

© Рябков А.Н., 2012
УДК 615.322.099

**КОМПЛЕКСНАЯ ОЦЕНКА ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ ПРЕПАРАТА
ИЗ БИОМАССЫ КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЫ ПОЛИСЦИАСА
ПАПОРТНИКОЛИСТНОГО КАК СОСТАВЛЯЮЩАЯ ЭТАПА
ЕГО ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

А.Н. Рябков

ГБОУ ВПО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Рязань

В настоящей работе проведено комплексное экспериментальное изучение возможных проявлений токсичности препарата из биомассы клеточной культуры полисциаса папоротниколистного, назначаемого длительными курсами в высоких суточных дозах. Все количественные значения фиксируемых параметров, отражающих функционально-метаболическое состояние подопытных лабораторных животных, в целом характеризовались стабильностью, что является важнейшим свидетельством безопасности оцениваемого препарата из биомассы клеточной культуры полисциаса папоротниколистного в условиях его длительного применения в относительно высоких дозах. Это подтверждает его значимость как перспективного субстрата для получения лекарственных средств, используемых в клинической практике.

Ключевые слова: полисциас папоротниколистный, клеточная культура, хроническая токсичность.

В настоящее время культивирование тканей некоторых растений семейства аралиевых является одним из перспективных способов получения ценного и доступного лекарственного сырья [2, 4, 6]. Экспериментально-фармакологические исследования, проведенные с основным представителем этого семейства – женьшенем, свидетельствуют о том, что препараты из биомассы клеточной культуры не уступают, а по некоторым характеристикам даже превосходят действие препарата из естественно произрастающего растения [1, 10].

Близким к женьшеню растением, давно и успешно применяющимся в народной медицине стран Востока, является полисциас папоротниколистный. Его ткани также получают искусственно, выращивая на специальных питательных сре-

дах. Проведенная фармакологическая оценка некоторых эффектов препарата из биомассы клеточной культуры полисциаса папоротниколистного свидетельствует о его достаточно высокой биологической активности [3, 7, 8, 9, 12]. Не менее важной является оценка безопасности данного препарата, от которой во многом будет зависеть перспектива его практического применения.

Целью настоящей работы явилось экспериментальное изучение возможных проявлений хронической токсичности препарата из биомассы клеточной культуры полисциаса папоротниколистного (*Poliscias filicifolia* Bailey).

Материалы и методы

Данное исследование хронической токсичности препарата из биомассы куль-

туры ткани полисициаса папоротниколистно-го (б.к.т. ПП) проводилось в условиях его ежедневного введения лабораторным животным в течение 6 месяцев. При этом оцениваемые параметры регистрировались по истечению 2, 4 и 6-го месяцев введения и на 14-й день после отмены препарата, назначаемого шестимесячным курсом.

Выбор дозировок препарата из б.к.т. ПП проведен с учетом сопоставимости характеристик его острой токсичности с соответствующими показателями препарата из биомассы клеточной культуры женьшеня, а также на основании литературных данных по оценке хронической токсичности последнего [5, 13]. В них дана развернутая аргументация применения в подобном исследовании доз 0,5 и 5 мл настойки на кг массы тела подопытного животного. Они, по экстраполятивной оценке, значительно превышают терапевтические дозы данного препарата в клинической практике.

Эксперименты проведены на взрослых нелинейных крысах-самцах, масса которых к началу исследования составляла 160-200 г, распределенных на три потока:

1) крысы, которым ежедневно вводили препарат из б.к.т. ПП в дозе 5 мл/кг;

2) крысы, которым исследуемый препарат вводился в той же объемной дозе, но после десятикратного разведения дистиллированной водой, что соответствует при пересчете на настойку дозе 0,5 мл/кг [11];

3) интактные животные, или биологический контроль, находившиеся в стандартных условиях вивария с препаратными сериями, которым с целью исключения влияния манипуляционного фактора (фиксация, введение желудочного зонда) ежедневно в то же время по аналогичной технологии вводили дистиллированную воду в объемной дозе – 5 мл/кг.

При введении препарата крыс фиксировали только руками, исключая использование зажимов, корцангов и других приспособлений, которые при частом и длительном применении могут травмировать животных, вызвать формирование у них отрицательной условно-рефлекторной

реакции на процедуру введения, повысить агрессивность и в итоге исказить результаты истинного влияния на организм оцениваемого средства.

