УДК 615.322:582.998.16].099-047.37

О. О. МАЛЮГІНА, здобувач, О. В. МАЗУЛІН, д-р фарм. наук, проф.,
І. Ф. БЄЛЕНІЧЕВ, д-р мед. наук, проф.,
Г. П. СМОЙЛОВСЬКА, канд. фарм. наук
Запорізький державний медичний університет

ВИВЧЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ЛІПОФІЛЬНИХ ЕКСТРАКТІВ КАРОТИНОЇДОВМІСНИХ СОРТІВ РОДУ ЧОРНОБРИВЦІ (*TAGETES* L.)

Ключові слова: *Tagetes erecta* L., *Tagetes patula* L., гостра токсичність, ліпофільні екстракти

Вивчення гострої токсичності є першим етапом дослідження, який надає інформацію про небезпечність лікарської речовини для здоров'я людини в умовах короткотривалої дії. Ці дані можуть бути використані для визначення класу токсичності, а також як первинна інформація під час встановлення підгострої, хронічної, специфічної токсичності, токсикодинаміки, визначенні співвідношення між дозою та негативним ефектом, видової та статевої чутливості та ін. [1, 2].

Чорнобривці розлогі (*Tagetes patula* L.) та чорнобривці прямостоячі (*Tagetes erecta* L.) належать до роду *Tagetes* L. триби *Tageteae* родини *Asteraceae*, до якого входить близько 56 однорічних та багаторічних видів і більш ніж 600 форм та сортів рослин [3, 4]. Вони широко відомі як декоративні рослини. У народній медицині настої та відвари з різних частин чорнобривців використовують для лікування захворювань шлунково-кишкового тракту, інфекційних захворювань, як жовчогінні та сечогінні засоби [4, 5, 6].

Останні роки рослини роду *Tagetes* L. привертають увагу світової наукової спільноти завдяки вмісту біологічно активних речовин широкого спектра, серед яких виділяють каротиноїди лютеїн, β-каротин, зеаксантин, неоксантин, віолаксантин, флавоноїди патулетин, рутин, кверцетин, кверцетогетин та їхні глікозиди, амінокислоти, органічні кислоти, дубильні речовини, ефірні олії. Екстракти та біологічно активні речовини, отримані з чорнобривців, є перспективними для застосування у медицині та виявляють в експерименті антиоксидантні, протигрибкові, протимікробні, гепатопротекторні, протипаразитарні та ранозагоювальні властивості [4, 6, 7].

Виходячи з вищенаведеного, дослідження гострої токсичності ліпофільних екстрактів із суцвіть чорнобривців розлогих та чорнобривців прямостоячих має велике наукове та практичне значення.

Метою дослідження є встановлення гострої токсичності ліпофільних екстрактів чорнобривців розлогих низькорослої форми сорту Голдкопфен **(***Tagetes patula* L. *nana var. Goldkopfen)* та чорнобривців прямостоячих високорослої форми сорту Гаваї (*Tagetes erecta* L. *plena var. Hawaji).*

Матеріали та методи дослідження

Ліпофільні екстракти отримували з суцвіть чорнобривців розлогих низькорослої форми сорту Голдкопфен та чорнобривців прямостоячих високорослої форми сорту Гаваї, зібраних протягом вегетаційного періоду (червень–вересень) 2012–2013 рр. на території України. Повітряно-суху сировину піддавали вичерпній екстракції олією кукурудзяною рафінованою дезодорованою на водяній бані, екстракт відділяли, відстоювали та стандартизували за вмістом каротиноїдів і флавоноїдів.

© Колектив авторів, 2016

Дослідження гострої токсичності здійснювали на білих нелінійних щурах обох статей віком 3,5 міс та масою 160–180 г, отриманих із розплідника ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» (м. Київ). Тривалість карантину становила 14 діб. Упродовж цього терміну двічі на день робили спостереження за поведінкою та загальним станом тварин. Перед початком експерименту тварин було розподілено за групами методом рандомізації. За критерій прийнятності рандомізації приймали відсутність зовнішніх ознак захворювання та гомогенність груп за масою тіла (± 20%). Тварин, що не відповідали критеріям, було виключено з експерименту.

