

*В.М.Коваленко, проф. ¹, Г.М.Шаяхметова, к.б.н. ¹,
Л.Б.Бондаренко, д.б.н. ¹, О.С.Волошина, к.б.н. ¹, А.К.
Вороніна, к.б.н. ¹, І.С. Блажчук, к.б.н. ¹, А.В. Матвієнко, к.м.н. ¹,
Г.М.Мазманян ¹, Е. В.Шелковая ², М.О.Яворська ²*

ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ТА ТОКСИЧНОСТІ ПРИ ПОВТОРНИХ ВВЕДЕННЯХ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТУ ДЛЯ СХУДНЕННЯ "СТИФІМОЛ"

*Інститут фармакології та токсикології АМН України¹, м. Київ
АТЗТ "Київський вітамінний завод"², м. Київ*

З останньою оцінкою Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВОЗ), більше 1 мільярда людей на планеті мають зайву вагу. У промислово розвинених країнах ця проблема торкнулась усіх шарів населення незалежно від соціальної та професійної належності, віку, місця проживання і статі, спостерігається зростання частоти розвитку ожиріння у дітей та підлітків [1]. Медикаментозна терапія ожиріння потрібна так само, як і при будь-якому хронічному захворюванні. Її метою є підвищення ефективності немедикаментозних методів лікування, направлених на ефективне зниження маси тіла, попередження рецидивів, покращення метаболічних показників [2].

Останнім часом значну увагу привертають комплексні натуральні препарати для боротьби з надлишковою масою тіла, що містять рослинні компоненти, вітаміни, амінокислоти та мінерали. Вони здатні ефективно знижувати масу тіла, поліпшувати загальний стан і при цьому не викликають побічних ефектів, звикання та є безпечними при тривалому застосуванні.

До цього ряду належить новий комплексний натуральний препарат у вигляді капсул для схуднення Стифімол (ЗАТ Київський вітамінний завод), що містить екстракт гарцинії камбоджійської (*Garcinia cambodgia*), хрому піколінат, L-тирозин, L-карнітин, екстракт бурих водоростей. Метою даної роботи було досліджен-

ня його гострої токсичності та токсичності при повторних введеннях.

Матеріали і методи

Вивчення гострої токсичності при внутрішньошлунковому введенні проводили на білих мишах-самках Вістар масою 16-19 г та щурах-самках Вістар масою 150-160 г. Самки даних видів гризунів, в основному, є більш чутливими до токсичної дії речовин, ніж самці, та визнані адекватними тест-системами для таких досліджень [3]. Беручи до уваги, що Стифімол — це речовина з невідомою токсичністю, стартовою дозою було обрано 5000 мг/кг, яка є лімітуючим показником при визначенні гострої токсичності речовин при внутрішньошлунковому шляху введення [4]. Спостереження за тваринами здійснювали 14 днів після введення препарату, після чого їх під ефірним наркозом піддавали евтаназії методом цервікальної дислокації, проводили макроскопію внутрішніх органів та головного мозку.

Дослідження токсичності препарату у трьох дозах (терапевтичній - 100 мг/кг, 5- та 10-кратних терапевтичній) при повторних, протягом 3 міс, введеннях [4, 5] проводили на 40 щурах-самцях лінії Вістар з початковою масою тіла 130-150 г. Тривалість введення була визначена згідно міжнародних вимог [5] виходячи із імовірного терапевтичного курсу для людини (4-6 тижнів). Із вмісту капсул готували водні су-

спензії різної концентрації, які дозволяли забезпечити необхідний об'єм дозування у перерахунку на суму активних речовин для кожної з експериментальних груп. Дози розраховували, виходячи з передбачуваних для клінічного застосування з урахуванням коефіцієнту видової чутливості [6]. Щурам контрольної групи вводили дистильовану воду.

Протягом експерименту проводили моніторинг стану тварин. Раз на тиждень — зважування. Проводили контроль споживання їжі та води. Через 3 міс після початку введення визначали рухові та поведінкові реакції тварин за допомогою тесту "відкрите поле" [7].

