

ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ З ГРИБІВ РЕЙШИ

- І. І. Герасимець, к. фарм. н., доц. каф. фармакології з клінічною фармакологією
Л. С. Фіра, д. біол. н., проф., зав. кафедри фармації ННІ ПО
І. І. Медвідь, к. мед. н., асист. каф. мікробіології, вірусології та імунології
- Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль

Експериментальні та клінічні дослідження останніх років переконливо доводять перспективність використання засобів природного походження в комбінованій терапії онкопатологій. Особливо актуальним є вивчення препаратів, які підсилюватимуть протипухлинну резистентність, перешкоджатимуть розвитку метастазів та рецидивів пухлин, знижуватимуть токсичні прояви хіміотерапії. Використання засобів, здатних нормалізувати стан фізіологічної антиоксидантної системи та підвищити опірність організму пухлинному процесу, є важливим для онкології [2, 6, 7, 8].

Нас зацікавили **гриби рейши (*Ganoderma lucidum*)**, які містять величезну кількість цінних біологічно активних речовин та з давніх-давен використовуються східною медициною для профілактики та лікування онкопатологій, цукрового діабету, гепатитів, імунних захворювань, запальних процесів [8, 16, 17]. Основні біологічно активні речовини, які містяться в плодово-му тілі рейши – це полісахариди, білки, пептиди, амінокислоти, тритерпени та стероли [3, 4, 16, 19, 20, 21]. Зарубіжними дослідниками було встановлено, що ганодерові кислоти, які містяться у грибах рейши пригнічують проліферацію клітин при лікуванні раку шийки матки. Крім того, є експериментальні дані про те, що рейши можливо застосовувати в комплексній терапії лейкемії, лімфоми та міеломи. Науково підтверджена ефективність застосування рейши для лікування раку молочної залози та простати [13, 14].

На фармацевтичному ринку України гриби рейши можна знайти у складі закордонних лікарських препаратів. Проте, вітчизняна компанія «MikoFit» Ltd. під керівництвом О. М. Муртіщева та О. О. Чехути розробила та запатентувала (Деклараційний патент на корисну модель UA 67319) методику культивування та переробки базидіальних грибів, зокрема рейши. Це дає можливість культивувати гриби рейши в Україні та забезпечити сировинну базу для створення на їх основі лікарських засобів.

У відповідності до Методичних рекомендацій ДЕЦ МОЗ України [5] при дослідженні нового перспективного лікарського засобу поряд з вивченням фармакологічної активності обов'язковою характеристикою є оцінка токсичності, що дозволяє в свою чергу оціни-

ти ступінь його нешкідливості [1]. Чим більша ефективність та нешкідливість препарату, тим ширшими є можливості застосування його в медичній практиці.

У зв'язку з цим, **метою нашої роботи** було вивчити гостру токсичність **сухого екстракту з грибів рейши (СЕГР)**, культивованих саме в Україні. СЕГР був отриманий науковцями кафедри хімії природних сполук НФаУ та стандартизований за стероїдними сполуками, відповідно до вимог ДФУ.

Матеріали та методи дослідження

Експериментальні дослідження токсичності СЕГР проводили в центральній науково-дослідній лабораторії Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України з дотриманням правил біоетики відповідно до «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [18].

Дослідження було проведено на 24 білих безпородних щурах-самцях та самицях масою 180-220 г. Усіх тварин було рандомізовано на групи, які наведені в таблиці 1.

Таблиця 1

Рандомізація щурів в експерименті з вивчення гострої токсичності сухого екстракту грибів рейши

Умови дослідю	Доза, мг/кг	Кількість щурів	
		самці	самиці
Контрольні тварини	–	6	6
Сухий екстракт грибів рейши	5000,0	6	6

Шлях введення СЕГР – внутрішньошлунковий, відповідно до передбачуваного способу застосування препарату в клінічній практиці [5].

За 24 год до введення препарату щурів позбавляли їжі. Контрольним тваринам вводилась відповідна кількість питної води. Суспензію сухого екстракту грибів рейши вводили внутрішньошлунково натще, після чого тварин утримували ще 4 год без їжі з вільним доступом до питної води. Для вивчення гострої токсичності СЕГР було обрано дозу 5000 мг/кг, оскільки, при виборі доз для внутрішньошлункового введення, вона є максимальною для четвертого класу токсичності (ма-

лотоксичні речовини) відповідно до методичних рекомендацій (О. В. Стефанов, 2001) [5]. Якщо при цьому не спостерігається загибель тварин, введення більшої дози вважається недоцільним.