В каждый из трех потоков было включено по 40 крыс. На этапах регистрации параметров безопасности (по истечению 2, 4 и 6-го месяцев введения и на 14-й день после отмены препарата, назначаемого 6-месячным курсом) в обследование отбирали по 6 животных из каждого потока. Они и составили серии сравнения. При этом за сутки до начала анализа отобранных крыс помещали в специальные индивидуализированные камеры для сбора суточной мочи.

Следуя общепринятым схемам подобных работ, был использован достаточно широкий комплекс методик, позволяющий провести многостороннюю и надежную оценку данного вида безопасности препарата из б.к.т. ПП, включающий следующие виды исследований: функциональные, массаметрические, гематологические, биохимические.

При этом первый вид исследований осуществляли над бодрствующими животными, а для проведения последующих – крыс наркотизировали эфиром, после чего проводили взятие необходимых биосубстратов.

Результаты и их обсуждение

Оценка параметров функционального состояния центральной нервной системы и некоторых общих физиологических показателей

Анализ возможного развития нейротоксического действия изучаемого препарата проводился по косвенной оценке функционального состояния центральной нервной системы путем регистрации у животных контрольной и препаратных серий суммационно-порогового показателя (минимальное напряжение электрического тока, вызывающее мышечную реакцию) и количественных характеристик таких поведенческих реакций, как норковый рефлекс (одна из разновидностей ориентировочной реакции), двигательная активность и эмоциональная реакция.

Поведенческие реакции изучались после помещения подопытных животных в специальную ярко освещенную камеру с основанием в виде квадратной площадки размером 60х60 см с 16 равномерно распределенными отверстиями («норками») диаметром 4 см и бортиками по периферии высотой 10 см. Количественная оценка норкового рефлекса проводилась путем фиксации числа заглядываний крысы в «норки» в минуту, двигательной активности – по числу вертикальных «вставаний» на бортик камеры в единицу времени, эмоциональной реакции – по количеству каловых шариков в первые минуты после помещения животных в освещенную камеру.

Далее у крыс, находящихся под легким эфирным наркозом, определяли ряд общих физиологических показателей: частоту сердечных сокращений (с помощью электрокардиографа ЭК1Т-03М), частоту дыхательных движений (с помощью специального датчика, фиксируемого к грудной клетке животного) и ректальную температуру. Эти параметры используются при экспериментально-фармакологических анализах как маркеры возможного влияния исследуемого средства на регуляторные механизмы функциональной активности сердечно-сосудистой и дыхательной систем, так и наличия у него избирательной органотропности влияния на миокард и бронхолегочные структуры. Данные термометрии рассматриваются как один из достаточно чувствительных параметров функционально-метаболического гомеостаза.

Все зафиксированные значения суммационно-порогового потенциала и регистрируемых параметров поведенческих реакций при введении препарата из б.к.т. ПП в дозах 0,5 и 5 мл/кг характеризовались высокой степенью стабильности по сравнению с контрольной группой.

Также не отмечено статистически достоверных изменений регистрируемых значений общих физиологических показателей в обеих «полициасовых» сериях по сравнению с показателями контрольных крыс на каждом этапе введения препарата и в периоде его последействия.

Анализ динамики массаметрических данных

Наркотизированных крыс взвешивали на высокоточных весах ВЛКТ, после чего у них извлекали внутренние органы – печень, почки, сердце, легкие, селезенку, надпочечники, семенник – и взвешивали их на торсионных весах. В качестве оцениваемых параметров использовали весовые коэффициенты, являющиеся результатом отношения массы органа к 1/100 массы тела животного. Весовые коэффициенты – это более «чувствительные» и информативные показатели динамики массы органа, чем данные только непосредственного взвешивания, так как они преимущественно отражают первичность именно органических изменений, а не их пропорциональность динамике массы тела как, например, в период роста или общестимулирующего воздействия какого-то фактора. Поэтому при изменениях массы органов, обусловленных их гипер- или гипотрофией, в том числе и за счет токсического действия ксенобиотика, которым и может быть испытуемое средство, данный показатель более оптимален. При этом относительно «локальные» изменения массы органов, в свою очередь, могут быть связаны с органотропным метаболическим эффектом препарата или быть опосредованными через изменение им функциональной активности данного органа.

Величины весовых коэффициентов на каждом этапе проводимого исследования представлены свидетельствуют о стабильности регистрируемых показателей: ни по одному из органов не выявлено статистически значимых отличий при введениях препарата из б.к.т. ПП по сравнению с контролем.

