

- ния ноотропных препаратов // Вестник РАМН. 2000. №9. С. 27–34.
5. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* Ишемия мозга. – М.: Медицина. 2002. С. 328.
6. *Гусев Е.И., Скворцова В.И., Стаховская Л.В.* Эпидемиология инсульта в России // Журн. неврол. и психиатр. (приложение «Инсульт»). 2003. №8. С. 4-9.
7. *Каркищенко Н.Н.* Альтернативы биомедицины. т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. М.: Изд-во ВПК. 2007. С. 448.
8. *Скворцова В.И.* с соавт. Принципы ранней реабилитации больных с инсультом // Журн. неврол. и психиатр. 2002. № 7. С. 28-33.
9. *Hufschmidt A., Lucking C.* Neurologie Compact. Leitlinien für Klinik und Praxis. Thieme Verlag. 2003. 582 p.
10. *Paxinos G., Watson C.* The rat brain in stereotaxic coordinates., 4th Edition. 1998. P. 403-405.

Piracetam & piracetam combination with melaxen cerebroprotective effects at global cerebral ischemia in rats

E.V. Ganzgorn, Yu.S. Maklyakov, D.P. Khloponin, A.E. Matukhno, O.M. Kudelina, N.N. Karkischenko

On the base of EEG spectral analysis we've studied the effects of piracetam and its combination with melaxen in the conditions of cerebral blood flow disturbance in a rat model of global cerebral ischemia. It was established, that preventive usage of piracetam & melaxen combination significantly reduces the degree of circulatory ischemia adverse effects on the functional state of the rat brain. The obtained results can be used in clinical practice for the treatment of ischemic and neurodegenerative brain diseases.

Key words: piracetam, melaxen, cerebral ischemia, EEG.

Изучение острой токсичности и раздражающего действия лецитина

А.К. Гусейнов¹, В.Н. Каркищенко², А.В. Сергиенко¹, М.Н. Ивашев¹

¹ – Пятигорская государственная фармацевтическая академия, Пятигорск

² – Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: д.м.н., профессор Ивашев Михаил Николаевич ivashev@bk.ru

Проведенные исследования на куриных эмбрионах и конъюнктиве морских свинок показали, что лецитин биотехнологический не обладает раздражающей активностью и безопасен в применении для слизистых оболочек млекопитающих. По Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова субстанция лецитина биотехнологического может быть отнесена к практически нетоксичным препаратам LD₅₀>5000 мг/кг.

Ключевые слова: раздражающая активность, острая токсичность, лецитин.

Высококачественный лецитин представляет собой смесь фосфолипидов, состоящую из холина, инозитола и фосфатидов. Эти компоненты относятся к группе важнейших нутриентов питания, дефицит которых является серьезной проблемой для здоровья абсолютно числа населения. Особую опасность представляет недостаток лецитина в диете у детей раннего возраста, что особенно сказывается при искусственном вскармливании ребенка, ведь грудное молоко матери является единственным источником лецитина для младенца [4, 9, 10].

Длительное время добавление липидов в парентеральном питании рассматривалось исключительно как источник энергии и способ предупреждения или коррекции дефицита незаменимых жирных кислот [8].

Такое одностороннее использование лецитина позволило сделать предположение о том, что недооценены фармакологические свойства ценного метаболического корректора и средства заместительной терапии. Необходимо

эмпирическое обоснование и научное подтверждение с помощью экспериментального моделирования патологического состояния лабораторных животных возможности применения лецитина как средства комплексной нейропротекторной и кардиопротекторной терапии. Учитывая химический состав лекарственных форм лецитина и комплексных лекарственных средств, содержащих лецитин в качестве вспомогательного компонента, целесообразно изучение определения у лецитина индивидуальной фармакологической активности с целью расширения фармакодинамических параметров.

Цель исследования: изучение безопасности применения биотехнологического лецитина в сравнении с лецитином растительного и животного происхождения. Для определения дозировки и кратности субстанции, для возможности длительного применения субстанции, предложенной для наполнения капсул, необходимо сначала определить степень безопасности: раздражающее действие и токсичность.

Материалы и методы

Эксперимент начали с изучения влияния лецитина на острую токсичность и раздражающее действие.

Опытные группы животных принимали изучаемый лецитин, полученный биотехнологическим методом. Контрольной группе животных вводили в эквивалентном объеме 0,9% раствор натрия хлорида. В эксперименте использованы лецитин растительный (соевый) (Фирма Lipoid GmbH Германия); лецитин животного происхождения (яичный) 10%.

