УДК 615.2 https://doi.org/10.33250/16.04.248

Л. Б. Бондаренко[1], А. К. Вороніна[2], Г. М. Шаяхметова[1], І. С. Блажчук[1], Т. А. Карацуба[1], В. М. Коваленко[1]

Дослідження підгострої токсичності лікарського засобу на основі есенціальних фосфоліпідів

[1]Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії медичних наук України», м. Київ

[2]Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів, м. Київ

Ключові слова: есенціальні фосфоліпіди, підгостра токсичність, щури

Дослідження та застосування фосфоліпідів для потреб медицини бере свій початок у грудні 1939 року, коли Ханс Ейкерманн уперше з соєвих бобів виділив фракцію фосфатидилхолінів, яка була багата на поліненасичені (есенціальні) жирні кислоти, особливо лінолеву та линоленову. Ця фракція отримала назву «ессенціальні» фосфоліпіди. Ця високоочищена фракція фосфатидилхолінів приблизно на 50 % складається з 1,2-дилінолеоїлфосфатидилхоліну, головного діючого інгредієнта, який зазвичай присутній у тваринному організмі в незначній кількості.

«Ессенціальні» фосфоліпіди різного походження знайшли своє застосування як гепатопротекторні препарати, які захищають і покращують функцію печінки в хворих на цукровий діабет з неалкогольною жировою дистрофією печінки [1] та хронічними інфекціями. В основному такі лікарські засоби містять фосфоліпіди з соєвих бобів, соєву олію, гідрогенізовану рицинову олію, етанол, етилванілін, 4-метоксиацетофенон, желатинові барвники E171, E172, DL-α-токоферол. Вони також застосовуються для лікування цирозу печінки, печінкової недостатності, печінкової коми, при захворюваннях серцево-судинної системи, гіперліпопротеїнемії, гіперхолестеринемії, атопічному дерматиті, екземі, пієлонефриті [2].

Оскільки біологічна активність «ессенціальних» фосфоліпідів відкрита досить давно й їхнє медичне застосування розпочалось ще до остаточного формування світової системи контролю за безпечністю та ефективністю лікарських засобів, то натепер склалася парадоксальна ситуація. Більшість опублікованих у відкритому доступі досліджень ефектів «ессенціальних» фосфоліпідів проводилися на людині. Результати доклінічного вивчення конкретних лікарських засобів на основі фосфоліпідів зазвичай є власністю фірм-виробників і не викладаються у відкритий доступ. Однак дослідження на тваринах мають не меншу наукову значущість з огляду на той факт, що тварини також страждають від захворювань печінки, а також на те, що інформація, отримана в результаті досліджень на тваринах зі застосуванням таких препаратів, може доповнити сукупність існуючих знань щодо їхнього використання та буде необхідною виробникам препаратів-генериків для їхньої реєстрації.

Мета дослідження – оцінка підгострої токсичності препарату есенціальних фосфоліпідів (Ессенціалє Н) у трьох дозах на щурах обох статей для того, щоб надати додаткову наукову інформацію як про придатність

© Колектив авторів, 2022

препарату для лікування, так і для підтвердження основних параметрів його безпечності.

Матеріали та методи. Усі процедури дослідження відповідають вимогам національних регуляторних органів [3]. Підгостру токсичність шляхом повторних уведень тест-зразка Ессенціалє Н протягом 28 днів досліджували з використанням білих щурів обох статей (*Rattus norvegicus*), що є загальноприйнятим видом гризунів для дослідження токсичності речовин, включаючи лікарські засоби, при повторних уведеннях. Із використанням системи рандомних номерів 20 самців і 20 самиць з масою тіла 150–180 г були розподілені на 3 дослідних і 1 контрольну групу (по 5 особин для кожної статі). Тваринам згодовувався *ad libitum* стандартний раціон для лабораторних тварин, вода з міського водогону (після оберненого осмосу та стерилізації УФ-випромінюванням) подавалась *ad libitum*. У кімнатах для утримання тварин підтримувались наступні умови: температура – 20–24 °С, вологість – 30–70 %, цикл освітлення – 12 год світло/12 год темрява. Перед початком дослідження Комітет з біоетики ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ» узгодив протокол дослідження, а також процедури, пов'язані з утриманням тварин та їхнім використанням в експерименті.

Експерименти проводились з використанням препарату Ессенціалє Н, розчину для ін'єкцій (Ей, Наттерманн енд Сайі ГмбХ, Німеччина).

При вивченні підгострої токсичності був використаний внутрішньоочеревинний шлях введення препарату відповідно до його клінічного застосування в 3 дозах: терапевтичній (22,13 мг/кг), 5-разовій терапевтичній (110,65 мг/кг) та 10-разовій терапевтичній (221,3 мг/кг). Контрольній групі тварин вводили відповідний об'єм розчинника (води для ін'єкцій) в об'ємах, які відповідали максимальній дозі досліджуваного препарату.

Спостереження за тваринами тривали протягом усього періоду дослідження. Протягом експерименту проводили моніторинг маси тіла. Тварини були піддані евтаназії через 24 год після останнього введення препаратів та голодування протягом ночі. Безпосередньо перед евтаназією всіх тварин було зважено та зроблено аналіз сечі. Потім під легким ефірним наркозом були відібрані зразки крові для біохімічних і гематологічних досліджень і здійснено евтаназію шляхом цервікальної дислокації, розтин, макроскопічний огляд і взяття органів для визначення маси та мікроскопічних досліджень.

Для отримання сечі використовували метаболічні клітки виробництва фірми Ugo Basile, Італія. Зібрану за ніч сечу досліджували за допомогою діагностичних смужок-індикаторів Medi-Test Combi 11 фірми MACHEREY-NAGEL на приладі URYXXON® Relax (Німеччина). Вимірювали об'єм зібраної сечі, центрифугували її протягом 10 хв при 1000 об/хв, осад вивчали [4] під мікроскопом MBL 2000 (KRUSS, Німеччина) при збільшенні 10 х та 40 х. Методи, показники та одиниці вимірювання, що були використані при аналізі сечі, наведені нижче:

Показник	Метод/тест-система	Одиниця вимірювання / параметр
Об'єм	Вимірювання за шкалою мірного циліндру кліток для збору сечі	мл
Колір	Візуальна оцінка	-

Показник	Метод/тест-система	Одиниця вимірювання / параметр
Питома вага	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	г/мл
Кров	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	Кількість еритроцитів/мл
Уробіліноген	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	мг/дкл
Білок	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	мг/дкл
Білірубін	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	Негативний, незначний, середній, високий
Нітрити	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	Негативний, позитивний
Кетони	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	Негативний, незначний, середній, високий
Глюкоза	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	мг/дкл
pH	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	Одиниці pH
Лейкоцити	Діагностичні смужки Medi-Test Combi 11	Кількість лейкоцитів/мл

Проводили мікроскопію осаду сечі з використанням мікроскопа MBL 2000 (Kruss, Германія) при збільшенні 40 х. Наявність різних елементів осаду оцінювали наступним чином:

-	«Відсутні»	Відсутні в 2–3 полях зору
(+)	«Сліди»	Поодинокі в 2–3 полях зору
+	«Незначна кількість»	Поодинокі в кожному полі зору
++	«Помірна кількість»	Декілька в кожному полі зору
+++	«Значна кількість»	Багато в кожному полі зору

Кров для гематологічних досліджень збирали в пробірки з калієм ЕДТА (KABE Labortechnik) й аналізували на автоматичному гематологічному аналізаторі Mythic 22, Швейцарія:

Показник	Метод	Одиниця вимірювання
Гемоглобін	Пряме визначення	г/дл
Еритроцити	Пряме визначення	10^6/мл
Гематокрит	Пряме визначення	Відсоток
Середній об'єм еритроциту	Обчислення	Фемтолітр
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті	Обчислення	Пікограм
Лейкоцити	Пряме визначення	10^3/мл
Лейкоцитарна формула (нейтрофіли, лімфоцити, еозинофіли, базофіли, моноцити)	Пряме визначення	Відсоток
Тромбоцити	Пряме визначення	10^3/мл

Також у кожної тварини було відібрано кров зі стегнової вени, виділено сироватку крові з використанням центрифуги ЦЛК-1 (10 хв, 1500 g). Біохімічні показники сироватки крові були досліджені в день отримання за допомогою автоматичного біохімічного аналізатора Prestige 24i, Японія:

Показник	Тест-система	Одиниця вимірювання
Аланінамінотрансфераза	Prestige 24i LQ ALAT	МО/л
Аспартатамінотрансфераза	Prestige 24i LQ ASAT	МО/л
Лужна фосфатаза	Prestige 24i LQ ALP	МО/л
Білірубін (загальний)	Prestige 24i LQ BIL TOTAL	мг/дл
Гамма-глутамілтрансфераза	Prestige 24i LQ GGT	МО/л
Холестерин	Prestige 24i LQ CHOL	ммоль/л
Тригліцериди	Prestige 24i LQ TG	ммоль/л
Сечовина	Prestige 24i LQ UREA	ммоль/л
Креатинін	Prestige 24i LQ CREATININE	мкмоль/л
Глюкоза	Prestige 24i LQ GLUCOSE	ммоль/л
Загальний білок	Prestige 24i LQ TOTAL PROTEIN	г/л
Альбумін	Prestige 24i LQ ALBUMIN	г/л

Усі знеживлені в кінці дослідження тварини підлягали повному зовнішньому огляду, розтину з урахуванням зареєстрованих клінічних порушень і детальному дослідженню внутрішніх органів. У всіх тварин були вилучені та зважені печінка, серце, нирки, селезінка, легені, сім'яники, яєчники, тимус, мозок. Відносну масу органів розраховували на 100 г маси тіла.

Для мікроскопічного дослідження шматочки досліджуваних органів фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, за стандартною методикою зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та поміщали в парафін. Гістологічні зрізи товщиною 4–5 мкм фарбували гематоксиліном й еозином. Препарати вивчали та фотографували за допомогою мікроскопа OLYMPUS BX 51.

Нормальність розподілу отриманих даних перевіряли за тестом Шапіро-Уїлка. Отримані дані представляли як середнє значення ± похибка середнього (M ± m) для нормально розподілених змінних або медіана та 25 і 75 квартилі [Me (25 %; 75 %)] для змінних з ненормальним розподілом. Статистичний аналіз результатів експерименту проводили з використанням однофакторного дисперсійного аналізу (ANOVA) для нормально розподілених змінних і за критерієм Краскела-Уолліса для змінних з ненормальним розподілом. Для статистичної обробки даних використовували програму STATISTICA 10. Різницю між досліджуваними показниками вважали статистично вірогідною в разі $p \leq 0,05$.

Результати та їх обговорення. Індивідуальну масу тіла тварин реєстрували відразу після отримання, перед рандомізацією та починаючи від першого дня введення препаратів один раз на тиждень у ранкові часи протягом усього періоду дослідження. Зміни маси тіла розраховували порівняно з масою в попередній термін спостереження. Порівнювали ступінь приросту маси тіла тварин дослідних і контрольних груп. Дані динаміки маси тіла та її приросту наведено в таблицях 1, 2.

Маса тварин, яким уводили Ессенціалє Н у терапевтичній дозі 22,13 мг/кг, і тварин контрольної групи рівномірно збільшувалась протягом перших двох тижнів експерименту. Будь-яких відмінностей приросту маси тіла не зареєстровано, даний показник знаходився в межах фізіологічної норми для даного виду тварин відповідно до їхнього віку.

Таблиця 1

Динаміка маси тіла білих щурів за умов уведення Ессенціалє Н протягом 28 днів, г (M ± m, n = 5)

Термін спостереження, день	Контрольна група		Ессенціалє Н					
			22,13 мг/кг		110,65 мг/кг		221,30 мг/кг	
	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці
0	177,40 ± 3,99	157,20 ± 4,60	150,20 ± 2,71	158,20 ± 3,84	150,20 ± 1,93	159,40 ± 4,78	150,60 ± 11,21	159,25 ± 6,14
7	193,0 ± 5,04	198,0 ± 9,50	170,60 ± 5,33	189,20 ± 2,87	184,20 ± 5,20	204,60 ± 11,64	165,20 ± 4,49	197,0 ± 5,05
14	201,0 ± 5,47	234,80 ± 12,40	182,20 ± 6,34	218,0 ± 3,49	197,20 ± 6,78	223,60 ± 16,18	171,80 ± 5,68	190,50 ± 3,86
21	209,20 ± 6,40	257,60 ± 11,90	194,60 ± 6,90	231,0 ± 5,23	210,60 ±10,02	265,0 ± 15,88	181,20 ± 4,50	222,50 ± 2,25
28	219,80 ± 6,37	277,60 ± 10,82	190,60 ± 6,05	230,80 ± 7,44	226,0 ± 7,30	259,80 ± 16,14	170,40 ± 3,31	216,0 ± 6,38

Таблиця 2

Приріст маси тіла білих щурів за умов уведення Ессенціалє Н протягом 28 днів, г (M ± m, n = 5)

Термін спостереження, день	Контрольна група		Ессенціалє Н					
			22,13 мг/кг		110,65 мг/кг		221,30 мг/кг	
	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці
7	15,60 ± 2,29	40,80 ± 5,54	20,40 ± 2,79	31,0 ± 3,24	34,0 ± 4,47*	45,20 ±11,22	14,60 ± 7,36	37,75 ± 3,12
14	8,20 ± 2,20	36,80 ± 3,72	11,60 ± 4,69	28,80 ± 2,62	13,0 ± 2,77	19,0 ± 6,36*	6,60 ± 2,68	-6,50 ± 1,55*
21	8,0 ±3,29	22,80 ± 2,65	12,40 ± 6,38	13,0 ± 2,0*	13,40 ± 4,93	6,60 ± 0,87*	9,40 ± 2,94	32,0 ± 4,67
28	10,60 ±2,71	20,00 ± 3,16	-4,0 ± 2,02*	-0,20 ± 2,56*	15,40 ± 10,60	29,60 ± 8,44	-10,80 ± 2,58*	-6,50 ± 6,17*

*Примітка. Тут і в табл. 3–6: *Вірогідні зміни порівняно з тваринами контрольної групи.*

Однак, починаючи з третього тижня та протягом четвертого тижня, приріст маси сповільнився спочатку в самиць, а потім і в самців дослідної групи порівняно з контролем.