До початку та наприкінці експерименту у щурів визначали кількість еритроцитів і лейкоцитів, лейкоцитарну формулу крові [8], концентрацію гемоглобіну за допомогою біотесту "PLIVA-Lachema a.s." (Чехія), проводили аналіз сечі за допомогою набору діагностичних смужок DeKa Phan ("PLIVA-Lachema a.s.", Чехія) та мікроскопію осадку сечі.

Через 90 днів введення препарату в усіх тварин під легким ефірним наркозом брали кров із стегнової вени, після чого їх піддавали евтаназії методом цервікальної дислокації та розтинали. Визначали відносну масу, а також проводили макроскопічні та мікроскопічні дослідження головного мозку та внутрішніх органів. У сироватці крові досліджували активність аланін- та аспаратамінотрансферази (АлАТ та АсАТ), лужної фосфатази (ЛФ), вміст загального білірубину, сечовини, креатиніну, холестеролу, тригліцеридів, загальних ліпідів, загального білку та глюкози, використовуючи біотести виробництва фірми "PLIVA-Lachema a.s." (Чехія).

Усі тварини, що використовували у експериментах, були вирощені у віварії Інституту фармакології та токсикології АМН України та утримувались у стандартних умовах за температури 22-24 °С та відносної вологості 30-70 % з вільним доступом до корму та води. Групи тварин формували за методом рандомізації з попереднім карантинном протягом 14 днів. План досліджень був розглянутий та схвалений Комітетом по біоетиці ІФТ АМН України, усі процедури, пов'язані з гуманним поводженням із тваринами, були дотримані.

Статистичну обробку даних проводили з використанням t-критерію Ст'юдента. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною при значенні $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Препарат Стифімол, введений однократно внутрішньошлунково самкам мишей (5 особин) та щурів (5 особин) у лімітуючій дозі 5000 мг/кг,

не викликав їхньої загибелі. З огляду на це, введення вищих доз було недоцільним [4]. Протягом усього часу спостережень (14 днів) всі тварини мали охайний вигляд, були активні, мали рівну блискучу шерсть, шкіру без слідів розчухування, виразкоутворення та облісіння. Разове внутрішньошлункове введення препарату Стифімол у дозі 5000 мг/кг справило негативний вплив на прирост маси тіла мишей через 3 та 7 днів спостереження. Вплив препарату на масу тіла самок щурів був більш виражений — через 3 та 7 днів після введення Стифімолу тварини схудли, відповідно, на 10% і 14% ($p < 0,01$). Негативна динаміка маси тіла тварин в даному випадку, ймовірно, пов'язана зі специфічною дією препарату, є цілком очікуваною і не може розглядатись як побічний ефект (табл. 1).

Розтин дослідних тварин (мишей і щурів) не виявив структурних змін, гемодинамічних порушень та запальної реакції в головному мозку, внутрішніх органах і тканинах, а також в черевній, грудній та навколосерцевій порожнинах. Отримані дані свідчать, що препарат Стифімол належить до V класу токсичності — практично нетоксичні речовини [3].

Під час дослідження токсичності Стифімолу при повторних введеннях стан шерстного покриву та шкіри, а також активність дослідних щурів були на рівні контролю протягом усього експерименту, загибелі не було. Дані щодо моніторингу маси тіла (рисунок) свідчать, що щури дослідних груп набирали масу

Таблиця 1

Маса тіла самок мишей та щурів після внутрішньошлункового введення препарату Стифімол у дозі 5000 мг/кг ($M \pm m$, $n=5$).

Вид тварин	Терміни, дні	Маса тіла	Ступінь вірогідності змін порівняно з 0 днем	Середня зміна маси порівняно з 0 днем в г / %
Миші	0	$17,8 \pm 0,5$	—	—
	3	$19,0 \pm 0,6$	$p > 0,05$	+1,2 / +7
	7	$19,4 \pm 0,6$	$p > 0,05$	+1,6 / +9
	14	$21,6 \pm 0,8$	$p < 0,01$	+3,8 / +21
Щури	0	$157,4 \pm 1,8$	—	—
	3	$141,6 \pm 3,7$	$p < 0,01$	-15,8 / -10
	7	$135,8 \pm 4,7$	$p < 0,01$	- 21,6 / -14
	14	$173,6 \pm 3,1$	$p < 0,01$	+16,2 / +10

