

Yeriomenko R F, Maloshtan L N. Вивчення безпечності екстракту з трави люцерни посівної = Safety study of extract of medica-go sativa sowing grass. Journal of Education, Health and Sport. 2015;5(2):23-32. ISSN 2391-8306. DOI: [10.5281/zenodo.14896](https://doi.org/10.5281/zenodo.14896)
<http://ojs.ukw.edu.pl/index.php/johs/article/view/2015%3B5%282%29%3A23-32>
<https://pbn.nauka.gov.pl/works/534392>
<http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.14896>
Formerly Journal of Health Sciences. ISSN 1429-9623 / 2300-665X. Archives 2011 – 2014
<http://journal.rsw.edu.pl/index.php/JHS/issue/archive>

Deklaracja.

Specyfika i zawartość merytoryczna czasopisma nie ulega zmianie.

Zgodnie z informacją MNIŚW z dnia 2 czerwca 2014 r., że w roku 2014 nie będzie przeprowadzana ocena czasopism naukowych; czasopismo o zmienionym tytule otrzymuje tyle samo punktów co na wykazie czasopism naukowych z dnia 31 grudnia 2014 r.

The journal has had 5 points in Ministry of Science and Higher Education of Poland parametric evaluation. Part B item 1089. (31.12.2014).

© The Author (s) 2015;

This article is published with open access at License Open Journal Systems of Kazimierz Wielki University in Bydgoszcz, Poland and Radom University in Radom, Poland Open Access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Noncommercial License which permits any noncommercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author(s) and source are credited. This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Received: 20.10.2014. Revised 18.01.2015. Accepted: 25.01.2015.



Wydział Kultury Fizycznej, Zdrowia i Turystyki UKW w Bydgoszczy



Wydział Nauk Pedagogicznych UMK w Toruniu



Wydział Nauk Ekonomicznych i Zarządzania UMK w Toruniu



INTERDYSCYPLINARNA KONFERENCJA NAUKOWA 15 - 16 I 2015 BYDGOSZCZ

J a k o ś ć SPORCIE

trzy panele:

- jakość w sporcie

- kariera dwutorowa

- aspekty ekonomiczne, prawne,
pedagogiczne kultury fizycznej

Miejsce konferencji: Instytut Kultury Fizycznej UKW, ul. Sportowa 2, Bydgoszcz

HONOROWY PATRONAT



MINISTERSTWO
SPORTU I TURYSTYKI



PREZES
POLSKIEGO KOMITETU
OLIMPIJSKIEGO



WOJEWODA
KUJAWSKO-POMORSKI



MARSZAŁEK
WOJEWÓDZTWA
KUJAWSKO-POMORSKIEGO



PREZYDENT
MIASTA BYDGOSZCZY

УДК: 615.32:582.736.3:001

**ВИВЧЕННЯ БЕЗПЕЧНОСТІ ЕКСТРАКТУ З ТРАВИ
ЛЮЦЕРНИ ПОСІВНОЇ
SAFETY STUDY OF EXTRACT OF MEDICAGO SATIVA SOWING GRASS**

**Р.Ф.ЄРЬОМЕНКО, Л.М.МАЛОШТАН
RF YERIOMENKO, LN MALOSHTAN**

**Національний фармацевтичний університет (м. Харків, Україна)
Department of Physiology and Anatomy of the National University of Pharmacy,
Kharkiv, Ukraine
nedtrans2@rambler.ru**

Резюме

В даній роботі встановлено відсутність токсичної дії після одноразового внутрішньошлункового введення щурам-самцям та щурам-самкам ЕТЛП в дозі 5000 мг/кг. Згідно з загальноприйнятою токсикологічною класифікацією речовин ЕТЛП при внутрішньошлунковому введенні належить до V класу токсичності – практично нешкідливих речовин ($LD_{50} > 5000$ мг/кг). Результати макро- та мікроскопічних досліджень внутрішніх органів через 14 днів після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП у дозі 5000 мг/кг показали відсутність будь-яких анатомічних та морфологічних порушень у тканинних структурах щурів самців та самок. Розраховане значення ТІ, яке лежить за межами 200, свідчить про високий ступінь безпечності ЕТЛП та його перспективність для медичної практики як ефективного та безпечного коректора білкового обміну з анаболічною дією.

