «Аксион» ЭК1Т-1/3–07, Россия). Функциональное состояние внутренних органов и процессов обмена веществ оценивали по содержанию общего белка, белковых фракций, общего холестерина, липопротеидов высокой плотности, липопротеидов низкой плотности, триглицеридов, мочевины и креатинина; активности аспартаминотрансферазы, аланинаминотрансферазы, лактатдегидрогеназы и щелочной фосфатазы в сыворотке крови на биохимическом анализаторе Sapphir (Япония). Гематологические показатели крови определяли на автоматическом анализаторе Mindray BC-5300 (Китай). Исследование коагуляционных свойств крови проводили с использованием стандартных

реактивов Sigma (США) на коагулометре Bio bas I (Испания). В моче животных методом пламенной фотометрии (Flarho-4, Германия) определяли концентрацию ионов калия и натрия; содержание глюкозы, белка, концентрацию креатинина и мочевины – с помощью полуавтоматического анализатора мочи Н-500 (Россия). Для проведения патоморфологических исследований внутренние органы животных фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином-эозином, пикрофуксином по ван Гизону и крезилвиолетом по Нисслю.

Для выявления возможного местнораздражающего действия фитоэкстракт вводили животным опытных групп однократно внутрижелудочно в дозах 100 и 1000 мг/кг. Через 3, 6 и 24 часа после введения исследуемого средства с помощью лупы осматривали слизистую оболочку желудка и кишечника. Оценку возможных мутагенных свойств экстракта сухого *R. uniflorum* проводили с использованием методов учета хромосомных aberrаций бластных клеток костного мозга белых крыс-самцов. Учет проводили через 24 часа после однократного внутрижелудочного введения исследуемого средства в дозах 100 и 1000 мг/кг. Костный мозг брали из бедренной кости. Анализ aberrаций хромосом осуществляли методом визуального просмотра метафазных пластинок при увеличении микроскопа $\times 1000$. От каждой особи исследовали по 100 метафазных пластинок, удовлетворяющих необходимым требованиям. Повреждения хромосом учитывали согласно рекомендациям, изложенным в методических работах [9].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программ Statistica for Windows 6.0. Для оценки различий выборок, имеющих нормальное распределение, применяли t-критерий Стьюдента. Различия считались достоверными при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований показали, что при трехмесячном введении экстракта сухого *R. uniflorum* в дозах 100 и 500 мг/кг не наблюдали гибели животных и выраженных изменений их общего состояния (поведение, потребление суточного объема корма, выделения, шерстяной покров, слизистые). Ректальная температура у крыс опытных групп не отличалась от показателя контрольных животных. У животных, получавших экстракт сухой *R. uniflorum* в дозе 500 мг/кг, прирост массы тела в первые два месяца наблюдения был выше, чем у животных контрольной группы.

Тестирование животных в «открытом поле» показало, что общая двигательная активность и уровень тревожности у животных опытных групп были на уровне контрольных показателей. При этом у крыс, получавших экстракт *R. uniflorum* в дозах 100 и 500 мг/кг, отмечалось увеличение количества посещенных центральных квадратов (на 22% и 28%) и вертикальных стоек без опоры (на 25% и 30% соответственно) по сравнению с данными у контрольных животных.

Установлено, что длительное введение экстракта сухого *R. uniflorum* в дозах 100 и 500 мг/кг не оказывает отрицательного влияния на дыхательную функцию белых крыс: во все сроки исследования частота дыхания у животных опытных групп была в пределах физиологической нормы и не отличалась от данных в контроле. Исследуемое средство не вызывает изменений в функциональном состоянии сердечно-сосудистой системы: уровень артериального давления крыс, показатели биоэлектрической активности миокарда и ритм сердечных сокращений не имеют значимых различий с контрольными животными.

Результаты гематологических исследований показали, что трехмесячное введение исследуемого средства не влияет на содержание

гемоглобина и показатели периферической крови. В ходе биохимического анализа крови лабораторных животных установлено, что применение экстракта сухого *R. uniflorum* не оказывает неблагоприятного воздействия на функциональное состояние организма: содержание белка, белковых фракций, активность АЛТ, АСТ, ЛДГ и щелочной фосфатазы статистически не отличались от таковых у животных контрольной группы. При этом на фоне введения исследуемого средства отмечается снижение общего холестерина, концентраций креатинина и мочевины в сыворотке крови. Показатели системы гемостаза у животных опытных групп не имеют значимых различий с таковыми контрольных животных.

