

# ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-5-28-35

## ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ АРНИКИ ОБЛИСТВЕННОЙ (*ARNICA FOLIOSA* NUTT.) ЭКСТРАКТА СУХОГО

В. В. Бортникова<sup>1</sup>, Л. В. Крепкова<sup>1,\*</sup>, Н. С. Михеева<sup>2</sup>, М. В. Боровкова<sup>1</sup>

Проведено доклиническое изучение безопасности впервые полученного в ФГБНУ ВИЛАР арники облиственной экстракта сухого. Показана низкая токсичность экстракта, ЛД<sub>50</sub> для крыс при однократном приеме внутрь — более 21,5 г/кг. В условиях длительного, в течение 90 дней, введения в желудок крысам-самцам и самкам изучаемый экстракт в дозе 1250 мг/кг (1/17 ЛД<sub>50</sub> при введении в желудок крысам) вызывал увеличение количества тромбоцитов в периферической крови, укорочение протромбинового и АЧТВ времени, что свидетельствует о нарушении реологии крови и повышении риска ее внутрисосудистого свертывания. В испытанных дозах 100, 500 и 1250 мг/кг экстракт проявлял седативное действие. При длительном введении в желудок крысам-самцам в максимальной испытанной дозе экстракт арники вызывал гепато- и нефротоксичность, а также раздражал слизистую желудочно-кишечного тракта крыс. Сухой экстракт арники в дозе 100 мг/кг (10-кратная эффективная доза в эксперименте) стимулировал гуморальное звено иммунитета и не влиял на эффекторы клеточного иммунитета мышей линии СВА. Исследуемый экстракт в тестах общей системной и активной кожной анафилаксии и реакции гиперчувствительности «замедленного» типа не проявлял аллергизирующих свойств. При изучении репротоксичности сухой экстракт арники замедлял процесс окостенения хрящевых закладок костей плюсны 20-дневных плодов при введении крысам с 1 по 19 день беременности в дозе 1250 мг/кг и не влиял на генеративную функцию крыс-самцов и самок.

**Ключевые слова:** доклиническое токсикологическое исследование; арники облиственной экстракт сухой; внутрисосудистое свертывание крови; гепато- и нефротоксичность.

## ВВЕДЕНИЕ

Растения рода арника (*Arnica* L.) сем. Астровые (*Asteraceae*) являются перспективным источником получения биологически активных веществ. В России в медицинской практике используются 3 вида растений рода арника: арника горная (*Arnica montana* L.), арника Шамиссо (*Arnica chamissonis* Less.) и арника облиственная (*Arnica foliosa* Nutt), которые содержат схожий комплекс биологически активных веществ, представляющих различные классы химических соединений — флавоноиды, эфирные масла с сесквитерпеновыми лактонами, тритерпеноиды, полисахариды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты, неопределенные фитостерины, оксикумарины, каротиноиды [14 – 18]. В связи с тем, что арника облиственная имеет большую надземную массу, она была введена в культуру с целью обеспечения сырьевой базы при промышленном производстве лекарственных средств.

В течение нескольких лет в ФГБНУ ВИЛАР велась работа по созданию оптимальной технологической схемы получения сухого экстракта из травы арники

облиственной [3, 9, 11] и изучению его фитохимического состава. В результате этих исследований установлено, что комплекс биологически активных соединений, идентифицированных в сухом экстракте арники облиственной, обуславливает широкий спектр его фармакологической активности [5 – 7]. В экспериментах на животных показано, что арника облиственной экстракт сухой (АОЭС) при введении в желудок или внутривенно оказывает кровоостанавливающее действие, а также ранозаживляющий и противовоспалительный эффект на слизистые оболочки прямой кишки, проявляет гастропротективное, гиполипидемическое и антиоксидантное действие. Изучение биологической активности АОЭС с применением специфических биотест-систем по НАДФН-оксидазному тесту показало наличие у него иммуномодулирующей активности [2].

С целью получения результатов, определяющих степень безопасности и риска клинического применения лекарственных средств, разработанных на основе арники облиственной, были проведены доклинические токсикологические исследования арники экстракта сухого.

## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основными биологически активными веществами АОЭС являются фенольные соединения, составляющие

<sup>1</sup> ФГБНУ ВИЛАР, Россия, 117216, Москва, ул. Грина, 7.

<sup>2</sup> Центр экспертизы и контроля готовых лекарственных средств ФГБУ «НЦЭСМП», Россия, 127051, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8 стр. 2.

\* e-mail: krepkova2011@yandex.ru

щие 30–35 % (флавоноидные гликозиды: лютеолин-7-гликозид, апигенин-7-О-гликозид, кверцетин-3-гликозид; фенолкарбоновые кислоты — хлорогеновая, кофейная, феруловая). Кроме того, в составе экстракта содержится 3–5 % липофильных веществ (пигменты, липиды, смолы, сесквитерпеновые лактоны ряда геленалина и кумарины — скополетин, умбеллиферон); 20–25 % углеводов (полисахариды и простые сахара — фруктоза, сахароза и глюкоза); 20–25 % азотсодержащих соединений (белки, аминокислоты — аспарагиновая и глутаминовая, гистидин, цистин) [1, 8, 10]. Стандартизацию АОЭС проводили по содержанию фенольных соединений в пересчете на лютеолин-7-гликозид, количество которого в экстракте должно содержаться не менее 4,5 %. Методика валидирована [1]. Исследования выполнены согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации № 708н от 23.08.2010, Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 “Принципы надлежащей лабораторной практики”) [13].

Эксперименты на животных проведены в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986).

