

А. С. Саратиков, Н. С. Лившиц, Ф. И. Бурченкова, Н. Г. Кадыхагова,  
Т. П. Новожеева, Р. Р. Ахмеджанов, Т. В. Перевозчикова, Л. В. Баширова

## ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ЭПЛИРА

Сибирский медицинский университет, Томск

Проведена доклиническая токсикологическая оценка нового гепатопротекторного средства эплира. Препарат по показателям острой токсичности относится к мало опасным; при 6-месячном введении в дозах 30, 150 и 300 мг/кг крысам и 100 мг собакам не вызывает существенных функциональных и структурных нарушений в органах и системах животных. Эплир не обладает мутагенными, канцерогенными, аллергизирующими и иммунотоксическими свойствами, не влияет на репродуктивную функцию.

**Эплир** (аббревиатура английских слов extract polar lipids rock) — очищенная полярная фракция высокоминерализованных илово-сульфидных осадков озер Западной Сибири. Препарат получен в лаборатории геохимии НИИ химии нефти ТНЦ СО РАН и экспериментально изучен на кафедрах фармакологии и фармацевтической технологии Сибирского государственного медицинского университета. Представляет собой порошок темно-коричневого цвета со специфическим бальзамическим запахом, не растворяется в воде, частично растворяется в гексане, бензоле, этаноле, диэтиловом эфире, растительных маслах, хорошо растворяется в хлороформе и диметилсульфоксиде. В состав эплира входят фосфолипиды (20 %), каротиноиды (8 %), сульфолипиды (2 %), тиоцикланы (7 %), тиоалканы (5 %). Среди фосфолипидов идентифицированы фосфатидилхолин (11 %), фосфатидилэтаноламин (3 %), кислые глицерофосфатиды (6 %). Преобладающим пигментом является  $\beta$ -каротин, остальные каротины (9-*цис*-каротин,  $\alpha$ -каротин и зеакаротин) обнаружены в незначительных количествах. Является эффективным гепатопротективным и противовоспалительным средством [1 – 7]. Рекомендован ФГК МЗ России к медицинскому применению. Зарегистрирован Министерством здравоохранения России в качестве БАД к пище.

Целью настоящей работы явилось изучение острой и хронической токсичности эплира, оценка его мутагенной и канцерогенной активности, влияния на репродуктивную функцию, аллергизирующих и иммунотоксических свойств.

### Материалы и методы

Токсичность препарата (в форме суспензии на 1 % крахмальном геле) определяли на беспородных животных обоего пола: острую — на белых мышках массой 18 – 20 г, крысах массой 200 – 220 г и кроликах массой 1,6 – 2,3 кг, хроническую — на крысах с исходной массой 160 – 200 г и собаках массой 5 – 7 кг, содержащихся в стандартных условиях вивария [8]. Каждая экспериментальная группа состояла из 10 крыс и 4 собак. Препарат вводили ежедневно в течение 6 месяцев внутрь: крысам в эффективной (30 мг/кг), средней (150 мг/кг) и субтоксической

(300 мг/кг) дозах, собакам — 100 мг на животное (в виде таблеток). Крысы контрольной группы получали эквивалентное количество растворителя. О степени хронической токсичности эплира судили по общему состоянию животных, динамике массы тела, показателям периферической крови (гемоглобин, эритроциты, ретикулоциты, лейкоциты, лейкограмма, СОЭ), функциональному состоянию ЦНС (суммационно-пороговый показатель и исследовательское поведение в тесте “открытое поле”), сердца (ЭКГ во II стандартном отведении), печени (проба с нагрузкой бромсульфалеином, содержание в сыворотке крови аланин- и аспартатаминотрансфераз, щелочной фосфатазы; содержание в ткани печени цитохрома Р-450, активность амидопирин-N-деметилазы и анилин-*p*-гидроксилазы), почек (суточный диурез, рН мочи, содержание в моче глюкозы, белка, креатинина). Исследуемые показатели регистрировали до введения препарата (фон), через 1, 3 и 6 мес эксперимента. Затем после последнего введения препарата животных забивали в 2 срока: через 24 ч и через 2 нед (отдаленный результат); органы и ткани подвергли патологоанатомическому исследованию.

