

ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ КАПСУЛ, СОЗДАННЫХ НА ОСНОВЕ ВИНОГРАДА ЛИСТЬЕВ КРАСНЫХ ЭКСТРАКТА СУХОГО

Л.В. Крепкова

к.б.н., зав. отделом токсикологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: krepkova2011@yandex.ru

В.В. Бортникова

к.б.н., вед. науч. сотрудник, отдел токсикологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: bortnikova.v@yandex.ru

О.С. Кузина

ст. науч. сотрудник, отдел токсикологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: oskt@list.ru

М.В. Боровкова

ст. науч. сотрудник, отдел токсикологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: borovkova_65@mail.ru

М.А. Джавахян

к.фарм.н., зав. отделом фармацевтической технологии,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)

Приведены результаты экспериментального токсикологического изучения капсул на основе винограда культурного листьев красных экстракта сухого. Показано, что введение указанных капсул в желудок кроликам в течение 90 дней в дозах 50 и 150 мг/кг (5- и 15-кратные суточные терапевтические) не оказывало повреждающего действия на основные внутренние органы и системы организма; стимулировало эритропоэз, снижало уровень общего холестерина в сыворотке крови и увеличивало время свертывания крови.

Ключевые слова: капсулы, винограда листьев красных экстракт сухой, хроническая токсичность, кролики.

Для цитирования: Крепкова Л.В., Бортникова В.В., Кузина О.С., Боровкова М.В., Джавахян М.А. Доклиническое изучение безопасности капсул, созданных на основе винограда листьев красных экстракта сухого. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2018;21(11):45–50. <https://doi.org/10.29296/25877313-2018-11-07>

В настоящее время хроническая венозная недостаточность (ХВН) является широко распространенным заболеванием. По данным ВОЗ, число больных, страдающих лимфатическими отеками нижних и верхних конечностей, – примерно 10% от всего населения планеты. В развитых странах мира частота варикозной болезни составляет 25–33% среди женщин и 10–20% среди мужчин. Только в России официально зарегистрировано более 38 млн человек, страдающих различными формами варикозной болезни [1, 2]. Поскольку возрастает частота развития указанного заболевания, проблема его эффективного лечения остается актуальной в наши дни.

Лечение хронической венозной недостаточности должно быть комплексным. При этом большое значение имеет правильно подобранная консервативная терапия, основными целями которой являются устранение симптомов венозной недостаточности, профилактика рецидивов заболеваний вен, сохранение трудоспособности, а также повышение качества жизни. Наряду с эластической компрессией и физиотерапевтическим воздействием медикаментозное лечение остается одним из основных компонентов терапии ХВН. Основной группой лекарственных средств являются флебопротекторы – препараты, влияющие на тонус вены и защищающие ее стенку и клапаны от разрушающих воздействий. Флебопро-

текторы различаются по спектру воздействия на различные симптомы ХВН и клинической эффективности и выполняют основные задачи терапии: повышают тонус венозной стенки, улучшают лимфоотток, воздействуют на микроциркуляторные изменения, корректируют гемореологические нарушения и купируют воспалительные проявления. За счет этого происходит облегчение симптомов заболевания: болей, отеков и тяжести в ногах. Одним из таких лекарственных средств является зарубежный препарат «Антистакс» (капсулы 0,180 г для приема внутрь, гель и спрей для наружного применения), содержащий стандартизованный сухой экстракт красных листьев винограда культурного, для которого установлена хорошая эффективность и безопасность [3–6].

В рамках выполнения требований федеральной целевой программы развития фармацевтической промышленности Российской Федерации, направленной на поэтапное замещение импортируемых лекарственных средств препаратами отечественного производства, в ФГБНУ ВИЛАР разработан аналог «Антистакса» – сухой экстракт на основе винограда культурного листьев красных (ВЛКЭС). Химический состав полученного экстракта представлен веществами фенольной природы (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, танины) и ресвератролом. В указанном экстракте обнаружены аминокислоты и макро- и микроэлементы, преобладающими по количественному содержанию из которых являются кальций и марганец [7, 8]. На основе указанного экстракта разработаны две лекарственные формы: крем 3%-ный для местного применения и капсулы 0,180 г для приема внутрь.

Необходимым условием для оценки безопасного применения в медицинской практике новых лекарственных средств является проведение доклинических токсикологических исследований.