Термін спостереження за тваринами при вивченні гострої токсичності, згідно з методичними рекомендаціями, склав 2 тижні. У першу добу досліджуваної тварини знаходилися під постійним наглядом. При цьому враховували такі показники: загальний стан, зовнішній вигляд, особливості поведінки тварин, інтенсивність та характер рухливої активності, наявність судом, координацію рухів, реакцію на зовнішні подразники (тактильні, звукові, світлові), стан волосяного покриву, видимих слизових оболонок, відношення до корму, ритм, частоту дихання, час виникнення та характер інтоксикації, її важкість, перебіг, час загибелі тварин або їх одужання.

Реєстрували прояви порушень фізіологічного стану щурів, виживаність, динаміку маси тіла (на 3, 7 та 14 доби експерименту). Після закінчення терміну спостереження тварин знеживлювали шляхом декапітації під тіопенталовим наркозом, проводили розтин та макроскопічне дослідження внутрішніх органів, розраховували їх масові коефіцієнти (МК) [10].

Отримані результати піддавали статистичній обробці в програмі STATISTICA 12. Достовірність міжгрупових відмінностей визначали за допомогою критерію рангових сум Вілкоксона та критерію Манна-Уїтні. Результати вважали достовірними при $p \leq 0,05$ [9, 12, 15].

Результати дослідження та їх обговорення

На основі проведених досліджень встановлено, що після внутрішньошлункового введення СЕГР у дозі 5000 мг/кг у піддослідних щурів жодних ознак інтоксикації не спостерігали: тварини були охайними, активними, реагували на звукові і світлові подразники, процеси сечовиділення і дефекації були в нормі, порушення дихання та судом не спостерігали, рефлекторна збудливість була збережена. Споживання води та їжі щурів усіх груп було в нормі. Загибелі тварин протягом усього періоду спостереження не зареєстровано (табл. 2). Таким чином, введення більших доз досліджуваної субстанції згідно методичних рекомендацій [11] не є доцільним.

Таблиця 2

Результати дослідження гострої токсичності СЕГР за внутрішньошлункового шляху введення

Умови досліджу	Доза мг/кг	Ефект від застосування, кількість тварин, що загинули / загальна кількість тварин у групі	
		самці	самки
Контрольні тварини	-	0/6	0/6
СЕГР	5000,0	0/6	0/6

Спостереження за динамікою маси тіла піддослідних тварин показало відсутність відмінностей при порівнянні

з групою інтактного контролю, тварини обох груп рівномірно набирали вагу (табл. 3).

Після закінчення експерименту та виведення тварин з досліду евтаназією був проведений розтин, макроскопічний огляд внутрішніх органів та визначена їх маса, що дало змогу розрахувати інтегральний показник – масові коефіцієнти внутрішніх органів.

Таблиця 3

Динаміка маси тіла щурів обох статей за одноразового внутрішньошлункового введення сухого екстракту з грибів рейши ($M \pm m$; $n=24$)

Умови досліджу	Вихідні дані	3 дні, г	7 днів, г	14 днів, г
Самці				
Контрольні щури	208,00±4,70	214,00±5,18	219,00±5,14*	238,17±4,69*
СЕГР	205,17±3,30	212,50±3,99	220,33±3,85*	240,17±4,53*
Самки				
Контрольні щури	188,50±2,43	195,00±2,52	207,50±4,09*	236,67±3,00*
СЕГР	191,00±2,18	197,00±3,01	209,00±3,06*	243,33±4,38*

Примітка: * – відхилення показника достовірне щодо вихідних даних, $p \leq 0,05$.