Тварин утримували у клітках по 6 голів у кожній в окремих кімнатах зі світловим режимом 12 годин – світло, 12 годин – темрява, температурою повітря 19–25 °С, відносною вологістю – 50–70% [8, 9].

Статистичне оброблення результатів здійснювали з використанням стандартного пакету аналізу програм статистичної обробки результатів версії Microsoft Office Excell 2003. Достовірність відмінностей між експериментальними групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента та U-критерію Уітні-Манна комп'ютерної програми «STATISTICA for Windows 6.0» (StatSoft Inc., №AXXR712D833214FAN5).

Для визначення токсичності у разі нашкірного нанесення зразків дослідним тваринам вистригали ділянки шкіри на спині – першій групі розміром 2 х 2 см, другій – 4 х 4 см, третій – 8 х 8 см. На ці ділянки за допомогою піпетки-дозатора однократно наносили досліджувані зразки в об'ємах – 3,0 мл, 6,0 мл и 12,0 мл відповідно. Після нанесення зразків тварин спостерігали протягом 48 год та реєстрували випадки загибелі, зміни з боку серцево-судинної, дихальної, центральної нервової систем, поведінки та рухової активності [1, 2, 9].

Для визначення показників гострої токсичності у разі внутрішньошлункового введення використовували 3 однорідні групи по 6 тварин, у тому числі контрольна, сформовані як зазначено вище. Досліджувані рослинні екстракти вводили внутрішньошлунково за допомогою металевого зонду у зростаючих дозах за Літчфілдом–Уілкоксоном. Для досягнення великих доз екстракти вводили тваринам повторно з інтервалами 30 хв протягом 2–3 год. Період спостереження становив 14 діб. При цьому реєстрували наявність симптомів інтоксикації, показники загального стану. До початку експерименту, а також на 2, 7 та 14 добу виконували зважування та облік вживання корму та води. Через 14 діб тварин всіх експериментальних груп піддавали евтаназії тіопенталом натрію та патоморфологічному дослідженню [8, 9].

Результати дослідження та обговорення

Результати дослідження гострої токсичності за нашкірного нанесення наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Результати дослідження гострої токсичності ліпофільних екстрактів чорнобривців за нашкірного нанесення, *n* = 6

Досліджуваний екстракт	Площа тіла, на яку наносили зразок, см	Доза, яку наносили, мл	Доза, яку наносили, мл/см^2	Кількість летальних випадків
Tagetes patula L. *nana var. Goldkopfen*	2 х 2	3,0	0,7500	0
	4 х 4	6,0	0,3750	0
	8 х 8	12,0	0,1875	0
Tagetes erecta L. *plena var. Hawaji*	2 х 2	3,0	0,7500	0
	4 х 4	6,0	0,3750	0
	8 х 8	12,0	0,1875	0

Як свідчать дослідження, одноразове нанесення різних доз досліджуваних ліпофільних екстрактів не спричинювало загибелі тварин у жодній експериментальній групі, також не були зафіксовані зміни з боку серцево-судинної, дихальної системи, ЦНС та активності тварин. Шкіра та підшкірна клітковина у місці нанесення не були видозмінені; інфільтратів, подразнення або некрозу тканин у місці нанесення не спостерігали.

У зв'язку з відсутністю токсичного ефекту за нашкірного нанесення досліджуваних екстрактів, було виконано дослідження гострої токсичності за внутрішньошлункового введення. Встановлено, що у разі внутрішньошлункового введення досліджуваних ліпофільних екстрактів летальний ефект не був зафіксований у жодному випадку, у тому числі за введення максимально можливої (лімітуючої) дози – 20 мл/кг (табл. 2).