Определение параметров токсичности АОЭС проведено при однократном внутрибрюшинном и пероральном способах введения белым нелинейным мышам и крысам Вистар обоего пола с использованием метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксону. Общетоксическое действие АОЭС изучено в условиях хронического эксперимента (90 дней) на 80 половозрелых крысах Вистар, самцах и самках, первоначальная масса тела 180–200 г (по 10 животных в группе, питомник — филиал “Андреевка” ФГБУН НЦБМТ ФМБА Московской области) при ежедневном введении водного раствора сухого экстракта в желудок в дозах 100, 500 и 1250 мг/кг. Контрольные животные получали эквивалентные объемы (4–5 мл) водопроводной воды. Выбор экспериментальных доз был обусловлен тем, что максимальная доза 1250 мг/кг соответствовала 1/17 от ЛД<sub>50</sub> при внутрижелудочном введении крысам; минимальная доза — 100 мг/кг составляла 1/87 от ЛД<sub>50</sub>, доза 500 мг/кг была промежуточной. В течение исследования регистрировали интегральные показатели здоровья животных. Через 30 и 90 дней введения экстракта определяли показатели клинической биохимии и гематологии: гематологические показатели — на полуавтоматическом гематологическом анализаторе Hema-screen 13 фирмы Hospitex Diagnostics S. A. (Италия); параметры гемостаза — на анализаторе свертывания крови АнСО8–01–“ВАС-МА” (Россия) с помощью наборов фирмы “Human”,

Германия; биохимические показатели и активность некоторых ферментов сыворотки крови — на полуавтоматическом биохимическом анализаторе крови Screenmaster Tecno фирмы Hospitex Diagnostics S. A. (Италия) при помощи наборов фирмы “Human”, Германия. В те же сроки проводили ЭКГ-исследование на электрокардиографе “HeartMirror” фирмы “ИННО-МЕД Медикал”, Венгрия; диурез на фоне 3 % водной нагрузки и исследование центральной нервной системы по ориентировочным реакциям в тесте “открытое поле”. В конце хронического эксперимента по 5 животных из группы подвергали эвтаназии в СО<sub>2</sub>-камере для проведения патогистологических исследований внутренних органов, делая гистологические срезы и окрашивая их гематоксилином-эозином.

Исследование потенциальных аллергизирующих свойств АОЭС проводили в тестах общей системной и активной кожной анафилаксии на 60 морских свинках-альбиносах-самцах (питомник — филиал “Андреевка” ФГБУН НЦБМТ ФМБА Московской области). Морских свинок сенсибилизировали эффективной экспериментальной дозой 10 мг/кг и 10-кратной эффективной 100 мг/кг по общепринятой схеме сенсибилизации. Морским свинкам контрольной группы вводили эквивалентный объем 0,9 % раствора NaCl. Интенсивность анафилактического шока оценивали на 21 день по 4-балльной системе в индексах по Weigle. При проведении реакции гиперчувствительности “замедленного” типа (ГЗТ) вводили дозу АОЭС, эквивалентную 10 мМ раствора, в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ) в соотношении 1:1. Оценку реакции ГЗТ проводили через 24 ч после разрешающей инъекции тестируемого препарата и рассчитывали индекс реакции (ИР) по формуле:

$$\text{ИР} = (P_o - P_k) / P_k \cdot 100,$$

где P<sub>o</sub> — масса опытной лапы; P<sub>k</sub> — масса контрольной лапы.

Влияние АОЭС на гуморальное звено иммунитета изучали на 30 мышках-самцах линии СВА с массой тела 20–22 г (питомник — филиал “Андреевка” ФГБУН НЦБМТ ФМБА Московской области), разделенных на 3 группы по 10 животных в каждой.

Мышей иммунизировали внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (ЭБ) в оптимальной иммуногенной дозе. АОЭС вводили мышам внутрижелудочно 5-кратно в дозах 10 и 100 мг/кг. На 5 сут после иммунизации животных декапитировали и в суспензии клеток селезенки определяли число АОК методом локального гемолиза в модификации Cunningham, а в сыворотке крови — титр гемагглютининов в реакции гемагглютинации, поставленной в микротетраторе Такачи (Labor, Венгрия). Контрольным животным вводили соответствующее количество 0,9 % раствора NaCl. Влияние экстракта на клеточный иммунитет изучали с помощью реакции ГЗТ на 50 мышках-самцах линии СВА (5 групп по 10 животных в каждой). АОЭС вво-

дили животным однократно внутрибрюшинно в дозах 10 и 100 мг/кг за 1 сут до иммунизации ЭБ (“Д-1”), одновременно с иммунизацией (“Д-0”) и через 24 ч после инъекции антигена (“Д+1”). Контрольные мыши получали внутрибрюшинно в режиме “Д+1” соответствующее количество 0,9 % раствора NaCl. На 5 сут после иммунизации все животные получали субплантарно в заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе  $5 \times 10^8$  клеток на мышшь в объеме 50 мкл (опытная лапа). В подушечку контрлатеральной лапы (контрольная лапа) вводили 50 мкл 0,9 % раствора NaCl. Результаты реакции регистрировали через 24 ч. ИР вычисляли по формуле:

$$\text{ИР} = (P_o - P_k) / P_k \cdot 100,$$

где  $P_o$  — масса опытной лапы,  $P_k$  — масса контрольной лапы.