За умов застосування Ессенціалє Н у 5-разовій терапевтичній дозі (110,65 мг/кг) у деякі терміни спостереження приріст маси тіла в щурів-самців і щурів-самиць також вірогідно відрізнявся від тварин контрольної групи. Але ці відмінності приросту маси тіла відмічались в обох дослідних групах у різні терміни спостереження, що можна пояснити індивідуальними особливостями фізіологічного розвитку тварин.

За введення 10-разової терапевтичної дози Ессенціалє Н (221,30 мг/кг) тварини обох статей погано набирали масу тіла, навіть у деякі періоди спостереження зафіксовано зменшення маси тіла як самиць, так і самців.

Спостереження за тваринами з метою виявлення клінічних ознак токсичності препаратів почали з першого дня введення. На початку введення препаратів тварини всіх груп мали охайний вигляд, були активні, мали рівну блискучу шерсть, шкіру без слідів розчухування, виразкоутворення та облисіння, жодних змін у поведінці не спостерігали. Надалі щури контрольної групи протягом усього терміну спостережень залишалися в цілком задовільному стані. Негативний вплив води для ін'єкцій за внутрішньоочеревинного введення не виявлено. Така сама картина була й за введення Ессенціалє Н у дозі 22,13 мг/кг. Однак за умов введення Ессенціалє Н у вищих дозах, починаючи практично з першого дня спостереження, як у самців, так і в самиць через короткий відрізок часу після введення спостерігали значне зниження спонтанної рухової активності, цей стан у тварин тривав близько 1 год, після чого проходив і тварини почувалися задовільно. У місцях ін'єкцій інколи з'являлися невеликі ущільнення та почервоніння, що може бути результатом місцево-подразнюючої дії внаслідок уведення великих об'ємів препаратів. У щурів, яким уводили Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг, через 14 днів від початку введення було виявлено збільшення черева, чого не спостерігали в тварин інших груп. Періодично в тварин даного дозового рівня фіксували діарею.

При застосуванні Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг загинув 1 самець. Цей факт потребує на особливу увагу, оскільки в наявних у відкритому доступі роботах інших авторів про загибель тварин у разі застосування «ессенціальних» фосфоліпідів не зазначалось [1, 2, 5].

Інші зміни стану, у тому числі поведінкового, у цій групі тварин не спостерігали.

Дослідження сечі показали, що за умов введення Ессенціалє Н у дозі 22,13 мг/кг усі показники залишалися в межах фізіологічної норми для щурів [6]. Із подальшим збільшенням дози препарату відзначались вірогідні відмінності за об'ємом, питомою вагою, вмістом білірубіну (табл. 3). За введення Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг виявлено збільшення вмісту еритроцитів і лейкоцитів у сечі порівняно з контролем. Загалом, за результатами показників аналізу сечі (колір, об'єм, питома вага, pH, вміст білка, рівень глюкози) не виявлено порушень функціонального стану нирок піддослідних тварин. Мікроскопія осаду сечі також не виявила негативного впливу Ессенціалє Н.

Результати дослідження гематологічних показників венозної крові щурів обох статей у разі введення Ессенціалє Н у дозі 22,13 мг/кг свідчать про відсутність різниці між

контрольною та дослідними групами щурів (табл. 4). Хоча й спостерігались вірогідні зміни деяких гематологічних показників при зростанні доз досліджуваного препарату, але їхній рівень не перевищував межі фізіологічної норми для даного виду тварин [6, 7].

Дані дослідження біохімічних показників сироватки крові щурів (табл. 5), яким протягом 28 днів вводили Ессенціалє Н, і тварин контрольних груп свідчать, що в разі застосування препарату в дозі 22,13 мг/кг усі досліджені показники сироватки крові тварин обох статей знаходилися в межах фізіологічної норми для даного виду тварин відповідно до їхнього віку [6, 7] і не відрізнялись від показників контрольної групи. Виключенням була активність аспартатамінотрансферази – даний показник вірогідно збільшився порівняно з тваринами контрольної групи. У разі введення Ессенціалє Н у дозі 110,65 мг/кг відмічалось вірогідне збільшення активності амінотрансфераз у деяких тварин, переважно в щурів-самців, порівняно з контрольною групою. Це може свідчити про розвиток у піддослідних тварин під впливом препарату в зазначеній дозі патології жовчовивідних шляхів, оскільки згідно з даними літератури при механічних жовтяницях активність амінотрансфераз незначно підвищується [8]. При збільшенні дози до 221,30 мг/кг у сироватці крові щурів-самців зафіксовано значне підвищення вмісту загального білірубіну в 6 разів відносно контрольної групи. Отримані дані можуть свідчити про те, що хронічна експозиція Ессенціалє Н у високих дозах може призводити до ушкодження печінки за типом холестазу.

Таблиця 3

Біохімічні показники сечі щурів за умов уведення Ессенціалє Н протягом 28 днів (M ± m, n = 5)

Група	Стать	Показник							
		Об'єм, мл	Уробіліноген, мг/дл	Білірубін, мг/дл	Білок, мг/дл	pH	Питома вага, кг/л	Еритроцити, ерит./мкл	Лейкоцити, лейк./мкл
Контроль	Самиці	4,54 ± 0,58	0,80 ± 0,44	2,60 ± 0,54	58,0 ± 15,34	5,60 ± 0,22	1,0210 ± 0,0026	0	0
	Самці	11,88 ± 3,71	0,40 ± 0,36	1,40 ± 0,36	44,0 ± 12,52	6,20 ± 0,33	1,0150 ± 0,0037	6,0 ± 2,19	5,0 ± 4,47
Ессенціалє Н, 22,13 мг/кг	Самиці	3,58 ± 0,45	2,0 ± 0	2,0 ± 0,49	86,0 ± 12,52	5,90 ± 0,22	1,0190 ± 0,0026	2,0 ± 1,79	5,0 ± 4,47
	Самці	3,08 ± 0,36	2,0 ± 0,57	1,40 ± 0,67	76,67 ± 19,05	5,0 ± 0*	1,0260 ± 0,0017	14,0 ± 8,29	25,0 ± 12,25
Ессенціалє Н, 110,65 мг/кг	Самиці	10,18 ± 0,40*	0,40 ± 0,36	0,40 ± 0,22*	30,0 ± 0	6,20 ± 0,11	1,0130 ± 0,0011*	6,0 ± 2,19	0
	Самці	8,84 ± 1,20	0,80 ± 0,44	0,60 ± 0,22	44,0 ± 12,5	6,10 ± 0,30	1,016 ± 0,840	24,0 ± 9,63	10,0 ± 5,48
Ессенціалє Н, 221,30 мг/кг	Самиці	9,28 ± 1,61	0	0,60 ± 0,22*	12,0 ± 6,57	6,30 ± 0,23	1,0140 ± 0,0017	14,0 ± 8,30	5,0 ± 4,47
	Самці	7,80 ± 0,97	0	1,0 ± 0,35	7,50 ± 6,50	6,13 ± 0,11	1,0160 ± 0,0011	10,0 ± 0,18	0