Ключові слова: безпечність, екстракт з трави люцерни посівної, гостра токсичність, доза LD_{50} , морфоструктура тканин.

Abstrakt

In this study there was determined the absence of toxic effect after a single intragastric administration of EGMS at a dose of 5000 mg / kg to male and female rats. According to the conventional toxicological classification of substances, under the intragastric administration

EGMS belongs to class V of toxicity – practically harmless substances ($LD_{50} > 5000$ mg / kg). The results of macro- and microscopic studies of internal organs in 14 days after a single intragastric administration of EGMS at a dose of 5000 mg / kg showed the absence of any anatomical and morphological disorders in tissue structures of male and female rats. The calculated value of TI, which lies beyond 200, indicates a high level of safety of EGMS and its prospectivity for medical practice as an effective and safe corrector of protein metabolism with an anabolic action.

Key words: safety, an extract from the herb alfalfa seed, acute toxicity, LD50 dose, morphological structure of tissues.

Вступ. Відомо, що на сьогодні в процесі пошуку та створення нових лікарських засобів (ЛЗ) основним акцентом є безпечність, хоча висока ефективність відіграє важливу роль у виборі субстанції для створення на її основі нових препаратів. Доказано, що препарати рослинного походження хоча інколи і поступаються синтетичним за ефективністю, але переважають їх за безпечністю [1, 2, 3]. Препарати з анаболічною дією не є виключенням. Тому нами здійснено пошук та проводиться дослідження нового коректора білкового обміну з анаболічною дією рослинного походження – екстракту з трави люцерни посівної (ЕТЛП) [4, 5, 6].

При дослідженні нового лікарського засобу обов'язковою характеристикою поряд з вивченням лікувальних властивостей є визначення показника LD_{50} (середньолетальна доза), що визначається при вивченні гострої токсичності [7]. Це дозволяє оцінити ступінь токсичності препарату, широту його терапевтичної дії і співвідношення безпечність/небезпечність в умовах застосування препарату в дозах, що у декілька десятків та сотень разів перевищують терапевтичну.

Зважаючи на вищевикладене, **метою** даної роботи є вивчення безпечності ЕТЛП шляхом визначення показника LD_{50} в процесі вивчення гострої токсичності, що дасть змогу в подальшому оцінити широту його терапевтичної дії та співвідношення «безпечність/небезпечність» [7].

Матеріали і методи. З метою визначення LD_{50} та відтворення клініки гострого отруєння гостру токсичність ЕТЛП вивчали відповідно до методичних рекомендацій ДЕЦ МОЗ України на щурах обох статей після одноразового внутрішньошлункового введення [7, 8, 9]. Шлях введення обраний згідно з пропонуваним шляхом введення – перорально. Значення доз обирали згідно з методичними рекомендаціями ДЕЦ МОЗ України [7]. Згідно з ними при виборі доз для внутрішньошлункового введення