Исследование потенциальных эмбриотоксических и тератогенных свойств АОЭС проводили при внутрижелудочном введении водного раствора крысам Вистар с 1 по 19 день беременности в дозах 500 и 1250 мг/кг. Контролем служили животные, получавшие эквивалентные объемы водопроводной воды. В течение беременности еженедельно учитывали прирост массы тела беременных крыс. Половину беременных самок умерщвляли под легким эфирным наркозом и вскрывали на 20 день беременности для регистрации пре- и постимплантационной гибели и внешнего осмотра плодов. Вторую половину беременных самок оставляли до естественных родов. Оценивали состояние родившегося потомства с 1 по 30 день жизни, учитывали прирост массы тела, выживаемость, а также скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания в тестах: переворачивание на плоскости (2 день), открытое поле (30 день). Для изучения влияния на генеративную функцию крыс АОЭС вводили в желудок крысам-самкам в течение 15 дней, а крысам-самцам — в течение 60 дней в тех же дозах. После завершения периода введения подопытных животных спаривали с интактными самцами и самками. В качестве контроля служили интактные самки и самцы, скрещенные между собой. Для скрещивания самок подсаживали к самцам в соотношении 2:1 сроком на 2 эстральных цикла. Оплодотворение регистрировали с помощью вагинальных

мазков. Рассчитывали индекс плодовитости и индекс беременности. Половину беременных самок умерщвляли под легким эфирным наркозом и вскрывали на 20 день беременности для регистрации пре- и постимплантационной гибели. Вторую половину оставляли до естественных родов. У полученного потомства учитывали динамику массы тела и гибели до окончания срока вскармливания, а также визуально оценивали физическое развитие крысят (отлипание ушных раковин, покрытие шерстью, открытие глаз и др.).

Статистическую обработку полученных результатов проводили методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента, критерия *U*-Уилкоксона — Манна — Уитни и критерия *F*-Фишера [12]. Достоверность различий с контролем считали при  $p < 0,05$ . Статистические данные обрабатывали с помощью программы Office Excel.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При однократном внутрибрюшинном введении АОЭС мышам и крысам обоего пола в дозах 3000 – 5000 мг/кг выявлена одинаковая картина острого отравления экспериментальных животных, характеризующаяся в основном признаками угнетения центральной нервной системы, ЛД<sub>50</sub> для мышей и крыс установлены на уровне 4100 – 4500 мг/кг. Одно- и двукратное введение в желудок мышам и крысам АОЭС в широком диапазоне доз до 21500 мг/кг не вызывало их гибели, в связи с чем не удалось установить параметры острой токсичности. Указанная доза являлась максимально возможной при введении в желудок экспериментальным животным и являлась ориентировочной ЛД<sub>50</sub> (табл. 1).

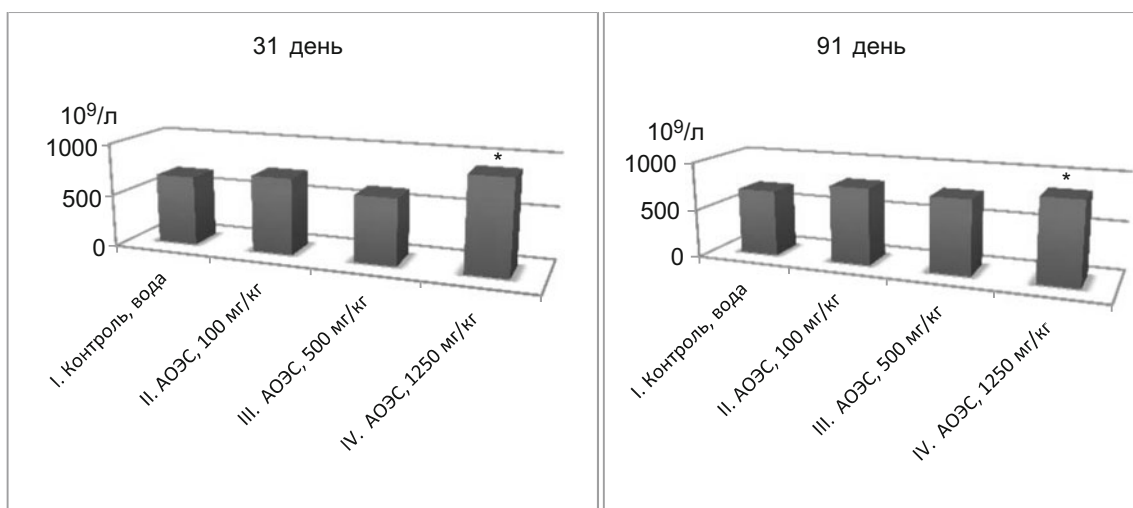
Анализируя полученные данные, можно сделать заключение о том, что по показателям среднесмертельных доз не выявлено статистически достоверных различий в чувствительности лабораторных животных к действию АОЭС в зависимости от вида и пола животных, кроме того, показатели ЛД<sub>50</sub> при введении АОЭС в желудок мышам и крысам возрастают, примерно в 5 раз по сравнению с ЛД<sub>50</sub> при внутрибрюшинном введении, что, по-видимому, свидетельствует о низкой биодоступности изучаемого экстракта.

Таким образом, по величинам средних смертельных доз при однократном внутрибрюшинном и внутрижелудочном способах введения различным видам лабораторных животных АОЭС является малотоксичным веществом по классификации токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТ 12.1.007–76 [4].

В результате длительного 90-дневного введения АОЭС в желудок крысам-самцам и самкам в дозах 100, 500 и 1250 мг/кг не установлено его повреждающего действия на основные интегральные показатели животных (общее состояние, поведение, потребление корма и воды, динамика массы тела) и не отмечено гибели крыс.