Эмбриотоксичность и тератогенность эплира оценивали по результатам изучения антенатального и постнатального развития потомства, а также репродуктивной активности крыс (самцов и самок) [8]. Влияние препарата на антенатальное развитие проверено на 122 беременных беспородных крысах. Препарат вводили в желудок в субтоксической дозе 300 мг/кг с 1 по 19 день беременности; по 30 мг/кг (эффективная доза) и 150 мг/кг (промежуточная доза) с 6 по 16 день беременности. Животные контрольной группы получали в те же сроки эквивалентное количество растворителя. После эвтаназии на 20 день беременности изучали репродуктивные органы самок и плоды. Критерием повреждающего действия препарата служили пред- и постимплантационная летальность, масса и длина плодов, масса плаценты, аномалии развития внутренних органов, состояние костной системы. Воздействие на постнатальное развитие оценивали при изучении потомства от 12 самок, получавших в течение всего периода беременности эпир в дозе 300 мг/кг.

Влияние препарата в дозе 300 мг/кг на репродуктивную функцию оценивали на 28 самцах (введение в

течение 60 дней до скрещивания с интактными самками) и 58 самках (введение в течение 15 дней до скрещивания с интактными самцами) [8].

Для оценки мутагенной активности препарата учитывали генные мутации на индикаторных бактериях (штаммы *Salmonella typhimurium* TA 100, TA 98, TA 1537, TA 1950 и TA 1534) в тесте Эймса — *Salmonella*/микросомы, хромосомные aberrации в клетках костного мозга мышей, доминантные летальные мутации у мышей [8].

Аллергезирующие свойства определяли на беспородных белых мышках-самцах массой 20 – 22 г и морских свинках массой 250 – 300 г. Сенсибилизацию организма оценивали *in vitro* по дегрануляции тучных клеток, получаемых из перитонеального экссудата мышей, которым в желудок вводили эплир в дозах 30 и 300 мг/кг в течение 10 дней. Для оценки реакций гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) определяли влияние препарата на Т-предшественники и Т-эффекторы ГЗТ. В первом случае сенсибилизацию организма проводили одновременно с последним введением препарата путем подкожной инъекции взвеси эритроцитов в количестве 0,1 мл. Разрешающую дозу антигена вводили в подушечки задних лап через 5 сут после сенсибилизации организма. Для определения влияния эплира на зрелые клетки-эффекторы ГЗТ его вводили в дозе 300 мг/кг однократно одновременно с инъекцией разрешающей дозы антигена. Влияние препарата на развитие реакции гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) оценивали по воспроизведению реакции общей анафилаксии на морских свинках после введения им эплира в дозах 60 и 600 мг/кг в течение 10 дней; в качестве антигена использовали бычий сывороточный альбумин [8].

Иммуноксические свойства эплира исследовали в экспериментах на крысах-самцах, которым вводили в желудок препарат в дозе 300 мг/кг ежедневно в течение 6 месяцев. О степени естественной резистентности организма судили по титру гетерогемагглютининов с эритроцитами барана в сыворотке крови, содержанию В-лимфоцитов в периферической крови, числу нормальных антителообразующих клеток селезенки, содержанию в перитонеальном экссудате мононуклеаров, экспрессирующих  $F_{cy}$ -рецепторы. Определяли цитотоксичность клеток селезенки, тимуса, перитонеального экссудата [8, 9].

Результаты обработаны методами вариационной статистики с применением параметрических и непараметрических критериев [10].

### Результаты и их обсуждение

Эплир при однократном введении в желудок и внутрибрюшинно в дозах до 7000 мг/кг не вызывает гибели мышей, крыс и кроликов в течение 2 недель наблюдения. У животных не нарушается координация движений, сохраняются рефлексы, не происходит угнетения дыхания. Выраженной видовой и половой чувствительности к нему не выявлено.