В ранее проведенных экспериментах было показано, что винограда листьев красных экстракт сухой малотоксичен, не проявляет аллергенности, оказывает стимулирующее действие на гуморальный иммунный ответ, не влияет на генеративную функцию экспериментальных животных. При нанесении на депилированную кожу крыс крем 3% хорошо переносится и не вызывает раздражения [9–11].

Ц е л ь и с с л е д о в а н и я – проведение доклинического токсикологического исследования капсул, созданных на основе винограда листьев красных экстракта сухого.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Исследуемые капсулы – твердые желатиновые, содержали 0,180 г сухого экстракта винограда листьев красных, в качестве вспомогательных веществ – микрокристаллическую целлюлозу и кальция стеарат. По внешнему виду капсулы соответствовали требованиям ГФ XIII, ОФС 1.4.1.0005.15.

Исследования выполнены в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [12]. Животные получены из питомника ООО «КролИнфо», (Московская область). Имеется ветеринарное свидетельство последнего контроля их здоровья. Эксперименты на животных проведены в соответствии с правилами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей [13]. Протокол эксперимента был одобрен биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР.

Исследование проведено на клинически здоровых кроликах-самцах породы «Шиншилла» с массой тела 3,5–4,0 кг, предварительно рандомизированных на три группы по пять животных в каждой: 1-я – контроль (плацебо капсул); 2-я – капсулы с экстрактом винограда листьев красных, доза 50 мг/кг; 3-я – капсулы с экстрактом винограда листьев красных, доза 150 мг/кг (15-кратная суточная терапевтическая доза в пересчете на сухой экстракт). Исследуемый препарат вводили в желудок кроликам в течение 90 дней. Контрольные животные получали плацебо капсул.

На протяжении всего эксперимента у кроликов регистрировали основные интегральные показатели: общее состояние, двигательную активность, потребление корма и воды, динамику массы тела, состояние шерстного покрова. У подопытных животных на 31-й и 91-й дни эксперимента брали пробы периферической крови. Для исследования гематологических (количество эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, содержание и концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцитов, распределение эритроцитов по объему, лейкограммы) и биохимических (содержание общего белка, альбуминов, триглицеридов, общего билирубина, глюкозы, мочевины, креатинина, ионов калия и натрия) показателей, а также активности некоторых ферментов сыворотки крови (аланин- и аспартатаминотрансфераза, *альфа*-амилаза, *гамма*-

глутамилтрансфераза, щелочная фосфатаза, лактатдегидрогеназа и креатинкиназа МВ). Определение указанных показателей проводили на полуавтоматическом гематологическом анализаторе «BC-2300» (MINDRAY, Китай) и автоматическом биохимическом анализаторе крови URIT-8030 («Urit Medical Electronic», Китай) с использованием наборов фирмы «Human» (Германия). В те же сроки определяли время свертывания крови по методу Моравица.

Функциональное состояние сердечно-сосудистой системы кроликов оценивали по результатам электрокардиограмм, снятых во II стандартном отведении на электрокардиографе «Heart Mirror» («ИННОМЕД Медикал», Венгрия). По окончании эксперимента животных подвергали эвтаназии в CO₂-камере, после чего их вскрывали. Внутренние органы фиксировали в 10%-ном формалине, делали гистологические срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали с помощью светового микроскопа. Статис-

тическую обработку полученных результатов осуществляли методом вариационной статистики с применением *t*-критерия Стьюдента. Достоверность различий с контролем считали при $p < 0,05$. Статистические данные обрабатывали с помощью программы Office Excel [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Введение в желудок капсул с сухим экстрактом винограда листьев красных в дозах 50 и 150 мг/кг в течение 90 дней не вызывало у кроликов изменений внешнего вида и поведения. На протяжении первых четырех недель хронического эксперимента животные 3-й группы меньше потребляли корма и воды, что привело к незначительному снижению их массы тела по сравнению с контролем. В последующие периоды наблюдения указанные интегральные показатели нормализовались и соответствовали контрольным (рис. 1–3). В течение всего эксперимента не отмечено гибели кроликов.