Таблица 1. Показатели средних смертельных доз (мг/кг) АОЭС при однократном введении различным видам лабораторных животных ( $M \pm m$ )

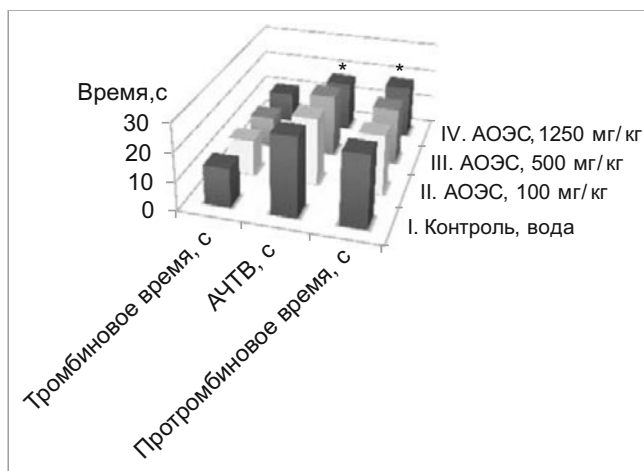
| Вид и пол животных | Способ введения |                 |
|--------------------|-----------------|-----------------|
|                    | внутрибрюшинно  | внутрижелудочно |
| Мыши, самцы        | 4100 ± 290      | более 21500     |
| Мыши, самки        | 4500 ± 320      | более 21500     |
| Крысы, самцы       | 4200 ± 364      | более 21500     |
| Крысы, самки       | 4500 ± 420      | более 21500     |



**Рис. 1.** Количество тромбоцитов ( $10^9/л$ ) в крови крыс-самцов, получавших водный раствор АОЭС в хроническом эксперименте (\*  $p < 0,05$ ).

При исследовании гематологических показателей периферической крови: количество эритроцитов, лейкоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, среднее содержание и концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцитов у крыс-самцов и самок II – IV групп не имело статистически достоверных различий с контролем, за исключением статистически достоверного увеличения количества тромбоцитов в группе крыс-самцов, получавших экстракт в дозе 1250 мг/кг на 31 и 91 дни хронического опыта (рис. 1).

Исследование длительного влияния АОЭС в дозах 100 и 500 мг/кг на систему плазменного гемостаза крыс-самцов и самок не установило изменений показателей в плазме крови по сравнению с контролем. Введение АОЭС в дозе 1250 мг/кг вызывало в конце хронического эксперимента статистически значимое укорочение протромбинового времени и активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ) у крыс-самцов, а у крыс-самок – укорочение АЧТВ, протромбинового времени и увеличение содержания фибриногена в плазме по сравнению с контролем, что свидетельствует о нарушении реологических свойств крови экспериментальных животных в результате длительного введения АОЭС в указанной дозе (рис. 2 и 3).



**Рис. 2.** Показатель свертывающей системы крыс-самцов, получавших водный раствор АОЭС в хроническом эксперименте (\*  $p < 0,05$ ).

Исследование ряда биохимических показателей (общий белок, альбумины, общий холестерин, триглицериды, общий билирубин, глюкоза, мочевины, креатинин, концентрация ионов  $Na^+$  и  $K^+$ ), а также активности некоторых ферментов сыворотки крови (ала-

**Таблица 2.** Активность ферментов сыворотки крови крыс-самцов, получавших водный раствор АОЭС в хроническом эксперименте (\*  $p < 0,05$ ) ( $M \pm m$ )

| Группа животных      | Исследуемый показатель, $M \pm m$ |                            |                         |                                     |                    |
|----------------------|-----------------------------------|----------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--------------------|
|                      | аланин-трансаминаза, Е/л          | аспартат-трансаминаза, Е/л | щелочная фосфатаза, Е/л | $\gamma$ -глутамил-трансфераза, Е/л | альфа-амилаза, Е/л |
| I. Контроль, вода    | $65 \pm 4$                        | $124 \pm 5$                | $757 \pm 88$            | $2,6 \pm 0,5$                       | $2109 \pm 393$     |
| II. АОЭС, 100 мг/кг  | $64 \pm 4$                        | $115 \pm 7$                | $688 \pm 61$            | $6,4 \pm 1,5$                       | $1923 \pm 242$     |
| III. АОЭС, 500 мг/кг | $74 \pm 4$                        | $10^8 \pm 4$               | $894 \pm 85$            | $4,5 \pm 1,4$                       | $1934 \pm 162$     |
| IV. АОЭС, 1250 мг/кг | $53 \pm 6$                        | $118 \pm 6$                | $1172 \pm 107^*$        | $6,9 \pm 1,2^*$                     | $2090 \pm 317$     |

\* Здесь и в табл. 3 – 7 достоверность различий с контролем (\*  $p < 0,05$ ).

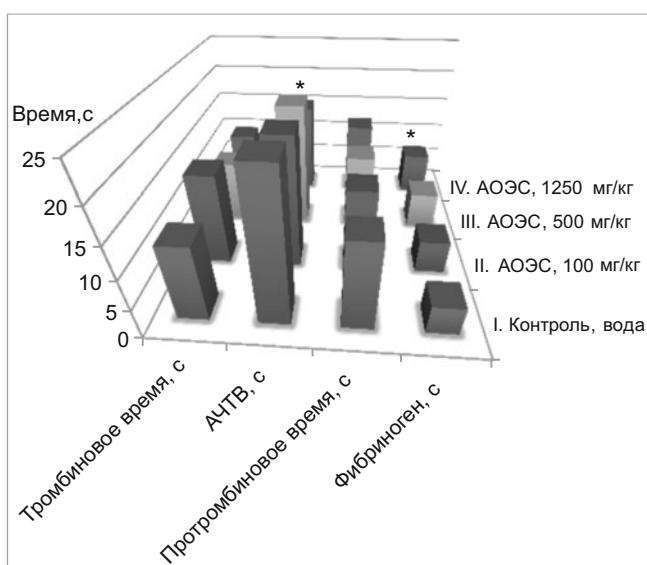


Рис. 3. Показатели свертывающей системы крыс-самок, получавших водный раствор арники экстракта в хроническом эксперименте (\*  $p < 0,05$ ).

