

УДК 615.07:615.34:615.241.3:637.66:599.735.3

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ПЕРСПЕКТИВНОСТИ РАЗРАБОТКИ ПРЕПАРАТА ОБЩЕТОНИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ КРОВИ МАРАЛА

Лунин К.П., Зверев Я.Ф., Турецкова В.Ф.

ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет»
Минздравсоцразвития России, Барнаул, e-mail: lunin.86@mail.ru

В статье приведены результаты исследования острой токсичности и общетонизирующей активности субстанции высушенной крови марала двух различных фирм – производителей Алтай. Изучение проводили по усовершенствованной методике оценки выносливости мелких лабораторных животных, предложенной Каркищенко В.Н. с соавт. Выявлено, что курсовое применение исследуемых субстанций приводит к увеличению продолжительности плавания крыс в течение изучаемого периода. Установлено, что после введения высушенной крови марала всех образцов наблюдалось однотипное увеличение продолжительности плавания крыс, более выраженное у образца крови марала серии № 1 по сравнению с образцом серии № 2 на 10 сутки наблюдения. Исследование острой токсичности не привело к гибели ни одного животного, исходя из этого субстанцию высушенной крови марала можно отнести к 4 классу опасности (малоопасные вещества). Полученные данные подтверждают наличие общетонизирующей активности высушенной крови марала различных производителей Алтай и перспективность её дальнейшего углубленного исследования.

Ключевые слова: кровь марала, общетонизирующая активность

PHARMACOLOGICAL ASSESSMENT OF DRUG DEVELOPMENT PROSPECT GENERAL TONIC ACTIVITY OF RED DEER'S BLOOD

Lunin K.P., Zverev Y.F., Turetskova V.F.

Altai State Medical University, Barnaul, e-mail: lunin.86@mail.ru

This paper includes research findings on acute toxic and general tonic activity of the red deer's dried blood obtained from two different Altai producing companies. The research was conducted according to the improved procedure of endurance assessment of small laboratory animals proposed by Karkishchenko V.N. et al. In the course of the experiment it has been discovered that the use of substances under investigation result in prolonged duration of rats' swimming during the experimented period. It was established that after the ingestion of dried red deer's blood of all the samples, a similar increase in the duration of rats' swimming was observed, more pronounced in the № 1 sample of blood series in comparison with the sample № 2 on the 10th day of observation. Acute toxicity studies did not lead to the death of any animal, that is why dried Altai wapiti's blood substance can be attributed to hazard class 4 (low hazardous substances). The data obtained confirm the presence of general tonic activity in red deer's dried blood produced by different Altai manufacturers and the prospects for its further in-depth investigation.

Keywords: red deer blood, general tonic activity

Важнейшей задачей современной фармацевтической науки является разработка новых эффективных лекарственных препаратов. Поставленная задача может быть решена двумя способами: создание новых субстанций и лекарственных форм на их основе и совершенствование известных, зарекомендовавших себя в медицинской практике лекарственных средств с целью более рационального их использования.

Обращает на себя внимание тот факт, что ранее в России был зарегистрирован лекарственный препарат на основе крови марала общетонизирующего действия («Кропанол капсулы 0,5» ФСП 42-0148-0392-00). Срок действия фармакопейной статьи в настоящий момент истек.

В последние десятилетия в Алтайском крае и Республике Алтай производится большое количество биологически активных добавок на основе крови марала. Анализ имеющейся информации указывает на то, что область применения данной продукции в виде пантогематогена в каче-

стве общетонизирующего и адаптогенного средства очень широка: курортология, восстановительная медицина, спортивная медицина [8].

В настоящее время для получения пантогематогена применяются две технологии, которые отличаются различной степенью очистки исходного сырья (кровь используется цельная или предварительно очищенная от фибрина) и способом сушки (применяется вакуумная и распылительная). При этом отсутствуют единые подходы не только к технологии, но и к стандартизации как исходного сырья, так и готовой продукции на основе крови марала [9].

Следует отметить, что качество данной продукции контролируется согласно разработанным фирмами-производителями техническим условиям, в основном по таким товароведческим показателям, как внешний вид, цвет, вкус, запах, содержание тяжелых металлов, микробиологическая чистота, массовая доля влаги, количественное содержание гемоглобина и т.д. Биологическая

активность и содержание других групп БАВ в выпускаемой продукции не определяются.