Таблиця 4

Гематологічні показники венозної крові щурів за умов уведення Ессенціалє Н протягом 28 днів (M ± m, n = 5)

Показник	Контрольна група		Ессенціалє Н					
			22,13 мг/кг		110,65 мг/кг		221,30 мг/кг	
	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці
Лейкоцити, 10^3/мл	12,06 ± 0,96	14,10 ± 1,02	12,02 ± 1,92	13,32 ± 1,71	15,30 ± 3,91	15,72 ± 2,64	14,42 ± 1,49	14,63 ± 0,95
Лімфоцити, %	82,22 ± 3,33	84,34 ± 1,06	78,68 ± 3,73	79,12 ± 1,63	66,02 ± 3,43*	73,72 ± 1,61	69,36 ± 5,23	75,35 ± 0,57
Моноцити, %	4,24 ± 0,53	4,42 ± 0,37	4,42 ± 0,66	4,92 ± 0,52	6,04 ± 0,37*	7,12 ± 0,67*	8,94 ± 2,18	8,43 ± 0,45
Нейтрофіли, %	11,16 ± 1,44	9,02 ± 0,75	13,30 ± 2,56	13,08 ± 2,05	23,30 ± 3,11*	15,92 ± 1,35	18,22 ± 7,79	12,95 ± 0,21
Еозинофіли, %	0,12 ± 0,07	0,14 ± 0,04	0,34 ± 0,18	0,10 ± 0,03	0,08 ± 0,04	0,10 ± 0,05	0,06 ± 0,02	0,20 ± 0,07
Базофіли, %	2,26 ± 0,36	2,08 ± 0,29	3,26 ± 0,74	2,78 ± 0,11	4,56 ± 0,32	3,14 ± 0,40	3,42 ± 0,38	3,08 ± 0,11*
Еритроцити, 10^6/мл	7,84 ± 0,10	8,16 ± 0,13	8,07 ± 0,23	8,31 ± 0,09	7,05 ± 0,36	7,61 ± 0,53	6,44 ± 0,41*	7,33 ± 0,39
Гемоглобін, г/дл	14,24 ± 0,33	14,64 ± 0,07	14,36 ± 0,29	14,74 ± 0,128	13,02 ± 0,56	13,04 ± 0,94	11,72 ± 0,91	13,68 ± 0,71
Гематокрит, %	40,78 ± 0,82	42,04 ± 0,27	42,20 ± 0,82	43,20 ± 0,36	37,50 ± 1,93	38,46 ± 2,47	34,30 ± 2,35	39,93 ± 1,83
Середній об'єм еритроциту, мкм^3	52,06 ± 0,65	51,60 ± 0,93	52,36 ± 0,66	52,04 ± 0,83	53,22 ± 0,83	50,62 ± 0,45	53,22 ± 0,32	54,50 ± 0,33*
Середня концентрація гемоглобіну в еритроциті, пг	18,18 ± 0,33	17,98 ± 0,32	17,82 ± 0,24	17,74 ± 0,28	18,48 ± 0,28	17,12 ± 0,10	18,12 ± 0,29	18,65 ± 0,06
Тромбоцити, 10^3/мл	791,40 ± 41,24	729,80 ± 51,07	749,40 ± 39,64	727,0 ± 60,32	809,0 ± 78,20	689,40 ± 30,46	764,80 ± 70,22	660,0 ± 43,16

Таблиця 5

Біохімічні показники сироватки крові щурів за умов уведення Ессенціалє Н протягом 28 днів (M ± m, n = 5)

Показник	Контрольна група		Ессенціалє Н					
			22,13 мг/кг		110,65 мг/кг		221,30 мг/кг	
	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці
Альбумін, г/л	40,94 ± 0,28	39,58 ± 0,35	40,62 ± 1,37	39,44 ± 0,63	37,08 ± 0,30	37,26 ± 1,29	37,34 ± 0,62	37,88 ± 0,52
Загальний білок, г/л	63,80 ± 0,66	61,20 ± 0,37	64,80 ± 1,83	64,0 ± 1,61	59,80 ± 0,92	58,60 ± 1,50	59,8 ± 1,53*	61,25 ± 1,31
Загальний білірубін, мг/дл	1,26 ± 0,10	1,0 ± 0,09	1,54 ± 0,20	1,16 ± 0,23	1,20 ± 0,13	1,98 ± 0,76	1,84 ± 0,17*	1,43 ± 0,12*
Холестерин, ммоль/л	1,58 ± 0,06	1,52 ± 0,34	1,44 ± 0,12	1,47 ± 0,07	1,44 ± 0,10	1,58 ± 0,10	2,21 ± 0,70	1,45 ± 0,05
Глюкоза, ммоль/л	5,90 ± 0,38	5,72 ± 0,34	4,76 ± 0,13*	4,52 ± 0,29*	6,44 ± 0,26	6,54 ± 0,50	7,26 ± 0,51	6,05 ± 0,54
Креатинін, мкмоль/л	50,60 ± 3,03	49,20 ± 0,97	51,40 ± 2,44	50,0 ± 1,38	45,60 ± 0,40	44,60 ± 3,16	54,80 ± 2,97	48,0 ± 0,71
Сечовина, ммоль/л	6,86 ± 0,45	6,18 ± 0,25	7,50 ± 0,54	7,30 ± 0,35*	9,56 ± 0,57*	8,84 ± 0,80	8,82 ± 0,89	6,48 ± 0,37
Тригліцериди, ммоль/л	0,80 ± 0,07	0,80 ± 0,13	0,64 ± 0,07	0,76 ± 0,13	0,38 ± 0,04	0,42 ± 0,07	0,76 ± 0,11	1,0 ± 0,07
Аланінаміно-трансфераза, МО/л	40,40 ± 2,32	42,0 ± 2,24	48,0 ± 2,59	58,20 ± 4,47*	41,20 ± 3,99	52,0 ± 5,86	41,40 ± 1,40	40,0 ± 2,04
Аспартатаміно-трансфераза, МО/л	163,40 ± 11,5	182,20 ± 12,17	261,0 ± 16,7	223,80 ± 12,62*	231,20 ± 31,37	208,80 ± 22,32	200,0 ± 24,47	193,50 ± 17,97
Лужна фосфатаза, МО/л	119,76 ± 13,6	137,52 ± 23,36	144,22 ± 15,80	178,86 ± 15,02	134,65 ± 7,52	187,32 ± 24,43	159,0 ± 23,76	116,90 ± 5,49
Гамма-глутамілтрансфераза, МО/л	0	0	0,38 ± 0,12*	0,50 ± 0,16*	0,18 ± 0,11	0,22 ± 0,20	0,94 ± 0,20*	0,75 ± 0,24*

При введенні Ессенціалє Н у дозі 221,3 мг/кг активність гамма-глутамілтрансферази в сироватці крові самців і самиць вірогідно зросла порівняно з контролем і перевищила фізіологічну норму. Інші біохімічні показники сироватки крові в щурів обох статей у разі застосування Ессенціалє Н залишились у межах норми.