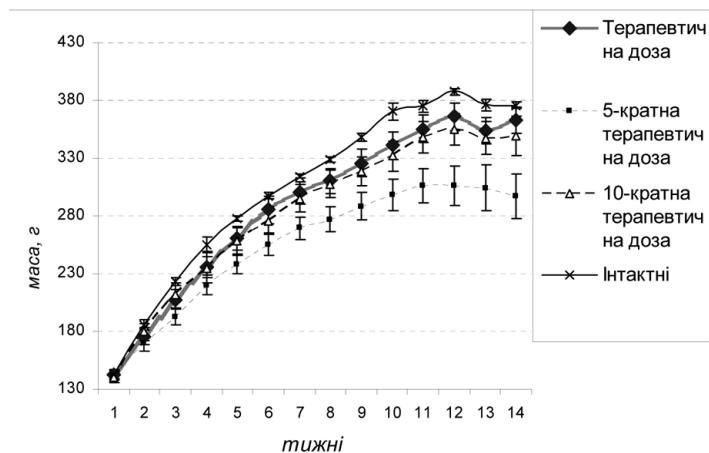


Рисунок . Динаміка маси тіла щурів різних груп протягом експерименту ($n=10$).

Таблиця 2

Показники поведінкових реакцій щурів у "відкритому полі" після введення Стифімолу протягом 90 діб ($M \pm m$, $n=10$)

Показники	Групи тварин			
	інтактні тварини (контроль)	терапевтична доза	5-кратна терапевтична доза	10-кратна терапевтична доза
Латентний період, с	$4,8 \pm 0,51$	$6,0 \pm 1,14$	$3,2 \pm 0,66$	$8,0 \pm 1,42^*$
Горизонтальна активність, к-сть квадратів перетнутих за 3 хв	$46,7 \pm 8,71$	$39,5 \pm 5,67$	$43,1 \pm 3,91$	$39,9 \pm 6,72$
Вертикальна активність, кількість стійок за 3 хв	$3,5 \pm 0,91$	$5,9 \pm 0,84$	$5,4 \pm 0,86$	$4,1 \pm 1,16$
Дослідницька активність, к-сть зазирань в пірки за 3 хв	$5,2 \pm 1,10$	$3,5 \pm 0,73$	$2,6 \pm 0,50^*$	$4,3 \pm 1,01$
Грумінг, к-сть р-цій за 3 хв	$1,6 \pm 0,34$	$2,0 \pm 0,52$	$3,2 \pm 0,77$	$1,5 \pm 0,50$
Уринації, к-сть за 3 хв	$0,9 \pm 0,10$	$0,80 \pm 0,13$	$1,0 \pm 0,15$	$0,9 \pm 0,10$
Дефекації, к-сть за 3 хв	$0,8 \pm 0,20$	$0,9 \pm 0,18$	$0,9 \pm 0,28$	$0,9 \pm 0,23$

Примітка: в цій та табл. 5 і 6 * - $P < 0,05$ порівняно з контролем

повільніше, ніж контрольні тварини. Найбільш вираженою ця різниця була у групі шурів, які отримували 5-кратну терапевтичну дозу. Подібний вплив Стифімолу на приріст маси тіла пов'язаний із його специфічною фармакологічною активністю.

Результати дослідження стану ЦНС за тестом "відкрите поле" наведені в табл. 2. Вони свідчать, що після повторних введень Стифімолу у терапевтичній дозі рухова та орієнтовно-дослідницька активність шурів була на рівні контролю. Після повторних введень препарату Стифімол в 5-кратній терапевтичній дозі у шурів зафіксовано зниження дослідницької активності у 2 рази, а після його введення у 10-кратній терапевтичній дозі (1000 мг/кг маси тіла) - підвищення латентного періоду у 1,6 рази.

