

## Изучение фармакологической безопасности стандартизированного очищенного рассола бишофита

Л.И. Бугаева ✉, А.А. Спасов, С.А. Лебедева, Т.М. Коржова, А.Ю. Гетманенко

Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия  
Волгоградский медицинский научный центр, Волгоград, Россия

**Аннотация.** В экспериментах на половозрелых крысах проведена оценка фармакологической безопасности очищенной формы стандартизированного рассола минерала бишофита (СРБ) при внутрижелудочном повторном введении в течение 90 дней в дозе 0,01 мл/кг (экспериментально доказанная терапевтическая доза). Установлено, что исследуемое вещество не оказывает повреждающего влияния на общее состояние животных (масса тела, шерстный и кожный покровы, поведение), гематологические и биохимические показатели крови, электрофизиологическую работу миокарда, функции печени и почек, не способствует изменениям морфоструктуры внутренних органов и головного мозга. В действии СРБ при повторном 90-дневном введении выявлены эффекты половых различий в поведенческой активности (повышение двигательной и эмоциональной активности у самцов и снижение таковых эффектов у самок), электрокардиограмме (повышение частоты сердечных сокращений и амплитуды зубца «R» у самцов и отсутствия изменений у самок), биохимических показателях (увеличение уровня глюкозы у самцов и отсутствия изменений у самок). Данные изменения не выходили за рамки физиологической нормы и полностью нивелировались до состояния контроля в период 30-дневной отмены введения СРБ.

**Ключевые слова:** стандартизированный рассол бишофита (СРБ), токсикологические исследования, фармакологическая безопасность, открытое поле, гематологические исследования, биохимические исследования, функциональные исследования

ORIGINAL RESEARCHES

Original article

doi: <https://doi.org/10.19163/1994-9480-2023-20-4-73-77>

## Studying the pharmacological safety of the standardized cleared bischofit brine

L.I. Bugaeva ✉, A.A. Spasov, S.A. Lebedeva, T.M. Korzhova, A.Yu. Getmanenko

Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia  
Volgograd Medical Research Center, Volgograd, Russia

**Abstract.** In experiments on mature rats, the pharmacological safety of a purified form of a standardized brine of the mineral bischofite (SBB) was assessed with repeated intragastric administration for 90 days at a dose of 0.01 ml/kg (experimentally proven therapeutic dose). It has been established that the test substance does not have a damaging effect on the general condition of animals (body weight, coat and skin, behavior), hematological and biochemical blood parameters, electrophysiological work of the myocardium, liver and kidney function, does not contribute to changes in the morphostructure of internal organs and brain. In the action of SBB with repeated 90-day administration, the effects of gender differences in behavioral activity (increase in motor and emotional activity in males and decrease in such effects in females) were revealed, electrocardiogram (increased heart rate and amplitude of the "R" wave in males and no changes in females), biochemical parameters (increased glucose levels in males and no changes in females). These changes did not go beyond the physiological norm and completely leveled to the state of control during the 30-day withdrawal of SRP administration.

**Keywords:** standardized bischofite brine (SBB), toxicological studies, pharmacological safety, open field, hematological studies, biochemical studies, functional studies

Согласно разработанной в 2000 г. ГБУ ВМНЦ и ВолГМУ программе «Российский магний» волгоградскими химиками-синтетиками получен очищенный от техногенных примесей стандартизированный рассол минерала бишофит [1]. Данный стандартизированный магнийсодержащий рассол бишофита, с успехом применяющийся в клинической практике в качестве бальнеологического средства, явился также основой для создания новых отечественных магнийсодержащих лекарственных препаратов, используемых

для профилактики и лечения гипомagneмий различной этиологии. Доклиническими токсикологическими исследованиями показано наличие у данной формы СРБ при внутрижелудочном введении крысам более низкой, нежели у неочищенной формы, токсичности, отсутствие кумулирующих и аллергенных свойств [2].

В настоящей работе сочли целесообразным исследовать фармакологическую безопасность очищенной формы СРБ при 90-дневном внутрижелудочном введении крысам.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Исследовать доклиническую фармакологическую безопасность стандартизированного раствора минерала бишофит при повторном внутрижелудочном введении крысам в течение 90 дней и 30 дней его отмены.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнено в соответствии с требованиями действующего Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова А.Н. [3], со статьей 11 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (Собрание законодательства Российской Федерации, 2010, № 16, ст. 1815; № 31, ст. 4161) и согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009).