Таким чином, нами показано, що введення Ессенціалє Н у великих дозах в основному впливає на ферменти-маркери ушкодження печінки й може свідчити про можливий розвиток жовтяниці та порушення функції печінки. Причому можна відзначити більшу чутливість самців до дії Ессенціалє Н при застосуванні високих доз препарату.

Результати макро- та мікроскопічного дослідження показали, що застосування Ессенціалє Н у терапевтичній дозі (22,13 мг/кг) не спричиняло негативного впливу. Загальний стан дослідних і контрольних тварин був задовільний. На шкірі та слизових оболонках патологічних змін не спостерігалося. На розтині контрольних і більшості дослідних тварин у головному мозку, серці, легенях, нирках, тимусі, шлунку, тонкому й товстому кишечнику та в яєчниках патологічних змін не спостерігалося.

Слід відмітити, що одна тварина – самець – загинула на 26-й день після введення препарату в дозі 221,30 мг/кг. На розтині черевна порожнина була повністю заповнена геморагічно-серозною рідиною, що й призвело до загибелі тварини.

Після евтаназії в тварин, яким уводили Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг, у черевній порожнині відмічалася флуктуація. На розтині черевна порожнина була переповнена геморагічною рідиною.

Що стосується інших органів, а саме, печінки, селезінки та сім'яників, то в капсулі й оточуючій їх вісцеральній очеревині відмічалась запальна реакція. У 90 % випадків, особливо в разі застосування 110,65 мг/кг і 221,30 мг/кг Ессенціалє Н, на діафрагмальній поверхні селезінки й на вісцеральній поверхні печінки виявляли осередки блакитно-сірого нальоту. Якщо в контрольних тварин нижня поверхня печінки була відносно плоскою, а краї – гострими, то в дослідних тварин обох статей між частками печінки виявлялися спайки, а орган мав вигляд повнокровного, коричнювато-червоного кольору шароподібного конгломерату. Щодо щурів, яким уводили Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг, то повнокров'я печінки в них було ще більш вираженим.

Дані щодо відносної маси органів щурів обох статей наведено в таблиці 6. Порівняння отриманих результатів дослідних тварин з контрольними стосовно масових коефіцієнтів органів показали, що 22,13 мг/кг і 110,65 мг/кг Ессенціалє Н практично не впливали на зазначені показники. У разі збільшення дози препарату до 221,30 мг/кг вірогідно збільшувалися показники масових коефіцієнтів печінки щурів обох статей порівняно з контролем, а також масові коефіцієнти селезінки самців. Це пов'язано зі запальною реакцією та повнокров'ям органів.

При мікроскопічному дослідженні гематоксилін-еозинових препаратів головного мозку, міокарда, нирок, підшлункової залози, шлунка, тонкого та товстого кишечника, яєчників незалежно від дозового рівня препарату дистрофічних змін, гемодинамічних порушень і запальної реакції в цих органах не спостерігалося. Капсула печінки та вісцеральна очеревина були розрихлені та в разі збільшення дози до 221,30 мг/кг потовщувалися. У печінці не спостерігалося

Таблиця 6

Відносна маса внутрішніх органів і головного мозку щурів за умов уведення Ессенціалє Н протягом 28 днів (M ± m, n = 5)

Показник	Контрольна група		Ессенціалє Н					
			22,13 мг/кг		110,65 мг/кг		221,30 мг/кг	
	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці	самиці	самці
Тимус	0,180 ± 0,013	0,180 ± 0,015	0,230 ± 0,020	0,120 ± 0,018	0,20 ± 0,040	0,130 ± 0,010*	0,160 ± 0,001	0,150 ± 0,024
Селезінка	0,470 ± 0,036	0,530 ± 0,053	0,570 ± 0,039	0,510 ± 0,085	0,520 ± 0,074	0,510 ± 0,056	0,670 ± 0,032	0,790 ± 0,089*
Сім'яники/яєчники	0,035 ± 0,002	1,310 ± 0,096	0,0450 ± 0,0056	1,10 ± 0,10	0,0330 ± 0,0005	1,140 ± 0,075	0,0460 ± 0,0093	0,930 ± 0,20
Легені	0,60 ± 0,035	0,50 ± 0,038	0,690 ± 0,021	0,650 ± 0,055	0,550 ± 0,049	0,530 ± 0,019	0,650 ± 0,055	0,510 ± 0,014
Серце	0,370 ± 0,022	0,370 ± 0,023	0,360 ± 0,004	0,330 ± 0,015	0,310 ± 0,013	0,350 ± 0,009	0,320 ± 0,004	0,330 ± 0,017
Печінка	3,180 ± 0,127	3,110 ± 0,090	3,230 ± 0,069	3,350 ± 0,190	3,510 ± 0,130	3,090 ± 0,140	4,090 ± 0,170*	3,490 ± 0,110*
Нирки	0,620 ± 0,017	0,660 ± 0,036	0,650 ± 0,024	0,690 ± 0,009	0,610 ± 0,019	0,620 ± 0,015	0,70 ± 0,038	0,690 ± 0,018
Головний мозок	0,780 ± 0,029	0,690 ± 0,033	0,810 ± 0,029	0,710 ± 0,023	0,720 ± 0,052	0,710 ± 0,030	0,770 ± 0,016	0,77 ± 0,03

порушень гістоархітектоніки, тканина мала часточковий малюнок. Гепатоцити – в основному з незміненими тинкторіальними властивостями, полігональної форми, з чіткими контурами. В їхній цитоплазмі виявлялися базофільні брилки. Центральна частина паренхіматозних клітин була заповнена круглими ядрами, в яких розміщувались 1–2 ядерця. Об'єм ядер у гепатоцитах мало відрізнявся між собою. Серед клітин були наявні гістіоцити, лімфоцити, зрідка – сегментарні лейкоцити, інфільтрація мала дифузний характер. Це свідчить про наявність хронічної форми запального процесу. Слід відмітити, що в тварин, яким уводили Ессенціалє Н у дозах 110,65 мг/кг і 221,30 мг/кг, у печінці поряд з незміненими гепатоцитами часто зустрічалися клітини, в яких базофільні брилки не виявлялися. Їхня цитоплазма дифузно фарбувалася в блакитний колір, ядра були нечіткими, зерна хроматину й ядерце – не визначалися. Осередковано, поблизу капсули, розміщувалися набряклі, кулеподібні гепатоцити зі зернистою чи оптично пустою цитоплазмою. Ядра в таких клітинах були невеликих розмірів, гіперхромні, ядерця в них погано визначалися (рис. 1). Це свідчить про дистрофічні зміни в окремих гепатоцитах. У печінці тварин, незалежно від статі, яким уводили Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг, спостерігали осередки повнокров'я міжчасточкових і портальних вен, а також синусоїдів. У просвіті останніх виявлялася значна кількість мононуклеарів, зірчасті ретикулоендотеліоцити були активними.