нин- и аспартаттрансаминазы, альфа-амилазы, щелочной фосфатазы и  $\gamma$ -глутамилтрансферазы), характеризующих функциональное состояние печени, почек, поджелудочной железы и сердечно-сосудистой системы экспериментальных животных, показало, что длительное введение АОЭС в дозах 100 и 500 мг/кг не влияло на указанные показатели крыс – самцов и самок. В условиях хронического эксперимента АОЭС в дозе 1250 мг/кг нарушал функциональное состояние печени экспериментальных животных, вызывая статистически значимое увеличение активности щелочной фосфатазы и  $\gamma$ -глутамилтрансферазы у крыс-самцов (91 день) и у крыс-самок (31 день), по сравнению с контролем (табл. 2).

Исследование функционального состояния почек крыс-самцов в условиях водной нагрузки показало, что под действием АОЭС в дозе 1250 мг/кг в течение всего хронического опыта наблюдали относительное увеличение суммарного диуреза крыс за 5 ч проведения пробы с  $(94,5 \pm 13,6) \%$  в контроле до  $(123,1 \pm 10,0) \%$ . При длительном введении АОЭС в желудок крысам-самкам в дозах 500 и 1250 диуретическое действие экстракта в исследуемые сроки было

более выражено и коррелировало со снижением уровня креатинина и концентрации ионов  $\text{Na}^+$  в сыворотке крови животных (рис. 4, 5).

Исследование функционального состояния сердечно-сосудистой системы (ЭКГ-исследование) крыс обоего пола не выявило кардиотоксического действия АОЭС в исследуемых дозах при длительном введении в желудок экспериментальным животным.

АОЭС у крыс-самцов и самок во всех испытанных дозах в тесте “открытое поле” вызывал снижение ориентировочных реакций (вертикальный компонент, “норковый” рефлекс и двигательная активность), особенно выраженное у крыс-самцов по сравнению с контролем, что может быть расценено как проявление седативного действия экстракта (табл. 3, 4).

Патогистологические исследования внутренних органов крыс-самцов и самок, получавших в течение 90 дней в желудок АОЭС в дозах 100 и 500 мг/кг, не установили токсического эффекта экстракта и раздражающего действия на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта животных. У крыс-самцов исследуемый экстракт в дозе 1250 мг/кг проявлял гепато- и нефротоксическое действие, выражающееся в умеренной зернистой дистрофии гепатоцитов и гипертрофии отдельных почечных клубочков, а также вызывал гиперплазию фолликулов селезенки и множество сидерофагов в ее артерии (рис. 6, а, б). У крыс-самок исследуемый экстракт в максимальной дозе вызывал лишь незначительную гипертрофию отдельных клубочков почек. В максимальной испытанной дозе 1250 мг/кг АОЭС раздражал слизистую желудочно-кишечного тракта крыс-самцов и самок.

Таким образом, в результате изучения общетоксического действия АОЭС установлено, что его длительное введение внутрь крысам в дозе 1250 мг/кг вызывало увеличение количества тромбоцитов в периферической крови, укорочение протромбинового и АЧТВ времени и увеличение содержания фибриногена в плазме крови и сидерофагов в артерии селезенки. Полученные изменения могут свидетельствовать о повышении риска внутрисосудистого свертывания крови. Во всех испытанных дозах экстракт обладал седативным эффектом, а в дозе 1250 мг/кг вызывал умеренное диуретическое действие. АОЭС в максимальной испытанной дозе проявлял гепато- и нефротоксичность, а так-

Таблица 3. Показатели функционального состояния ЦНС (в течение 3 мин) крыс-самцов, получавших водный раствор АОЭС, в хроническом эксперименте ( $M \pm m$ )

| Группа животных     | Исследуемый показатель |                        |                              |               |                 |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|---------------|-----------------|
|                     | “норковый” рефлекс     | вертикальный компонент | число пересекаемых квадратов | груминг       | дефекация       |
| I. Контроль, вода   | $6,8 \pm 1,2$          | $2,4 \pm 0,3$          | $4,9 \pm 1,0$                | $1,5 \pm 0,5$ | $2,5 \pm 0,5$   |
| II. АОЭС, 100 мг/кг | $5,0 \pm 0,5$          | $1,1 \pm 0,3^*$        | $1,5 \pm 0,5^*$              | $1,9 \pm 0,5$ | $1,7 \pm 0,4$   |
| III. АОЭС 500 мг/кг | $3,9 \pm 1,0$          | $1,2 \pm 0,3^*$        | $1,6 \pm 0,3^*$              | $2,0 \pm 0,8$ | $0,9 \pm 0,3^*$ |
| IV. АОЭС 1250 мг/кг | $3,0 \pm 0,5^*$        | $1,2 \pm 0,3^*$        | $1,5 \pm 0,2^*$              | $1,7 \pm 0,5$ | $1,0 \pm 0,4^*$ |

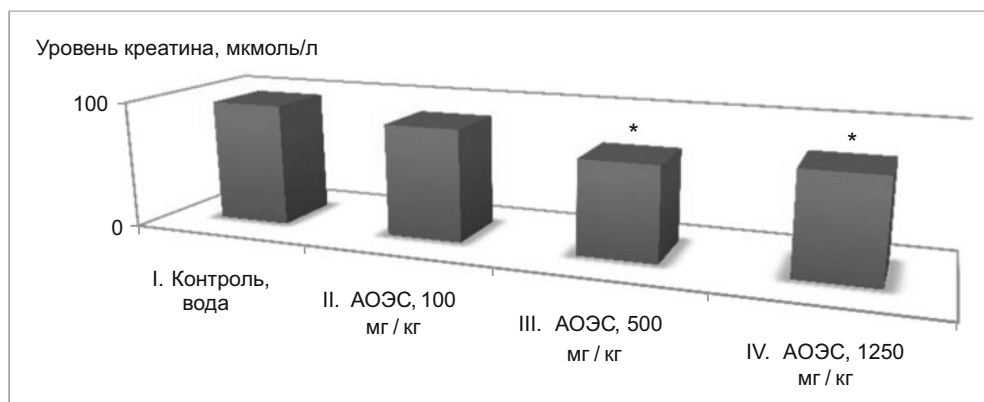


Рис. 4. Уровень креатинина в сыворотке крови (мкмоль/л) крыс-самок, получавших водный раствор АОЭС в хроническом эксперименте (\*  $p < 0,05$ ).