Гематологические показатели

Кровь является достаточно часто поражаемым лекарственными средствами субстратом, что может составлять основу серьезных осложнений фармакотерапии, ограничивать интенсивность и продолжительность ее проведения. Поэтому на этапе доклинического исследования новых веществ, планируемых в дальнейшем для

применения в клинической практике, оценка гематотоксичности является обязательной компонентой комплексной характеристики их безопасности.

Сравнение гематологических параметров у крыс после двух-, четырех-, шестимесячного периодов перорального введения оцениваемого препарата в дозах 0,5 и 5 мл/кг и в контрольной группе проводилось в крови, взятой из брюшной аорты наркотизированных эфиром животных по общепринятым методам, включающим определение числа эритроцитов, лейкоцитов, составляющих лейкоцитарной формулы и концентрации гемоглобина. Средние величины и их ошибки всех сравниваемых серий свидетельствуют о том, что показатели и «красной» крови (число эритроцитов, концентрация гемоглобина), и «белой» крови (число лейкоцитов, параметры лейкоцитарной формулы – удельное значение палочкоядерных, сегментоядерных клеток, лимфоцитов, моноцитов и эозинофилов) во всех препаратных сериях сохранились на уровне статистически не отличимом от соответствующих значений в контрольных группах на каждом этапе определения.

Биохимическое исследование сыворотки крови

Взятую у наркотизированных животных из брюшной аорты кровь центрифугировали в стандартном режиме (при 3000 об/мин в течение 15 минут). В полученной сыворотке проводили определение широкого комплекса биохимических показателей, отражающих ряд функциональных и метаболических характеристик печени (АСТ, АЛТ, ГГТП, ЩФ), поджелудочной железы (амилаза), состояние белкового (общий белок, его фракции – альбумины, α_1 -, α_2 -, β -, γ -глобулины), углеводного (глюкоза), липидного (общий холестерин, триглицериды, β -липопротеиды) и электролитного (калий, натрий, кальций, хлор) обменов.

Значения активности определяемых ферментов, концентрации метаболитов и электролитов также в целом характеризуются отсутствием каких-либо значимых и

статистически подтвержденных изменений в группах животных в условиях постоянного введения им препарата из б.к.т. ПП в дозах 0,5 и 5 мл/кг курсами различной продолжительности по сравнению с крысами, которым в эти же сроки вводили эквивалентные количества плацебо. Выявленную биохимическую стабильность, оцененную по комплексу сывороточных показателей, безусловно можно рассматривать в качестве важнейшего свидетельства сохранения гомеостаза в условиях длительных курсовых введений относительно высоких суточных доз препарата из б.к.т. ПП.

Показатели суточной мочи

Сбор мочи у подопытных животных всех сравниваемых серий проводили в течение последних суток каждого этапа настоящего исследования, т.е. после двух-, четырех- и шестимесячных введений препарата из б.к.т. ПП в дозах 0,5 и 5 мл/кг (и дистиллированной воды – в контрольной группе). Для этого по шесть случайно отобранных крыс из каждого потока помещали в специальные индивидуализированные клетки с мочеприемником, расположенным под конусовидным дном. Собранная моча подвергалась физико-химическому анализу (регистрация количества, pH, удельной плотности) и биохимическому исследованию (определение концентраций белка, креатинина, мочевины, калия, кальция, неорганического фосфора, хлоридов). Близость абсолютных значений в «полициасовых» и контрольных сериях параметров количества суточной мочи, ее плотности, показателя pH, содержания белка, мочевины и креатинина свидетельствуют о полном сохранении выделительной функции почек у животных после всех сроков введения оцениваемого препарата. Данные об отсутствии каких-либо сдвигов в препаратных сериях концентраций калия, кальция, неорганического фосфора и хлоридов, отражающие стабильность электролитного обмена в организме подопытных крыс, можно рассматривать в качестве подтверждения сохранения и этой гомео-

статической функции почек в условиях ежедневного и длительного назначения высоких доз препарата из б.к.т. ПП.

Выводы

Подводя итог полученным результатам по оценке возможных проявлений признаков хронической токсичности, можно отметить следующее.

Абсолютные значения каждого параметра регистрируемого комплекса у животных контрольного потока свидетельствуют о полном соответствии видовой норме, что является обязательным условием корректного сравнения их с соответствующими показателями в опытных сериях.

Выполненные на всех этапах в соответствии со схемой эксперимента исследования позволяют сделать заключение об отсутствии каких-либо признаков органной токсичности испытуемого препарата, назначаемого в дозах 0,5 и 5 мл/кг.