Всі інші показники поведінкових реакцій були на рівні контролю. Вважається, що збільшення латентного періоду, зниження загальної та дослідницької активності є наслідком підвищення рівня стресованості тварин або анксиолітичної дії препарату [7]. Але, у даному ви-

падку не можна твердити, що введення високих доз Стифімолу впливало на реактивність ЦНС шурів, оскільки ключові показники емоційного стану - горизонтальна та вертикальна активність, а також кількість уринацій і дефекацій були такими ж, як і у тварин контрольної групи. З огляду на це, виявлені відмінності у показниках тривалості латентного періоду та кількості зазирань у нірки, на наш погляд, скоріше можуть бути пояснені з точки зору гетерогенності емоційних реакцій, пов'язаних з індивідуальною реактивністю тварин у відкритому полі. Отже, можна стверджувати, що у тесті "відкрите поле" не виявлено токсичного впливу препарату на ЦНС.

У сечі шурів, яким у різних дозах вводили Стифімол, не було виявлено глюкози, нітритів, кетонів, уробіліногену та білірубину. Показники рН, питомої ваги та білку у сечі дослідних шурів не відрізнялись від показників, отриманих до введення препарату, та від показників контрольних тварин (табл. 3).

Склад осаду сечі у шурів дослідних та інтактної груп істотно

не відрізнявся у всі терміни спостережень. Кількість лейкоцитів була на рівні 1-2 у полі зору, еритроцитів, циліндрів, епітелію нирок та сечового міхура виявлено не було, а плоский епітелій представлений поодинокими клітинами. Сольовий склад сечі під впливом препарату не змінювався та, в основному, був представлений кристалами сечової та щавлевої кислот в помірній кількості.

90-добове введення препарату Стифімол не впливало на показники периферичної крові (табл. 4). Єдиним виключенням стала кількість лейкоцитів у шурів, що отримували Стифімол у 10-кратній терапевтичній дозі, яка була вірогідно нижчою, ніж у тварин контрольної групи, але знаходилась у межах фізіологічної норми для даного виду. Внутрішньошлункове введення Стифімолу протягом 90 діб не впливало і на показники диференційної формули крові, що може свідчити про відсутність запальних та алергічних реакцій в організмі тварин.

Результати дослідження біохімічних показників сироватки крові шурів після повторних введення препарату Стифімол наведені у табл. 5.

Питома вага, рН та білок у сечі шурів до початку експерименту (I) та через 90 діб (II) введення Стифімолу, (M ± m, n=10)

Таблиця 3

Показники	Групи тварин							
	інтактні		1- кратна терапевтична доза		5-кратна терапевтична доза		10-кратна терапевтична доза	
	I	II	I	II	I	II	I	II
рН	6,3±0,3	6,3±0,2	6,0±0,2	6,4±0,2	6,2±0,4	6,5±0,4	6,4±0,3	6,5±0,2
Білок, г/л	0,3±0	0,31±0,1	0,3±0,2	0,3±0	0,3±0	0,98±0,5	0,37±0,2	0,21±0,1
Питома вага	1,019± 0,004	1,018± 0,002	1,021± 0,003	1,019± 0,001	1,017± 0,003	1,019± 0,004	1,021± 0,003	1,020± 0,002

Вміст гемоглобіну, еритроцитів та лейкоцитів у периферичній крові шурів до початку експерименту (I) та через 90 діб введення Стифімолу (II), (M ± m, n=10)

Таблиця 4

Показники	Групи тварин							
	контроль		1- кратна терапевтична доза		5-кратна терапевтична доза		10-кратна терапевтична доза	
	I	II	I	II	I	II	I	II
Гемоглобін, г/л	125,89± 3,14	149,19± 2,64*	122,12± 4,09	154,16± 1,42*	121,96± 4,57	147,39± 4,96*	117,55± 3,42	154,10± 3,24*
Лейкоцити, x 10 ³ /мкл ⁻³	13,06± 0,39	15,89± 0,64*	13,36± 0,62	17,11± 0,68*	13,14± 0,64	16,99± 0,73*	11,57± 0,46**	13,86± 0,60***
Еритроцити, x 10 ⁶ /мкл ⁻³	5,88± 0,32	8,07± 0,27*	6,34± 0,29	8,06± 0,28*	6,79± 0,21**	8,77± 0,34*	6,27± 0,2	7,77± 0,34*

Примітки: 1.* - P < 0,05 порівняно з вихідними даними відповідних груп тварин;

2. ** - P < 0,05 порівняно з інтактною групою у відповідні терміни спостереження.