У легенях усіх трьох дослідних груп тварин, незалежно від статі, поряд з незміненою тканиною, зустрічалися осередки альвеоліту, інтерстиціальної пневмонії, ендоваскуліти. Крім того, в окремих тварин, яким уводили

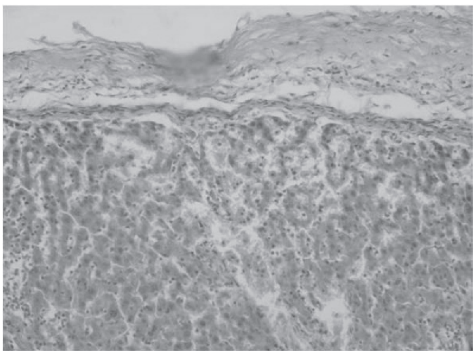

Рис. 1. Потовщення та розпушення капсули, інфільтрація її мононуклеарами, дистрофія гепатоцитів. Печінка тварини після 28 днів внутрішньоочеревинного введення Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг. Фарбування гематоксиліном і еозином. Зб. × 200

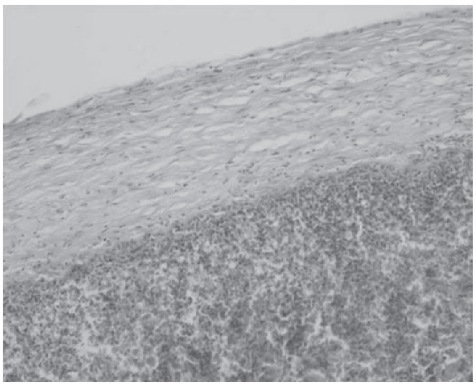

Рис. 2. Продуктивна запальна реакція в капсулі та червоній пульпі селезінки. Тварині протягом 28 днів внутрішньоочеревинно вводили Ессенціалє Н у дозі 110,65 мг/кг. Фарбування гематоксиліном і еозином. Зб. × 200

Ессенціалє Н у дозах 110,65 мг/кг і 221,30 мг/кг, перебронхіально виявлялося скупчення лімфоїдних елементів, які інфільтровані у власну й слизову оболонку бронхів, що призводило до появи осередків дискомплексації епітеліального шару слизової оболонки. Нерідко навколо дрібних артерій відмічалось скупчення гістіолімфоцитарних елементів, так звані «муфти».

У більшості тварин незалежно від статі й дози Ессенціалє Н капсула та вісцеральна очеревина селезінки були потовщеними, розрихленими, набряклими й інфільтрованими гістіоцитами, моноцитами, лімфоцитами та сегментоядерними лейкоцитами. Це свідчить про запальну осередковану реакцію в оболонках селезінки (рис. 2).

У білій пульпі селезінки спостерігалася гіперплазія мальпігієвих тілець, реактивні центри в них – розширені, перифолікулярно збільшувалась кількість середніх лімфоцитів. По ходу трабекул, навколо трабекулярних артерій і в червоній пульпі поряд з повнокров'ям місцями виявлялися невеликі скупчення лімфоїдних елементів (рис. 3). У просвіті окремих венозних судин спостерігалася значна кількість лімфоцитів. Це свідчить про подразнюючий ефект даного препарату.

Як видно з таблиці 6 масовий коефіцієнт тимусу порівняно з контролем вірогідно зменшувався в щурів-самців, яким вводили Ессенціалє Н у дозі 110,65 мг/кг. Це пов'язано з тим, що при мікроскопічному дослідженні гістологічних препаратів часточки тимусу були невеликих розмірів. У більшості з них мозкова речовина була значно розширена. Некробіотичних чи деструктивних змін у тимоцитах не спостерігалось, можливо вони переміщувалися в кров'яне русло.

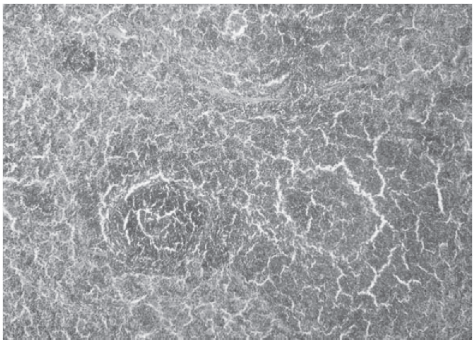

Рис. 3. Виражена активація лімфопоезу в білій пульпі селезінки. Тварині протягом 28 днів внутрішньоочеревинно вводили Ессенціалє Н у дозі 110,65 мг/кг. Фарбування гематоксиліном і еозином. Зб. × 100

Патоморфологічні зміни в сім'яниках певною мірою залежали від дози препарату (рис. 4). За даними макро- та мікроскопічних досліджень у разі застосування Ессенціалє Н у дозі 22,13 мг/кг патологічних змін не спостерігалося. При застосуванні 221,30 мг/кг препарату проявився токсичний ефект, що призводив у окремих щурів-самців до деструктивних змін у сім'яних канальцях. Вони характеризувалися некрозом сім'яних канальців, деформацією й їхнім спустошенням, деструкцією статевих клітин, появою великих і багатоядерних клітин, розшаруванням та інфільтрацією статевих мембран звивистих канальців правих сім'яників.

Отже, в цілому, у разі застосування Ессенціалє Н у дозі 22,13 мг/кг патологічних змін не спостерігалося. З підвищенням дози препарату до 110,65 мг/кг і 221,30 мг/кг у більшості тварин у капсулі печінки та прилеглій вісцеральній очеревині, селезінці та сім'яниках виявлялась запальна реакція. Також у даній експериментальній групі з'явилась запальна реакція, яка характеризувалась у частини тварин геморагічно-запальним процесом у черевній порожнині. У печінці відмічались осередкові дистрофічні зміни та гемодинамічні порушення.