же раздражал слизистую желудочно-кишечного тракта крыс.

При изучении потенциальных алергизирующих свойств АОЭС на морских свинках-альбиносах показано, что в тесте реакции общей анафилаксии не выявлено признаков анафилактического шока ни у одного животного в опытных группах.

В тесте активной кожной анафилаксии не установлено достоверных различий в размерах пятен у животных опытных групп по сравнению с контрольной, т.е. реакция активной кожной анафилаксии — отрицательная (табл. 5).

В тесте реакции гиперчувствительности замедленного типа показано, что сенсибилизация животных АОЭС не потенцировала индекс реакции ГЗТ, который не имел статистически достоверных различий с аналогичным показателем животных контрольной группы:  $0,50 \pm 0,060$  (опыт) и  $0,70 \pm 0,050$  (контроль).

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о том, что АОЭС не вызывал признаков развития системной и активной кожной анафилаксии, а также не потенцировал реакцию ГЗТ у мышей, т.е. не проявлял алергенности.

При исследовании влияния на процессы антителообразования установлено, что исследуемый экстракт в дозе 100 мг/кг увеличивал число антителообразующих клеток (АОК) селезенки, как в абсолютных значениях, так и на  $10^6$  спленоцитов, а также повышал обратный

титр геагглютининов в сыворотке крови экспериментальных животных по сравнению с контролем (табл. 6).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что АОЭС в дозе 100 мг/кг умеренно стимулировал гуморальное звено иммунитета экспериментальных животных.

При исследовании влияния АОЭС на клеточно-опосредованную реакцию ГЗТ установлено, что исследуемый экстракт не потенцировал индекс реакции ГЗТ у мышей линии СВА в дозах 10 и 100 мг/кг при различных схемах его введения (табл. 7), то есть не влиял на эффекторы клеточного звена иммунитета мышей.

Введение АОЭС крысам-самкам с 1 по 19 день беременности в дозах 500 и 1250 мг/кг не влияло на динамику их массы тела и внутриутробную гибель плодов. АОЭС в исследуемых дозах не оказывал повреждающего действия на состояние внутренних органов эмбрионов, но в максимальной испытанной дозе 1250 мг/кг замедлял скорость окостенения хрящевых закладок костей плюсны 20-дневных плодов.

При исследовании потомства в постнатальном периоде развития в течение 30 дней не установлено влияния АОЭС в дозах 500 и 1250 мг/кг на количество новорожденных крысят в помете, массу их тела и смертность, физическое развитие и функциональное состояние ЦНС по ориентировочным реакциям.

Таблица 4. Показатели функционального состояния ЦНС (в течение 3 мин) крыс-самок, получавших водный раствор АОЭС, в хроническом эксперименте ( $M \pm m$ )

| Группа животных      | Исследуемый показатель |                        |                              |                 |               |
|----------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|-----------------|---------------|
|                      | “норковый” рефлекс     | вертикальный компонент | число пересекаемых квадратов | груминг         | дефекация     |
| I. Контроль, вода    | $11,7 \pm 2,1$         | $1,6 \pm 0,2$          | $12,5 \pm 2,8$               | $2,7 \pm 0,4$   | $1,4 \pm 0,6$ |
| II. АОЭС, 100 мг/кг  | $12,5 \pm 0,7$         | $0,8 \pm 0,2$          | $8,8 \pm 1,1$                | $2,1 \pm 0,5$   | $1,9 \pm 0,4$ |
| III. АОЭС, 500 мг/кг | $10,6 \pm 1,5$         | $0,4 \pm 0,2^*$        | $7,9 \pm 1,2$                | $3,0 \pm 0,5$   | $3,0 \pm 0,3$ |
| IV. АОЭС, 1250 мг/кг | $6,8 \pm 0,6$          | $0,2 \pm 0,2^*$        | $4,9 \pm 1,4^*$              | $1,7 \pm 0,2^*$ | $1,2 \pm 0,4$ |

\*  $p < 0,05$ .

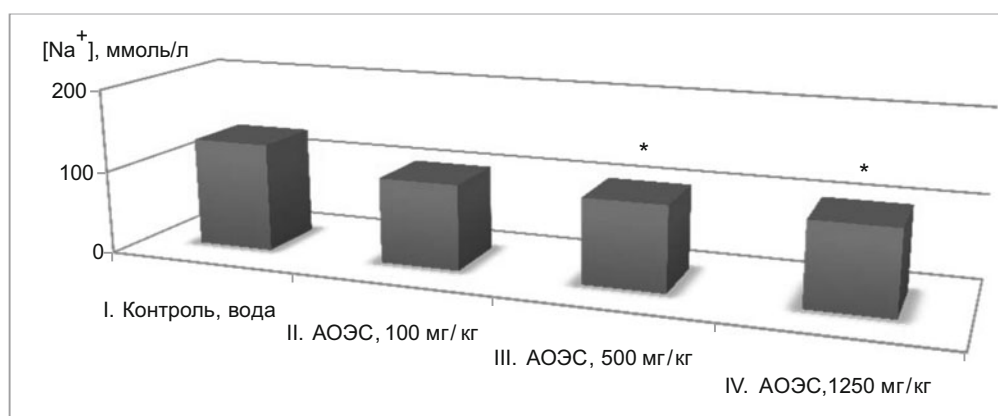


Рис. 5. Концентрация ионов Na<sup>+</sup> в сыворотке крови (ммоль/л) крыс-самок, получавших водный раствор АОЭС в хроническом эксперименте (\*  $p < 0,05$ ).

