

Н.В. Тихонова, В.М. Позняковский

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ И КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ БАД «ЭРАМИН»

Впервые проведены экспериментальные и клинические испытания БАД «Эрамин», разработанной сотрудниками УГАВМ, КемТИПП и ООО «НПП «Эраконд-Урал», на белых беспородных мышах, белых крысах линии Вистар, кроликах породы шиншилла. В результате исследований установлено, что БАД «Эрамин» не обладает острой, хронической токсичностью, раздражающим действием и эмбриотоксическими свойствами, стимулирует эритропоэз, усиливает обменные процессы, способствует заживлению послеоперационных ран и обладает бактерицидными свойствами. Таким образом, «Эрамин» является безопасной биологически активной добавкой с различной функциональной направленностью.

Биологически активная добавка «Эрамин», токсичность, бактерицидные свойства, регенерация мягких тканей.

Введение

Сохранение и укрепление здоровья населения, профилактика заболеваний, которые обусловлены отклонениями от правильного питания детей и взрослых, является важной государственной задачей [1]. Одним из возможных путей решения этой задачи является разработка и использование биологически активных добавок (БАД) к пище, обладающих высокой эффективностью. Экспериментальные и клинические испытания новых БАД являются определяющим критерием в оценке их качества, безопасности и эффективности.

Сотрудниками УГАВМ совместно с кафедрой товароведения и управления качеством КемТИПП и ООО «НПП «Эраконд-Урал» (г. Екатеринбург) разработана БАД «Эрамин».

В связи с этим целью работы являлась оценка острой и хронической токсичности, эмбриотоксических, бактерицидных, раздражающих и ранозаживляющих свойств разработанной нами БАД «Эрамин».

Целесообразно дать краткую характеристику БАД.

«Эрамин» – экстракт люцерны посевной, полученный в результате гидробаротермической обработки растительного сырья с добавлением микроэлементов: железо серноокислое 7-водное, цинк серноокислый 7-водный, марганец серноокислый 5-водный, медь серноокислая 5-водная, аммоний молибденовоокислый, аммоний ванадиевоокислый, кобальт серноокислый 7-водный, хром (3) серноокислый 6-водный.

При условии потребления 2 г (2 таблетки) БАД в день обеспечивается 200 % суточной потребности взрослого человека в биофлавоноиде лютеолине.

БАД «Эрамин» прошла клинические, санитарно-химические и санитарно-микробиологические испытания в Головном испытательном центре пищевой продукции при Институте питания РАМН, на основании чего МЗ РФ выданы регистрационные удостоверения, утвержденные Главным государственным санитарным врачом РФ, разрешающие серийное производство (Свидетельство о государственной регистрации № 77.99.11.3.У.9568.10.89 от 14.10.2009 г., ТУ 9197-001-84518363-09).

Объекты и методы исследований

Экспериментальные и клинические испытания БАД проводили на кафедрах фармакологии и микробиологии УГАВМ.

Объекты исследований: белые беспородные мыши, белые крысы линии Вистар, кролики породы шиншилла и кровь подопытных животных.

Исследования острой токсичности БАД проводили на беспородных белых мышах живой массой 20–22 г. Сформировали две группы белых мышей по 16 животных. Белые мыши находились в одинаковых условиях содержания. Первая группа мышей контрольная. Животным второй группы вводили внутрь «Эрамин» с помощью шприца через зонд в виде 10 и 30 % водного раствора в дозах от 3000 до 7500 мг/кг. Наблюдение за клинико-физиологическим состоянием вели в течение 20 дней. Выбор доз обоснован тем, что количество БАД, введенной животным, значительно выше профилактических и терапевтических доз. Кроме того, вводили исследуемую добавку в максимальном объеме, чтобы установить дозу, необходимую для гибели мышей.

Для определения хронической токсичности по принципу аналогов сформировали три группы кроликов породы шиншилла живой массой 4,0–5,0 кг по 10 животных в каждой. Первая группа контрольная. Кролики этой группы получали основной рацион, животные второй группы дополнительно к основному рациону – 10 % водный раствор «Эрамина» в дозе 25 мг/кг живой массы ежедневно в течение 60 дней (3 курса по 20 дней), а животные третьей группы дополнительно к основному рациону получали внутрь «Эрамин» в дозе 50 мг/кг живой массы ежедневно в течение 60 дней (3 курса по 20 дней). Наблюдение за клиническим состоянием кроликов проводили на протяжении всего опыта.