лімітуючим показником при визначенні гострої токсичності є максимальна доза четвертого класу токсичності (малотоксичні речовини) – 5000 мг/кг. У випадку, коли ця доза не викликає загибелі тварин, введення більшої дози є недоцільним. Згідно з вищенаведеним для проведення дослідження нами була обрана доза ЕТЛП 5000 мг/кг, яку вводили одноразово внутрішньошлунково щурам самцям та самкам. З метою диференціювання можливих токсичних властивостей біологічно активних речовин екстракту рослинної лікарської сировини, що міститься в ЕТЛП, та визначення їх впливу на організм щурів самців та самиць, їх стан порівнювали з групами інтактних щурів обох статей. Після введення препарату та розчинника за тваринами спостерігали протягом 14 днів та оцінювали загальний стан тварин, виживаність, динаміку маси тіла тварин, а по закінченні досліду після виведення тварин з експерименту проводили макроскопічну оцінку стану внутрішніх органів та систем, витягали органи, зважували їх з метою визначення масових коефіцієнтів та далі проводили гістологічне дослідження. Для мікроскопічного аналізу в обох серіях експерименту відібрано зразки печінки, нирок, серця, легень, селезінки, наднирників, тимусу, сім'яників, яєчників, шлунка. Контролем слугували зразки аналогічних органів інтактних самців щурів. Зразки органів зафіксовані у 10% розчині формаліну, проведені по спиртах зростаючої міцності, занурені у целоїдин-парафін. Зрізи товщиною 3-4 мкм фарбували гематоксиліном та еозином [10, 11, 12]. Огляд мікропрепаратів проводили під мікроскопом Micros 400. Мікрофотографування мікроскопічних зображень здійснено цифровим фотоапаратом Nikon CoolPix 4500. Фотознімки обробляли на комп'ютері Pentium 2,4GHz за допомогою програми Nikon View 5. Отримані експериментальні дані статистично обробляли методом варіаційної статистики (вираховували середнє арифметичне та його стандартну похибку). Статистичні висновки при порівнянні рядів експериментальних даних отримували на основі методів однофакторного дисперсійного аналізу або дисперсійного аналізу для даних з повторними вимірюваннями, критеріїв Ньюмена-Кейлса, Данета та непараметричних методів аналізу (критеріїв Крускала-Уоліса та Мана-Уїтні з поправкою Бонфероні) [13, 14, 15]. Відмінності вважали значущими при $p < 0,05$. Результати надані в таблицях 1-4 та на рис. 1

Результати та їх обговорення. У процесі аналізу результатів дослідження гострої токсичності ЕТЛП встановлено, що після одноразового внутрішньошлункового введення тваринам групи ІК питної води та дослідної групи ЕТЛП в дозі 5000 мг/кг (табл. 1) ознак інтоксикації в день введення та протягом 14 діб поспіль у щурів обох

статей не виявлено: тварини були охайними, активними, реагували на звукові і світлові подразники, процеси сечовиділення і дефекації були в нормі, порушення дихання та судом не спостерігали, рефлекторна збудливість була збережена. Споживання води та їжі щурів цих груп було в нормі. Загибелі тварин протягом всього періоду спостереження не зареєстровано (табл. 1).

Таблиця 1

Вживаність щурів обох статей після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП

Умови досліджу	Доза, мг/кг	Вживаність, абс. од.		Вживаність, %	
		Самці	Самиці	Самці	Самиці
ІК	-	6 з 6	6 з 6	100	100
ЕТЛП	5000,0	6 з 6	6 з 6	100	100

Аналіз динаміки маси тіла тварин, наведений у табл. 2 показав, що у щурів обох статей після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП та у групах інтактних тварин протягом терміну спостереження відбувається збільшення маси тіла відносно вихідних даних. Це також підтверджує відсутність токсичного впливу ЕТЛП на трофічні та метаболічні процеси в організмі тварин.

Таблиця 2

Динаміка маси тіла щурів обох статей після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП

Умови досліджу	Вихідні дані	3 дні, г	7 днів, г	14 днів, г
Самці				
ІК	202,5±3,82	205,0±2,89	211,7±1,67	221,7±1,67*
ЕТЛП	205,0±4,47	208,3±3,57	217,5±2,50	227,5±2,50*
Самки				
ІК	200,0±5,33	200,8±4,55	206,7±3,33	217,5±3,10*
ЕТЛП	210,0±4,65	210,8±3,96	215,8±3,52	218,3±3,57**

Примітки: 1. *- відхилення показника достовірне щодо вихідних даних, $p \leq 0,05$; 2. ** - відхилення показника прямує до вірогідного щодо вихідних даних, $P > 0,05$;

Після закінчення експерименту та виведення тварин з досліду евтаназією був проведений розтин, макроскопічний огляд внутрішніх органів та визначена їх маса, що дало змогу розрахувати інтегральний показник – масовий коефіцієнт внутрішніх органів (табл. 3).