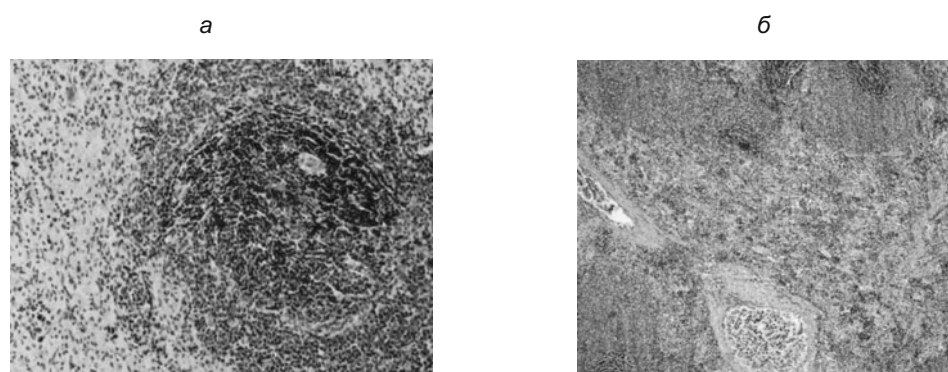


Рис. 6. Селезенка крыс-самцов: а — контроль, б — получавших водный раствор АОЭС в хроническом эксперименте, доза 1250 мг/кг (размытые границы фолликулов, в артерии — множество сидерофагов). Окраска гематоксилином и эозином, ув.  $\times 100$ .

Исследование генеративной функции крыс-самцов и самок, получавших АОЭС в исследуемых дозах, не выявило его повреждающего действия на способность к зачатию и оплодотворению подопытных животных.

Таблица 5. Размер окрашенных пятен кожи морских свинок, сенсibilизированных водным раствором АОЭС в реакции активной кожной анафилаксии ( $M \pm m$ )

| Группа животных         | Размер окрашенного пятна, мм <sup>2</sup> |
|-------------------------|---|
| I. Контроль, 0,9 % NaCl | 4,1 $\pm$ 0,5                             |
| II. АОЭС, 10 мг/кг      | 3,2 $\pm$ 0,3                             |
| III. АОЭС, 100 мг/кг    | 2,9 $\pm$ 0,4                             |

## ВЫВОДЫ

1. При однократном внутрибрюшинном и внутрижелудочном введении мышам, крысам АОЭС относится к классу малотоксичных веществ.

2. В условиях хронического эксперимента при 90-дневном введении водного раствора АОЭС в желудок крысам обоего пола в дозах 100, 500 и 1250 мг/кг выявлено, что по общетоксическому действию пороговой является доза 500 мг/кг.

3. По ориентировочным реакциям в тесте "открытое поле" исследуемый экстракт в дозах 500 и 1250 мг/кг при 90-дневном введении в желудок крысам-самцам и самкам проявлял седативное действие,

Таблица 6. Показатели гуморального иммунного ответа у мышей линии СВА при 5-дневном внутрижелудочном введении водного раствора АОЭС ( $M \pm m$ )

| Группа животных, доза           | Показатели иммунного ответа            |   |                               |
|---------------------------------|--|---|-------------------------------|
|                                 | абсолютное число АОК на одну селезенку | количество АОК на 10 <sup>6</sup> спленоцитов | обратный титр гемагглютининов |
| I. Контроль, 0,9 % раствор NaCl | 32100 $\pm$ 2700                       | 305,0 $\pm$ 22,0                              | 68,8 $\pm$ 7,4                |
| II. АОЭС, 10 мг/кг              | 34172 $\pm$ 3020                       | 312,7 $\pm$ 12,0                              | 73,6 $\pm$ 10,4               |
| III. АОЭС, 100 мг/кг            | 41485 $\pm$ 2725*                      | 377,4 $\pm$ 27,0                              | 89,1 $\pm$ 7,6                |

Таблица 7. ИР гиперчувствительности замедленного типа у мышей линии СВА при различных схемах введения водного раствора АОЭС ( $M \pm m$ )

| Группа животных, доза               | ИР         |
|-------------------------------------|------------|
| I. Контроль, 0,9 % NaCl, день "+ 1" | 30,8 ± 4,1 |
| II. АОЭС 10 мг/кг, день "- 1"       | 31,4 ± 2,2 |
| III. АОЭС 100 мг/кг, день "- 1"     | 32,7 ± 2,6 |
| IV. АОЭС 10 мг/кг, день "+ 1"       | 34,6 ± 3,0 |
| V. АОЭС 100 мг/кг, день "+ 1"       | 30,4 ± 2,0 |

статистически достоверно снижая "норковый" рефлекс и двигательную активность подопытных животных в 2 и 3 раза, по сравнению с контролем ( $p < 0,05$ ).

4. Длительное введение водного раствора АОЭС в желудок крысам в дозе 1250 мг/кг повышало риск внутрисосудистого свертывания крови, вызывая статистически достоверное ( $p < 0,05$ ) увеличение количества тромбоцитов в периферической крови на 35 и 24 %, укорочение протромбинового и АЧТВ времени на 35 и 37 % (крысы-самцы) и увеличение содержания фибриногена в плазме крови на 39 % (крысы-самки), а также сидерофагов в артерии селезенки по сравнению с контролем.