Під час розтину всі тварини мали охайний шерстний покрив, незмінні слизові оболонки природних отворів. Підшкірні лімфовузли звичайні за розміром та на дотик. В очеревинній порожнині спостерігали незмінні серозні покриви очеревини. Поверхня печінки, нирок та наднирників гладенька. Колір, форма, розмір органів звичайний. Вузликів утворень не відмічено. Підшлункова залоза сірувато-рожевого кольору, гілко-тяжистого вигляду. Селезінка повнокровна, пружна. Слизова оболонка шлунка з вираженим рельєфом складок. Орган зберігає характерну анатомічну структуру. Слизова оболонка кишечника не змінена. Вміст кишечника відповідає його відділам. У щурів-самців сім'яники, передміхурова залоза – звичайного вигляду. У грудній порожнині всі органи розташовані анатомічно правильно. М'яз серця на розрізі темно-червоний, трохи волокнистий, однорідний. Легені повітряні, листки плеври не змінені. Лімфатичні вузли грудної та очеревинної порожнин на вигляд не змінені.

Аналіз наведених в таблиці 4 даних масових коефіцієнтів внутрішніх органів щурів обох статей після одноразового внутрішньошлункового введення екстракту грибів рейши та у групах контрольних тварин підтверджує відсутність патологічних змін у функціональному стані дослідних тварин у порівнянні з інтактними.

Зважаючи на вищенаведені результати дослідження та на рекомендації ДЕЦ МОЗ України [5], встановлення середньолетальної дози ЛД₅₀ для СЕГР є неможливим, оскільки внутрішньошлункове введення в максимально вводимій щурам дозі 5000 мг/кг не викликало загибелі тварин та патологічних змін з боку функціонального стану організму щурів.

Масові коефіцієнти внутрішніх органів щурів при вивченні гострої токсичності сухого екстракту грибів рейши ($M \pm m$; $n=24$)

Групи тварин	Орган	Печінка	Серце	Легені	Нирки	Селезінка
<i>Самці</i>						
Контрольні тварини		3,89±0,11	0,38±0,01	0,67±0,02	0,61±0,01	0,39±0,01
СЕГР		3,96±0,06	0,41±0,01	0,70±0,02	0,62±0,01	0,41±0,01
<i>Самки</i>						
Контрольні тварини		3,51±0,05	0,34±0,01	0,64±0,02	0,61±0,01	0,38±0,01
СЕГР		3,65±0,08	0,36±0,02	0,66±0,01	0,61±0,01	0,40±0,02

Примітка: * – відхилення показника достовірне щодо вихідних даних, $p \leq 0,05$.

Таким чином, комплекс проведених досліджень з вивчення безпечності потенційних лікарських засобів дозволив встановити відсутність токсичної дії при внутрішньошлунковому введенні шурам-самцям та шурам-саміцям СЕГР в дозі 5000 мг/кг. Це дає змогу віднести СЕГР до V класу токсичності – практично нешкідливих речовин (табл. 5), що відповідає токсикологічній класифікації речовин за К. К. Сидоровим [11].

Таблиця 5

Параметри гострої токсичності сухого екстракту з грибів рейши за одноразового внутрішньошлункового введення шурам обох статей

Препарат	ЛД ₅₀ , мг/кг	Клас токсичності
Сухий екстракт грибів рейши	> 5000	V практично нешкідливі речовини (ЛД ₅₀ > 5000 мг/кг)

Отримані дані щодо гострої токсичності СЕГР можуть бути використані для встановлення його мінімальної, максимальної та середньотерапевтичної доз, а також з метою подальшого вивчення різних видів фармакологічної активності.

Висновки

Експериментально підтверджено відсутність токсичної дії сухого екстракту грибів рейши за внутрішньошлункового шляху введення (ЛД₅₀ > 5000 мг/кг). Згідно з класифікацією речовин за токсичністю, сухий екстракт грибів рейши належить до V класу токсичності – практично нешкідливі речовини за внутрішньошлункового введення.

Отримані дані щодо безпечності сухого екстракту з грибів рейши зумовлюють перспективу подальшого вивчення його фармакологічної активності.