Результаты исследований, представленные на рис. 1, показывают, что длительное введение экстракта сухого *R. uniflorum* в дозах 100 и 500 мг/кг оказывает мочегонное действие, увеличивая диурез на 24% и 32% по сравнению с показателем контрольных животных. При этом введение исследуемого средства не влияет на остальные показатели функционального состояния почек белых крыс: в моче отсутствует глюкоза, билирубин; концентрация электролитов, содержание белка и креатинина – в пределах физиологической нормы.

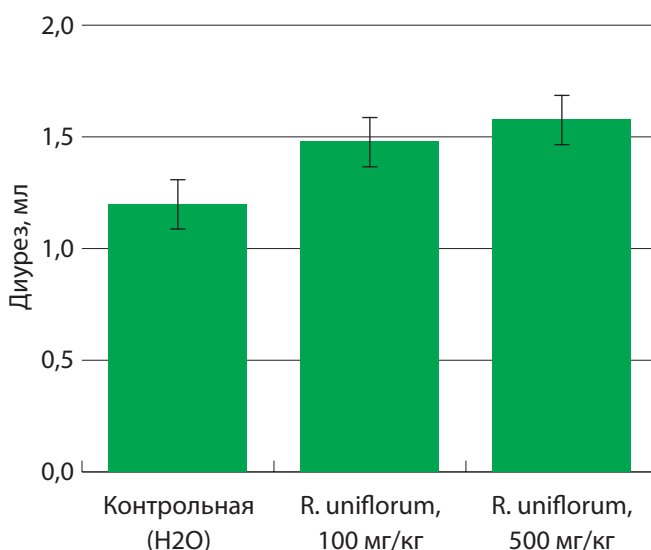


РИС. 1. Влияние длительного введения экстракта сухого из корневищ с корнями *R. uniflorum* на диуретическую активность белых крыс

Длительное введение исследуемого средства не оказывает влияния на весовые коэффициенты внутренних органов. При патоморфологическом изучении внутренних органов (головной мозг, легкие, почки, печень, тимус, красный костный мозг, селезенка, щитовидная железа, надпочечники, гонады) не было установлено патологических изменений в их структуре, обусловленных токсическим действием исследуемого средства.

Таблица 1

ВЛИЯНИЕ ОДНОКРАТНОГО ВВЕДЕНИЯ ЭКСТРАКТА СУХОГО ИЗ КОРНЕВИЩ С КОРНЯМИ *R. UNIFLORUM* НА КОЛИЧЕСТВО ХРОМОСОМНЫХ АБЕРРАЦИЙ В КЛЕТКАХ КОСТНОГО МОЗГА БЕЛЫХ КРЫС

| Показатели | Группы животных | | |
|--|-----------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | Контроль | <i>R. uniflorum</i> , 100 мг/кг | <i>R. uniflorum</i> , 1000 мг/кг |
| Число метафаз | 800 | 800 | 800 |
| Количество aberrаций, % | 1,0 | 0,9 | 0,8 |
| Клетки с множественными aberrациями, % | 0 | 0 | 0 |
| Пробелы, % | 0,4 | 0,3 | 0,5 |
| Доля поврежденных клеток, % | 1,3±0,18 | 1,4±0,29 | 1,4±0,32 |

При исследовании местнораздражающего действия выявлено, что через 3, 6 и 24 часа после введения фитоэкстракта слизистая оболочка всех исследуемых отделов пищеварительной трубки имеет бледно-розовую окраску, не отмечается гиперемии, инъекции сосудов, а также отека, ее рельеф сохраняется, складки имеют стандартную конфигурацию и расположение. В целом макроскопическая картина слизистой оболочки желудка и кишечника животных опытных групп соответствует таковой контрольных животных.

Результаты исследований, представленные в табл. 1, свидетельствуют, что однократное интрагастральное введение фитоэкстракта крысам-самцам в дозах 100 и 1000 мг/кг не вызывает увеличения количества поврежденных клеток в костном мозге животных опытных групп по сравнению с контролем.

ВЫВОДЫ

1. Экстракт сухой *R. uniflorum* в дозах 100 и 500 мг/кг при длительном введении не оказывает отрицательного влияния на морфофункциональное состояние центральной нервной, сердечно-сосудистой и мочевыделительной систем, органов желудочно-кишечного тракта, состояние обмена веществ, показатели периферической крови и системы гемостаза лабораторных животных.

2. Трехмесячное введение экстракта *R. uniflorum* повышает ориентировочно-исследовательскую активность животных и оказывает умеренное мочегонное действие.