Эксперименты проведены на белых аутобредных крысах самцах и самках 3–3,5-месячного возраста с исходной массой тела 180–225 г, доставленных из Питомника Филиала ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» России «Андреевка», Московской области.

После доставки из специализированного питомника животные в течение 2 недель находились на карантинном режиме с ежедневным ветеринарным осмотром. Содержание животных осуществлялось в соответствии с постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 № 51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», и правил, принятых Европейским парламентом и советом Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях (Директива 2010/63/ЕЕС).

По истечении карантина животных перемещали в экспериментальный отсек, где проводили 7-дневную адаптацию и распределение по группам. Состояние здоровья в период адаптации ежедневно оценивали по внешнему виду и проявлению клинических признаков заболевания путем визуального осмотра в группах. Животных с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы не включали. Распределение по исследуемым группам (контрольная и опытная группы) проводили с учетом массы тела в пределах средних значений  $\pm 20\%$ .

Тестируемый стандартизированный раствор минерала бишофит (СРБ) вводили опытной группе крыс внутрижелудочно ежедневно курсом 90 дней в форме раствора на дистиллированной воде в дозе 0,01 мл/кг (экспериментально доказанная терапевтическая доза). Контрольной группе крыс вводили внутрижелудочно дистиллированную воду в дозе 5 мл/кг.

В период эксперимента исследовали: общее состояние, массу тела, поведенческую активность, электрофизиологическую активность миокарда, периферическую кровь, биохимические показатели плазмы крови, функциональное состояние печени и почек. Также, по окончании 3-месячного курса введения и 1 месяца отмены проводили патоморфологические исследования.

Динамику прироста массы тела оценивали ежедневно. Вес тела отмечали в граммах, прирост – в процентах. По окончании трехмесячного периода введения СРБ и через 1 месяц после его отмены введение исследовали: поведенческую активность в тесте «открытое поле» [4] (учитывали количество пересеченных квадратов, вертикальных стоек, заглядываний в напольные отверстия, акты груминга и дефекаций); периферическую кровь – по количеству эритроцитов ( $1 \times 10^{12}/л$ ), лейкоцитов ( $1 \times 10^9/л$ ), тромбоцитов ( $1 \times 10^9/л$ ) и уровню гемоглобина (г/л), измеряемых на анализаторе гематологическом MicroCC 20Plus (США), скорости оседания эритроцитов (мм/ч), цветовому показателю эритроцитов (у. е.), времени (с) свертывания крови по методу Мас-Магро [5].

В окрашенных по методу Романовского [5] мазках крови подсчитывали лейкоформулу (соотношение форменных элементов в лейкоформуле выражали в %). При биохимическом исследовании плазмы крови крыс [4] определяли уровни глюкозы (ферментативный метод), трансаминаз (метод Райтмана в реакции с 2,4-динитрофенилгидразином), мочевины (диацетилмонооксимный метод), креатинина (цветная реакция с пикриновой кислотой), общего холестерина (ферментативный метод), общего белка (биуретовая реакция), щелочной фосфатазы (метод постоянного времени по цветной реакции с 4-нитрофенолом) с использованием наборов BIO-LA-TEST (Чехия, Erba Lachema s.r.o.). Интенсивность окраски изучаемых показателей измеряли на цифровом спектрофотометре PD-303UV (ApeI, Япония) при длине волны 420–540 нм в кювете толщиной 1 см. Об электрофизиологической активности миокарда судили по электрокардиограмме крыс [4], записанной на трехканальном электрокардиографе ЭКЗТ-02 «АКСИОН» (Ижевск, Россия). Регистрировали изменения интервалов «R-R» (с), «QRS» (с), амплитуду зубца «R» (мВ). По интервалу «R-R» рассчитывали частоту сердечных сокращений (уд./мин). Функциональное состояние печени (ее поглотительно-выделительную и детоксицирующую функцию) оценивали в нагрузочном тесте с красителем бромсульфалеином (SIGMA – ALDRICH, Германия) [6]. Экскреторную функциональную активность почек исследовали в нагрузочном тесте с красителем «феноловый красный» [7]. Патоморфологические исследования проводили по общепринятым методам эвтаназии и некропсии животных [8, 9].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ Microsoft Excel. Значимость различий количественных признаков оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ  
И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