Таблиця 3

Масові коефіцієнти внутрішніх органів щурів при одноразовому внутрішньошлунковому введенні при вивченні гострої токсичності ЕТЛП

Умови досліджу		Самці		Самки	
		ІК	ЕТЛП	ІК	ЕТЛП
Печінка		3,63±0,01	3,57±0,02	2,96±0,06	2,86±0,14
Нирки	права	0,31±0,01	0,31±0,01	0,28±0,01	0,28±0,01
	ліва	0,31±0,01	0,31±0,01	0,27±0,01	0,27±0,01
Серце		0,36±0,01	0,36±0,01	0,30±0,01	0,30±0,01
Легені		0,75±0,01	0,75±0,02	0,69±0,03	0,73±0,05
Селезінка		0,37±0,02	0,37±0,02	0,39±0,03	0,39±0,02
Наднирники		0,029±0,001	0,030±0,001	0,032±0,002	0,028±0,001
Тимус		0,132±0,009	0,112±0,010	0,109±0,009	0,114±0,016
Сім'яники	Правий	0,54±0,01	0,56±0,01	-	-
	Лівий	0,55±0,01	0,57±0,01	-	-

Аналіз наведених в таблиці 3 масових коефіцієнтів внутрішніх органів щурів обох статей після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП та у групах інтактних тварин підтверджує відсутність патологічних змін у функціональному стані дослідних тварин в порівнянні з інтактними (табл. 3).

Під час розтину всі тварини мали охайний шерстний покрив та незмінні слизові оболонки природних отворів. Макроскопічне дослідження внутрішніх органів засвідчило відсутність ознак гіпо- або гіпертрофії органів, порушень кровообігу, запалення, пухлинного росту. При огляді порожнин тіла не виявлено наявності патологічного вмісту, спайок. Отже за результатами макроскопічного огляду внутрішніх органів та порожнин тіла щурів обох статей встановлено, що одноразове введення ЕТЛП в дозі 5000 мг/кг є безпечним для тварин і не чинить патологічного впливу на стан внутрішніх органів та систем організму.

Результати морфологічного дослідження внутрішніх органів щурів обох статей: печінки, нирок, серця, легень, селезінки, наднирників, тимусу, сім'яників, яєчників, шлунка представлені на рисунку 1.

