

Рекомендована д.м.н., професором С.М.Дрогоров

УДК 615.451.1:616.147.17-007.64

ВИВЧЕННЯ ТОКСИЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВОЇ ВІТЧИЗНЯНОЇ МАЗІ “ЕСТАН” У ГОСТРОМУ ТА ХРОНІЧНОМУ ЕКСПЕРИМЕНТІ

К.П.Бездітко, С.А.Гращенко

Національний фармацевтичний університет

Наведені результати вивчення гострої та хронічної токсичності нової вітчизняної мазі “Естан”, призначеної для місцевого лікування геморою та інших проктологічних захворювань. Мазь розроблена на основі екстрактів кори дуба та насіння каштану кінського. Гостру токсичність вивчали при трьох шляхах застосування: ректальному, внутрішньошлунковому та нашкірному, хронічну — при ректальному. Досліджували вплив мазі на загальний стан тварин, динаміку маси тіла, динаміку масових коефіцієнтів внутрішніх органів, показники периферичної крові, вуглеводного та ліпідного обміну, функціональний стан печінки, нирок, серцево-судинної системи, центральної нервової системи. За результатами проведених експериментів встановлено, що мазь “Естан” при ректальному ($LD_{50} > 3000$ мг/кг), внутрішньошлунковому ($LD_{50} > 15000$ мг/кг) та нашкірному застосуванні ($LD_{50} > 22600$ мг/кг) згідно з класифікацією речовин за токсичністю відноситься до VI класу — відносно нешкідливі речовини. Тривале ректальне застосування мазі не викликає шкідливої дії та впливу на внутрішні органи і системи лабораторних тварин, що підтверджується клінічними, біохімічними та гістологічними дослідженнями.

Доклінічне вивчення гострої та хронічної токсичності нових лікарських засобів є обов'язковим та одним з найважливіших етапів створення препаратів, оскільки дозволяє прогнозувати їх безпечність за умов клінічного застосування [2, 4]. Спеціалістами ВАТ “ХФЗ “Червона зірка”” під керівництвом канд. біол. наук І.В.Трутаєва для місцевого лікування проктологічних захворювань на основі екстрактів кори дуба та насіння кінського каштану створена мазь “Естан”. При проведенні доклінічних досліджень у ЦНДЛ НФаУ під керівництвом проф. Л.В.Яковлевої встановлені виражені протизапальні, анальгетичні, репаративні, мембраностабілізуючі, антимікробні та антиоксидантні властивості мазі. Метою даної роботи стало вивчення гострої токсичності та параметрів

токсикодинаміки нової комбінованої мазі “Естан” у хронічному експерименті.

Матеріали та методи

Гостру токсичність мазі “Естан” вивчали на двох видах тварин (щурах та мишах) при трьох шляхах введення: ректальному (в дозі 3000 мг/кг), внутрішньошлунковому (15000 мг/кг) та нашкірному (22600 мг/кг) [4]. По закінченні періоду досліджень (14 діб) проводили евтаназію тварин відповідно до норм біоетики та здійснювали розтин, макроскопічний огляд внутрішніх органів тварин та визначення їх маси для подальшого одержання масових коефіцієнтів (МК).

Хронічну токсичність мазі “Естан” вивчали на 33-х статевозрілих щурах обох статей з масою тіла 220-270 г та 8-ми статевозрілих кролях обох статей з масою тіла 2,04-2,87 кг. Мазь вводили ректально в умовно терапевтичній дозі (1 мл/кг маси тіла для щурів та 2,5 мл/кг маси для кролів), яку застосовували при вивченні специфічної активності на моделях фенолового та формалінового проктиту [2, 4]. Тривалість дослідження токсичних ефектів мазі була обумовлена терміном її застосування в клініці (14-30 днів). Всі показники вивчали в динаміці до початку досліду, через 1 та 3 місяці. Вплив мазі “Естан” на функціональний стан ЦНС визначали за результатами тесту “відкрите поле” [2]. Для оцінки стану загальнотрофічних процесів в організмі тварин досліджували у динаміці приріст маси тіла і відносну масу внутрішніх органів [2, 4]. Можливий токсичний вплив мазі “Естан” на периферичну кров оцінювали при проведенні в динаміці повного клінічного аналізу крові [1]. Для поглибленого вивчення функціонального стану печінки визначали загальний білок сироватки крові, час скипання крові, вміст фібриногену, протромбіновий час, активність церулоплазміну, АлАТ та АсАТ у сироватці крові та результати тесту на медикаментозний сон, який викликали 1%-м розчином барбамілу з розрахунку 80 мг/кг [1, 3]. Для оцінки можливого впливу мазі “Естан” на функцію нирок визначали в динаміці відносну щільність та рН сечі, хлориди сироватки крові та сечі