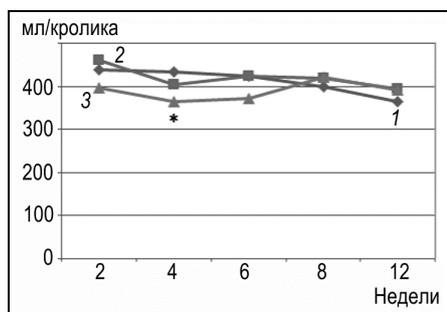


Рис. 1. Среднесуточное потребление воды кроликами, получавшими капсулы с экстрактом винограда листьев красных, в хроническом эксперименте: 1 – контроль, плацебо капсул; 2 – доза 50 мг/кг; 3 – доза 150 мг/кг

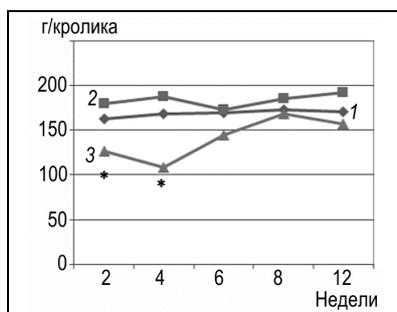


Рис. 2. Среднесуточное потребление корма кроликами, получавшими капсулы с экстрактом винограда листьев красных, в хроническом эксперименте: 1 – контроль, плацебо капсул; 2 – доза 50 мг/кг; 3 – доза 150 мг/кг

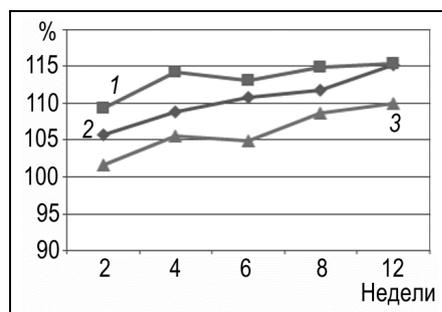


Рис. 3. Динамика массы тела кроликов (в % к исходной), получавших капсулы с экстрактом винограда листьев красных, в хроническом эксперименте: 1 – контроль, плацебо капсул; 2 – доза 50 мг/кг; 3 – доза 150 мг/кг

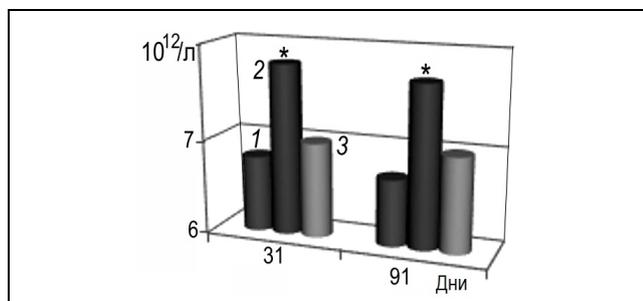


Рис. 4. Количество эритроцитов ($10^{12}/л$) в периферической крови кроликов, получавших капсулы с экстрактом винограда листьев красных, в хроническом эксперименте: 1 – контроль, плацебо капсул; 2 – доза 50 мг/кг; 3 – доза 150 мг/кг (* – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$)

Клинический анализ периферической крови выявил статистически значимое увеличение числа эритроцитов в группе животных, получавших препарат в дозе 50 мг/кг, по сравнению с контролем в оба срока исследования. Другие гематологические показатели (количество лейкоцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина, гематокрит, содержание и концентрация гемоглобина в эритроците, средний объем эритроцитов, распределение эритроцитов по объему, лейкограммы) не имели статистически достоверных различий у кроликов контрольной и опытных групп и соответствовали физиологической норме (рис. 4).

Длительное введение в желудок капсул, содержащих сухой экстракт винограда листьев красных, в обеих испытанных дозах умеренно увеличивало время свертывания крови кроликов относительно контроля. Статистически значимое изменение указанного параметра зарегистрировано на 31-й день хронического опыта у животных 2-й группы (таблица).

В условиях хронического эксперимента введение исследуемого препарата в обеих испытанных дозах не оказывало повреждающего действия на функциональное состояние печени, почек, поджелудочной железы и миокарда подопытных животных. Биохимические показатели (содержание общего белка, альбуминов, триглицеридов, общего билирубина, глюкозы, мочевины, креатинина, ионов калия и натрия) и активность некоторых ферментов сыворотки крови (аланин- и аспартатаминотрансфераз, *альфа*-амилазы, *гамма*-глутамилтрансферазы, щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы и креатинкиназы МВ) во всех экспериментальных группах статистически значимо не

Таблица. Время свертывания (с) крови кроликов, получавших капсулы с экстрактом винограда листьев красных, в хроническом эксперименте (метод Моравица)

Группа животных	Дни эксперимента	
	31-й	91-й
1-я	299,2±12,4	172,8±20,6
2-я	356,2±6,0*	205,0±27,7
3-я	325,2±7,3	212,4±27,3

Примечание: * – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$.