Литература

1. Вивчення гострої токсичності та фармакологічної активності сухого екстракту трави вероники лікарської / С. М. Марчишин, Т. Я. Ярошенко, І. І. Мілян [та ін.] // Мед. та клін. хімія. – 2015. – № 4. – С. 96-100.
2. Выявление противоопухолевой активности грибного мицелия и плодовых тел базидиальных грибов / Е. Ветчинкина, А.А. Широков, А. Б. Бучарская [и др.] // Успехи мед. микол. – 2015. – № 14 (14). – С. 462-471.
3. Довгий Р. С. Хімічний склад *Ganoderma lucidum* та особливості впливу окремих його речовин на імунну систему ссавців в умовах пухлинного росту / Р. С. Довгий, О. М. Макаренко, М. П. Рудик // Актуальні пробл. сучасн. мед.: Вісн. укр. мед. стоматол. акад. – 2011. – № 11 (4-1 (36)). – С. 128-134.
4. Дуденко Ю. Ю. Біологічно активні сполуки лікарського гриба *Ganoderma lucidum* (Curt.: fr) P. Karst / Ю. Ю. Дуденко, С. Л. Міркуль, В. О. Іваніца // Мікробіол. і біотехнол. – 2012. – № 2. – С. 6-19.
5. Експериментальне вивчення токсичної дії потенційних лікарських засобів / В. М. Коваленко, О. В. Стефанов, Ю. М. Максимов, І. М. Трахтенберг // Докл. дослід. лік. засоб.: метод. рек. / за ред. О. В. Стефанова. – К.: Авіцена, 2001. – С. 74-97.
6. Ефективність застосування тіотриазоліну за умов доксорубіцинової кардіоміопатії / І. С. Чекман, Т. С. Трофімова, І. А. Мазур [та ін.] // Запор. мед. журн. – 2010. – Т. 12. – № 5. – С. 207-210.
7. Ильинских Н. Н. Антимутагенная активность экстрактов из мицелия грибов шиитаке (*Lentinula Edodes*) при воздействии противоопухолевого препарата адриамицина на культуру лимфоцитов человека / Н. Н. Ильинских, Е. Н. Ильинских, Л. Б. Глухова // Успехи мед. микол. – 2015. – № 14 (14). – С. 423-427.
8. Иммунобиологическое действие экстрактов и средств, полученных из высших грибов *Ganoderma lucidum*, *Cordyceps sinensis* и *Leucoagaricus macrorrhizus* / Р. С. Довгий, В. В. Позур, В. М. Святецька [та ін.] // Вісн. пробл. біол. і мед. – 2013. – № 2 (2). – С. 44-49.
9. Основные методы статистической обработки результатов фармакологических экспериментов // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2000. – С. 349-354.
10. Резніков О. Г. Загальні етичні принципи експериментів на тваринах / О. Г. Резніков // Ендокринолог. – 2003. – Т. 8, № 1. – С. 142-145.
11. Сидоров, К. К. О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения / К. К. Сидоров // Токсикол. новых промышл. хим. вещ. – 1973. – Вып. 13. – С. 47-51.
12. Шеламова М. А. Статистический анализ медико-биологических данных с использованием программы EXCEL / М. А. Шеламова, Н. И. Инсарова, В. Г. Леценко. – Минск: БГМУ, 2010. – 96 с.
13. Anticancer and anti-inflammatory properties of *Ganoderma lucidum* extract effects on melanoma and triple-negative breast cancer treatment / A. Barbieri, V. Quagliariello, V. Del Vecchio [et al.] // Nutrients. – 2017. – № 9(3). – P. 210-219. doi:10.3390/nu9030210.
14. Anti-tumor effects of *Ganoderma lucidum* (reishi) in inflammatory breast cancer in vivo and in vitro models / I. J. Suarez-Arroyo, R. Rosario-Acevedo, A. Aguilar-Perez [et al.] // PloS one. – 2013. – № 8(2), P. 43-57.
15. Citation bias favoring statistically significant studies was present in medical research / A. S. Jannot, T. Agorisas, A. Gayet-Ageron et al. // J. Clin. Epidemiol. – 2013. – № 66 (3). – P. 296-301. doi:10.1016/j.jclinepi.2012.09.015. [PubMed].

16. Chemical characterization and antitumor activities of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* / Z. Liang, Y. Yi, Y. Guo [et al.] // *Internat. j. molec. sci.* – 2014. – № 15 (5). – P. 9103-9116. doi:10.3390/ijms15059103.

17. Effect of medicinal mushrooms on blood cells under conditions of diabet. mellitus / T. Vitak, B. Yurkiv, S. Wasser [et al.] // *World j. diabet.* – 2017. – № 8 (5). – P. 187-201.

18. Gross D. Ethics in Animal-Based Research / D. Gross, R. Tolba // *Eur. Surg. Res.* – 2015. – Vol. 55, № 1-2. – C. 43-57.