При введении субстанции эплира крысам в желудок в течение 6 мес в дозах 30, 150, 300 мг/кг не наблюдается гибели животных, существенных изменений общего состояния (поведение, аппетит, выделения, шерсть, слизистые), массы тела, показателей периферической крови по сравнению с животными контрольной группы. Препарат не вызывает значительных сдвигов со стороны ЭКГ и ритма сердечных сокращений, функционального состояния ЦНС, определяемого по тестам сумационно-порогового показателя и “открытого поля”.

Судя по коэффициенту ретенции бромсульфалеина, активности в сыворотке крови аминотрансфераз, эплир не оказывает неблагоприятного воздействия на функциональное состояние печени; препарат не вызывает существенных изменений содержания в печени цитохрома Р-450, активности амидопирин-N-деметилазы и анилин-р-гидроксилазы. У крыс, получавших эплир, отсутствуют изменения со стороны функции почек, сохраняется нормальный суточный диурез, близкие к норме значения рН мочи, уровень белка и креатинина колеблется в пределах физиологической нормы для крыс.

В экспериментах на собаках эплир в дозе 100 мг на животное не вызывает отклонений в поведении животных и показателях периферической крови.

При патоморфологическом исследовании крыс и собак не обнаружено патологических отклонений, обусловленных токсическим действием препарата, в паренхиматозных органах (печень, почки, легкие, сердце), во всех отделах желудочно-кишечного тракта, железах внутренней секреции (гипофиз, щитовидная железа, надпочечники, поджелудочная железа), кровеносных и иммунокомпетентных органах (костный мозг, селезенка, тимус, лимфатические узлы).

Таким образом, эплир при длительном (6 месяцев) курсе введения является малотоксичным препаратом. Используемые в экспериментах дозы превышают рекомендуемые для человека на 1 кг массы при введении крысам в 21 – 210 раз, собакам — в 11 раз.

Эплир при введении в желудок крысам в различные сроки беременности не проявляет эмбриотоксических и тератогенных свойств: не влияет на продолжительность беременности, пре- и постимплантационную гибель эмбрионов, количество желтых тел, мест имплантаций и живых плодов, их массу и краниокаудальный размер. У эмбрионов, подвергшихся в антенатальном периоде воздействию эплира, не отмечено уродств или пороков развития внутренних органов, а также аномалий развития скелета.

Во всех испытанных дозах препарат не влияет на число родившихся крысят, их массу, размеры, а также на смертность в течение первых 2 мес постнатального развития. Препарат не нарушает репродуктивную функцию самцов и самок, напротив, отмечается снижение предимплантационной летальности. Число желтых тел, мест имплантаций, живых плодов, индекс беременности, число резорбций на одну самку оказались на уровне контрольных величин. Гистологиче-

ский анализ репродуктивных органов самцов и самок не выявил каких-либо морфологических изменений по сравнению с контролем. Следовательно, эплир не обладает эмбриотоксическими и тератогенными свойствами.

Исследование мутагенной активности эплира в тестах на *Salmonella* методом прямого контакта и с метаболической активацией *in vitro* (концентрации препарата до 10000 мкг/мл) и *in vivo* (с использованием беспородных мышей-самцов в качестве промежуточного хозяина) в дозе 5000 мг/кг свидетельствует об отсутствии мутагенного эффекта препарата и продуктов его метаболизма. Учет хромосомных aberrаций клеток костного мозга мышей линии СВА через 6 и 24 ч после введения эплира в желудок в дозе 1000 мг/кг не выявил статистически достоверных, по отношению к контролю, изменений числа клеток с цитогенетическими нарушениями. Оценка доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей линии СВА по уровню постимплантационных потерь также не обнаружила повреждающего действия препарата на генетические структуры половых клеток животных — эплир в дозе 5000 мг/кг не влияет на количество эмбрионов, остановившихся в развитии на стадиях поздних и ранних сперматид. Следовательно, эплир не обладает мутагенными свойствами. С этим выводом согласуются результаты изучения канцерогенных свойств эплира, проведенные в лаборатории природных канцерогенов Онкологического научного центра РАМН. Хронические эксперименты на мышцах-гибридах линии F<sub>1</sub>[СВА × С<sub>57</sub>Bl/6] (19 месяцев) и крысах Вистар (24 месяца) свидетельствуют об отсутствии у препарата (в дозах 30 и 150 мг/кг) канцерогенных свойств. Напротив, при спонтанных новообразованиях у крыс имеет место дозо-зависимая тенденция к снижению частоты гемобластозов, опухолей молочных желез и печени.

