

«Утверждаю»

Проректор по НИР

ГБОУ ВПО БГМУ МЗ РФ

В.А.Катаев

2016 г.



ПРОТОКОЛ

№ 1 от « 15 » марта 2016 года

**Результаты доклинического исследования на безопасность образцов
аккумулированных драже APL на лабораторных животных**

Экспериментальными методиками изучены следующие образцы:

Табл. 1

№	Наименование / маркировка	Описание
1	SLD	–драже с запахом лимонной кислоты желтоватого цвета
2	NRM	–драже с запахом лимонной кислоты желтоватого цвета
3	RLX	–драже с запахом лимонной кислоты желтоватого цвета
4	GTS	–драже с запахом лимонной кислоты желтоватого цвета
5	ALT	–драже с запахом лимонной кислоты фиолетового цвета
6	GRW	–драже с запахом лимонной кислоты сиреневого цвета
7	MLS	–драже с запахом лимонной кислоты слабо оранжевого цвета
8	PWR man	– драже с запахом лимонной кислоты слабо желтого цвета
9	PWR woman	–драже с запахом лимонной кислоты светло оранжевого цвета
10	FIT day	–драже с запахом лимонной кислоты слабо розового цвета
11	FIT night	–драже с запахом лимонной кислоты желтоватого цвета
12	HRT	– драже с запахом лимонной кислоты розового цвета
13	ICE	– драже с запахом лимонной кислоты желтого цвета
14	STP	– драже с запахом лимонной кислоты розового цвета

I Определение острой токсичности на образцах аккумулярованных драже APL

Методы исследования

Острую токсичность 14 образцов драже определяли на белых мышах самцах массой 20,0-25,0 г. по методу Litchfield I. и Wilcoxon F. в модификации Прозоровского В.Б. (2) при пероральном однократном введении 10 % раствора испытуемых веществ днем в одно и тоже время (12 часов). Наблюдали в течение 14 дней. Регистрировались поведенческие реакции, активность, летальность. Содержание и кормление согласно современным стандартным требованиям (3). Ежедневные наблюдения за поведенческими рефлексамии, внешним видом, массой.

Готовили 10%-ный раствор на дистиллированной воде из перемолотых испытуемых образцов драже APL. Контрольная группа животных получала физиологический раствор натрия хлорида. Начальный объем – 0,2 мл.

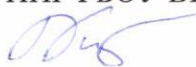
При отсутствии изменений поведенческих реакций в течение 2-х дней, дозу увеличивали постепенно (по 0,1 мл) до объема 1,0 мл, что составило 100 мг чистого вещества, т.е. >4000 мг/кг. Дальнейшее увеличение объема per os не допускается (1).

Результаты

Наблюдение в течение 2-х последующих недель за лабораторными животными отклонений от нормальных показателей не выявило у всех 14 групп экспериментальных животных, гибели не наблюдалось.

Вывод: Установлено, что изученные 14 образцов аккумулярованных драже APL практически не токсичны по классификации К.К. Сидорова (4).

Проректор по НИР ГБОУ ВПО БГМУ МЗ РФ



В. А. Катаев

II Исследование кумулятивных свойств аккумулярованных драже APL

Поскольку в состав образцов драже входят витамины и биофлавоноиды, целесообразно убедиться в отсутствии кумулятивного эффекта комплексного продукта.

Методы исследования

Кумуляцию всех 14 образцов (SLD, NRM, RLX, GTS, ALT, GRW, MLS, PWR man, PWR woman, FIT day, FIT night, HRT, ICE, STP) продукта изучали методом определения субхронической токсичности по Lim R.K. (5) у белых неинбредных крыс – самцов массой 180,0-210,0 г в возрасте 16-18 недель.

Условия содержания и кормления согласно существующих стандартных нормативов и требований (Страсбург, 1986). Испытуемые вещества вводили в виде 10%-ного водного раствора внутривентрикулярно ежедневно в одно и то же время (12 часов). Поскольку острая токсичность отсутствует, целесообразно первоначально установить дозу 100 мг/кг, далее увеличивая дозу (и объем) согласно методике.