Таблиця 2

Результати дослідження гострої токсичності ліпофільних екстрактів чорнобривців за внутрішньошлункового введення лімітуючої дози, *n* = 6

Досліджуваний ліпофільний екстракт	Лімітуюча доза, мл/кг	Кількість летальних випадків
Tagetes patula L. *nana var. Goldkopfen*	20	0
Tagetes erecta L. *plena var. Hawaji*	20	0

Упродовж усього терміну спостереження у експериментальних групах не спостерігали значущих порушень загального стану та поведінки тварин. З першої по четверту добу фіксували певне зниження активності та вживання корму, інколи – діарею. Щоб виключити цей ефект, спричинений стресом через вміщення тварин у незнайому обстановку, виконували дослідження зміни маси тіла відносно фонових показників. Динаміка маси тіла в усіх експериментальних групах була у межах норми (табл. 3).

Таблиця 3

Динаміка маси тіла щурів, що перенесли інтоксикацію після внутрішньошлункового введення ліпофільних екстрактів чорнобривців (г, *M* ± *m*), *n* = 6

Термін спостереження	Контроль	*Tagetes patula* L. *nana var. Goldkopfen*	*Tagetes erecta* L. *plena var. Hawaji*
На початку експерименту	172,0 ± 3,0	175,0 ± 4,0	173,0 ± 4,0
2 доба	173,0 ± 4,0	171,0 ± 5,0	169,0 ± 3,0
7 доба	181,0 ± 3,0	175,0 ± 3,0	173,0 ± 4,0
14 доба	187,0 ± 4,0	183,0 ± 4,0	182,0 ± 3,0

Із табл. 3 випливає, що на другий день дослідження відмічали певну втрату ваги у тварин усіх груп, яким вводили рослинні екстракти. Аналіз даних не виявив достовірної різниці у динаміці маси тіла дослідних та контрольних тварин.

Після евтаназії тіопенталом натрію дослідні тварини було піддано патоморфологічному дослідженню.

Під час макроскопічного дослідженні видових та статевих відмінностей, а також впливу внутрішньошлункового введення на стан внутрішніх органів не встановлено. Шерсть усіх тварин мала охайний вигляд, ділянок облисіння не було. Під час огляду грудної та черевної порожнини порушень у розміщенні внутрішніх органів не виявили. Підщелепні лімфатичні вузли та слинні залози мали овальну або округлу форму, однорідний рожевуватий або жовтуватий колір та помірну щільність. Щитоподібна залоза щільно прилежала до гортані та мала нормальні розміри та щільність, рожевувато-червонуватий колір. Тимус був трикутної форми, білуватого кольору та помірно

щільної консистенції. Змін у розмірах, формі та структурі серцевого м'яза не встановлено. Легені мали блідо-рожеве забарвлення, спадалися при розтині грудної клітини. Тканини легень у розрізі мали однорідне блідо-рожеве забарвлення. Слизова оболонка бронхів – гладка, блискуча, блідо-рожева. Під час дослідження шлунково-кишкового тракту також не виявлено патологічних змін. Шлунок мав нормальну форму та розміри, просвіт був заповнений щільним харчовим вмістом, слизова оболонка мала блідо-рожеве забарвлення, була блискучою та складчастою. У слизовій тонкого та товстого кишечника змін не було. Величина та форма печінки – без змін, капсула тонка та прозора. Тканина печінки мала нормальний колір та консистенцію. Підшлункова залоза забарвлена у блідо-рожевий колір, мала нормальну дольчасту структуру. Розміри та форма нирок не відрізнялися від контролю, капсула легко знімалася, поверхня органу гладка, однорідна, рівномірного коричнево-сірого забарвлення, нормальної будови. Форма, розміри, щільність наднирників та статевих залоз – у нормі. Селезінка забарвлена у темно-вишневий колір, змін у структурі та щільності не зафіксовано. Оболонки головного мозку тонкі, прозорі, речовина мозку мала помірну щільність. Не спостерігали розширення шлуночків мозку або інших анатомічних та морфологічних змін. Масові коефіцієнти внутрішніх органів тварин, що отримували рослинні екстракти, та контрольних груп тварин статистично не відрізнялись.