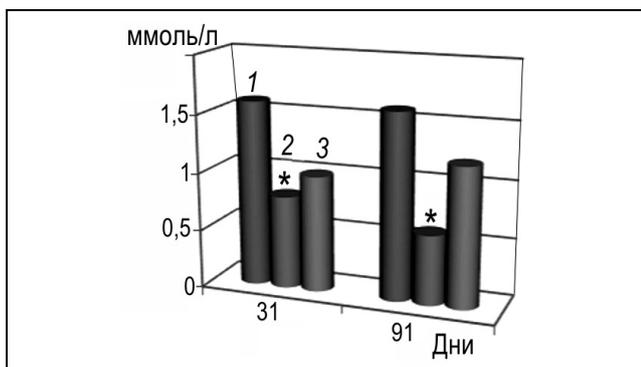


Рис. 5. Содержание общего холестерина (ммоль/л) в сыворотке крови кроликов, получавших капсулы с экстрактом винограда листьев красных, в хроническом эксперименте: 1 – контроль, плацебо капсул; 2 – доза 50 мг/кг; 3 – доза 150 мг/кг (* – достоверность различий с контролем, $p < 0,05$)

различались. Исключение составило снижение уровня общего холестерина в сыворотке крови кроликов 2-й и 3-й групп по сравнению с контролем в оба срока исследования (31-й и 91-й дни), при этом статистически значимое у животных, получавших капсулы в дозе 50 мг/кг (рис. 5).

Электрокардиографические исследования, проведенные в конце эксперимента, выявили уменьшение интервала Т-Р у животных 2-й и 3-й групп: с $0,033 \pm 0,003$ с в контроле до $0,022 \pm 0,003$ ($p < 0,05$) и $0,023 \pm 0,003$ с ($p > 0,05$) в опыте, и как следствие, незначительное увеличение частоты сердечных сокращений (ЧСС) с $305,4 \pm 18,9$ в контроле, до $351,6 \pm 13,3$ и $354,0 \pm 21,2$ ($p > 0,05$) в опытных группах. Полученные изменения параметров ЭКГ были расценены как функциональные, так как они находились в границах физиологических колебаний для животных данного вида.

Патогистологические исследования, проведенные в конце хронического эксперимента, подтвердили отсутствие повреждающего действия исследуемого препарата в обеих испытанных дозах на внутренние органы кроликов (сердце, легкие, печень, почки, надпочечники, селезенка, тимус, поджелудочная и щитовидная железы, семенники). Капсулы, содержащие сухой экстракт винограда листьев красных, при длительном введении в желудок в дозах, превышающих терапевтическую в 5 и 15 раз, не раздражали слизистую желудочно-кишечного тракта экспериментальных животных.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о хорошей переносимости и отсутствии общетоксического действия капсул на основе сухого экстракта винограда культурного листьев красных в дозах, превышающих терапевтическую в 5 и 15 раз, на организм экспериментальных животных.

Длительное введение исследуемого препарата в желудок кроликам в дозе 50 мг/кг стимулировало эритропоз, повышая количество эритроцитов в периферической крови, оказывало гиполипидемическое действие и увеличивало время свертывания крови. Полученные результаты согласуются с данными литературы и обусловлены наличием в составе сухого экстракта винограда листьев красных фенольных соединений, в том числе флавоноидов и ресвератрола, которые обладают широким спектром фармакологической активности, в том числе противовоспалительным и антиоксидантным действием [15–19].

Результаты токсикологического исследования позволили рекомендовать исследуемый препарат – капсулы, содержащие сухой экстракт винограда листьев красных 0,180 г, для проведения клинических исследований в рекомендуемой терапевтической дозе 10 мг/кг.