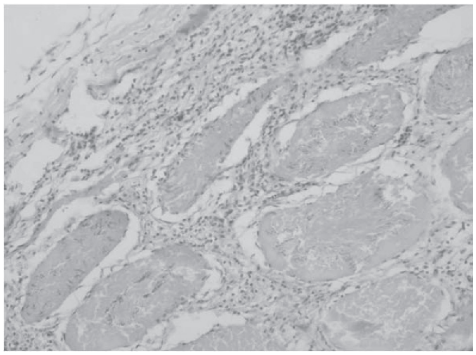

Рис. 4. Некроз сім'яних канальців, лейкоцитарна інфільтрація мембрани канальця. Тварині протягом 28 днів внутрішньоочеревинно вводили Ессенціалє Н у дозі 110,65 мг/кг. Фарбування гематоксиліном і еозином. Зб. × 200

Висновки

1. Проведені дослідження дозволили виявити дозозалежний ефект Ессенціалє Н на всі досліджені показники.
2. Загалом, Ессенціалє Н у дозі 22,13 мг/кг не спричиняв помітного негативного впливу на приріст маси тіла, показники аналізу сечі, гематологічні та біохімічні параметри, тканини внутрішніх органів.
3. Із підвищенням дози Ессенціалє Н до 110,65 мг/кг були відзначені сповільнення приросту маси тіла, вірогідне збільшення активності амінотрансфераз порівняно з контрольною групою, з'являлись ознаки запальної реакції у внутрішніх органах.
4. За умов застосування Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг негативні зміни поглиблювались (вірогідне збільшення активності амінотрансфераз, гамма-глутамілтрансферази, масових коефіцієнтів печінки, селезінки, поява деструктивних змін у сім'яниках). Одна тварина загинула.
5. Отримані дані можуть свідчити про те, що хронічна експозиція Ессенціалє Н у високих дозах може призводити до ушкодження печінки за типом холестазу.
6. Можна відзначити більшу чутливість самців до дії Ессенціалє Н при застосуванні високих доз препарату.

1. Effect of Essentiale in diabetic subjects with non-alcoholic fatty liver. K. Poongothai, G. Karkuzhali, T. Siva-Prakash et al. *Int. J. Diab. Dev. Countries*. 2005. V. 25, № 12. P. 1–6.
2. Essential phospholipids in the treatment of chronic pyelonephritis. A. A. Ovchinnikov, V. E. Tsvettsikh, B. A. Berdichevskii et al. *Urol. Nefrol.* 1996. № 4. P. 7–9.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів: методичні рекомендації; за ред. О. В. Стефанова. Київ : ВД «Авіцена», 2001. 527 с.

4. *Краевский В. Я.* Атлас микроскопии осадков мочи. Москва : Медицина, 1976. 167 с.
5. Prophylactic and curative assessment of Essentiale Forte® on carbon tetrachloride-induced liver damage in Wistar rats. O. S. Olukiran, R. O. Akomolafe, K. D. Bamitale et al. *Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences*. 2014. V. 2, № 3. P. 408–414. http://dx.doi.org/ 10.3889/oamjms.2014.070.
6. Проблема нормы в токсикологии. И. М. Трахтенберг, Р. Е. Сова, В. О. Шефтель, Ф. А. Оникиенко. Москва : Медицина, 1991. 204 с.
7. Лабораторные животные. И. П. Западнюк, В. И. Западнюк, Е. А. Захария, Б. В. Западнюк. Київ : Вища школа, 1983. 384 с.
8. *Колб В. Г., Камышников В. С.* Клиническая биохимия. Минск : Беларусь, 1976. 312 с.

Л. Б. Бондаренко, А. К. Вороніна, Г. М. Шаяхметова, І. С. Блажчук, Т. А. Карацуба, В. М. Коваленко

Дослідження підгострої токсичності лікарського засобу на основі есенціальних фосфоліпідів

Есенціальні фосфоліпіди різного походження знайшли своє застосування як гепатопротекторні препарати, які захищають і покращують функцію печінки в хворих на цукровий діабет з неалкогольною жировою дистрофією печінки та хронічними інфекціями. Оскільки біологічна активність «ессенціальних» фосфоліпідів відкрита досить давно й їхнє медичне застосування розпочалось ще до остаточного формування світової системи контролю за безпечністю та ефективністю лікарських засобів, то натепер склалася парадоксальна ситуація. Більшість опублікованих у відкритому доступі досліджень ефектів «ессенціальних» фосфоліпідів проводилася на людині. Результати доклінічного вивчення конкретних лікарських засобів на основі фосфоліпідів зазвичай є власністю фірм-виробників і не викладаються у відкритий доступ. Однак дослідження на тваринах мають не меншу наукову значущість з огляду на той факт, що тварини також страждають від захворювань печінки, а також на те, що інформація, отримана в результаті досліджень на тваринах зі застосуванням таких препаратів, може доповнити сукупність існуючих знань щодо їхнього використання та буде необхідною для виробників препаратів-генериків для їхньої реєстрації.

Мета дослідження – оцінка підгострої токсичності препарату есенціальних фосфоліпідів (Ессенціалє Н) у трьох дозах на щурах обох статей для того, щоб надати додаткову наукову інформацію як про придатність препарату для лікування, так і для підтвердження основних параметрів його безпечності.

Підгостру токсичність шляхом внутрішньоочеревинних повторних уведень тест-зразка Ессенціалє Н протягом 28 днів досліджували на білих щурах обох статей (*Rattus norvegicus*). 20 самців і 20 самиць з масою 150–180 г були розподілені на 3 дослідних та одну контрольну групу (по 5 особин для кожної статі): 1 група одержувала препарат у терапевтичній дозі 22,13 мг/кг; 2 група – у 5-разовій терапевтичній – 110,65 мг/кг; 3 група – у 10-разовій терапевтичній – 221,30 мг/кг. Контрольній групі тварин вводили розчинник (воду для ін'єкцій) у об'ємах, які відповідали максимальній дозі досліджуваного препарату. У кінці експерименту тварин знеживлювали, проводили аналіз сечі, макроскопічні та мікроскопічні дослідження, визначали гематологічні параметри та біохімічні показники сироватки крові.

Проведені дослідження дозволили виявити дозозалежний ефект Ессенціалє Н на всі досліджені показники. Загалом, введення Ессенціалє Н у дозі 22,13 мг/кг не спричиняло помітного негативного впливу на приріст маси тіла, показники аналізу сечі, гематологічні та біохімічні параметри, тканини внутрішніх органів.

Із підвищенням дози Ессенціалє Н до 110,65 мг/кг було відзначено сповільнення приросту маси тіла, вірогідне збільшення активності амінотрансфераз порівняно з контрольною групою, з'являлись ознаки запальної реакції у внутрішніх органах.

За умов застосування Ессенціалє Н у дозі 221,30 мг/кг негативні зміни поглиблювались (вірогідне збільшення активності амінотрансфераз, гамма-глутамілтрансферази, масових коефіцієнтів печінки, селезінки, поява деструктивних змін у сім'яниках). Одна тварина загинула.

Отримані дані можуть свідчити про те, що хронічна експозиція Ессенціалє Н у високих дозах може призводити до ушкодження печінки за типом холестазу. Можна відзначити більшу чутливість самців до дії Ессенціалє Н у разі застосування високих доз препарату.