Эплир не оказывает алергизирующего действия. В исследованных дозах препарат не влияет на реакцию ГЗТ, не изменяет показатель дегрануляции тучных клеток, ослабляет проявления реакции ГНТ.

Эплир (300 мг/кг в желудок в течение 6 месяцев) не оказывает токсического влияния на функциональное

состояние клеток иммунокомпетентных органов (не изменял содержание лейкоцитов и В-лимфоцитов в периферической крови, не влияет на титр нормальных гетерогемагглютининов в сыворотке), способствует усилению миграции клеточных элементов (снижает количество ядросодержащих клеток в селезенке, увеличивая их уровень в перитонеальном экссудате и не влияя на число кариоцитов в тимусе), стимулирует экспрессию F<sub>cy</sub>-рецепторов на моноклеарах перитонеального экссудата и повышает содержание в них лизо-сом.

Таким образом, доклиническое токсикологическое исследование эплира свидетельствует, что препарат обладает малой токсичностью как при однократном введении в желудок и внутрибрюшинно лабораторным животным разных видов, так и при длительном в течение 6 мес введении в желудок крысам и собакам. Эплир не проявляет мутагенных, канцерогенных, эмбриотоксических, тератогенных, иммунотоксических и алергизирующих свойств.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Э. И. Белобородова, В. Н. Буркова, А. И. Венгеровский и др., *Сибир. ж. гастроэнтерологии и гепатологии*, **1**(6), 291 – 292 (1998).
2. Г. Ф. Большаков, А. С. Саратиков, Е. Я. Матис и др., А. с. СССР № 1260005 “Способ получения биологически активных веществ, обладающих гепатозащитным действием” (1986).
3. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, *Экспер. и клин. фармакол.*, **58**(1), 8 – 11 (1995).
4. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, *Бюл. exper. биол.*, **127**(4), 392 – 394 (1999).
5. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, Н. О. Батурина, В. С. Чучалин, *Экспер. и клин. фармакол.*, **59**(1), 24 – 26 (1996).
6. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, О. В. Паульс, И. М. Седых, *Фармакол. и токсикол.*, **53**(5), 42 – 45 (1990).
7. А. С. Саратиков, А. И. Венгеровский, И. М. Седых, *Фармакол. и токсикол.*, **53**(2), 38 – 40 (1990).
8. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000).
9. *Методические рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств*, Москва (1992).
10. Г. Ф. Лакин, *Биометрия*, Москва (1980).

Поступила 15.09.03.

## PRECLINICAL TOXICOLOGICAL INVESTIGATION OF EPLIR

A. S. Saratikov<sup>1</sup>, N. S. Livshiz, F. I. Burchenkova, N. G. Kadichagova, T. P. Novozheeva, R. R. Achmedganov, T. V. Perevozchikova, L. V. Bashirova

Siberian Medical University, Tomsk, Russia

The preclinical safety of eplir, hepatoprotective agent, was studied. It was found that eplir is a low-toxicity substance. 6-Month oral administration of the drug in doses 30, 150 and 300 mg/kg in rats and 100 mg/kg in dogs did not cause any essential functional and structural disorders in the organs and systems studied. The drug does not possess mutagenic, cancerogenic, allergenic and immunotoxic properties and does not affect the reproductive function.