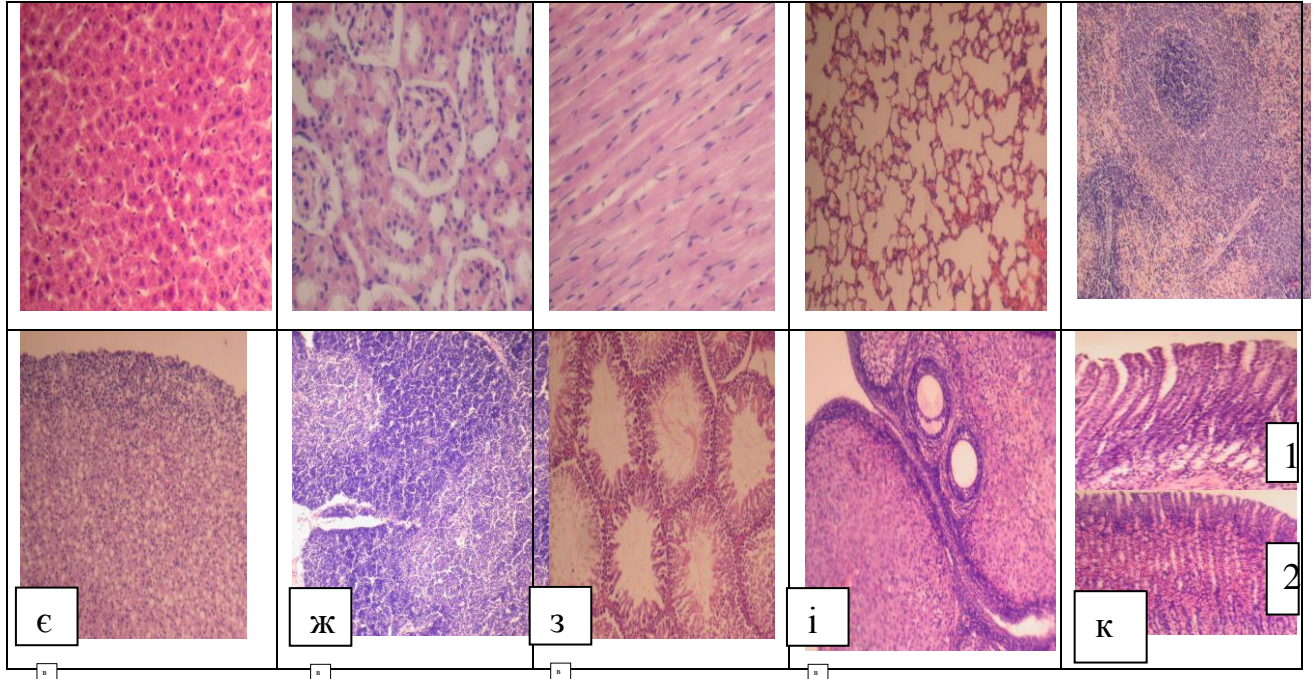


Рис. 1. Стан основних внутрішніх органів щурів на 14-ту добу після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП в дозі 5000 мг/кг. Гематоксилін-еозин. x100-250:

- а – печінка: нормальний стан печінкової паренхіми;
- б – нирка: структура тілець та звивистих канальців не змінена;
- в – міокард: нормальний стан серцево-м'язових волокон;
- г – легені: гістоархітектоніка альвеолярних ходів та мішечків не порушена;
- д – селезінка: нормальний стан білої та червоної пульпи
- є – наднирник: облігатні зони кори та хромафінні клітини мозкового шару в нормі;
- ж – тимус: стан лімфоїдної тканини в нормі;
- з – сім'яники: сім'яні канальці не змінені, структура клітини в нормі;
- і – яєчник: різні за розвитком фолікули та жовті тіла;
- к – фундальний (1) та пілоричний (2) відділи шлунка: стан слизової в нормі.

Як видно на рис. 1 гістоархітектоніка печінки, нирок, серця, легень, селезінки, наднирників, тимусу, сім'яників, яєчників, шлунка щурів на 14-й день досліду після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП в дозі 5000 мг/кг як і в інтактних

щурів мала типовий, притаманний для даного виду тварин, вигляд без морфологічних порушень у тканинних структурах тварин.

Аналіз результатів досліджень з вивчення гострої токсичності нового лікарського засобу дозволив встановити відсутність токсичної дії після одноразового внутрішньошлункового введення щурам-самцям та щурам-самкам ЕТЛП в дозі 5000 мг/кг, що свідчить про те що ЛД₅₀ знаходиться за межами 5000 мг/кг. Згідно з загальноприйнятою токсикологічною класифікацією речовин [1] ЕТЛП при внутрішньошлунковому введенні належить до V класу токсичності – практично нешкідливих речовин (табл. 4). На підставі отриманих макро- та мікроскопічних даних можна зробити висновок про те, що через 14 днів після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП у дозі 5000 мг/кг не спостерігали будь-яких помітних морфологічних змін у стані досліджених органів щурів обох статей (рис. 1).

Таблиця 4

Параметри гострої токсичності ЕТЛП при одноразовому внутрішньошлунковому введенні щурам обох статей

Препарат	ЛД ₅₀ , мг/кг	Клас токсичності
ЕТЛП	> 5000	V практично нешкідливі речовини (ЛД ₅₀ >5000 мг/кг)

Зазначені результати свідчать про високий ступінь безпечності ЕТЛП. Це підтверджує значення терапевтичного індексу (ТІ) ($TI = LD_{50}/UTD$, де УТД – умовно терапевтична доза або ЕД₅₀) ЕТЛП, який з врахуванням, що УТД=25 мг/кг, дорівнює мінімум 200, бо значення дози ЛД₅₀ ЕТЛП при внутрішньошлунковому введенні лежить за межами 5000 мг/кг.