Для определения эмбриотоксических свойств БАД «Эрамин» проведены два эксперимента. В первом эксперименте беременные самки белых крыс получали «Эрамин» внутрь в дозе 25 мг/кг, а во втором – 250 мг/кг. В первом случае для опыта использовали 224 плода белых крыс, 110 из которых послужили контролем.

Раздражающее действие «Эрамина» исследовали на 15 кроликах породы шиншилла общепринятыми методами при однократном и длительном наружном применении раствора от 5 до 20 % concentra-

ции. По принципу аналогов сформировали 5 групп животных по 3 кролика в каждой. Первая группа контрольная – животным этой группы наносили на выстриженные участки кожи по 10–12 капель дистиллированной воды в течение 30 дней и однократно 2 капли в конъюнктивальный мешок левого глаза. Кроликам 2–5 опытных групп капали раствор «Эрамина» в 5–20 % концентрациях на кожу в течение 30 суток и однократно на конъюнктиву правого глаза. Раздражающее действие оценивали по толщине кожной складки, которую определяли с помощью штангенциркуля, и воспалительным процессам в области нанесения БАД.

Для оценки бактерицидной активности «Эрамина» в качестве тест-системы были взяты следующие бактериальные культуры:

1) *E. Coli* – кафедра микробиологии УГАВМ;

2) *Staphyloc. aureus* – кафедра микробиологии УГАВМ.

Бактериальные культуры засевали в чашки с мясопептонным агаром, содержащим 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5; 10 % БАД «Эрамин». Нагрузка 100 тыс. микробных тел на чашку Петри. Инкубация при температуре 37 °С – 7 дней с ежедневным просмотром чашек.

Эксперимент по изучению влияния БАД «Эрамин» на регенерацию мягких тканей проводили на 10 кроликах породы шиншилла. По принципу аналогов сформировали две группы по 5 животных в каждой. Все животные находились в одном помещении, имели одинаковые условия содержания и кормления. Под местным обезболиванием 0,5 % раствором новокаина животным наносили резаную кожно-мышечную рану длиной 10 мм, глубиной 3 мм, на уровне середины наружной поверхности бедра. Разрез наносили продольно мышечным волокнам. Приготовили стерильный 10 % водный раствор «Эрамина» и использовали его для лечения экспериментальной раны у кроликов второй опытной группы. В послеоперационном периоде рану обрабатывали раствором «Эрамина» ежедневно два раза в день утром и вечером до полного выздоровления путем нанесения из шприца. Животным первой группы лечение раны не проводили. Наблюдения за состоянием животных и процессом заживления ран вели в течение 35 суток. Пробы крови брали до начала опыта и после нанесения ран на третьи сутки.

Исследования показателей крови подопытных животных определяли по общепринятым методикам.

Полученные материалы обработаны методом вариационной статистики с использованием критерия Стьюдента и компьютерной программы Biostat.

Результаты и их обсуждение

Острая токсичность

Изменения физиологического состояния, клиническую картину отравления и гибель животных не отмечали. Определить ЛД 50 не удалось, так как дозы больше 7500 мг/кг не вводили из-за большого объема препарата. После двухнедельного наблюдения животных усыпляли эфиром для патолого-анато-

мического вскрытия и морфологического анализа. Вскрытие трупов производили с целью научного исследования, которое отличается от обычного вскрытия более тщательным исследованием внутренних органов: селезенки, печени, сердца и других. Трупы мышек вскрывали в специальном помещении – прозектории УГАВМ. На вскрытии патологических изменений во внутренних органах не обнаружено.

Таким образом, «Эрамин» в дозах 3000–7500 мг/кг живой массы не оказывает токсического действия. Согласно классификации Н.Ф. Измерова (цит. по А.А. Ступниковому, 1975), «Эрамин» относится к малоподобным (IV класс) веществам.

Хроническая токсичность

При определении острой токсичности животные не погибли, общее состояние кроликов за весь период опыта было хорошим: животные были подвижны, активны, аппетит хорошо выражен, шерстный покров гладкий блестящий, плотно прилегает к поверхности тела.

Через 30 дней после дачи БАД по 3 животных из каждой группы убивали под наркозом для патолого-анатомического исследования.