Учитывая вышеизложенное и наличие в пантогематогене высокоактивного комплекса биологически активных веществ (аминокислоты, гормоны, эпидермальный и инсулиноподобный факторы роста, витамины, минеральные вещества, пептиды, основания нуклеиновых кислот) [8], представляется целесообразным его углубленное изучение, в том числе проведение всесторонней фармакологической оценки.

Целью данного исследования является изучение острой токсичности и общетонизирующего действия препаратов крови марала различных фирм-производителей Алтайского края.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись две серии высушенной субстанции крови марала различных фирм производителей Алтайского края.

При получении обеих серий забор крови у маралов-доноров осуществлялся во время срезки пантов (май–июнь 2013 г). Технология получения пантогематогена серии № 1 заключалась в том, что после забора кровь разливали в специальные формы и замораживали при температуре -15°C , после чего подвергали сушке в вакуум-шаровой мельнице В-500 (г. Бийск) при температуре 40°C в течение 12 часов.

При получении пантогематогена серии № 2 кровь предварительно очищали от фибрина механическим методом с использованием лопастной мешалки МЛ-200 (Россия). Очищенную кровь сушили распылительным методом на сушилке РС-200 (Россия) при температуре ниже температуры коагуляции белков, в течение времени прохождения капли крови через ток воздуха.

Обе исследуемые субстанции представляли собой однородный порошок коричневого цвета с характерным запахом, практически не растворимый в воде. В связи с тем, что в последние годы многие исследователи общетонизирующее действие крови марала связывают с наличием специфического комплекса аминокислот [8], во всех сериях сырья определяли качественный и количественный состав аминокислот. Исследования проводили методом ВЭЖХ на хроматографе Shimadzu LC-20 Prominence, (Япония) с УФ-детектированием (254 нм). Установлено, что все серии содержат одинаковый набор аминокислот. При этом их количественное содержание отдельных аминокислот в каждой серии сырья отличалось незначительно и варьировало в пределах от 0,71 и до 9,1 мг% [6, 7].

Определение острой токсичности субстанции крови марала проводили согласно «Методическим указаниям по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» на половозрелых белых мышах обоего пола (массой 20–24 г), полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и прошедших карантин в течение четырнадцати суток. Содержание экспериментальных животных (мышей) осуществлялось в стандартных условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде и пище, в условиях нормального температурного и светового режимов. При исследовании токсичности животных были разделены на 5 групп по 10 мышей в каждой.

Первая группа животных являлась контрольной и получала перорально с пищей хлебный шарик размером 1 см^3 . Указанный способ введения связан с плохой растворимостью исследуемых субстанций в воде и технической сложностью введения суспензии в крахмальном клейстере.

Вторая и третья группы животных получали серию № 1 исследуемой субстанции крови марала перорально с пищей (хлебный шарик размером 1 см^3 , смешанный с исследуемой пробой) однократно в течение суток в дозах 2500 и 7500 мг/кг соответственно.

Четвертая и пятая группа животных по такой же методике и в тех же дозах получали серию № 2 исследуемой субстанции крови марала.

Общая продолжительность наблюдения составляла четырнадцать суток. В первые сутки мыши находились под постоянным наблюдением. Общее состояние животных в течение опыта оценивали с учетом изменения координации движений, поведенческих реакций, дыхательной функции, нервно-мышечной возбудимости, также измеряли массу тела до получения исследуемой субстанции и после окончания наблюдения.

Определение общетонизирующей активности субстанции крови марала осуществляли согласно «Методике оценки выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптогенной активности некоторых лекарственных препаратов», предложенной Каркищенко В.Н. с соавт. [10].

Исследование проводили на сертифицированных аутбредных половозрелых животных обоего пола – крысах линии сток Wistar массой 130–170 г, полученных из вивария Института цитологии и генетики СО АН РФ и прошедших 14-дневный карантин. Содержание экспериментальных животных осуществлялось в стандартных условиях вивария на обычном рационе, при свободном доступе к воде и пище, в условиях светового режима 12:12 ч и температуры $20\text{--}22^{\circ}\text{C}$. Животные были разделены на 3 группы: 1 – контрольная; 2, 3 – экспериментальные. Первая группа крыс получала воду и хлебный шарик размером 1 см^3 . Животные второй и третьей групп получали по той же схеме хлебные шарики, смешанные с субстанцией крови марала в дозе 300 мг/кг: соответственно серию № 1 и серию № 2.

Ванну вместимостью 80 литров наполняли водой, с температурой $27\text{--}29^{\circ}\text{C}$. Для определения исходного уровня выносливости до начала эксперимента крысы всех групп запускались в воду с использованием груза, составлявшего 10% от массы тела.