Первым, «внешним», проявлением достаточно высокой безопасности препарата из б.к.т. ПП, назначаемого двух-, четырех- и шестимесячными курсами в дозах 0,5 и 5 мл/кг, служит отсутствие, как и в контроле, летальности во всех препаратных сериях вне зависимости от дозы и длительности введения.

Более глубинными явились исследования, позволившие провести количественную оценку возможного влияния оцениваемого препарата на организм подопытных животных (массаметрические, функциональные, биохимические). Отсутствие функционально-метаболических изменений у крыс, получавших препарат из б.к.т. ПП, подтверждает высокую степень его безопасности даже в режиме относительно интенсивного и длительного назначения.

Литература

1. Адаптогенная активность настойки из биомассы культуры ткани женьшеня в эксперименте / А.Н. Кудрин [и др.] // Фармация. – 1982. – № 5. – С. 33-38.
2. Бутенко Р.Г. Изучение некоторых штаммов культур тканей трех видов *Rapax L.* как возможных источников стимулирующих препаратов / Р.Г. Бутенко, Л.И. Слепян, Т.И. Хретонова // Растит. ресурсы. – 1979. – Т. 15, вып. 2. – С. 265-270.
3. Влияние культивируемых клеток полисциаса на биосинтез белка в печени кроликов / А.В. Лекис [и др.] // Хим.-фармац. журн. – 1988. – № 8. – С. 970-973.
4. Высоцкая Р.И. Культура ткани женьшеня (биология и перспективы использования в медицине): автореф. дис... канд. фармац. наук / Р.И. Высоцкая. – Л., 1978. – 31 с.
5. Изучение безопасности применения препарата из биомассы культуры тканей женьшеня в эксперименте / Ф.П. Крендаль [и др.] // Фармация. – 1982. – № 6. – С. 45-49.
6. К изысканию нового лекарственного препарата из биомассы культуры тканей женьшеня / И.В. Александрова [и др.] // Фармация. – 1982. – № 4. – С. 37-39.
7. Котин А.М. Витагмал / А.М. Котин. – СПб., 2008. – 84 с.
8. Михайлова Н.В. Полисциас папоротниколистный *Polyscias filicifolia* (Moore ex Fournier) Bailey в культуре *in vitro*: автореф. дис... канд. фармац. наук / Н.В. Михайлова. – Л., 1981. – 17 с.
9. Рябков А.Н. Влияние препаратов из биомасс клеточных культур растений семейства аралиевых на биохимические проявления экспериментального атеросклероза / А.Н. Рябков // Научно-методический журнал «Вестник Московского государственного областного гуманитарного института». – 2011. – №1. – С. 25-27.
10. Слепян Л.И. Фармакологическое изучение препаратов из культуры ткани женьшеня / Л.И. Слепян, А.Н. Поскаленко, С.Ю. Андреев // 14-й Тихоокеанский конгр.: сб. тез. – Хабаровск, 1979. – С. 202-203.
11. Трахтенберг И.М. Показатели нормы у лабораторных животных в токсикологическом эксперименте / И.М. Трахтенберг. – М., 1978. – 359 с.

12. Трилис Я.Г. Механизмы повышения резистентности организма к действию экстремальных факторов настойкой полисциаса: автореф. дис... канд. биол. наук / Я.Г. Трилис. – СПб., 1996. – 21 с.
13. Чубарев В.Н. Изучение фармакологических свойств препарата из биомассы культуры тканей женьшеня: автореф. дис. ...канд биол. наук / В.Н. Чубарев. – Купавна, 1987. – 24 с.

COMPLEX ASSESSMENT OF CHRONIC TOXICITY OF THE PREPARATIONS FROM THE BIOMASS OF THE POLISCIAS FICIFOLIA BAILEY CELLULAR CULTURE AS PART OF ITS PRECLINICAL STUDY

A.N. Ryabkov

This work is devoted to a comprehensive experimental study of the possible toxicity of the preparations from the biomass of the poliscias filicifolia bailey cellular culture, administered for a long time in high doses.

Key words: *poliscias filicifolia, cellular culture, chronic toxicity.*

Рябков Александр Николаевич – д.м.н., доц. кафедры фармакологии с курсом фармации и фармакотерапии ФДПО ГБОУ ВПО РязГМУ Минздравсоцразвития России.
E-mail: ran@rofoms.ryazan.ru.