При патолого-анатомическом вскрытии животных патологических изменений во внутренних органах не отмечено.

Для оценки состояния организма животных исследовали клинко-физиологические показатели (табл. 1), морфобиохимические показатели крови и изменения массы тела до начала опыта и по его окончании.

Таблица 1

Клинко-физиологические показатели кроликов

Группа	Температура, °С	Пульс, ударов в мин	Частота дыхания в 1 мин
В начале опыта			
1	38,60±0,07	149,8±2,48	54,3±2,41
2	38,57±0,9	147,4±3,67	52,6±2,1
3	38,64±0,7	150,3±2,58	51,7±1,9
В конце опыта			
1	38,6±0,05	149,6±3,1	54,5±2,5
2	38,5±0,04	149,1±3,8	54,7±1,8
3	38,5±0,05	149,7±2,5	50,8±1,9

Анализ табл. 1 показал, что у кроликов второй опытной группы, дополнительно получавших к основному рациону «Эрамин» в дозе 25 мг/кг, отмечено незначительное повышение частоты сердечных сокращений и дыхания в конце опыта. Изменения этих показателей оставались в пределах физиологической нормы. Увеличение частоты пульса и дыхания, возможно, связано с максимальным поступлением биологически активных веществ в организм кроликов. В третьей группе наблюдается обратный процесс – увеличение дозы БАД к уменьшению усвоения биологически активных веществ и выведению излишков химических элементов.

Морфобиохимические показатели крови подопытных животных представлены в табл. 2.

Таблица 2

Морфобиохимические показатели крови кроликов

Показатель	Группа		
	1	2	3
Гемоглобин, г/л	$94,7 \pm 1,8$ $94,2 \pm 2,3$	$95,2 \pm 2,1$ $99,7 \pm 2,0$	$96,5 \pm 1,9$ $105,3 \pm 2,4$
Эритроциты, $10^{12}/л$	$4,34 \pm 0,02$ $4,27 \pm 0,03$	$4,25 \pm 0,03$ $4,53 \pm 0,02$	$4,31 \pm 0,03$ $4,57 \pm 0,03$
Лейкоциты, $10^9/л$	$6,71 \pm 0,13$ $6,75 \pm 0,12$	$6,38 \pm 0,08$ $6,37 \pm 0,15$	$6,57 \pm 0,12$ $6,61 \pm 0,10$
Общий белок, г/л	$66,4 \pm 1,8$ $65,7 \pm 1,6$	$65,3 \pm 1,5$ $68,4 \pm 2,1$	$66,1 \pm 1,2$ $67 \pm 1,4$
Глюкоза, ммоль/л	$5,12 \pm 0,1$ $5,13 \pm 0,2$	$5,16 \pm 0,1$ $5,15$	$5,10 \pm 0,1$ $5,12 \pm 0,2$

Примечание. В числителе – показатели в начале опыта, в знаменателе – в конце опыта.

При норме 90–100 г/л лучшие показатели по сравнению с контролем были у кроликов второй опытной группы, то есть при использовании БАД в дозе 25 мг/кг. Уровень гемоглобина в этой группе составил 99,7 г/л. Более низкие показатели были у животных контрольной группы. В ходе опыта нами было установлено, что в крови кроликов с увеличением дозы БАД возросло содержание гемоглобина и составило 105 г/л, что в пределах физиологической нормы. Максимальное значение содержания эритроцитов достигало у кроликов третьей опытной группы (50 мг/кг) – $4,57 \cdot 10^{12}/л$, минимальное содержание эритроцитов у кроликов контрольной группы – $4,27 \cdot 10^{12}/л$, что свидетельствует о положительном влиянии «Эрамина» на органы кроветворения. Количество общего белка во второй опытной и третьей группах выше на 4,6 и 3 % соответственно, чем в контроле. Повышение этого показателя свидетельствует об активации обменных процессов.

Таким образом, «Эрамин» не оказывает негативного влияния на морфологический состав крови, белковый и энергетический обмен.

БАД «Эрамин» является источником микроэлементов, в частности железа. Отмечено увеличение содержания железа в сыворотке крови с одновременным повышением дозы БАД. При дозе 25 мг/кг количество железа во второй группе достигло 18,42 мкмоль/л, в третьей – 21,7 мкмоль/л.