3. Экстракт сухой *R. uniflorum* в дозах 100 и 1000 мг/кг при однократном введении не оказывает местнораздражающего и мутагенного действия.

Исследования проведены в рамках выполнения темы госзадания №121030100227-7

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Санданов Д.В., Дулепова Н.А., Гармаева Л.Л. *Fornicium uniflorum* (Asteraceae) в Забайкалье: распространение, экология, структура сообществ и популяций // *Растительный мир Азиатской России*. – 2016. – Т. 22, №2. – С. 25–31.
2. Garmaeva L.L., Nikolaeva I.G., Nikolaeva G.G. *Amino acids from Rhaponticum uniflorum* // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2017. – Vol. 53, №3. – P. 607–608.
3. Garmaeva L.L., Nikolaeva I.G., Nikolaeva G.G., Tsybiktarova L.P. *Vitamin B content in Rhaponticum uniflorum* // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2015. – Vol. 51, №5. – P. 978–979.
4. Оленников Д.Н., Кащенко Н.И. *Rhaponticum uniflorum*: химический состав и биологическая активность // *Химия растительного сырья*. – 2018. – №2. – С. 5–20.
5. Николаева И.Г., Цыбиктарова Л.П., Гармаева Л.Л. и др. *Определение содержания экдистероидов в сырье Fornicium uniflorum L. и Serratula centauroides L. методом хроматоспектрофотометрии* // *Журнал аналитической химии*. – 2017. – Vol. 72, №8. – С. 33–41.
6. Татарина Н.К. *Адаптогенные свойства экстрактов Fornicium uniflorum L.: дисс. ... канд. мед. наук.* – Улан-Удэ, 2017. – 114 с.
7. Татарина Н.К., Разуваева Я.Г., Шантанова Л.Н. *Противотревожное действие экстракта из корней Rhaponticum uniflorum* // *Бюллетень ВСНЦ СО РАМН*. – 2015. – №2. – С. 92–94.
8. Хобракова В.Б., Татарина Н.К. *Влияние экстракта сухого левзеи одноцветковой на гуморальное звено иммунного ответа при экспериментальном иммунодефиците* // *Медицинская иммунология*. – 2017. – Т. 19, №SV. – С. 401.
9. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. – Ч. 1. – М.: Гриф и К., 2012. – 944 с.

10. Патент 2705582 Российская Федерация, МПК А 61 К. Способ получения средства, обладающего стресспротективной, антигипоксической и анксиолитической активностью / Николаев С.М., Шантанова Л.Н., Николаева И.Г., Разуваева Я.Г., Николаева Г.Г., Торопова А.А., Цыбиктарова Л.П., Гармаева Л.Л., Матханов И.Э. – №2019111274; заявл. 15.04.2019; опубл. 08.11.2019, Бюлл. №31. – 16 с.
11. Гармаева Л.Л. Фармакогностическое исследование *Fornicium uniflorum* L. и разработка средства, обладающего стресспротективной и антигипоксической активностью: автореферат дисс. ... канд. фарм. наук. – Улан-Удэ, 2016. – 21 с.

THE PRECLINICAL STUDIES ON THE SAFETY OF RHAPONTICUM UNIFLORUM ROOTS EXTRACT

Ya.G. Razuvaeva¹, A.A. Toropova¹, E.A. Ubeeva², V.G. Banzaraksheev², V.V. Ayusheeva¹

1 Institute of General and Experimental Biology SB RAS, Ulan-Ude, Russia

2 Buryat State University, Ulan-Ude, Russia

*The purpose of this work is to determine chronic toxicity, as well as the possible local irritating and mutagenic effect of *Rhaponticum uniflorum* L. DC. root extract. The studies were performed on white Wistar rats. The effect of *R. uniflorum* extract on the morphofunctional state of internal organs was assessed after its three-month administration (per os) at doses of 100 and 500 mg/kg. The possible locally irritating and mutagenic effect of the investigational agent was determined with its single administration at doses of 100 and 1000 mg/kg. It was found that long-term administration of *R. uniflorum* extract does not have a negative effect on the morphofunctional state of the central nervous, cardiovascular and urinary systems, organs of the gastrointestinal tract, the state of metabolism, indicators of peripheral blood and the hemostasis system of laboratory animals. A single administration of the test agent in doses of 100 and 1000 mg/kg does not have a local irritating effect on the mucous membrane of the digestive tract and does not exhibit a mutagenic effect.*

Keywords: *Rhaponticum uniflorum* L. DC, *Fornicium uniflorum* (L.) Zuev., roots extract, chronic toxicity, local irritant effect, mutagenic effects