ВЫВОДЫ

1. Длительное введение (90 дней) в желудок кроликам капсул на основе сухого экстракта винограда культурного листьев красных в дозах 50 и 150 мг/кг не оказывало общетоксического действия.
2. В 5-кратной терапевтической дозе препарат стимулировал процесс кроветворения (эритропоэз), увеличивал время свертывания крови, снижал содержание общего холестерина в сыроворотке крови экспериментальных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. Богачёв В.Ю. Системное лечение хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Consilium-provisorum. 2002. Т. 2. № 2. С. 21–26.
2. Стуров Н.В. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей: эпидемиология, патогенез, клиника и принципы терапии // Врач. 2008. № 4. С. 22–24.
3. Медведев А.П., Немирова С.В., Аветисян Е.А. Возможность применения экстракта красных листьев винограда в амбулаторном лечении пациентов с венозными тромбозомболическими осложнениями // Флебология. 2013. Т. 7. № 3. С. 34–39.
4. Цыганок С.С., Парахонский А.П. Эффективность экстракта красных листьев винограда в лечении хронической венозной недостаточности нижних конечностей // Фундаментальные исследования. 2008. № 7. С. 110–111.
5. Цуканов Ю.Т., Цуканов А.Ю. Опыт 6-месячного применения экстракта красных листьев винограда при гормониндуцированной флебопатии // Ангиология и сосудистая хирургия. 2014. Т. 20. № 3. С. 102–107.
6. Регистр лекарственных средств России [электронный ресурс]. <https://www.rlsnet.ru/>.
7. Дул В.Н., Даргаева Т.Д., Копытько Я.Ф., Сокольская Т.А. Изучение состава фенольных веществ красных листьев винограда культурного (*Vitis vinifera* L.) методом ВЭЖХ // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2014. № 3. С. 33–36.
8. Дул В.Н., Даргаева Т.Д., Сайбель О.Л. Разработка методик контроля качества сухого экстракта красных листьев винограда культурного // Сб. тр. 2-й науч.-практ. конф. аспирантов и мол. уч. «Молодые ученые и Фармация XXI века». 2014. С. 72–75.
9. Бабенко А.Н., Савинова Т.Б., Крепкова Л.В., Дмитриева О.П. Экспериментальная оценка влияния винограда (*Vitis vinifera* L.) листьев красных экстракта сухого на генеративную функцию крыс // Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии. 2017. № 1(21). С. 74–78.
10. Бабенко А.Н., Кузина О.С., Бортникова В.В., Дмитриева О.П., Крепкова Л.В., Джавахян М.А. Экспериментальное токсикологическое изучение крема, созданного на основе экстракта сухого винограда листьев красных // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. 2016. № 4(14). С. 23–27.
11. Бортникова В.В., Боровкова М.В., Крепкова Л.В. Изучение иммуномодулирующего действия винограда (*Vitis vinifera* L.) листьев красных экстракта сухого // тез. Докладов XXIII Росс. нац. конгресса «Человек и лекарство». М. 2016. 167 с.
12. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. М.: Гриф и К. 2012. С. 80–93.
13. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях. Страсбург. 1986.
14. Лакин Г.Ф. Биометрия. М. 1990. 350 с.
15. Тараховский Ю.С., Ким Ю.А., Абдрашилов Б.С., Музафаров Е.Н. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Под ред. Е.И. Маевского. Пушино: Synchronbook. 2013. 310 с.
16. Johnson W.D., Morrissey R.L., Osborne A.L., Kapetanovic I., Crowell J.A., Muzzio M., McCormick D.L. Subchronic oral toxicity and cardiovascular safety pharmacology studies of resveratrol, a naturally occurring polyphenol with cancer preventive activity // Food Chem Toxicol. 2011. V. 49. № 12. P. 3319–3327.
17. Электронный ресурс: <https://lifebio.wiki/>ресвератрол.
18. Барабой В.А. Фенольные соединения виноградной лозы: структура, антиоксидантная активность, применение // Biotechnologia Acta. 2009. Т. 2. № 2. С. 67–69.
19. Мусеева А.М., Железняк Н.В., Генералова А.Г., Мусеев Д.В. Фитоалексин ресвератрол: методы определения, механизмы действия, перспективы клинического применения // Вестник фармации. 2012. № 1(55). С. 63–73.

Поступила 15 августа 2018 г.

THE PRECLINICAL STUDY OF THE SAFETY CAPSULES, CONTAINING GRAPE RED LEAVES DRY EXTRACT

© Authors, 2018

L.V. Krepkova

Ph.D. (Biol.), Head of Toxicology Department,

All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)

E-mail: krepkova2011@yandex.ru