Определение насыщенности трансферина железом является одним из показателей интенсивности обмена веществ в организме. Трансферин – это сывороточный белок, переносчик железа в организме. Полученные данные свидетельствуют о повышении насыщенности железом трансферина и согласуются с предыдущими по содержанию железа в сыворотке крови, то есть максимальное насыщение наблюдалось у животных второй и третьей групп и составило соответственно 0,31 и 0,34 мкмоль/мл, в то время как в контрольной – 0,23 мкмоль/мл.

В синтезе белка важное место принадлежит трансаминазной активности крови, непосредственно таким ферментам, как аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартаминотрансфераза (АСТ). Аминотрансферазы играют важную роль в обмене белков. Небелковой частью этих ферментов является

витамин В. Эти ферменты катализируют в организме важнейшие процессы, связанные с белковым обменом, и участвуют в обратимой реакции переноса аминогрупп аминокислот на кетокислоты (переамирирование), то есть участвуют в процессе синтеза незаменимых аминокислот.

Выбранные биохимические показатели отражают функцию печени при различных физиологических и патологических состояниях. Нарушения функции печени, как правило, сопровождаются значительным повышением активности аминотрансфераз вследствие воздействия на печень токсических продуктов.

Изменение активности аспартаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы отражено в табл. 3.

Таблица 3

Активность АСТ и АЛТ в сыворотке крови кроликов

Группа	АСТ, нкат/л	АЛТ, нкат/л	Коэффициент де Ритиса
1	$0,200 \pm 0,005$	$0,160 \pm 0,001$	$1,25$
	$0,200 \pm 0,006$	$0,160 \pm 0,002$	$1,25$
2	$0,20 \pm 0,003$	$0,160 \pm 0,021$	$1,25$
	$0,210 \pm 0,002$	$0,170 \pm 0,015$	$1,24$
3	$0,200 \pm 0,004$	$0,15 \pm 0,007$	$1,33$
	$0,20 \pm 0,007$	$0,16 \pm 0,018$	$0,25$

Примечание. В числителе – показатели в начале опыта, в знаменателе – в конце опыта.

В ходе опыта установлено, что у кроликов второй группы повышается по сравнению с контролем активность в сыворотке крови АСТ до 0,21 нкат/л и АЛТ 0,17 нкат/л. Незначительное повышение активности аминотрансфераз служит показателем наиболее интенсивного синтеза белка.

Таким образом, БАД «Эрамин» при длительном применении (3 курса по 20 дней):

- 1) не оказывает токсического и местнораздражающего действия на организм животных;
- 2) не вызывает патолого-анатомических изменений во внутренних органах;
- 3) активизирует эритропоэз;
- 4) стимулирует обменные процессы.

Эмбриотоксические свойства

Результаты исследования показали, что при введении внутрь беременным самкам в течение 21 дня в дозе 25 мг/кг общая эмбриональная гибель составила 10,6 %, а в контрольной группе, где животным в период беременности никаких препаратов не вводили, общая эмбриональная смертность составила 15,3 %.

Таким образом, применение БАД «Эрамин» беременным самкам белых крыс в течение всего периода беременности снижает общую эмбриональную смертность крыс.

Раздражающее действие

Однократное и многократное нанесение на кожу водного раствора БАД «Эрамин» различных концентраций (5–10 %) не вызывало сосудистой реакции и других воспалительных процессов (болезнен-

ности, отеков, расчесов и т.д.). Толщина кожи по всей площади выбритого участка у животных всех групп составляла в среднем 3,7 мм. При исследовании влияния на слизистые оболочки различий между опытом и контролем не отмечено.

Таким образом, БАД «Эрамин» не обладает раздражающим действием.

Бактерицидная активность

Для определения перспективы использования «Эрамина» в лечебных целях в качестве ингибитора роста бактерий была определена бактериостатическая и бактерицидная активность новой БАД в модельных опытах *in vitro*.

Первые колонии бактерий на пластинчатых средах появились через 48 часов инкубации при температуре 37 °С, в то время как в контрольных чашках (без препарата) сплошной газон бактерий при аналогичных условиях инкубации. Бактерицидная активность «Эрамина» прямо зависела от концентрации его в питательной среде (табл. 4).

