

УДК 615.9

ОПРЕДЕЛЕНИЕ КЛАССА ТОКСИЧНОСТИ ЭКСТРАКТА *GRATIOLA OFFICINALIS L.*, С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НОВОГО ТЕСТ-ОБЪЕКТА – ЛИЧИНОК *CHIRONOMUS RIPARIUS*

М.Н. Курчатова,
Н.В. Полуконова,
Н.А. Дурнова

ГБОУ ВПО «Саратовский
государственный медицинский
университет
им. В.И. Разумовского»
Минздрава РФ, 410012,
г. Саратов, Российская
Федерация

Для исследования в качестве сырья использована трава аврана лекарственного. В качестве показателей токсичности на организменном уровне использованы значения средней летальной концентрации (LC_{50}) и характер кумуляции, определенные на личинках *Chironomus riparius*. Результаты по токсичности экстракта, полученные на личинках, сравнивали с результатами, полученными на лабораторных мышах по средней летальной дозе (LD_{50}). Подтверждена возможность использования личинок хирономид *Ch. riparius* в качестве нового тест-объекта по доклинической оценке безопасности фармакологических веществ. Полулетальная концентрация (LC_{50}) биофлавоноидного экстракта, установленная на личинках двукрылых насекомых – хирономид *Ch. riparius*, составила 2280 мг/л. Полулетальная доза (LD_{50}), определенная на лабораторных мышах при внутрибрюшинном введении составила 2375 мг/кг. Согласно классификации токсичности веществ экстракт соответствует классу практически не токсичных веществ. Экстракт аврана обладает слабой степенью кумуляции ($TL_{50} < 12$).

Ключевые слова: *Chironomus riparius* Mg, *Gratiola officinalis L.*, острая токсичность; класс токсичности.

Введение. В связи с обязательной доклинической проверкой безопасности лекарственных средств природного происхождения необходимо использовать разные методы оценки ответных реакций организма на разных уровнях организации (например, на организменном, клеточном; геном, хромосомном и геномном) [9]. В настоящее время наблюдается тенденция поиска новых тест-объектов по доклинической оценке их безопасности. Нами в качестве нового тест-объекта для определения класса токсичности в рамках доклинической оценки безопасности фармакологических веществ предложены личинки гетеротопных двукрылых насекомых (Diptera) – *Chironomus riparius* Meigen, 1804. Ранее политенные хромосомы этих личинок были предложены как тест-объект для анализа функциональной активности интерфазной хромосомы под влиянием холинотропных препаратов [10,11]. В

связи с этим, личинки *Ch. riparius* можно использовать не только для установления токсичности, но, одновременно, и цитотоксичности фармакологических веществ. В качестве растительного экстракта в данной работе использован экстракт аврана лекарственного (*Gratiola officinalis* Linnaei, 1753). Авран ядовит, не входит в Государственную Фармакопею, но используется в народной медицине [3]. Было установлено, что экстракт аврана, приготовленный определенным способом (позволяющим удалить токсичные вещества, например, алкалоиды), обогащен флавоноидом - кверцетином и обладает выраженной противоопухолевой, антиоксидантной и др. активностью [1], но исследования по установлению класса токсичности этого экстракта ранее не проводились.

Цель настоящего исследования – апробировать новый тест-объект – личинок *Chironomus riparius* для определения класса

Курчатова Мария Николаевна (Kurchatova Maria Nikolaevna), аспирант кафедры общей биологии фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО Саратовского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 410012, г. Саратов, Российская Федерация, kurchatova.marya@yandex.ru
Дурнова Наталья Анатольевна (Durnova Natalia Anatolevna), доктор биологических наук, доцент кафедры общей биологии, фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО Саратовского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 410012, г. Саратов, Российская Федерация, ndurnova@mail.ru
Полуконова Наталья Владимировна (Polukonova Natalia Vladimirovna), доктор биологических наук, профессор кафедры общей биологии фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО Саратовского государственного медицинского университета Минздрава РФ, 410012, г. Саратов, Российская Федерация, polukonovanv@yandex.ru

токсичности водорастворимых растительных экстрактов на примере *Gratiola officinalis*, и сравнить полученные данные с результатами оценки класса токсичности этого экстракта на лабораторных мышах.