Так как гранулы лецитина яичного трудно растворимы в спирте и нерастворимы в воде, мы в своих опытах использовали тонкие суспензии, полученные путем солюбилизации в твин-80, относящимся к неионогенным поверхностно-активным веществам (НПАВ). По химическому составу он представляет собой Сорбитан-полиоксиэтиленмоноолеат, имеет значение гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) равное 14,6 [2].

Установлено, что для НПАВ летальные дозы составляют от 3 до 50 г/кг массы человека [2, 7]. Из всех ПАВ наименее токсичны НПАВ, поскольку они плохо всасываются в кожу и не обладают резорбтивным действием [2]. Острая токсичность и местно-раздражающее действие их повышается с увеличением степени оксипилирования.

Раствор готовили в керамической ступке путем растирания субстанций лецитина с твин-80 и последующим добавлением при перемешивании 0,9% раствора натрия хлорида. При анализе некоторых работ выявлено, что для модифицирования вспомогательных веществ характерен эмпирический подход к их дозировке [2, 7].

Вещество вводили животным мето-

дом принудительного зондирования в теплом (37°C) виде [8].

В эксперименте принимали участие морские свинки массой 380-420 г и белые неимбредные мыши массой 20-22 г.

Животные выращены в питомнике ПятГФА, (г. Пятигорск), содержались на стандартном режиме вивария: температура окружающего воздуха 22±2,0°C, 12-ти-часовой синхронизированный световой режим, комбинированный корм и вода *ad libitum* [5].

Целью исследования фармакологического вещества на модели хорион-аллантаической оболочки куриного эмбриона явилось предварительное определение его возможного раздражающего действия на слизистые оболочки млекопитающих.

Результаты и их обсуждение

Оценку раздражающего действия проводили с помощью теста на хорион-аллантаической оболочке куриного эмбриона, HET-CAM test, продолжали испытания на животных по схеме, используемой в настоящее время в Германии (Spielmann и соавт., 1996), на слизистой оболочке глаза морских свинок *Guinea pigs* [6].

Результаты раздражения конъюнктивы млекопитающих регистрировали в баллах по 5-бальной шкале, согласно рекомендациям П. Михайлова (1985 г.). В данном случае контролем служил второй глаз животного [3].

Действие вещества оценивали в течение определенного периода времени по наличию или отсутствию воздействия на хорион-аллантаическую оболочку под нанесенной каплей раствора тестируемого вещества. Полученные результаты позволяли предположить, что тестируемые субстанции могут не обладать раздражающим действием на слизистые оболочки млекопитающих (табл. 1).

Показатели раздражающего действия лецитина в тесте HET-CAM

Препарат	Класс соединений по степени раздражения		
	Разведение 1:1	Разведение 1:2	Разведение 1:4
ЛБТ	1,7 умеренная	1,0 отсутствие раздражения	1,0 отсутствие раздражения
ЛС	1,7 умеренная	1,0 отсутствие раздражения	1,0 отсутствие раздражения
ЛЯ	2,0 умеренная	1,0 отсутствие раздражения	1,0 отсутствие раздражения

Примечание: степень раздражения 4 класс – сильная; 3 класс – умеренная; 2 класс – слабая; 1 класс – отсутствие раздражения. ЛБТ – лецитин биотехнологический; ЛС – лецитин соевый; ЛЯ – лецитин яичный.

При нанесении лецитина биотехнологического (ЛБТ) в разведении 1:1 в двух случаях из трех наблюдалось небольшое покраснение хорион-аллантаической оболочки, замедление тока крови, что позволило согласно классификации веществ по степени раздражения отнести ко 2-му классу соединений. В трех случаях исследований в разведениях 1:2 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаической оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения.

В трех случаях исследований в разведениях 1:4 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаической оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения и свидетельствует о наименьшем раздражающем действии лецитина БТ.

При нанесении лецитина растительного соевого (ЛС) разведение 1:1 в двух случаях из трех отмечалось покраснение хорион-аллантаической оболочки, замедление тока крови, что позволило согласно классификации веществ по степени раздражения отнести субстанцию ко 2-му классу соединений. В трех случаях исследований в разведениях 1:2 не наблюдалось

никаких изменений хорион-аллантаической оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения. В трех случаях исследований в разведениях 1:4 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаической оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения.

При нанесении лецитина яичного (ЛЯ) в разведении 1:1 в трех случаях из трех наблюдалось покраснение хорион-аллантаической оболочки, что позволило согласно классификации веществ по степени раздражения отнести ко 2-му классу соединений. В трех случаях исследований в разведениях 1:2 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаической оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения. В трех случаях исследований в разведениях 1:4 не наблюдалось никаких изменений хорион-аллантаической оболочки. Это соответствует 1-му классу по степени раздражения.