Таблиця 1

Показники функціонального стану системи зсідання крові щурів при тривалому застосуванні мазі “Естан” у дозі 1 мл/кг ($\bar{X} \pm S_x$)

Показники	Терміни дослідження	Щури самці				Щури самиці			
		n	негативний контроль	n	дослідна група	n	негативний контроль	n	дослідна група
Час зсідання, с	вих. дані	5	183,40±3,76	—	—	5	160,00±6,54	—	—
	1 міс.	6	174,50±4,91	6	181,17±6,01	6	166,17±8,34	6	164,17±6,37
	3 міс.	8	181,75±7,95	8	204,88±5,02 ^{*/**}	7	178,38±6,95	8	208,29±7,28 ^{*/**}
Протромбіновий час, с	вих. дані	5	27,00±4,21	—	—	5	18,20±4,14	—	—
	1 міс.	6	25,17±1,68	6	24,17±1,99	6	23,00±4,80	6	25,50±3,92
	3 міс.	7	23,00±2,13	8	21,63±3,80	7	19,00±4,00	8	22,13±2,59
Фібриноген, г/л	вих. дані	5	14,20±1,98	—	—	5	13,20±0,86	—	—
	1 міс.	6	11,50±1,23	6	12,17±0,95	6	11,00±0,93	6	10,00±0,68
	3 міс.	7	11,71±0,84	8	10,25±0,67	7	10,86±0,99	8	10,63±0,68

Примітки: * — відхилення показника достовірне щодо вихідних даних, $p \leq 0,05$ (ANOVA, критерій Даннета);

** — відхилення показника достовірне щодо показників групи негативного контролю, $p \leq 0,05$ (критерій t Стьюдента).

меркуриметричним методом, рівень сечовини у крові та сечі за реакцією з діацетилмоноксидом [3]. Критеріями впливу мазі “Естан” на вуглеводний та ліпідний обміни служили показники рівня глюкози, холестерину та загальних ліпідів у сироватці крові [3]. Функціональний стан серця та судин оцінювали за показниками ЕКГ [2].

Після закінчення періоду досліджень за правилами біоетики проводили евтаназію тварин, вилучали їх внутрішні органи (печінку, нирки, серце, легені, селезінку, наднирники, сім'яники), розраховували масові коефіцієнти та здійснювали макро- та мікроскопічне дослідження [4]. Для гістологічного дослідження тканинний матеріал фарбували гематоксиліном і еозином, оглядали під мікроскопом Micros 400 та фотографували апаратом Nikon Cool Pix 4500 з подальшою обробкою знімків за комп'ютерною програмою Nikon View 5.

Отримані експериментальні дані обробляли методом варіаційної статистики за допомогою стандартного пакету програм “Statistica 6,0”.

Результати та їх обговорення

Дослідження гострої токсичності мазі “Естан” після ректального, внутрішньошлункового та на шкірного застосування мазі в максимальній дозі (3000 мг/кг, 15000 мг/кг та 22600 мг/кг відповідно) не виявили ознак інтоксикації ні у щурів, ні у мишей: 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 у всіх дослідних тварин була збережена, споживання води та їжі не відрізнялось від такого у груп тварин негативного контролю. Загибелі тварин протягом усього періоду спостереження зафіксовано не було.

Під час розтину всі тварини (щури, миші) мали охайний шерстний покрив, незмінні слизові оболонки природних отворів. При дослідженні внутрішніх органів тварин не виявлено ознак інтоксикації або інших проявів патологічних процесів. За розміром, кольором, консистенцією, розташуванням та масовими коефіцієнтами внутрішні органи тварин не виходили за межі норми [2].

Таким чином, комплекс досліджень з вивчення гострої токсичності мазі “Естан” на двох видах тварин (щурах і мишах) дозволив встановити відсутність її токсичної дії при ректальному ($LD_{50} > 3000$ мг/кг), внутрішньошлунковому ($LD_{50} > 15000$ мг/кг) та на шкірному застосуванні ($LD_{50} > 22600$ мг/кг). Згідно з класифікацією речовин за токсичністю [4] мазь “Естан” відноситься до VI класу токсичності речовин — відносно нешкідливі речовини. Подальше встановлення середньолетальної дози мазі вважається недоцільним.