5. Водный раствор АОЭС в дозе 1250 мг/кг проявлял гепато- и нефротоксичность, а также раздражал слизистую желудочно-кишечного тракта крыс.

6. Водный раствор арники экстракта не вызывал признаков развития системной и активной кожной анафилаксии, а также не потенцировал реакцию ГЗТ у мышей, т.е. не проявлял аллергизирующих свойств.

7. Водный раствор АОЭС в дозе 100 мг/кг оказывал умеренное стимулирующее действие на гуморальное звено иммунитета мышей линии СВА в условиях антигенной нагрузки, увеличивая количество АОК селезенки на 29 % по сравнению с контролем (при  $p < 0,05$ ) и не влиял на клеточное звено иммунитета.

8. Водный раствор АОЭС в максимальной испытанной дозе 1250 мг/кг замедлял скорость окостенения

хрящевых закладок костей плюсны 20-дневных плодов. В испытанных дозах исследуемый экстракт не оказывал повреждающего действия на генеративную функцию крыс-самцов и самок.

## ЛИТЕРАТУРА

1. А. Ф. Азаркова, В. Н. Давыдова, А. Е. Бутова и др., *Тр. ВИЛАР. Химия, технология и медицина*, Москва (2000), сс. 50 – 53.
2. А. И. Багинская, Т. Е. Лескова, Ю. А. Леонидова и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 1, 189 – 195 (2012).
3. М. В. Балакина, В. Ф. Охотникова, Т. В. Качалина и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 1, 139 – 143 (2012).
4. И. В. Березовская, *Хим.-фарм. журн.*, **37**(3), 32 – 34 (2003).
5. В. В. Бортникова, Л. В. Крепкова, Н. С. Михеева, В. Б. Гнутов, *Тез. докл. XXI Российского нац. конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (2014).
6. В. В. Бортникова, Л. В. Крепкова, Н. С. Михеева, *Тез. докл. XIX Российского нац. конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (2012).
7. В. В. Бортникова, Л. В. Крепкова, Н. С. Михеева, В. Ф. Охотникова, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 3, 3 – 9 (2014).
8. А. Е. Бутова, А. Ф. Азаркова, В. Н. Давыдова и др., *III Российский нац. конгресс "Человек и лекарство"*, Тез. докл., Москва (1996).
9. В. Н. Давыдова, *Автореф. дис. докт. фарм. наук*, Москва (2002).
10. Р. И. Евстратова, В. И. Шейченко, К. С. Рыбалко, А. И. Баньковский, *Поиски новых БАВ*, Москва (1970).
11. Т. В. Качалина, *Тез. Докл. XI Российского нац. конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (2004).
12. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Москва (1990), сс. 113 – 130.
13. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Гриф и К, Москва (2012), сс. 13 – 80.
14. К. А. Потрясай, А. А. Маркарян, А. Ф. Азаркова, *Вопр. биол., мед. и фарм. химии*, № 9, 44 – 47 (2010).
15. Н. П. Скакун, С. М. Марчишин, *Фармакол. и токсикол.*, 11, (1984).
16. J. Merftort, D. Wendisch, *Planta Med.*, **7**, 434 – 437 (1987).
17. J. Merftort, *Planta Med.*, **54**(6), 571 (1988).
18. J. Merftort, *Planta Med.*, **55**(7), 608 – 609 (1988).

Поступила 29.04.19

## PRECLINICAL STUDY OF THE SAFETY OF LEAFY ARNICA (*ARNICA FOLIOSA* NUTT.) DRY EXTRACT

V. V. Bortnikova<sup>1</sup>, L. V. Krepkova<sup>1\*</sup>, N. S. Mikheeva<sup>2</sup>, and M. V. Borovkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> All-Russia Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (VILAR), ul. Grina 7, Moscow, 117216 Russia

<sup>2</sup> Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Ministry of Public Health of the Russian Federation, Petrovskii bul. 8/2, Moscow, 127051 Russia

\* e-mail: krepkova2011@yandex.ru

A preclinical study of the safety of *Arnica foliosa* (Nutt.) dry extract originally obtained in VILAR (Moscow) was conducted. The extract showed low toxicity upon single injection in laboratory animals with LD<sub>50</sub> p.o. in rats above 21.5 g/kg. In long-term (90 days) introduction p.o. to both rat males and females, the extract in a dose of 1250 mg/kg (1/17 LD<sub>50</sub> p.o.) caused an increase in platelet count of rats, and shortening of APTT and prothrombin time, indicating violation of the blood rheology and increased risk of intravascular coagulation. In the tested doses of 100, 500 and 1250 mg/kg, Arnica extract showed sedative effect. For a long-term administration p.o. in male rats at the maximum test dose, the extract caused hepato- and nephrotoxicity, as well as irritated mucous membranes of the gastrointestinal tract. Dry Arnica extract in a dose of 100 mg/kg (10 times the effective dose in the experiment) stimulated humoral immunity and did not influence the effectors of cellular immunity of CBA line mice. The studied extract showed allergenic properties neither in total systemic and active skin anaphylactic shock, nor in delayed type hypersensitivity tests. In the study of reprotoxicity, dry Arnica extract slowed evidence of the ossification of cartilage bookmarks metatarsus in 20-day fetuses when administered to females from the 1st to 19th day of pregnancy at a dose of 1250 mg/kg, therefore, it should not be prescribed during pregnancy.

**Keywords:** preclinical toxicological study; *Arnica foliosa* Nutt.; dry extract; intravascular coagulation; hepatotoxicity; nephrotoxicity.