Таблица 4

Влияние БАД «Эрамин» на разные виды бактерий

Культура	Концентрация, %					
	10	5	2,5	1,25	0,6	0,3
<i>E. coli</i>	–	+	+	+	+	+
<i>Staphyloc. aureus</i>	–	–	–	–	+	+

Примечание: «+» – наличие роста; «–» – отсутствие роста.

Приведенные данные показывают, что число колоний и площадь сплошного газона снижаются по мере увеличения процентного содержания БАД. Следует отметить, что уже начиная с 1,25 % концентрации установлено бактерицидное свойство «Эрамина» на *Staphyloc. aureus*, 10 % концентрация подавляла рост *E. coli*.

Таким образом, «Эрамин» обладает бактерицидными и бактериостатическими свойствами. Бактерицидность БАД повышается с увеличением концентрации.

Влияние БАД «Эрамин» на регенерацию мягких тканей

Список литературы

1. Политика здорового питания. Федеральный и региональный уровни / В.И. Покровский, Г.А. Романенко, В.А. Княжев, Н.Ф. Герасименко, Г.Г. Онищенко, В.А. Тутельян, В.М. Позняковский. – Новосибирск: Сиб. унив. изд-во, 2002. – 344 с.

Видимые различия в состоянии ран у животных первой и второй групп начали проявляться с третьих суток. В первой опытной группе отмечали образование грануляционной ткани на дне раны на 5 день после операции, в то время как у животных опытной группы на фоне проводимого лечения наблюдали образование грануляционной ткани на 3–4 день. К 25–28 дню после операции у кроликов второй группы восстанавливается многослойное строение эпителия. Строение мышечной ткани не имеет отличий от нормы. Возле отдельных мышечных волокон небольшие участки рубцовой ткани. Полное заживление раны происходит на 28 день после операции. В первой опытной группе через 30 дней эпителий в области раны незначителен, местами однослойный. В подлежащих мышцах наблюдаются дистрофические изменения мышечных волокон и очагов некроза, обширные поля рубцовой ткани и очагов некроза. Полное заживление раны отмечали на 35 день после операции.

У животных контрольной группы содержание гемоглобина возросло на 7,6 %, эритроцитов – на 7,0 %, а лейкоцитов – на 6,6 %, в то время как во второй опытной группе содержание гемоглобина – 4,9 %, эритроцитов – 2,5 %. Наименьшее количество лейкоцитов отмечено у животных второй опытной группы. Повышение количества лейкоцитов в первой опытной группе, возможно, связано с увеличением числа молодых нейтрофилов и снижением числа лимфоцитов в связи с интенсивным развитием воспалительного процесса в области раны. В крови кроликов первой группы количество тромбоцитов возросло на 12,2 %, в то время как во второй опытной группе – на 2,8 %. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) в контроле была выше на 6,6 % по сравнению с опытной группой, что свидетельствует об интенсивном развитии воспалительного процесса.

Таким образом, использование БАД «Эрамин» при лечении ран способствует наименьшему изменению гематологических показателей, снижению интенсивности воспалительного процесса, быстрому восстановлению эпителия и скелетной мышечной мускулатуры, а также уменьшению рубцовых изменений в тканях.

ФГОУ ВПО «Уральская государственная академия ветеринарной медицины»,

457100, Россия, Челябинская обл., г. Троицк, ул. Гагарина, 13.

Тел.: (35163) 2-00-10

Факс: (35163) 2-04-72

e-mail: tvi_t@mail.ru

SUMMARY

N.V. Tikhonova, V.M. Poznyakovsky

Experimental and clinical tests of baa «Eramin»

For the first time, experimental and clinical tests of biologically active additive (BAA) «Eramin» have been conducted. Laboratory mice, Wistar rats, Chinchilla rabbits were the research subjects. It has been found that BAA «Eramin» does not have any strong chronic toxicity, irritating and embryotoxic properties. It stimulates erythropoiesis, increases metabolism, promotes healing of postoperation soft tissue damages and has bactericidal properties. Thus, «Eramin» is a safe food additive with different functional properties.

Biologically active additive «Eramin», toxicity, bactericidal properties, regeneration of soft tissue.

Uralskay gosydarstvenay academy veterinary medicine
13, Gagarin street, Troitsk, 457100, Russia
Phone: (35163) 2-00-10
Fax: (35163) 2-04-72
e-mail: tvi_t@mail.ru