У період вивчення хронічної токсичності піддослідні тварини (щури, кролі), що ректально отримували мазь, за зовнішнім виглядом, поведінкою і відношенням до їжі не відрізнялися від тварин контрольних груп, яким вводили основу мазі. У ході експерименту не було відзначено пригнічення активності і розвитку агресивності у тварин порівнюваних груп. Ознак запалення природного отвору, тріщин у місці введення мазі не спостерігали. Вживаність тварин становила 100% у всіх групах. У всіх дослідних та контрольних групах маса тіла тварин зростала відносно вихідних даних до кінця експерименту, що вказує на відсутність токсичного впливу мазі “Естан” на трофічні процеси. Застосування мазі протягом 1-го та 3-х місяців не впливало на стан внутрішніх органів щурів і кролів та не викликало шкідливого

Таблиця 2

Показники ліпідного і вуглеводного обміну при тривалому застосуванні мазі "Естан" у дозі 1 мл/кг ($\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$)

Показники	Терміни дослідження	Щури самці (введення в дозі 1 мл/кг)			Щури самиці (введення в дозі 1 мл/кг)			Кролі обох статей (введення в дозі 2,5 мл/кг)					
		n	негативний контроль	п	дослідна група	n	негативний контроль	п	дослідна група	n	негативний контроль	п	дослідна група
Холестерин, ммоль/л	вих. дані	5	1,54±0,14	—	—	5	1,82±0,21	—	—	4	2,50±0,09	—	—
	1 міс.	6	1,63±0,07	5	1,17±0,05*/**	6	1,68±0,07	6	1,18±0,07*/**	—	—	—	—
	3 міс.	7	1,55±0,15	8	1,32±0,05	7	1,58±0,12	8	1,31±0,09*	4	2,41±0,16	4	1,54±0,20*/**
Загальні ліпіди, г/л	вих. дані	5	2,71±0,30	—	—	5	2,97±0,27	—	—	4	1,91±0,12	—	—
	1 міс.	6	2,74±0,21	6	2,68±0,08	6	2,76±0,08	6	2,73±0,15	—	—	—	—
	3 міс.	7	3,26±0,52	8	2,52±0,37	7	2,96±0,37	8	3,29±0,30	4	1,60±0,17	4	1,97±0,12
Глюкоза, ммоль/л	вих. дані	5	5,18±0,35	—	—	5	5,38±0,16	—	—	4	5,42±0,37	—	—
	1 міс.	6	6,21±0,23	6	5,53±0,26	6	6,08±0,28	6	6,15±0,28	—	—	—	—
	3 міс.	7	4,73±0,18	8	4,76±0,10	7	5,04±0,24	8	5,28±0,17	4	5,21±0,20	4	5,23±0,23

Примітки: * — відхилення показника достовірне щодо вихідних даних, $p \leq 0,05$ (ANOVA, критерій Даннета);

** — відхилення показника достовірне щодо показників групи негативного контролю, $p \leq 0,05$ (критерій t Стьюдента).

впливу на гематологічні показники, функції печінки, нирок, ЦНС та ССС.

Дослідження системи зсідання крові показало (табл. 1), що у групах як щурів самців так і щурів самиць, що отримували мазь "Естан", на 3-й місяць спостереження була зареєстрована тенденція до зниження вмісту фібриногену та достовірне збільшення часу зсідання крові відносно вихідних даних та контрольної патології. Ці зміни не виходили за межі коливань фізіологічної норми [2]. Дослідження системи зсідання крові у кролів підтверджує дані, отримані при вивченні хронічної токсичності на щурах. Оскільки підвищення зсідання крові призводить до тромбоутворення, вищенаведений вплив досліджуваного об'єкту на реологічні властивості крові слід розглядати як позитивний. Здатність мазі "Естан" поліпшувати реологічні властивості крові логічно пояснюється тим, що до її складу входить екстракт каштану кінського. Він, у свою чергу, містить есцин, ескулін та фраксин, які, за даними літератури, є прямими антикоагулянтами [7, 9].

У всіх щурів вже через 1 місяць застосування мазі "Естан" та у кролів через 3 місяці після її введення спостерігали зниження холестерину щодо вихідних даних та негативного контролю, яке не виходило за межі фізіологічної норми (табл. 2) [2]. Оскільки підвищення холестерину призводить до утворення холестеринових бляшок, вищенаведений вплив досліджуваного об'єкту на ліпідний обмін слід розглядати не як токсичний, а як позитивний. Здатність мазі "Естан" нормалізува-

ти ліпідний обмін пояснюється тим, що до її складу входять екстракти каштану кінського та кори дуба. Вони містять біофлавоноїдні комплекси, які за даними літератури проявляють гіпохолестеринемічні властивості [5, 6, 8, 10].

Загалом результати досліджень свідчать про відсутність будь-якого токсичного впливу мазі "Естан" під час її тривалого застосування на функції життєво важливих органів і систем організму піддослідних щурів та кролів.

Таким чином, нова високоефективна вітчизняна мазь "Естан" при одноразовому введенні максимальної дози характеризується як відносно нешкідлива та не чинить токсичної дії на органи і системи тварин при тривалому застосуванні.