Затем, в ходе эксперимента, животные помещались в воду с вышеуказанным грузом на третьи, седьмые и десятые сутки эксперимента: контрольная группа через один час после получения хлебного шарика, вторая и третья группы – через один час после получения исследуемых образцов.

Во всех случаях при наблюдении за животными фиксировалось время их нахождения в воде до момента, когда они были уже не в состоянии удерживаться над поверхностью воды самостоятельно. Этот момент являлся точкой окончания эксперимента.

Эксперименты проводили при строгом соблюдении требований Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей» (Страсбург, 1986 г.) и Приказа МЗ РФ № 708 Н от 28 августа 2010 г.

Экспериментальные данные обрабатывали статистически методом вариационных рядов с использованием *t*-критериев Стьюдента. Результаты представлены в виде среднего значения \bar{X} и ошибки среднего

m. Достоверными считали различия при достигнутом уровне значимости $p < 0,05$.

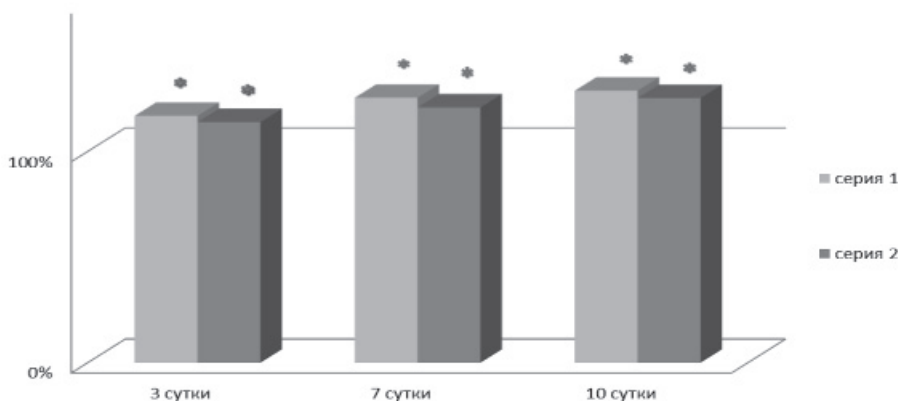
Результаты исследования и их обсуждение

При изучении острой токсичности перорально введение измельченных пантов марала различных фирм-производителей в дозах от 2500 до 7500 мг/кг массы мышей не влияло на их общее состояние и не вызвало гибель животных. Симптомы острого отравления исследуемыми сериями измельченных пантов марала отсутствовали. В течение последующего периода наблюдения все животные были активны, подвижны, с нормальной координацией движений, стандартной реакцией на внешние раздражители, обычной частотой и глубиной дыхательных движений, нормальной консистенцией фекальных масс, частотой мочеиспускания и окраской мочи, с хорошим аппетитом и нормальным внешним видом. В течение эксперимента гибели животных не отмечено, в связи с чем установить LD₅₀ не представилось возможным. Результаты исследования позволяют считать субстанцию крови марала указанных фирм-производителей Алтая нетоксичной в испытанном диапазоне.

Вследствие того, что максимально технически возможная доза (7500 мг/кг) не привела к гибели ни одного животного, можно сделать вывод, что LD₅₀ > 7500 мг/кг и в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 можно отнести исследуемый препарат к 4 классу опасности (малоопасные вещества) [4].

В ходе эксперимента по изучению общетонизирующей активности субстанции крови марала различных фирм-производителей Алтая наблюдался процесс тренировки животных контрольной группы, который выражался в увеличении времени нахождения в воде на третьи сутки на 6% ($p < 0,05$), седьмые – на 8% ($p < 0,05$) и десятые – на 12% ($p < 0,05$) по сравнению с исходным уровнем.

Результаты эксперимента по изучению общетонизирующей активности исследуемых образцов субстанции крови марала представлены на диаграмме. При этом время плавания крыс контрольной группы представлено в виде горизонтальной линии и условно принято за 100%. Возвышение диаграмм над данной линией наглядно показывает прирост времени плавания экспериментальных групп крыс по сравнению с контрольной группой (рисунок).