Материалы и методы исследования. Для исследования в качестве сырья использована трава аврана лекарственного, собранная в Саратовской области (пос. Чардым, июль-август 2013 г.). Экстракт получен способом, предполагающим его очистку от ядовитых соединений [7]. Спектрофотометрическим методом с использованием стандартного образца кверцетина (Sigma, 98%) нами вычислено среднее значение кверцетина в данном экстракте, которое составило 0,66%. Установленное нами методом жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количество кверцетина в сухом остатке экстрактивных веществ (получаемого из 10 г сухой травы аврана) составило 350 мкг. Концентрация исходного водного раствора экстракта аврана – 114000 мг/л.

В качестве показателей токсичности на организменном уровне, по которым устанавливали класс токсичности, нами использованы значения средней летальной концентрации (LC_{50}) [5,9] и характер кумуляции [5], определенные на личинках *Ch. riparius*.

Личинки *Ch. riparius*, собранные из природного водоема Саратовской обл., перед началом эксперимента в течение суток проходили акклимацию (при температуре 15–18°C, в эмалированной открытой кювете объемом 500 мл), в течение которых погибли особи, получившие микротравмы в процессе транспортировки. Эксперимент на установление острой токсичности проводили в течение 24 часов при температуре 15–18°C в непроточных условиях в пластиковых емкостях объемом 100 мл (с возможностью доступа воздуха) без добавления грунта и пищи [8]. Обоснованием отсутствия грунта и пищи для личинок в ходе эксперимента служило исключение возможности взаимодействия питательного субстрата на исследуемые экстракты [10]. Вода соответствовала СанПиН 2.1.4.559-96 [8]. В опытные и контрольные емкости помещали по 30 особей личинок, объем воды составил 30 мл в каждой емкости. Подсчитывалось количество погибших личинок. Для тестирования были использованы концентрации равные 1/10 и 1/50 разведения от исходного экстракта. Каждый эксперимент проводился в трех повторностях.

Для установления характера кумуляции в опытные и контрольные емкости помещали по 70 особей *Ch. riparius* в 70 мл. Через 24, 48,

72 и 96 ч подсчитывалось количество погибших личинок. Время гибели (TL_{50}) определяли графически от LC_{50} [5]. Учитывали суммарное время гибели в течение 96 часов ($\sum t$) от каждой из трех испытанных концентраций: 1/10 LC_{50} (228 мг/л), 1/100 LC_{50} (22,8 мг/л), 1/1000 LC_{50} (2,28 мг/л). Эксперимент проводили в трех повторностях. Среднее время гибели одной особи (t_n) вычисляли по формуле: $t_n = \sum t/n$, где n – общее количество погибших при каждой из трех выбранных концентраций. На график в логарифмическом масштабе наносили точки, соответствующие значениям t_n , через которые проводили прямую и определяли TL_{50} ; по оси абсцисс указывали время гибели особей, в часах, по оси ординат – концентрации экстракта, в мг/л.

Результаты по токсичности экстракта, полученные на личинках, сравнивали с результатами, полученными на лабораторных мышах по средней летальной дозе (LD_{50}). При определении средней летальной дозы (LD_{50}) использованы 18 самцов лабораторных мышей двух групп: контрольной и экспериментальных групп по количеству исследуемых концентраций (по шесть мышей). Лабораторные мыши содержались в стандартных условиях. Животным однократно внутрибрюшинно вводили водный раствор экстракта в разных дозах: 1700 мг/кг; 4000 мг/кг; 4475 мг/кг. Контрольной группе животных также внутрибрюшинно вводили физиологический раствор. Наблюдение за животными проводили в течение суток. Значения LD_{10} ; LD_{16} ; LD_{50} ; LD_{84} ; LD_{100} , не выявленные экспериментально, определяли пробит-анализом [2].

Результаты и обсуждение.

Определение класса токсичности экстракта аврана на хирономидах с учетом полулетальной концентрации. Смертность личинок *Ch. riparius* (экспозиция 24 ч) при разных концентрациях экстракта аврана составила: 50% при 2280 мг/л и 100% при 11400 мг/л, $LC_{50} = 2280$ мг/л. Множественное сравнение количества личинок, погибших в течение 96 часов эксперимента, с экстрактом аврана с использованием рангового дисперсионного анализа Фридмана, показало наличие статистически значимых отличий ($\chi^2=11,18$; $p<0,01$) гибели личинок в каждой из трех экспериментальных групп с различными концентрациями по сравнению с контролем. На рисунке 1 представлена динамика гибели личинок под действием разных концентраций экстракта. При концентрации водного раствора экстракта аврана (2,28 мг/л) гибель личинок не отличалась от контро-

ля. В течение всего эксперимента количество погибших личинок возрастало каждые сутки (рис. 1). Наибольшая гибель личинок наблюдалась в течение от трех до четырех суток при самой высокой из исследованных концентраций – 228 мг/л (рис. 1). Значение TL_{50} составило менее 12 ч, что соответствует слабой степени кумуляции экстракта аврана (рис. 2).