Таким чином, тварини, що отримували максимально допустимі для введення дози рослинних екстрактів, не відрізнялися згідно з патоморфологічним дослідженням за показниками від контрольних тварин. Із вищенаведеного випливає, що досліджувані екстракти не токсичні та можуть бути віднесені до VI групи токсичності – «Відносно нешкідливі».

Висновки

1. Під час вивчення гострої токсичності ліпофільних екстрактів чорнобривців розлогих та чорнобривців прямостоячих встановлено, що за нашкірного нанесення у дозі до 0,75 мл/см^2 та внутрішньошлункового введення лімітуючої дози 20 мл/кг маси тіла досліджувані екстракти не спричинювали загибелі тварин, а також не виявлено патологій під час патоморфологічного дослідження тварин.

2. На підставі дослідження гострої токсичності ліпофільні екстракти з суцвіть чорнобривців розлогих сорту Голдкопфен та чорнобривців прямостоячих сорту Гаваї віднесено до VI групи токсичності – «Відносно нешкідливі».

Список використаної літератури

1. *Кукес В. Г., Булоев В. М., Колхир В. К.* Методические указания по доклиническому изучению новых препаратов, разрабатываемых из природного сырья / Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Минздрав РФ, 2005. – 348 с.

2. *Стефанов А. В.* Доклинические исследования лекарственных средств. – К.: Авиценна, 2002. – 568 с.

3. *Третьяков М. Ю., Сорокопудов В. Н., Дейнека В. И.* Накопление ксантофиллов у некоторых видов рода *Tagetes* L. в условиях Белгородской области // С-х биол. – 2010. – № 4. – С. 105–109.

4. *Priyanka D., Shalini T., Kumar Navneet V.* A brief study on marigold (Tagetes species): a review // Inter. Res. J. Pharmacy. – 2013. – N 4 (1). – P. 43–48.

5. *Zhang P., Zeng L., Su X. Y. et al.* Karyotype studies on *Tagetes erecta* L. and *Tagetes patula* L. // African J. Biotechnol. – 2011. – V. 10 (72). – P. 16138–16144.

6. *Xu L. W., Juan C., Huan-yang Q. I., Shi Y. P.* Phytochemicals and Their Biological Activities of Plants in *Tagetes* L. // Chin. Herbal Med. – 2012. – N 4 (2). – P. 103–117.

7. *Ramya R., Mahna S., Bhanumathi S. P., Bhat S. K.* Analysis of Phytochemical Composition and Bacteriostatic Activity of *Tagetes* sp. // Inter. Res. J. Pharmacy. – 2012. – N 3 (11). – P. 114–115.

8. Лікарські засоби: Належна лабораторна практика: СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008. - СТ-Н МОЗУ 42-6.0:2008 [Чинний від 16. 02. 2009]. – К.: МОЗ України, 2009. – 27 с. – (Національні стандарти України).

9. *Кожемякін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А. та ін.* Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. – К.: Авіцена, 2002. – 155 с.

Надійшла до редакції 11 грудня 2015 року.

Е. А. Малюгина, А. В. Мазулин, И. Ф. Беленичев, Г. П. Смойловская
Запорожский государственный медицинский университет

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛИПОФИЛЬНЫХ ЭКСТРАКТОВ КАРОТИНОИДОСОДЕРЖАЩИХ СОРТОВ РОДА БАРХАТЦЫ (*TAGETES* L.)