Висновки

1. Аналіз результатів досліджень з вивчення гострої токсичності нового лікарського засобу дозволив встановити відсутність токсичної дії після одноразового внутрішньошлункового введення щурам-самцям та щурам-самкам ЕТЛП в дозі 5000 мг/кг, що свідчить про те що ЛД₅₀ знаходиться за межами 5000 мг/кг. Згідно з загальноприйнятою токсикологічною класифікацією речовин ЕТЛП при

внутрішньошлунковому введенні належить до V класу токсичності – практично нешкідливих речовин ($LD_{50} > 5000$ мг/кг).

2. Результати макро- та мікроскопічних досліджень свідчать про те, що через 14 днів після одноразового внутрішньошлункового введення ЕТЛП у дозі 5000 мг/кг не спостерігали будь-яких анатомічних та морфологічних порушень у тканинних структурах тварин.

3. Розраховане значення ТІ, яке лежить за межами 200, свідчить про високий ступінь безпечності ЕТЛП та його перспективність для медичної практики як ефективного та безпечного коректора білкового обміну з анаболічною дією.

References

Література

1. Волошин О.І. Ліки рослинного походження: сучасні тенденції у вітчизняній та світовій клінічній медицині і фармації / О.І. Волошин, О.В. Пішок, Л.О. Волошина // Фітотерапія. – 2003. – № 3. – С. 3-7.
2. Braun L., Cohen M. Herbs and natural supplements: An Evidence-based Guide / 2nd Edition. Marrickville NSW: Elsevier, 2007. – 567 p.
3. Hanson B.A. Understanding medicinal plants their chemistry and therapeutic action. – New York, London, Oxford: The Haworth Press. – 2005. – 307 p.
4. Ковальов С.В. Дослідження фенольного комплексу із трави люцерни посівної / С.В. Ковальов, А.М. Ковальова, Єрмоєнко Р.Ф., Малоштан Л.М. // Фармацевтичний часопис. – 2008. - №2(6). – С.27-30.
5. Ковальов С.В. Кількісне визначення фенольних сполук у траві люцерни посівної / С.В. Ковальов, Р.Ф. Єрмоєнко, Л.М. Малоштан // Фармаком. – 2008. - №4. – С.35-38.
6. Єрмоєнко Р.Ф. Дослідження впливу екстракту з трави люцерни посівної на стан мембранних білків та мембран в умовах гемолізу еритроцитів / Р.Ф. Єрмоєнко // Український біофармацевтичний журнал - 2011. - № 6(17). – С. 22-26.
7. Коваленко В.М. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / Доклінічні дослідження лікарських засобів: [метод. рек.] / В.М. Коваленко, О.В. Стефанов, Ю.М. Максимов, І.М. Трахтенберг [за ред.: член-кор. АМН України О. В. Стефанова] – К.: Авіцена, 2001. – С. 74–97.

8. Западнюк И.П. Лабораторные животные: разведение, содержание, использование в эксперименте / И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, С.А. Захария. – К.: Вища школа, 1983. – 552 с.
9. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Кожем'якін Ю.М., Хромов О.С., Філоненко М.А., Сайфетдінова Г. А.]. – К.: Авіцена, 2002.– 156 с.
10. Автандилов Г.Г. Введение в количественную патологическую морфологию.- М.: Медицина, 1980.- С. 216.
11. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой.- М.- 1982.- С. 304.
12. Матвієнко А.В., Степанова Л.В. Морфологічні дослідження на етапі доклінічного вивчення лікарських засобів. У кн.: Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. – Київ, 2001.- С.196-208.
13. Лапач С.Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. / С.Н. Лапач, А.В. Чубенко, П.Н. Бабич. – 2-е изд., перераб. и доп. – К.: МОРИОН, 2001. – 408 с.
14. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов.: [Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ]. / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 763-826.
15. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О.Ю. Реброва. – М.: МедиаСфера, 2006 – 312 с.