Согласно классификации по острой токсичности и опасности [4] исследуемый нами экстракт относится к практически не токсичным веществам, $LC_{50} > 100$ (мг/л).

Проверка оценки токсичности экстракта аврана на мышах. Для сравнения класса токсичности экстракта аврана на разных тест-объектах нами проведено определе-

ние его полуметальной дозы на лабораторных мышах. При внутрибрюшинном введении установлены дозы, вызывающие гибель 80% (4000 мг/кг) и 100% (4475 мг/кг) животных. По полученным нами данным определили значения таких доз, как LD_{10} (1778 мг/кг), LD_{16} (1905 мг/кг), LD_{84} (4100) мг/кг. Максимально переносимая доза (МПД) – 1700 мг/кг. LD_{50} составила 2375 мг/кг. Согласно классификации токсичности веществ при введении в брюшную полость животного [6] исследуемый экстракт относится к практически не токсичным веществам (LD_{50} от 1001 – 3000 мг/кг).

Заключение. В результате проведенной работы по оценке токсичности водного раствора экстракта аврана лекарственного, со-

державшего биофлавоноиды, определены LC_{50} , составившая на личинках хирономид – 2280 мг/л, и LD_{50} , составившая на лабораторных мышах при внутрибрюшинном введении – 2375 мг/кг, что соответствует практически не токсичным веществам. Установлена слабая степень кумуляции исследуемого экстракта ($TL_{50} < 12$). Полученные данные по определению класса токсичности растительного экстракта на *Ch. riparius* и лабораторных мышах совпадают, что делает возможным использование личинок хирономид в качестве нового тест-объекта для проведения анализа острой токсичности. Для этого личинки (после акклимации) помещаются в непроточных условиях в емкости без грунта и пищи с испытуемым раствором, так, чтобы объем раствора составлял не менее 1 мл для каждой. В группе контроля личинки находятся в чистой воде, соответствующей СанПиН 2.1.4.559-96. Количество погибших подсчитывается через сутки и сравнивается с контрольной группой (подробный алгоритм проведения анализа изложен в разделе Методика исследования). Личинки *Ch. riparius* являются удобными тест-объектами для анали-

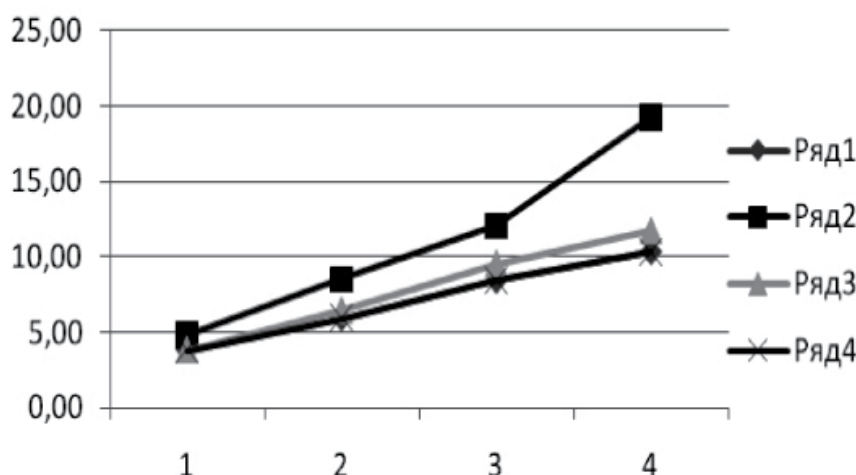


Рис. 1. Динамика суммарной смертности личинок хирономид под действием экстракта аврана лекарственного в течение 96 часов. Обозначения: ряд 1 – контроль; ряд 2 – концентрация 1/10 LC_{50} ; ряд 3 – концентрация 1/100 LC_{50} ; ряд 4 – концентрация 1/1000 LC_{50} . По оси x указаны дни эксперимента, по оси y – количество погибших животных.