Исследования по раздражающему действию было продолжено *in vivo* на слизистой оболочке глаза морских свинок. Изучали лецитин биотехнологический (опыты 1-3), растительный (опыты 4-6) и яичный (опыты 7-9) (табл. 2).

Таблица 2

Оценка раздражающего действия комплекса облепихового масла на конъюнктиве морских свинок

№ опыта	действие	отек (n=3)		гиперемия (n=3)	
		30 секунд	2 минуты	30 секунд	2 минуты
Лецитин биотехнологический					
1.		0	1	1	1
2.		0	1	0	1
3.		1	1	1	1
Лецитин растительный соевый					
4.		0	2	1	2
5.		0	2	1	1
6.		1	1	1	2
Лецитин яичный					
7.		0	2	1	1
8.		0	1	1	1
9.		1	1	1	2

Примечание: раздражающее действие 0-2 балла – слабое; 3-5 баллов – умеренное; 6-8 баллов – сильное. Опыты 1, 2, 3 – ЛБТ; 4, 5, 6 – ЛР; 7, 8, 9 – ЛЯ.

При нанесении лецитина биотехнологического через 30 с отек составил 0,33 баллов, гиперемия — 0,67, в сумме 1 балл – слабое раздражающее действие. Через две мин отек 1 балл, гиперемия — 1 балл, в сумме 2 балла – слабое раздражающее действие.

При нанесении лецитина растительного соевого на 30-й с отек — 0,33, гиперемия — 1 балл, в сумме 1,33 – слабое раздражающее действие. На 2-й мин 1,67 отек и гиперемия, в сумме 3,33 – умеренное раздражающее действие. Максимальное значение наблюдалось в опыте № 4: отек через две мин составил 2 балла и гиперемия — 2 балла, в сумме 4 балла, что соответствует умеренному раздражению.

При нанесении лецитина яичного отек через 30 с составил 0,33 балла, гиперемия — 1 балл, в сумме 1,33 – слабое раздражающее действие. Через две мин отек и гиперемия по 1,33, в сумме 2,67, что со-

ответствует умеренному раздражающему действию.

Экспериментальные данные позволили сделать вывод о том, что лецитин биотехнологический и яичный при применении на слизистую оболочку обладают слабым раздражающим действием, лецитин растительный — умеренным раздражающим действием. Все три вида сравниваемых между собой лецитина безопасны по действию на слизистые оболочки млекопитающих и допущены к дальнейшим исследованиям на млекопитающих.

Изучение острой токсичности лецитина проводили согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (под редакцией В.П. Фисенко) с определением LD₅₀ [6].

Критериями оценки острой токсичности служили картина интоксикации и выживаемость животных в течение 48 ч. Дальнейшее наблюдение проводили в

Таблица 3

Определение острой токсичности лецитина биотехнологического на мышах

Результат	Доза, мг/кг				
	100	500	1000	2000	5000
Кол-во животных	6	6	6	6	6
Выжило	6	6	6	6	6
Погибло	0	0	0	0	0
Z	-	0	0	0	0
D	-	400	500	1000	3000
DZ	-	0	0	0	0

$$m=6; LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(dZ)}{m}; LD_{50} > 5000 \text{ мг/кг}$$

Примечание: Z – показатель разницы между количеством погибших животных при использовании двух соседних доз; D – показатель разницы между количеством двух соседних доз.

Таблица 4

Определение острой токсичности лецитина яичного на мышах

Результат	Доза мг/кг				
	100	500	1000	2000	5000
Кол-во животных	6	6	6	6	6
Выжило	6	6	6	6	6
Погибло	0	0	0	0	0
Z	-	0	0	0	0
D	-	400	500	1000	3000
DZ	-	0	0	0	0

$$m=6; LD_{50} = LD_{100} - \frac{\sum(dZ)}{m}; LD_{50} > 5000 \text{ мг/кг}$$

Примечание: Z – показатель разницы между количеством погибших животных при использовании двух соседних доз; D – показатель разницы между количеством двух соседних доз.

течение 2-х недель, причем в первые 6 ч после введения мышам находились под непрерывным наблюдением [1]. При изучении острой токсичности субстанций лецитина вводили вещество в разных дозах. Для определения нагрузки на организм животного максимальным объемом жидкости проводили параллельные исследования с использовани-

ем физиологического раствора в эквивалентном объеме [6].