Ключові слова: есенціальні фосфоліпіди, підгостра токсичність, щури

Л. Б. Бондаренко, А. К. Воронина, А. М. Шаяхметова, И. С. Блажчук, Т. А. Карацуба, В. Н. Коваленко

Исследование подострой токсичности лекарственного средства на основе эссенциальных фосфолипидов

Эссенциальные фосфолипиды различного происхождения нашли свое применение в качестве гепатопротекторных препаратов, которые защищают и улучшают функцию печени у больных сахарным диабетом с неалкогольной жировой дистрофией печени и хроническими инфекциями.

Поскольку биологическая активность эссенциальных фосфолипидов открыта довольно давно и их медицинское применение началось еще до окончательного формирования мировой системы контроля безопасности и эффективности лекарственных средств, то на данный момент сложилась парадоксальная ситуация. Большинство опубликованных в открытом доступе исследований эффектов эссенциальных фосфолипидов проводилось на человеке. Результаты доклинического изучения конкретных лекарственных средств на основе фосфолипидов обычно являются собственностью фирм-производителей и не выкладываются в открытый доступ. Однако исследования на животных имеют не меньшую научную значимость ввиду того, что животные также страдают от заболеваний печени, а также потому, что информация, полученная в результате исследований на животных с применением таких препаратов, может дополнить совокупность существующих знаний по их использованию и будет необходимой для производителей препаратов-генериков для их регистрации.

Цель исследования – оценка подострой токсичности препарата на основе эссенциальных фосфолипидов (Эссенциале Н) в трех дозах на крысах обоих полов для того, чтобы предоставить дополнительную научную информацию как о пригодности препарата для лечения, так и для подтверждения основных параметров его безопасности.

Подострую токсичность путем внутрибрюшинных повторных введений тест-образца Эссенциале Н в течение 28 дней исследовали на белых крысах обоих полов (*Rattus norvegicus*). 20 самцов и 20 самок с массой тела 150–180 г были распределены на 3 опытные и одну контрольную группу (по 5 особей каждого пола): 1 группа получала препарат в терапевтической дозе 22,13 мг/кг; 2 группа – в 5-кратной терапевтической – 110,65 мг/кг; 3 группа – в 10-кратной терапевтической – 221,30 мг/кг. Контрольной группе животных вводили растворитель (воду для инъекций) в объемах, соответствующих максимальной дозе исследуемого препарата. В конце эксперимента животных подвергали эвтаназии, проводили анализ мочи, макроскопические и микроскопические исследования, определяли гематологические параметры и биохимические показатели сыворотки крови.

Проведенные исследования позволили выявить дозозависимый эффект Эссенциале Н на все исследованные показатели. В целом, введение Эссенциале Н в дозе 22,13 мг/кг не оказывало заметного негативного влияния на прирост массы тела, показатели анализа мочи, гематологические и биохимические параметры, ткани внутренних органов.

С повышением дозы Эссенциале Н до 110,65 мг/кг были отмечены замедление прироста массы тела, достоверное увеличение активности аминотрансфераз по сравнению с контрольной группой, появлялись признаки воспалительной реакции во внутренних органах.

В условиях применения Эссенциале Н в дозе 221,30 мг/кг отрицательные изменения усугублялись (достоверное увеличение активности аминотрансфераз, гамма-глутамилтрансферазы, массовых коэффициентов печени, селезенки, семенников, появление деструктивных изменений в семенниках). Одно животное погибло.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что хроническая экспозиция Эссенциале Н в высоких дозах может привести к повреждению печени по типу холестаза. Можно отметить большую чувствительность самцов к Эссенциале Н при применении высоких доз препарата.

Ключевые слова: эссенциальные фосфолипиды, подострая токсичность, крысы

L. B. Bondarenko, A. K. Voronina, H. M. Shayakhmetova, I. S. Blazhchuk, T. A. Karatsuba, V. M. Kovalenko

Study of essential phospholipids preparation subacute toxicity

Essential phospholipids of various origins have found their application as hepatoprotective drugs that protect and improve liver function in diabetes patients with non-alcoholic fatty liver disease and chronic infections. Since the biological activity of essential phospholipids was discovered quite a long time ago and their medical use began far before the final formation of the global system of control over the medicines safety and effectiveness, a paradoxical situation has developed at the moment. Most of the publicly available studies on the effects of essential phospholipids have been conducted in humans. The results of these preparations preclinical studies are usually the property of the manufacturing companies and are not publicly available. However, animal studies results are of the same scientific importance as humans given the fact that animals also suffer from liver diseases, and that the information obtained from animal studies using such medicines can add a lot to our existing knowledge. It will be necessary also for manufacturers of generic preparations for their registration.

The purpose of the study was to evaluate the subacute toxicity of essential phospholipids preparation (Essentiale N) in three doses on rats of both sexes, in order to provide additional scientific information both on its suitability for treatment and to confirm the main parameters of its safety.

Subacute toxicity by intraperitoneal repeated administrations of Essentiale N for 28 days was studied using white rats of both sexes (*Rattus norvegicus*). 20 males and 20 females with a body weight of 150–180 g were divided into 3 experimental and one control group (5 individuals for each sex): 1st group received Essentiale N in a therapeutic dose – 22.13 mg/kg; 2nd group – in a 5-fold therapeutic dose – 110.65 mg/kg; group 3 – in a 10-fold therapeutic dose – 221.30 mg/kg. The control group of animals was injected with a solvent (water for injections) in volumes that corresponded to the maximum dose of the studied

preparation. At the end of the experiment, animals were sacrifized, urine analysis was performed, hematological and serum biochemical indices, macroscopic and microscopic parameters were determined.

The results of the study revealed a dose-dependent effect of Essentiale N on all parameters. In general, Essentiale N at a dose of 22.13 mg/kg did not cause a noticeable negative effect on body weight gain, urine analysis indicators, hematological and biochemical parameters, tissues of internal organs.

With Essentiale N dose increasing to 110.65 mg/kg, a slowdown in body weight gain was noted, as well as increase in aminotransferases activity (compared to the control group), and signs of an inflammatory reaction in internal organs appeared.

With Essentiale N in a dose of 221.30 mg/kg, the negative changes deepened (profound increase in aminotransferases and gamma-glutamyltransferase activities, liver, spleen, testis mass coefficients, appearance of destructive changes in the testicles). One animal died.

The data obtained may indicate that chronic exposure to Essentiale N in high doses may lead to cholestasis-type liver damage. It could be noted that males are more sensitive to the action of Essentiale N when using its high doses.

Key words: essential phospholipids, subacute toxicity, rats

Надійшла: 17 червня 2022 р.

Прийнята до друку: 30 серпня 2022 р.

Контактна особа: Бондаренко Лариса Борисівна, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМНУ», буд. 14, вул. Антона Цедіка, м. Київ, 03150. Тел.: + 38 0 67 6832659.
Електронна пошта: larabon04@yahoo.com