Ключевые слова: *Tagetes erecta* L., *Tagetes patula* L., острая токсичность, липофильные экстракты

А Н Н О Т А Ц И Я

Бархатцы – распространенный по всему миру вид растений, который используется в народной медицине для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта и инфекционных болезней. Многокомпонентный химический состав обеспечивает широту терапевтического действия получаемых из них лекарственных средств. Экстракты и биологически активные вещества бархатцев привлекают внимание научного сообщества как перспективный источник новых фитопрепаратов. Поэтому исследование острой токсичности липофильных экстрактов бархатцев имеет большое научное и практическое значение. Целью работы было исследование острой токсичности липофильных экстрактов бархатцев распростертых низкорослой формы сорта Голдкопфен и бархатцев прямостоячих высокорослой формы сорта Гаваи при накожном нанесении и внутрижелудочном введении. Образцы для исследования были получены из сухого сырья бархатцев экстракцией маслом кукурузным рафинированным дезодорированным. Исследование проводили на белых нелинейных крысах в соответствии с требованиями законодательства Украины. Для определения токсичности при наружном нанесении образец наносили однократно в дозах 0,7500 мл/см^2, 0,3750 мл/см^2, 0,1875 мл/см^2. Исследование острой токсичности при внутрижелудочном введении осуществляли по методу Литчфилда–Уилкоксона на трех однородных группах животных. Для достижения больших доз образцы вводили повторно с интервалами 30 минут в течение 2–3 часов. В ходе эксперимента у животных не отмечали статистически достоверных изменений поведения и общего состоянии. При патоморфологическом исследовании не было выявлено отклонений в строении, структуре и массовых коэффициентах внутренних органов. Установлено, что исследуемые липофильные экстракты из соцветий бархатцев распростертых низкорослой формы сорта Голдкопфен и бархатцев прямостоячих высокорослой формы сорта Гавайи не токсичны при внутрижелудочном введении в лимитирующей дозе и при накожном нанесении, относятся к VI классу токсичности и могут быть использованы для получения фитопрепаратов.

E. A. Malugina, A. V. Mazulin, I. F. Belenichev, G. P. Smoylovskaya
Zaporizhzhia State Medical University

STUDYING ACUTE TOXICITY OF THE LIPOPHILIC EXTRACTIONS FROM *TAGETES* L. CONTAINING CAROTENOIDS

Key words: *Tagetes erecta* L., *Tagetes patula* L., acute toxicity, lipophilic extractions

A B S T R A C T

Marigold (*Tagetes* L.) is species of plants widely spread all over the world which is used in folk medicine for treating gastro-intestinal and infectious diseases. Multicomponent chemical composition assures large-scaled therapeutic action for the medicines obtained. Extractions and biological active substances from Marigold (*Tagetes* L.) as a promising source for new vegetable medicines attract attention of scientific community. Therefore, studying acute toxicity in lipophilic extractions from *Tagetes* L. is of great scientific and practical significance. The aim of this research was studying acute toxicity in lipophilic extractions from *Tagetes patula* L., undersized, *brand Goldkopfen* and *Tagetes erecta* L., high-sized, *brand Hawaji* in epicutaneous application and intragastric administration. The samples for research have been obtained from *Tagetes* dried raw material by extraction with corn oil refined and deodorized. The research has been carried out on white non-standard rats according to the Ukrainian legislation. Single external application of the sample in dosages 0.7500ml/cm^2, 0.3750ml/cm^2, 0.1875ml/cm^2 was used to assess toxicity. Studying acute toxicity in intragastric administration has been performed by Litchfield–Wilcoxony technique on three linear groups of animals. To attain higher dosages the samples have been introduced repeatedly at intervals 30 minutes within 120–180 minutes. During experiment no statistically reliable changes in behavior and general condition in animals have been noted. Pathomorphologic examination revealed no deviations in structure and mass indices for internal organs. It has been determined that lipophilic extractions from inflorescences of *Tagetes patula* L., undersized, *brand Goldkopfen* and *Tagetes erecta* L., high-sized, *brand Hawaji* are nontoxic both in intragastric administration in limiting dosage and in epicutaneous application, therefore they can be attributed to the VI class of toxicity and they are suitable for obtaining vegetable medicines.

Електронна адреса для листування з авторами: maluginaea@gmail.com