Все субстанции лецитина вводили в дозировке 100; 500; 1000; 2000; 5000 мг/кг, методом принудительного зондирования *per os* в теплом (37,0±0,1°C) виде. Результаты исследований по изучению острой токсичности на мелких лабораторных животных (мышах) приведены в

табл. 3, 4. В первые минуты после введения лецитина биотехнологического и лецитина растительного в дозе 2000 мг/кг и 5000 мг/кг у мышей наблюдалось некоторое снижение двигательной активности и потребления воды и пищи. В течение 6 ч после введения в указанных дозах отмечалось снижение реакции на раздражители. К окончанию первых суток все описанные явления прошли, и животные не отличались по внешнему виду и характеру поведения от животных контрольной группы (физиологический раствор). При введении лецитина животного происхождения существенных изменений в поведении животных отмечено не было. В течение дальнейших двух недель проводили наблюдения за двигательной активностью, наличием судорог, координацией движений, реакцией на раздражители, тонусом скелетной мускулатуры, дыханием, состоянием кожного покрова, шерсти и окраской видимых слизистых оболочек, потреблением воды и пищи. Достоверных заметных отклонений по сравнению с контрольной группой животных (физиологический раствор эквивалентно) не было выявлено.

Проведенные исследования позволили сделать вывод, что исследуемый лецитин биотехнологический и сравниваемые с ним лецитин растительный и животный, по Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова, могут быть отнесены к практически нетоксичным препаратам [6].

Проведенные исследования на куриных эмбрионах и конъюнктиве морских свинок показали, что лецитин биотехнологический не обладает раздражающей активностью и безопасен в применении для слизистых оболочек млекопитающих. По Hodge и Sterner и классификации К.К. Сидорова субстанция лецитина

биотехнологического может быть отнесена к практически нетоксичным препаратам $LD_{50} > 5000$ мг/кг.

Выводы

1. По данным эксперимента, проведенного на куриных эмбрионах, выявлено, что лецитин биотехнологический обладает слабой раздражающей активностью. В сравнении с лецитином растительного и животного происхождения установлено наименьшее раздражающее действие лецитина биотехнологического.

2. По данным эксперимента, проведенного на конъюнктиве морских свинок, лецитин биотехнологический через 30 с и на 2-й мин эксперимента проявил слабое раздражающее действие. Лецитин растительный на 30-й с проявил слабое раздражающее действие, на 2-й мин — умеренное раздражающее действие. Лецитин яичный через 30 с проявил слабое раздражающее действие, через две мин умеренное раздражающее действие.

3. Результаты по определению острой токсичности, исследованной на мышцах методом Кербера, показали 100% выживаемость животных при введении всех видов лецитина в дозах 100, 500, 1000, 2000, 5000 мг/кг; $LD_{50} > 5000$ мг/кг, что соответствует 5-му классу соединений — практически нетоксичным препаратам.

Список литературы

1. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ / В.В. Гацура. М.: Медицина. 1974. 141 с.
2. Коршунов В.А. Особенности сердечно-сосудистого действия антидепрессанта тетриндола: Дис. ... канд.фармац.наук. / В.А. Коршунов Пушино. 2000. 138 с.

3. Михайлов П. Медицинская косметика: пер. с болг. / П.Михайлов. М.: Медицина. 1985. 208 с.
4. Парентеральное питание в интенсивной терапии и хирургии. Методические рекомендации Министерства Здравоохранения и СР РФ. 2006.
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под редакцией В.П. Фисенко. Москва. 2000. 398 с.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / В.П. Фисенко [и др.] М.: Медицина. 2000. С. 220-221.
7. Серебрякова З.Г. Поверхностно-активные вещества в производстве искусственных волокон / З.Г. Серебрякова М. Химия. 1986. 215 с.
8. Сернов, Л.Н. Элементы экспериментальной фармакологии. / Сернов Л.Н., Гацура В.В., М. 2000. 351с.
9. Diet, Nutrition and Prevention of Chronic Diseases, Сер. техн. докл. ВОЗ, ВОЗ, Женева. 1990. 797 с.
10. Pluess T., Hayoz D., Berger M. Intravenous fish oil the physiological response to endotoxin in healthy subjects. Intensive Care Med 2007. 33: P. 789-797.

Studying of sharp toxicity and irritating action of lecithin

A.K. Gusejnov, V.N. Karkishchenko, A.V. Sergienko, M.N. Ivashev

The conducted researches on chicken embryos and a conjunctiva of porpoises have shown that lecithin biotechnological doesn't possess irritating activity and is safe in application for mucous membranes of mammals. On Hodge and Sterner and K.K.Sidorov's classifications the substance of lecithin biotechnological can be carried to almost nontoxic preparations $LD_{50} > 5000$ mg/kg.

Key words: irritating activity, sharp toxicity, lecithin.