**Біохімічні показники сироватки крові щурів
після внутрішньошлункового введення Стифімолу протягом 90 діб ($M \pm m$, $n=10$)**

Показники	Групи тварин			
	інтактні	1- кратна терапевтична доза	5-кратна терапевтична доза	10-кратна терапевтична доза
Білірубін, мкмоль/л	2,88±0,19	7,1±0,40	5,83±0,44	7,68±0,46*
ЛФ, мккат/л	2,88±0,19	3,56±0,39	3,81±0,69	3,45±0,26
АлАТ, мккат/л	0,40±0,05	0,42±0,04	0,52±0,05	0,46±0,03*
АсАТ, мккат/л	0,61±0,2	0,66±0,02	0,73±0,01*	0,61±0,01
Загальний білок, г/л	70,33±0,57	69,29±1,18	71,08±1,17	70,83±1,31
Глюкоза, ммоль/л	6,45±0,53	6,05±0,27	5,54±0,3	5,4±0,47
Сечовина, ммоль/л	5,09±0,21	6,0±0,21*	6,24±0,45*	6,63±0,78
Креатинін, мкмоль/л	114,85±6,86	130±8,012	82,41±8,88*	117,21±10,15
Холестерин, ммоль/л	2,43±0,03	2,33±0,03	2,37±0,11	2,47±0,03
Тригліцериди, ммоль/л	1,272±0,780	1,146±0,052	1,164±0,081	1,146±0,105
Загальні ліпіди, г/л	1,93±0,14	2,12±0,11	1,69±0,14	2,05±0,10

Таблиця 6

**Відносна маса внутрішніх органів і головного мозку самців щурів (г/100г маси тіла) після
внутрішньошлункового введення препарату Стифімол протягом 90 діб ($M \pm m$, $n=10$)**

Органи	Групи тварин			
	інтактні	1- кратна терапевтична доза	5-кратна терапевтична доза	10-кратна терапевтична доза
Печінка	3,04±0,11	3,06±0,07	3,37±0,37	3,01±0,10
Серце	0,30±0,01	0,31±0,01	0,34±0,02	0,30±0,01
Легені	0,46±0,02	0,50±0,04	0,53±0,05	0,43±0,05
Нирки	0,54±0,04	0,57±0,01	0,62±0,04	0,58±0,01
Селезінка	0,34±0,02	0,38±0,02	0,40±0,03	0,39±0,02
Мозок	0,51±0,03	0,55±0,02	0,54±0,06	0,56±0,02
Сім'яники	0,97±0,04	1,07±0,04	1,06±0,05	1,08±0,03*

Після введення Стифімолу у 1- кратній терапевтичній дозі показники ферментативної активності сироватки крові та вміст загального білірубину, загального білку, глюкози, тригліцеридів, холестерину та загальних ліпідів не відрізнялися від таких у контрольної групи, а рівень сечовини хоча і був вищим, знаходився у межах фізіологічної норми для даного виду тварин [9]. Аналогічна картина спостерігалась і після введення Стифімолу у 5- кратній терапевтичній дозі. Виключення склали концентрації сечовини та креатиніну, показники яких вірогідно відрізнялися від аналогічних в контролі, але не виходили за межі фізіологічної норми [10], та активність АсАТ, яка зростала на 20%. Визначення активності АлАТ та АсАТ, в основному, використовується для оцінки стану печінки, але для щурів аспаратамінотрансферазна активність має діагностичне значення лише при значному (у декілька разів) підвищенні, оскільки

більш специфічним печінковим ферментом для даного виду тварин є АлАТ [11]. Після повторних введень 10-кратної терапевтичної дози Стифі-молу біохімічні показники сироватки крові щурів також, в основному, лишалися на рівні інтактних тварин або не виходили за межі фізіологічної норми.

Таким чином, дослідження біохімічних параметрів сироватки крові не виявило негативного впливу повторних введень Стифімолу як у терапевтичній, так і у 5- та 10- кратних терапевтичній дозах.

Введення Стифімолу у дослідженому діапазоні доз, в основному, не впливало на відносну масу головного мозку та внутрішніх органів (табл. 6).

Виключенням стало незначне підвищення відносної маси сім'яників (на 11%) після введення препарату у 10-кратній терапевтичній дозі.