*Динамика времени плавания крыс, получавших субстанцию крови марала 2-х серий. По горизонтальной оси – сутки эксперимента, по вертикальной оси – прирост времени плавания экспериментальных групп животных по отношению к соответствующим показателям контрольной группы, %. Примечание. * – достоверные изменения ($p < 0,05$) времени плавания экспериментальных групп по отношению к показателям контрольной группы*

На третьи, седьмые и десятые сутки эксперимента в группе животных, получавших исследуемую серию № 1 пантогемагогена, срок пребывания в воде статистически достоверно ($p < 0,05$) увеличился по сравнению с показателем контрольной группы, на 17, 25,6 и 29% соответственно. Данный факт может свидетельствовать о наличии общетонизирующей активности исследуемой субстанции крови марала, и разницу в обнаруженных эффектах между подопытными и контрольными

крысами (12% ($p < 0,05$) на третьи, 16,6% ($p < 0,05$) на седьмые и 18% ($p < 0,05$) на десятые сутки) можно отнести к действию исследуемого образца.

Аналогичная тенденция наблюдалась при исследовании общетонизирующей активности групп животных, получавших кровь марала серии № 2. На третьи, седьмые и десятые сутки эксперимента срок пребывания животных в воде статистически достоверно ($p < 0,05$) увеличился, по сравнению с показателем контрольной группы на 14, 21 и 25,5%

соответственно. Обнаруженный эффект может свидетельствовать о наличии общетонизирующей активности субстанции крови марала, и разницу с показателями контрольной группы крыс (11% на третьи, 14% на седьмые и 16,5% на десятые сутки) можно отнести к действию исследуемого образца.

Сопоставление общетонизирующей активности исследуемых серий высушенной крови марала свидетельствует о более выраженном проявлении общетонизирующей активности у образца серии № 1, полученного с применением вакуумной сушки и менее выраженной – у образца серии № 2, высушенного распылительным методом. Так, на третьи сутки эксперимента разница в обнаруженных эффектах исследуемых образцов по сравнению с контрольной группой составляла 12 и 11%, на седьмые сутки 16,6 и 14%, на десятые сутки 18 и 16,6% соответственно.

Заключение

При анализе результатов изучения острой токсичности при энтеральном введении мышам пантогематогена, полученного по различным технологиям, в дозах от 2500 до 7500 мг/кг признаков острой токсичности не выявлено, летальность отсутствовала, что не позволило определить LD_{50} . В связи с чем изучаемый препарат может быть отнесен согласно ГОСТ 12.1.007-76 к IV классу опасности (малоопасные вещества).

Данные эксперимента по изучению общетонизирующей активности пантогематогена с использованием методики, предложенной Каркищенко В.Н. с соавт., подтверждают наличие указанной активности у изучаемых субстанций, независимо от применяемых технологий, и указывают на перспективность проведения дальнейших исследований по разработке препарата общетонизирующего действия на основе крови марала.

Список литературы

1. Базель В. С. Экологическое нормирование антропогенных нагрузок / В.С. Базель [и др.] // Экология. – 1992. – № 6. – С. 3–12.
2. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Медгиз, 1963. – 152 с.
3. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М., 1976, 7.
4. Государственный реестр лекарственных средств: официальное издание [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
5. Земцова Н.П. Анализ состава аминокислот крови и пантов марала методом ВЭЖХ // Перспективы развития санаторно-курортной помощи и реабилитации в Сибирском регионе: мат. межрег. науч.-практ. конф., посвященной 145-летию юбилею курорта Белокуриха, 75-летию Алтайского края / Н.П. Земцова, К.П. Лунин, В.Ф. Турецкова; под ред. Т.В. Кулишовой. – Белокуриха, 2012. – С. 102–103.
6. Лекарственные средства Дальнего Востока / АН СССР, Сиб. отд-ние, Дальневост. фил. им. В.Л. Комарова, Ин-т биол. актив. веществ. – Владивосток: [б. и.], 1951. – Вып. 9: Новые данные по фармакологии пантов пятнистого оленя / И.И. Брехман, Ю.И. Добряков, А.И. Танеева, 1968. – 114 с.
7. Лунин К.П. Сравнительный анализ качественно-количественного состава аминокислот крови и пантов марала методом ВЭЖХ // Разработка, исследование и маркетинг новой

фармацевтической продукции: сб. науч. тр / К.П. Лунин, Н.П. Земцова, В.Ф. Турецкова; Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолГМУ Минздрава России. – Пятигорск, 2013. – Вып. 68. – С. 257–259.

8. Луницын В.Г. Производство, переработка и биохимический состав продукции пантового оленеводства / В.Г. Луницын; РАСХН, Сиб. отд-ние, ВНИИПО. – Барнаул, 2008. – 294 с.