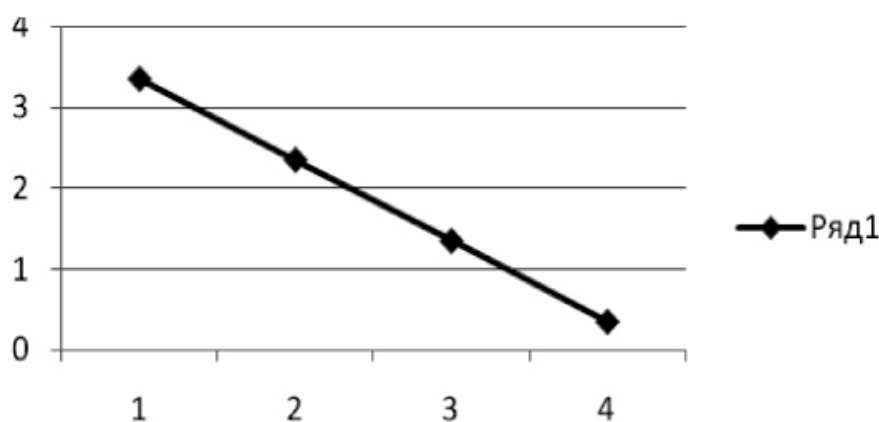


Рис. 2. Зависимость времени гибели личинок хирономид от концентрации под действием экстракта аврана. По оси x указаны часы, а по y – значения логарифмов четырех концентраций. Соответствие «концентрация-время» следующее: 1 – LC_{50} , 2 – $1/10LC_{50}$, 3 – $1/100LC_{50}$, 4 – $1/1000LC_{50}$.

за острой токсичности, так как их получение (отлов) и содержание не представляет технических трудностей, а предложенная методика является относительно простой, экономичной, и осуществляется в короткие сроки.

Выражаем благодарность зав. лабораторией физиологии и токсикологии ФГБУН ИБВВ им. И.Д. Папанина РАН, д.б.н. Григорию Михайловичу Чуйко за помощь в работе над статьей.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // LLC Science and Innovations, Saratov, Russia. 2012. P. 1-4.
2. Коросов А.В., Калинин Н.М. Количественные методы экологической токсикологии: Учебно-методическое пособие // ПетрГУ, КНЦ. Петрозаводск; 2003. 56 с.
3. Куркин В.А. Фармакогнозия: учебник для фармацевтических вузов (факультетов) // В.А. Куркин. 2-е изд., перераб. и доп. Самара; 2007. 1239 с.
4. Методы оценки экологической опасности пестицидов при их регистрации (Руководство по классификациям экологической опасности пестицидов) Российская Академия Сельскохозяйственных Наук Государственное научное учреждение Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии (ВНИИФ) Большие Вяземы. 2010.
5. МУ 2.1.5.720–98 Обоснование гигиенических нормативов химических веществ в воде водных объектов хозяйственно-питьевого и культурно-бытового водопользования (НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАН).
6. «Оценка токсичности и опасности дезинфицирующих средств» Методические указания МУ 1.2.1105-02 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 10 февраля 2002 г.)
7. Патент № 2482863, Способ получения сухого экстракта из растительного сырья, обладающего биологической активностью/ Полуконова Н.В., Наволокин Н.А., Дурнова Н.А., Маслякова Г.Н., Бучарская А.Б.// Заявка на патент № 2012105384, приоритет от 15.02.2012. Положительное решение от 7.02.2013 г.
8. РД 52.24.635-2002. Методические указания. Проверка наблюдений по оценке уровня токсического загрязнения донных отложений на основе биотестирования. Методы токсикологической оценки загрязнения пресноводных экосистем. М.: Росгидромет. 15 с.
9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств ч. 1 // Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
10. Федорова И.А., Полуконова Н.В., Дворецкий К.Н., Богословская С.И. Функциональная активность политенных хромосом *Chironomus* (Diptera) под влиянием холинотропных препаратов атропина и пилокарпина // Экологическая генетика. 2009. Т. 7 (№3). С. 44–52.
11. Федорова И.А., Полуконова Н.В., Петров Н.В. Цитогенетические эффекты холинотропных препаратов при комбинированном действии на личинок *Chironomus plumosus* (DIPTERA) *in vivo*. // Цитология, 2009, Том 51 (№10). С. 849-855.