В наблюдениях за общим состоянием животных, получавших ежедневно в течение 90 дней СРБ, существенных различий с контролем не зафиксировано. Состояние и опрятность шерстного покрова, видимых слизистых в исследуемых группах «Опыт» и «Контроль» не различались. Динамика массы тела животных была положительной. При этом относительно группы «Контроль» у крыс самцов опытной группы прослеживалась статистически незначимая тенденция меньшего прироста массы тела (в среднем 5,5 %; *p* > 0,05), тогда как у крыс самок различий с контролем не обнаружено. После отмены введения СРБ, прирост массы тела и у самцов, и у самок в опытной и контрольной группах не различался.

Незначительные половые различия выявлены и при тестировании поведенческой активности крыс. Так, относительно группы «Контроль» у самцов крыс в опытной группе прослеживалось повышение количества вертикальных стоек на 68,8 % (*p* > 0,05)

и заглядываний в напольные отверстия на 16,7 % (*p* > 0,05), при снижении количества актов груминга на 53,6 % (*p* > 0,05) и повышении числа актов дефекаций на 18,9 % (*p* > 0,05). У крыс самок в опытной группе прослеживалось снижение горизонтальной активности на 22,4 % (*p* > 0,05), вертикальных стоек на 66,2 % (*p* < 0,001), эмоциональная активность снижалась несущественно. Выявляемые изменения в поведенческой активности животных, получавших СРБ трехмесячным курсом, были полностью нивелированы до уровня контрольных значений после одного месяца отмены его введения.

Половые различия в действии СРБ также обнаруживались и в исследованиях по оценке электрофизиологической активности сердца (табл. 1).

Так, у самцов в опытной группе прослеживалось наличие статистически достоверного повышения частоты сердечных сокращений на 11,0 % (*p* < 0,01), при укорочении интервала «R-R» на 12,0% (*p* < 0,001) и повышении амплитуды зубца «R» в 2 раза (*p* > 0,05). Данные изменения не выходили за рамки физиологических норм и полностью нивелировались до состояния контроля через один месяц отмены введения самцам препарата СРБ. У самок же в опытной группе по сравнению с контролем существенных различий в исследуемых показателях не выявлялось.

Таблица 1

**Влияние СРБ (внутрижелудочно, 3 месяца) на электрокардиограмму крыс (M ± m)**

Исследуемые параметры	Контрольная группа, дистиллированная вода 5 мл/кг	Опытная группа, СРБ 0,01 мл/кг	Контрольная группа, дистиллированная вода 5 мл/кг	Опытная группа, СРБ 0,01 мл/кг
	самцы		самки	
ЧСС, уд./мин	354,0 ± 3,0	392,70 ± 4,06*	387,30 ± 6,32	393,00 ± 6,66
R, мВ	0,20 ± 0,03	0,40 ± 0,01	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,05
R-R, с	0,170 ± 0,002	0,150 ± 0,002**	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,003
QRS, с	0,030 ± 0,005	0,020 ± 0,004	0,030 ± 0,003	0,30 ± 0,003

\**p* < 0,01; \*\**p* < 0,001 различия достоверны по сравнению с интактным контролем.

В гематологических исследованиях значительных изменений в периферической крови крыс самцов и самок не зафиксировано, как на период окончания 3 месяцев введения препарата СРБ, так и на период его отмены. В биохимических показателях плазмы крови крыс исследуемых групп существенных различий также не обнаружено. Однако у крыс самцов в группе опыт относительно группы контроля выявлялась статистически незначимая тенденция повышения уровня глюкозы на 25,5 % (*p* > 0,05) и снижения уровня щелочной фосфатазы на 31,3 % (*p* > 0,05). Данные изменения полностью нивелировались до контрольных значений после отмены введения СРБ, что свидетельствует об их обратимости и отсутствии повреждающего действия.

При оценке влияния препарата СРБ на поглоительно-выделительную функцию печени по окончании 3 месяцев введения СРБ и после его отмены существенных изменений не обнаружено. При оценке же реабсорбирующей функции почек выявлено, что по сравнению с группой контроля у крыс самцов опытной группы количество выделяемой мочи повышалось на 9,6 % (*p* > 0,05), а количество выделяемого с мочой красителя на 60,0 % (*p* > 0,05). У крыс самок в опытной группе количество выделяемой мочи увеличивалось на 38,5 % (*p* < 0,01), а количество выделяемого с мочой красителя на 84,6 % (*p* < 0,01). В исследованиях, проведенных через один месяц после отмены введения СРБ, прослеживались эффекты реабилитации экскреторной и реабсорбирующей функций почек крыс как у самцов, так и у самок (табл. 2).