Табл. 2

Дни введения	Кол-во вещества драже, мг/кг
1-4	100
5-8	150
9-12	225
13-16	337,5
17-20	506,3
	$\Sigma=5275,2$

Суммарная доза за 20 дней составила 5275,2 мг/кг у всех испытуемых образцов драже.

Результаты

За 20 дней наблюдения патологических отклонений в поведенческих рефлексах, внешних данных, массы, физиологических реакциях не было. Гибели животных также не наблюдалось.

Вывод: кумулятивными свойствами испытуемые образцы аккумулярованных драже APL не обладают.

Проректор по НИР ГБОУ ВПО БГМУ МЗ РФ



В. А. Катаев

III Влияние образцов аккумулярованных дряже APL на работоспособность

Испытание потенциальных комплексных БАД на работоспособность лабораторных животных является обязательным (1,5).

Методы исследования

Работоспособность белых мышей определяется по времени пребывания на вращающемся валу (5). Животные получали 100 мг/кг испытуемых веществ в виде 10%-ного раствора, контрольная группа – физиологический раствор натрия хлорида per os за 40 минут до эксперимента. Каждое животное помещалось в закрытую камеру (30×30×40 см) с отверстиями для воздухообмена. Пол камеры состоял из стальных стержней, на которые подавалось постоянное напряжение 35-40 В (ток 1 А без учёта сопротивления кожи животных). Это вынуждало животное запрыгивать на вращающийся вал, поднятый на высоту 15 см от пола и покрытый мягким пористым материалом (диаметр вала – 7 см, скорость вращения – 1,5 об./сек) и в течение эксперимента передвигаться на нём. С помощью секундомера фиксировалась общая длительность пребывания животного на валу, окончание эксперимента определялось визуально, по снижению выносливости и физической усталости животного, падающего на электрический пол камеры и не способного подняться на вал снова.

Результаты

Из данных таблицы №3 следует, что все испытуемые образцы не угнетают работоспособности, но соединения PWR man, NRM, GTS, GRW повышают работоспособность ($P > 0,05$), увеличивая время пребывания лабораторных мышей на вращающемся валу по сравнению с контролем.

Влияние образцов аккумулярованных драже APL в дозе 100 мг/кг на работоспособность белых мышей.

Группа животных по вводимому виду драже APL	Количество животных	Время пребывания на вращающемся валу (мин) M±m
Контроль	10	245,7±34,5
SLD	10	263,5±28,8
RLX	10	277,5±37,4
PWR woman	10	290,0±41,2
FIT night	10	281,5±39,5
PWR man	10	298,8±37,7
NRM	10	292,7±36,6
GTS	10	305,4±40,5
FIT day	10	269,5±50,2
ICE	10	270,7±35,9
ALT	10	284,7±35,9
HRT	10	289,7±34,7
GRW	10	310,0±45,5
STP	10	282,7±37,7
MLS	10	279,4±40,5

Таким образом, действие исследуемых веществ заключается в повышении выносливости животных, проявляющемся в увеличении способности справляться с большими физическими нагрузками (PWR man, NRM, GTS, GRW) или не оказывают значимого влияния на выносливость и работоспособность животных.

IV Оценка аккумулярованных драже APL на общую анафилактикоидную реакцию.

Методы исследования

Эксперименты проводились на морских свинках массой 200,0-230,0. Сенсибилизировали лошадиной сывороткой подкожно (в холку) 0,1 мл (10 мг). Одновременно per os испытуемые БАД по 100 мг/кг (1 % - 1 мл) на 100,0 г массы свинки. Контрольная группа – физиологический раствор натрия хлорида (1 мл/100,0 г массы). Через 21 день – антиген внутривенно в заднюю скакательную вену 0,2 мл (20 мг). Животные наблюдались в течение 30 минут. Оценка реакции проводится в баллах:

А (+) – единичные кратковременные акты груминга (почесывания носа), гипотермия (не более чем на 1° С).

Б (++) – учащенные акты груминга, единичное стернутаия (чихание), гипотермия (на 1° С и более).