REFERENCES:

1. Navolokin N.A., Polukonova N.V., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B., Durnova N.A. Effect of extracts of *Gratiola officinalis* and *Zea mays* on the tumor and the morphology of the internal organs of rats with transplanted liver cancer // LLC Science and Innovations, Saratov, Russia. 2012. P. 1-4.
2. Korosov A.V., Kalinkina N.M. Quantitative methods in environmental toxicology: textbook // PetrGU, KNC. Petrozavodsk; 2003. 56 p. (in Russian)
3. Kurkin V.A. Pharmacognosy: a textbook for pharmaceutical universities (faculties) // V.A. Kurkin. 2-e izd., pererab. i dop. Samara; 2007. 1239 p. (in Russian)
4. Methods for assessing the ecological risks of pesticides in registration (Manual of classifications of ecological risks of pesticides) Rossijskaja Akademija Sel'skhozajstvennyh Nauk Gosudarstvennoe nauchnoe uchrezhdenie Vserossijskij nauchno-issledovatel'skij institut fitopatologii (VNIIF) Bol'shie Vjazemy. 2010. (in Russian)
5. MU 2.1.5.720–98 Substantiation of hygienic standards for chemical substances in water of water bodies of drinking and household water use (NII jekologii cheloveka i gigijeny okružhajushhej sredy im. A.N. Sysina RAMN). (in Russian)
6. «Evaluation of the toxicity and dangers of disinfectants» Methodical instructions MU 1.2.1105-02 (utv. Glavnym gosudarstvennym sanitarnym vrachom RF 10 fevralja 2002.) (in Russian)
7. Patent № 2482863, A method of obtaining a dry extract from vegetable raw materials with biological activity / Polukonova N.V., Navolokin N.A., Durnova N.A., Maslyakova G.N., Bucharskaya A.B.// Zayavka na patent № 2012105384, prioritet ot 15.02.2012. Polozhitel'noe reshenie ot 7.02.2013 (in Russian).
8. RD 52.24.635-2002. Methodical instructions. Check observations to assess the level of toxic pollution of bottom sediments on the basis of biotesting. Methods for Toxicological assessment of pollution of freshwater ecosystems. Moscow: Rosgidromet. 15 p. (in Russian)
9. The guidelines for conducting pre-clinical studies of drugs. ch. 1 // Pod red. A.N. Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (in Russian)
10. Fedorova I.A., Polukonova N.V., Dvoreckij K.N., Bogoslovskaja S.I. The functional activity of polytene chromosomes of *Chironomus* (Diptera) under the influence of chalinochromis drugs atropine and pilocarpine // Jekologicheskaja genetika. 2009. T. 7 (№3). P. 44–52 (in Russian).
11. Fedorova I.A., Polukonova N.V., Petrov N.V. Cytogenetic effects of chalinochromis drugs with combined effect on larvae of *Chironomus plumosus* (DIPTERA) *in vivo* // Citologija, 2009, Tom 51 (№10). P. 849-855 (in Russian).

M.N. Kurchatova, N.V. Polukonova, N.A. Durnova

DETERMINATION OF THE TOXICITY CLASS OF A GRATIOLA OFFICINALIS L. PLANT EXTRACT, USING LARVAE CHIRONOMUS RIPARIUS AS A NEW TEST OBJECT

State Budgetary Educational Institution V.I. Razumovsky «Saratov State Medical University». RF Ministry of Health of Russia, 410012, Saratov, Russian Federation

The herb golden pert (*Gratiola Officinalis*) was used as starting material in the study. Magnitudes of the median lethal concentration (LC_{50}) and accumulation character determined in larvae *Chironomus riparius* were taken as toxicity indicators on the organismal level. Results of the extract toxicity obtained with larvae were compared with those obtained with laboratory mice in terms of median lethal dose (LD_{50}). A possibility of using *Chironomid* larvae *Ch. riparius* as a new test object in pre-clinical safety assessment of pharmacological substances was proved. A semi-lethal concentration (LC_{50}) of the bio flavonoid extract in which double-wing insects larvae *Chironomid Ch. riparius* were put was 2280mg/l. A semi-lethal dose (LD_{50}) determined in laboratory mice at intra-abdominal administration was equal to 2375 mg/l. According to the toxicity classification of substances, the extract refers to the class of practically non-toxic substances. The herb golden pert extract has a weak ability of accumulation ($TL_{50} < 12$).

Key words: *Chironomus riparius* Mg, *Gratiola officinalis* L., acute toxicity, toxicity class.

Материал поступил в редакцию 02.10.2014 г.