Таблица 2

**Влияние СРБ на выделительную функцию почек у крыс (проба с феноловым красным) (M ± m)**

Исследуемые параметры	Контрольная группа, дистиллированная вода 5 мл/кг	Опытная группа, СРБ 0,01 мл/кг	Контрольная группа, дистиллированная вода 5 мл/кг	Опытная группа, СРБ 0,01 мл/кг
	самцы		самки	
<i>3 месяца отмены</i>				
Количество мочи, мл	7,30 ± 0,14	8,0 ± 0,2	3,90 ± 0,28	5,40 ± 0,18*
Количество краски, мг	1,00 ± 0,02	1,60 ± 0,59	1,30 ± 0,05	2,40 ± 0,14*
<i>1 месяц отмены</i>				
Количество мочи, мл	5,50 ± 0,06	6,00 ± 0,35	2,60 ± 0,12	2,90 ± 0,09
Количество краски, мг	2,80 ± 0,04	2,70 ± 0,09	0,60 ± 0,01	0,50 ± 0,13

\**p* < 0,01 различия достоверны по сравнению с интактным контролем.

По результатами патоморфологических исследований, проведенных после эвтаназии и аутопсии животных, существенных изменений при макроскопическом и микроскопическом обследовании внутренних органов у животных не обнаружено. Коэффициенты масс исследуемых органов в опытных группах самок и самцов не различались с группой контроля.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

На основании проведенных исследований по изучению фармакологической безопасности СРБ можно сделать заключение, что при внутрижелудочном трехмесячном повторном введении препарат в дозе 0,01 мл/кг не оказывает повреждающего влияния на интегральные показатели общего состояния крыс, поведенческую активность, электрофизиологическую активность миокарда, периферическую кровь, биохимические показатели плазмы крови, функции печени и почек, на состояние и морфоструктуру внутренних органов. Выявляемые эффекты половых различий в действии СРБ на поведенческую активность (повышение двигательной и эмоциональной активности у самцов и снижение таковых эффектов у самок), электрокардиограмму (повышение ЧСС и амплитуды зубца «R» у самцов и отсутствия изменений у самок), биохимические показатели (увеличение уровня глюкозы у самцов и отсутствия изменений у самок) могут свидетельствовать о наличии тенденции активирующего влияния СРБ в целом на самцов крыс. Вместе с тем данные эффекты не выходили за рамки физиологической нормы и полностью нивелировались до состояния контроля в период отмены введения стандартизированного раствора бишофит, что может свидетельствовать лишь о транзитном действии препарата на отдельные гомеостатические показатели с обратимым действием.

**СПИСОК ИСТОЧНИКОВ**

1. Озеров А.А., Сысуюев Б.Б., Солодунова Г.Н., Мерешкова Н.Ю. Эффективная технология очистки Бишофита

методом адсорбции на магнезия оксиде. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015; 7(1):83-85.

2. Сысуюев Б.Б., Спасов А.А., Мазанова Л.С. Изучение токсичности очищенного раствора минерала бишофит. *Современные проблемы науки и образования*. 2013;1:1-6.

3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под общей редакцией А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.

4. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Под ред. В.Г. Макарова, М.Н. Макаровой. СПб.: Изд-во «ЛЕМА», 2013. 116 с.

5. Кост Е.А. Справочник по клиническим лабораторным методам исследования. М.: Медицина, 1975. 382 с.

6. Израилет Л.И., Соминский В.М., Шибасева Т.М., Слинью В.И. Модификация бромсульфалеиновой пробы для изучения функционального состояния печени у крыс. *Гигиена и санитария*. 1976;3:59-61.

7. Ефременко А.А., Варшавский Б.Я. Модификация пробы с феноловым красным для изучения функционального состояния почек у крыс. *Гигиена и санитария*. 1977;2:82-84.

8. Коптяева К.Е., Мужикян А.А., Гушин Я.А. и др. Методика вскрытия и извлечения органов лабораторных животных (крысы). *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018;2:71-92.

9. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гушин Я.А. Особенности патологоанатомического исследования группы экспериментальных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014;1:75-80.

**REFERENCES**

1. Ozerov A.A., Sysuev B.B., Solodunova G.N., Mereshkova N.Yu. Effective technology of Bischofit purification by adsorption on magnesium oxide. *Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Basic Research*. 2015;7(1):83-85. (In Russ.).

2. Sysuev B.B., Spasov A.A., Mazanova L.S. Study of the toxicity of the purified solution of the mineral bischofite. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*. 2013;1:1–6. (In Russ.).

3. Nonclinical Drug Study Guidelines. Part one. Under the general editorship of A.N. Mironov. Moscow, Grif and K, 2012. 944 p. (In Russ.).

4. Reference book. Physiological, biochemical and biometric indicators of the norm of experimental animals. Ed. V.G. Makarova, M.N. Makarova. St. Petersburg, Publishing House "LEMA", 2013. 116 p. (In Russ.).

5. Coast E.A. Handbook of Clinical Laboratory Methods of Use. Moscow, Medicine, 1975. 382 p. (In Russ.).

6. Izrailet L.I., Sominsky V.M., Shibaeva T.M., Slinko V.I. Modification of a bromosulfalein sample to study the functional

state of the liver in rats. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and sanitation*. 1976;3:59–61. (In Russ.).

7. Efremenko A.A., Varshavsky B.Y. Modification of a phenol red sample to study the functional state of the kidneys in rats. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and sanitation*. 1977;2: 82–84. (In Russ.).

8. Koptyaeva K.E., Muzhikyan A.A., Gushchin Y.A. et al. Procedure for dissection and extraction of organs of laboratory animals (rats). *Laboratornye zhivotnye dlya nauchnykh issledovaniy = Laboratory animals for science*. 2018;2:71–92. (In Russ.).

9. Muzhikyan A.A., Makarova M.N., Gushchin Y.A. Features of pathological and anatomical research of a group of experimental animals. *Mezhdunarodnyi vestnik veterinarii = International bulletin of Veterinary Medicine*. 2014;1:75–80. (In Russ.).

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

#### Информация об авторах

*Любовь Ивановна Бугаева* – доктор биологических наук, заведующая лабораторией токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; [li\\_bugaeva@mail.ru](mailto:li_bugaeva@mail.ru)

*Александр Алексеевич Спасов* – академик, заслуженный деятель науки, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформации, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; [aspasov@mail.ru](mailto:aspasov@mail.ru)

*Светлана Александровна Лебедева* – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория синтеза инновационных лекарственных средств, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; [lebedeva.farm@mail.ru](mailto:lebedeva.farm@mail.ru)

*Татьяна Михайловна Коржова* – младший научный сотрудник лаборатории токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; [bundikoval@mail.ru](mailto:bundikoval@mail.ru)

*Андрей Юрьевич Гетманенко* – научный сотрудник лаборатории токсикологии, Научный центр инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством, Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, Россия; [dustgod@mail.ru](mailto:dustgod@mail.ru)

Статья поступила в редакцию 17.05.2023; одобрена после рецензирования 09.08.2023; принята к публикации 28.11.2023.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

#### Information about the authors

*Lyubov I. Bugaeva* – Doctor of Biological Sciences, Head of the Toxicology Laboratory, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; [li\\_bugaeva@mail.ru](mailto:li_bugaeva@mail.ru)

*Alexander A. Spasov* – Academician, Honored Scientist, Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmacology and Bioinformatics, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; [aspasov@mail.ru](mailto:aspasov@mail.ru)

*Svetlana A. Lebedeva* – Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory for the Synthesis of Innovative Medicines, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; [lebedeva.farm@mail.ru](mailto:lebedeva.farm@mail.ru)

*Tatyana M. Korzhova* – Junior Researcher at the Laboratory of Toxicology, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; [bundikoval@mail.ru](mailto:bundikoval@mail.ru)

*Andrey Yu. Getmanenko* – Researcher at the Laboratory of Toxicology, Scientific Center for Innovative Medicines with Pilot Production, Volgograd State Medical University, Volgograd, Russia; [dustgod@mail.ru](mailto:dustgod@mail.ru)

The article was submitted 17.05.2023; approved after reviewing 09.08.2023; accepted for publication 28.11.2023.