В (+++) – бронхоспазм, кашель, боковое положение, непроизвольные мочеиспускание, дефекация.

Г(+++++) – асфиксия, судороги, гибель животного.

Д – реакции нет.

Результаты рассчитаны по формуле Вейгла:

$$И = \frac{(A \times 1) + (B \times 2) + (B \times 3) + (Г \times 4)}{A + B + B + Г},$$

где А, Б, В, Г – число животных с данной выраженностью синдрома.

Результаты

Данные таблицы демонстрируют отсутствие способности у испытуемых соединений повышать анафилактикоидную реакцию у сенсибилизированных лошадиной сывороткой морских свинок.

Оценка анафилактической реакции морских свинок, sensibilized лошадиной сывороткой, при сочетании с аккумулярованными драже APL

Группа	Число животных в группе	Выраженность симптомов, число животных				Индекс Вейгла
		A(+)	B(++)	B(+++)	Г(++++)	
Контроль	12	6	4	2	–	1,75
MLS	12	4	5	3	–	1,92
RLX	12	5	4	3	–	1,83
HRT	12	4	4	4	–	1,5
FIT day	12	6	3	3	–	1,75
FIT night	12	6	4	2	–	1,66
ICE	12	5	5	2	–	1,75
PWR man	12	7	3	2	–	1,58
PWR woman	12	6	5	1	–	1,58
SLD	12	8	2	2	–	1,5
STP	12	7	3	2	–	1,58
ALT	12	7	2	3	–	1,67
GRW	12	5	3	4	–	1,92
NRM	12	5	5	2	–	1,75
GTS	12	8	2	2	–	1,5

В ряде случаев образцы драже статистически значимо ($p < 0,05$) снижают ее (HRT, SLD, GTS), и имеют тенденцию к снижению (PWR man, PWR woman, STP), $p > 0,05$. Гибель животных не наблюдалось ни в одной группе, индекс Вейгла не превышал 2,0.

Вывод. Реакции компенсаторно-адаптационного характера не нарушены, что является основанием для рекомендации исследованных БАД к практическому применению.

Проректор по НИР ГБОУ ВПО БГМУ МЗ РФ

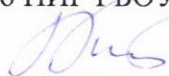


_____ В. А. Катаев

Выводы:

- 1) Испытанные образцы аккумулярованных драже APL SLD, NRM, RLX, GTS, ALT, GRW, MLS, PWR man, PWR woman, FIT day, FIT night, HRT, ICE, STP относятся к группе практически нетоксичных.
- 2) Все испытанные образцы драже APL не проявляют кумулятивного, тератогенного, эмбриотоксического действия.
- 3) Все 14 образцов аккумулярованного драже APL влияют на уровень физической работоспособности в пределах физиологических норм, повышая ее достоверно в ряде случаев (PWR man, NRM, GTS, GRW), предположительно обладая антиоксидантным действием.
- 4) У всех испытанных образцов аккумулярованного драже APL отсутствует анафилактикоидная реакция.
- 5) Целесообразны дальнейшие углубленные доклинические испытания всех 14 образцов, аккумулярованных драже APL.

Проректор по НИР ГБОУ ВПО БГМУ МЗ РФ



В. А. Катаев

Список литературы:

1. Прозоровский В.Б. Табличный метод определения минимальной токсической дозы //Фармакология и токсикология, 1983. – №6.
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая» под редакцией Миронова А.Н. – М.: Гриф и К. – 2012. – 944 с.
3. Сидоров К.К., Измеров Н.Ф., Саноцкий И.В.- Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии: Справочник., 1977.
4. МУК 2.3.2. 721-98. Определение безопасности и эффективности БАД к пище. (извлечения)/ Новая аптека 2001 №12.
5. Lim R.K.S., Rink K.G., Glass H.G. A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses// Arch. intern. Pharm. Ther.–1961.–vol.30.–p.336-352.
6. Приказ Минздравсоцразвития России от 23.08.2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

Прошито и пронумеровано
12 (двенадцать) листов

Проректор по НИР ГБОУ ВПО БГМУ МЗ РФ

В. А. Катаев