ВИСНОВКИ

1. Мазь "Естан" при ректальному (ЛД₅₀>3000 мг/кг), внутрішньошлунковому (ЛД₅₀>15000 мг/кг) та нашкірному застосуванні (ЛД₅₀>22600 мг/кг) згідно з класифікацією речовин за токсичністю відноситься до VI класу токсичності речовин — відносно нешкідливі речовини.

2. Тривале ректальне застосування мазі "Естан" не викликає шкідливої дії та впливу на внутрішні органи і системи лабораторних тварин, що підтверджується клінічними, біохімічними та гістологічними дослідженнями.

3. Результати проведених досліджень свідчать про доцільність більш поглибленого вивчення мазі "Естан" з метою створення нового препарату місцевої дії для лікування проктологічних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Биохимические анализы в клинике: Справочник / Под ред. В.М.Лифшица, В.И.Сидельникова. — М.: Мединформ, 2001. — 302 с.
2. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. — М.: ИД "Русский врач", 2003. — 154 с.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2-х т. — Мн.: Беларусь, 2000. — Т. 2. — 463 с.

4. Коваленко В.М., Стефанов О.В., Максимов Ю.М., Трахтенберг І.М. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. чл.-кор. АМН України О.В.Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — 528 с.
5. Choi J.S., Choi B.C., Choi K.E. // *Am. J. Health Syst. Pharm.* — 2004. — Vol. 61. — P. 2406-2409.
6. Halliwell B., Rafter J., Jenner A. // *Am. J. Clin. Nutr.* — 2005. — Vol. 81. — P. 268-276.
7. Hassig A., Liang W.X., Schwabl H. et al. // *Med. Hypotheses.* — 1999. — Vol. 52, №5. — P. 479-481.
8. Lin C.C., Hsu Y.F., Lin T.C. // *Anticancer Res.* — 2001. — Vol. 21, №1A. — P. 237-243.
9. Lynnette R. // *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis.* — 2001. — Vol. 475, №1-2. — P. 89-111.
10. Prior R., Wu X., Schaich K. // *J. Agric. Food Chem.* — 2005. — Vol. 53. — P. 4290-4302.

УДК 615.451.1:616.147.17-007.64

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НОВОЙ ОТЕЧЕСТВЕННОЙ МАЗИ “ЭСТАН” В ОСТРОМ И ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Е.П.Бездетко, С.А.Грашченкова

Представлены результаты изучения острой и хронической токсичности новой отечественной комбинированной мази “Эстан”, предназначенной для местного лечения геморроя и других проктологических заболеваний. Мазь создана на основе экстракта коры дуба и экстракта семян каштана конского. Острую токсичность изучали при трех путях введения: ректальном, внутрижелудочном и накожном, хроническую — при ректальном. Исследовали влияние мази на общее состояние животных, динамику массы тела, динамику массовых коэффициентов внутренних органов, показатели периферической крови, углеводного и липидного обменов, функциональное состояние печени, почек, сердечно-сосудистой системы, центральной нервной системы. По результатам эксперимента установлено, что мазь “Эстан” при ректальном ($LD_{50} > 3000$ мг/кг), внутрижелудочном ($LD_{50} > 15000$ мг/кг) и накожном применении ($LD_{50} > 22600$ мг/кг) относится к VI классу токсичности — относительно безвредные вещества. Длительное введение изучаемой мази не приводит к нарушениям функций жизненноважных органов и систем животного, что подтверждается клиническими, биохимическими и гистологическими исследованиями.

UDC 615.451.1:616.147.17-007.64

THE STUDY OF TOXIC PROPERTIES OF NEW DOMESTIC ESTAN OINTMENT IN THE ACUTE AND CHRONIC EXPERIMENT

Ye.P.Bezdetko, S.A.Grashchenkova

The results of studying the acute and chronic toxicity of the new domestic combined Estan ointment intended for local treatment of hemorrhoids and other proctological diseases are given. The ointment has been created on the basis of the oak bark extract and the extract of chestnut seeds. The acute toxicity has been investigated in three routes of introduction: rectal, intragastric and cutaneous; the chronic toxicity has been studied in rectal introduction of the ointment. The ointment's effect on the general state of animals, dynamics of the body weight, dynamics of the mass factors of the visceral organs, the values of the peripheral blood, carbohydrate and lipid metabolism, the functional condition of the liver, the kidneys, the cardiovascular system, the central nervous system. The results of the experiment have been shown that Estan ointment in rectal ($LD_{50} > 3000$ mg/kg), intragastric ($LD_{50} > 15000$ mg/kg) and cutaneous ($LD_{50} > 22600$ mg/kg) introduction belongs to the VI class of toxicity — a relatively harmless substances. A prolonged introduction of the ointment under research does not lead to dysfunctions of the vitally-important organs and systems of animals and it is confirmed by clinical trials, biochemical and histological studies.