При гістологічному дослідженні головного мозку і внутрішніх органів (серце, легені, стравохід, фун-

товстий кишечник, печінка, підшлункова залоза, селезінка, мезентеріальні лімфатичні вузли, нирки і надниркові залози, сім'яники, щитовидна залоза) тварин після введення препарату в дослідженому діапазоні доз альтеративні зміни, гемодинамічні порушення, а також ознаки запальної реакції не виявлені.

Висновки

1. За параметрами гострої токсичності при внутрішньошлунковому введенні мишам та щурам препарат Стифімол відноситься до практично нетоксичних речовин. Різниця у видовій чутливості до препарату не виявлено.
2. Стифімол не спричиняє негативного впливу на основні системи та органи щурів при повторних (90 днів) внутрішньошлункових введеннях у 1-, 5- та 10-кратних терапевтичних дозах.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бутрова С.А., Плохая А.А. Лечение ожирения: современные аспекты. — <http://www.medlinks.ru/article.php>
2. Bessler M. Multidisciplinary Management of Obesity / 85th Clinical Congress of the American College of Surgeon, 1999.
3. Principles and Methods of Toxicology, 4th edition. / ed. by A. Wallace Hayes. — 2001. — 1887 p.
4. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / за ред. О.В. Стефанова. — Київ, 2001. — 527 с.
5. Repeated Dose Toxicity. — Annex to Directive 75/318/EEC (April 1984).
6. Guidance for Industry and Reviewers Estimating the Safe Starting Dose in Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers U. S. of Department of Health and Human Services, FDA, CDER and CBER. — <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
7. Калугев А.В. Стресс, тревожность и поведение (актуальные проблемы моделирования тревожного поведения у животных) — К.:Энигма, 1998. — 96 с.
8. Лабораторные исследования в клинике / под ред. В.В. Меньшикова — М.: Медицина, 1987. — 365 с.
10. Любимов Б.И., Коваленко Л.П. и др. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания.- Москва, 2000. — 398 с.
11. Западнюк И.П. и др. Лабораторные животные.- К.:Вища школа, 1983. — С.250.
12. Sharp P., La Regina M. The laboratory rat. — CRC Press, 1998. — 213 p.

В.Н.Коваленко, А.М.Шаяхметова, Л.Б.Бондаренко, Е.С.Волошина, А.К. Воронина, И.С. Блажчук, А.В. Матвиенко, А.Н.Мазманыч, Е.В.Шелковая, М.О.Яворская

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ПРИ ПОВТОРНЫХ ВВЕДЕНИЯХ НОВОГО КОМПЛЕКСНОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПОХУДЕНИЯ "СТИФИМОЛ"

Показано, что по параметрам острой токсичности при внутрижелудочном введении белым мышам и крысам препарат Стифимол (капсулы) относится к V классу токсичности (практически нетоксичные вещества). Разница в видовой чувствительности к препарату не выявлена.

При повторных внутрижелудочных введениях в течение 90 суток в 1-, 5- и 10-кратных терапевтических дозах препарат Стифимол не оказывал отрицательного влияния на основные системы и органы крыс. Физиологические, гематологические, биохимические и гистоморфологические показатели не отличались от таковых у интактных крыс и не выходили за пределы физиологической нормы для данного вида животных.

V.N.Kovalenko, A.M.Shayachmetova, L.B.Bondarenko, E.S.Voloshina, A.K.Voronina, I.S.Blazhchuk, A.V.Matvienko, A.N.Mazmanyay, E.V.Shelkovaya, M.O.Yavorskaya

STUDY OF ACUTE AND CHRONIC TOXICITY OF NEW COMPLEX PREPARATION FOR THINNESS "STIFIMOL"

It was shown that according to parameters of acute toxicity with intragastral introduction to mice and rats preparation for thinness STIFIMOL (capsules) belonged to V class of toxicity (practically non toxic substances). Difference in species sensitivity for this preparation was absent.

With repeated intragastral introductions during 90 days of 1-, 5- and 10-times therapeutic doses preparation STIFIMOL did not cause negative effects on main systems and organs of rats. Physiological, hematological, biochemical and histomorphological parameters of experimental animals did not differ from control and did not exceed the limits of physiologic norm for this animal's species.