9. Луницын В.Г. Продукция пантового оленеводства (способы консервирования, переработки, использование): монография / В.Г. Луницын, Н.А. Фролов; РАСХН Сиб. отд-ние ВНИИПО. – Барнаул, 2006. – 270 с.

10. Разработка методики оценки физической выносливости мелких лабораторных животных для изучения адаптивной активности некоторых лекарственных препаратов // В.Н. Каркищенко [и др.] // Биомедицина. – 2011. – № 1. – С. 72–74.

11. Силаев А.Б. Химическая природа биологически активных веществ пантов / А.Б. Силаев, В.С. Галкин, Л.А. Филиппова // Пантовое оленеводство: сб. науч. работ ЦНИЛ пантового оленеводства. – Барнаул, 1975. – Вып. 4. – С. 93–100.

References

1. Bazel V.S. Ekologicheskoe normirovanie antropogennykh nagruzok, V.S. Bazel [i dr.], Ekologiya, 1992, no. 6, pp. 3–12.
2. Belenkiy M.L. Elementy kolichestvennoy otsenki farmakologicheskogo effekta, M.L. Belenkiy, L.: Medgiz, 1963, 152 p.
3. Gosudarstvennyy reestr lekarstvennykh sredstv: ofitsialnoe izdanie [Elektronnyy resurs]. Rezhim dostupa: <http://grls.rosminzdrav.ru>.
4. GOST 12.1.007-76. Sistema standartov bezopasnosti truda. Vrednye veshchestva. Klassifikatsiya i obshchie trebovaniya, M., 1976, 7 p.
5. Zemtsova N.P. Analiz sostava aminokislot krovi i pantov marala metodom VEZhKh. Perspektivy razvitiya sanatorno-kurortnoy pomoshchi i reabilitatsii v Sibirskom regione: mat. mezhreg. nauch.-prakt. konfe., posvyashchennoy 145-letnemu yubileyu kurorta Belokurikha, 75-letiyu Altayskogo kraya. N.P. Zemtsova, K.P. Lunin, V.F. Turetskova; pod red. T.V. Kulishovoy. Belokurikha, 2012, pp. 102–103.
6. Lekarstvennye sredstva Dalnego Vostoka. AN SSSR, Sib. otd-nie, Dalnevost. fil. im. V.L. Komarova, In-t biol. aktiv. veshchestv. Vladivostok: [b. i.], 1951. Vyp. 9: Noveyeye dannyye po farmakologii pantov pyatnistogo olenya, I.I. Brekhman, Yu.I. Dobryakov, A.I. Taneeva, 1968, 114 p.
7. Lunin K.P. Sravnitelnyy analiz kachestvennogo sostava aminokislot krovi i pantov marala metodom VEZhKh. Razrabotka, issledovanie i marketing novoy farmatsevticheskoy produktcii: sb. nauch. tr. K.P. Lunin, N.P. Zemtsova, V.F. Turetskova; Pятигорский медико-фармацевтический институт, filial GBOU VPO VolGGMU Minzdrava Rossii, Pyatigorsk, 2013, Vyp. 68, pp. 257–259.
8. Lunitsyn V.G. Proizvodstvo, pererabotka i biokhimicheskiy sostav produktcii pantovogo olenevodstva, V.G. Lunitsyn; RASKhN, Sib. otd-niye, VNIPO, Barnaul, 2008, 294 p.
9. Lunitsyn V.G. Produktiya pantovogo olenevodstva (sposoby konservirovaniya, pererabotki, ispolzovanie): monografiya, V.G. Lunitsyn, N.A. Frolov; RASKhN Sib. otd-nie VNIPO, Barnaul, 2006, 270 p.
10. Razrabotka metodiki otsenki fizicheskoy vynoslivosti melkikh laboratornykh zhivotnykh dlya izucheniya adaptivnoy aktivnosti nekotorykh lekarstvennykh preparatov, V.N. Karkishchenko [i dr.], Biomeditsina, 2011, no. 1, pp. 72–74.
11. Silayev A.B. Khimicheskaya priroda biologicheskikh aktivnykh veshchestv pantov, A.B. Silayev, V.C. Galkin, L.A. Filippova, Pantovoe olenevodstvo: sb. nauch. rabot TsNIL pantovogo olenevodstva, Barnaul, 1975, Vyp. 4, pp. 93–100.

Рецензенты:

Венгеровский А.И., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии, ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Томск;
Федосеева Л.М., д.фарм.н., профессор, заведующая кафедрой фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии, ГБОУ ВПО «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения России, г. Барнаул.

Работа поступила в редакцию 15.05.2014.