19. Immunization of fucose-containing polysaccharides from Reishi mushroom induces antibodies to tumor-associated Globo H-series

epitopes / S. F. Liao, C. H. Liang, M. Y. Ho [et al.] // *Proceed. Nation. Acad. Sci. USA.* – 2013. – № 110 (34). – P. 13809-13814.

20. Immuno-modulatory activity of *Ganoderma lucidum*-derived polysaccharide on human monocytoic dendritic cells pulsed with Der p 1 allergen / Rong-Hwa Jan, Teng-Yi Lin, Ya-Chun Hsu [et al.] // *BMC Immunol.* – 2011. – Vol. 12, № 31. – P. 1471-2172.

21. Optimization of Alkaline Extraction of Polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and Their Effect on Immune Function in Mice / Sheng Quan Huang, Jin-Wei Li, Zhou Wang [et al.] // *Molecules.* – 2010. – Vol. 15. – P. 3694-3708.

Надійшла до редакції 14.08.2019

УДК 615.099-071:582.28]-092.4

DOI:10.33617/2522-9680-2019-3-46

І. І. Герасимець, Л. С. Фіра, І. І. Медвідь

ВИЗНАЧЕННЯ ПАРАМЕТРІВ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЕКСТРАКТУ З ГРИБІВ РЕЙШИ

Ключові слова: гриби рейши, сухий екстракт, гостра токсичність.

Вивчення безпечності є обов'язковим етапом дослідження нових лікарських засобів, що дозволяє, за умов короткотривалої дії, оцінити небезпечність речовин для здоров'я, визначити клас токсичності та широту терапевтичної дії. Експериментально доведено, що сухий екстракт з грибів рейши належить до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини) за класифікацією К. К. Сидорова з урахуванням шляху введення.

И. И. Герасимец, Л. С. Фира, И. И. Медвидь

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ЭКСТРАКТА ИЗ ГРИБОВ РЕЙШИ

Ключевые слова: грибы рейши, сухой экстракт, острая токсичность.

Изучение безопасности является обязательным этапом исследования новых лекарственных средств, позволяющие, в условиях кратковременного действия, оценить опасность веществ для здоровья, определить класс токсичности и широту терапевтического действия. Экспериментально доказано, что сухой экстракт из грибов рейши относится к V классу токсичности (практически нетоксичные вещества) по классификации К. К. Сидорова с учетом пути введения.

I. I. Herasymets, L. S. Fira, I. I. Medvid

PARAMETERS OF THE EXPERIMENTAL EXTRACT OF REISH MUSHROOMS ACUTE TOXICITY DETERMINATION

Key words: Reishi mushrooms, dry extract.

Safety studies are a mandatory step in the new drugs research, allowing to evaluate the health hazards of substances, to determine the toxicity class and the extent of therapeutic action in the short term. It has been experimentally proved that the dry extract of reishi mushrooms belongs to the V class of toxicity (almost non-toxic substances) according to the classification of K. K. Sidorov, taking into account the route of administration.



DOI:10.33617/2522-9680-2019-3-49

УДК 582.674:547.466:615.074

ВИВЧЕННЯ АМІНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ ХВИЛІВНИКА ЗВИЧАЙНОГО (*ARISTOLOCHIA CLEMATITIS* L.)

- Л. І. Погодіна, аспір. каф. хімії природ. сполук і нутриціол.
- Н. Є. Бурда, д.фарм.н., доц., доц. каф. хімії природ. сполук і нутриціол.
- В. С. Кисличенко, д. фарм. н., проф., зав. каф. хімії природ. сполук і нутриціол.
- Національний фармацевтичний університет, м. Харків

Рід Хвилівник представлений 500 рослинами, які достатньо розповсюджені і зустрічаються в багатьох країнах світу [9].

Серед видів Хвилівника в Україні поширений **хвилівник звичайний** (*Aristolochia clematitis* L., родина *Aristolochiaceae*), який є багаторічною трав'янистою рослиною [9]. Зважаючи на перспектив-

ність застосування в медицині вищезазначеної рослини, актуальним є проведення поглибленого його фітохімічного вивчення.

Крім того, хвилівник звичайний є нефармакопейною рослиною в Україні та інших країнах, то виникає потреба в її стандартизації для подальшого одержання нових лікарських засобів на її основі.