

# EVALUATION OF ANTRAL HEPATOPROTECTOR ACUTE TOXICITY IN ALTERNATIVE TEST-SYSTEMS

Kuzminov B.P., Matysik S.I., Zazuliak T.S., Mykytchak T.I.

## ОЦІНКА ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ГЕПАТОПРОТЕКТОРА АНТРАЛЮ НА АЛЬТЕРНАТИВНИХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

**В**ітчизняний гепатопротектор антраль ефективно використовується для лікування гепатитів різного генезу [1-3], атеросклерозу, ішемічної хвороби серця, порушень згортання крові [4], цукрового діабету [5], обструктивної нефропатії, ускладненої інфекційно-запальним процесом, [6] тощо за їх самостійного перебігу і на тлі хронічної патології печінки [4]. Враховуючи фармакологічні ефекти антраля, можна передбачити його подальше активне впровадження у клінічну практику, що сприятиме збільшенню обсягів його виробництва на вітчизняних підприємствах. Відомо, що дія лікарських препаратів за умов промислового виробництва відрізняється від терапевтичного впливу, оскільки їхні дози, тривалість та шляхи надходження можуть змінюватися. Нині випуск антраля здійснюється за відсутності його гігієнічних нормативів в об'єктах довкілля. Сучасні підходи до оцінки токсичності хімічних речовин передбачають проведення біотестування шляхом застосування

альтернативних тест-систем, у т.ч. з залученням таких гідробіонтів, як *Daphnia magna* Straus [7, 9]. Такі дослідження стандартизовані, зокрема щодо стану культур та середовища для їх культивування, підготовки проб для тестування та проведення гострих і хронічних дослідів у багатьох країнах, у тому числі й в Україні [10].

**Метою** даного дослідження стало вивчення гострої токсичності антраля на *Daphnia magna* Straus.

**Об'єкт і методи дослідження.** Вітчизняний гепатопротектор синтетичного походження антраль – це таблетований препарат, зареєстрований в Україні. Випускається у твердих желатинових капсулах (світло-коричневого кольору – 0,1 г і коричневого – 0,2 г), які містять гранулят світло-жовтого кольору з зеленуватим відтінком. Кожна капсула містить трис- $\{N-(2,3\text{-диметилфеніл})\text{антранілато}\}$ алюміній – 0,1 або 0,2 г. Розчинність у різних розчинниках: помірно розчинний у хлороформі, практично нерозчинний у воді, 96% етиловому спирті, ацетоні і гексані. Нами проведено визначення гострої токсичності антраля на 180 ювенільних гіллястовусих рачках *Daphnia magna* Straus, яких розсаджували в ємності об'ємом 100 мл з середовищами культивування, до яких додавали різні концентрації препарату. Контрольну групу склали 30 особин, які перебували у чистому середовищі без додавання токсиканта. Тривалість експерименту становила 96 годин.

У контрольних й експериментальних ємностях використовували

**КУЗЬМІНОВ Б.П.,  
МАТИСІК С.І.,  
ЗАЗУЛЯК Т.С.,  
МИКИТЧАК Т.І.\***

Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького,  
\*Інститут екології Карпат НАН України

УДК 614.35:615.244.099

**Ключові слова:**  
антраль, токсичність,  
*Daphnia magna*  
Straus.

ОЦЕНКА ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ ГЕПАТОПРОТЕКТОРА АНТРАЛЯ НА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТЕСТ-СИСТЕМАХ

**Кузьминов Б.П., Матисик С.И., Зазуляк Т.С., Мыкытчак Т.И.\***

Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого,  
\* Институт экологии Карпат НАН Украины

**Целью** данного исследования стало изучение острой токсичности антраля на *Daphnia magna* Straus.

**Материалы и методы исследования.**

Определялась острая токсичность антраля в концентрациях 0,05; 0,10; 0,20; 0,50; 1,00 и 2,00 мг/л на 180 ювенильных ветвистоусых рачках *Daphnia magna* Straus. Контрольную группу составляли 30 особей, которые находились в чистой среде культивирования. Продолжительность эксперимента составляла 96 часов. Устанавливали токсичность по гибели не менее 50% испытуемых особей на протяжении 1; 6; 24; 48; 72 и 96 ч. Для вычисления  $LK_{50}$  использовали процент особей, погибших в опыте, относительно контроля. Процент смертности переводили в пробит, а концентрации вещества – в их десятичный логарифм. По этим величинам построили графики, из

которых по антилогарифмам концентрации в пробит со значением 5 определяли летальную концентрацию антраля для каждого периода эксперимента.

**Результаты.** Условия определения острой токсичности антраля на альтернативных тест-системах соблюдены, на что указывает смертность *Daphnia magna* Straus в контроле до 10%, а по экспозиции различными концентрациями препарата – не менее 50%. Установлена зависимость гибели *Daphnia magna* Straus от исследуемых концентраций антраля. Коэффициент корреляции между этими показателями на 24 ч составил 0,88; 48 ч – 0,98; 72 ч – 0,91 и 96 ч – 0,90 ( $p < 0,05$  во всех случаях). Рассчитано по графикам пробитных величин и десятичных логарифмов средние смертельные концентрации антраля (мг/л) для различной продолжительности биотестирования: на 48 ч – 3,7; 72 ч – 7,1; 96 ч – 2,5. Среднее значение  $LK_{50}$  для антраля составляет 4,4 мг/л, а стандартное отклонение – 2,4 мг/л. Доказано, что слаботоксичной (2 класс токсичности) является концентрация антраля 2,0 мг/л.

**Ключевые слова:** антраль, токсичность, *Daphnia magna* Straus.

© Кузьминов Б.П., Матисик С.И., Зазуляк Т.С., Микитчак Т.И.\* СТАТТЯ, 2016.

ли водопровідну воду, відстояну протягом 3-х діб, яку перед початком дослідів аерували. Якість водного середовища відповідає стандартизованим вимогам для проведення біотестування з використанням *D. magna*: насичення киснем перед проведенням експерименту сягало 6,2 мг/л (за вимогами – понад 6 мг/л), після досліду – 2,9 мг/л (за вимогами – понад 2 мг/л); рН – 7,2-7,3 (за вимогами – 6,0-8,5), температура – 19-21°C (за вимогами – 20 ± 2°C) [7, 8, 10].

Перед проведенням біотестування придатність культури *D. magna* визначали за їхньою реакцією на еталонну токсичну речовину – двохромовокислий калій. Середня летальна концентрація (ЛК<sub>50</sub>) у цьому випадку склала 1,1 мг/л, що перебуває у межах експериментально встановленого діапазону реагування тест-об'єкта *D. magna* – 0,9-1,5 мг/л [8]. Розведення і вміст культури відповідали стандартизованим методичним вимогам [9, 10].

Визначали токсичність таких концентрацій антралю: 0,05 мг/л; 0,10 мг/л; 0,20 мг/л; 0,50 мг/л; 1,00 мг/л і 2,00 мг/л. Основним критерієм токсичності була загибель не менше 50% піддослідних особин протягом 1; 6; 24; 48; 72 і 96 годин. Для кожної концентрації проводили по три паралельних досліди на виживання *D. magna*. Для обчислення ЛК<sub>50</sub> використовували відсоток особин, які загинули у досліді відносно контролю. Відсоток смертності переводили у пробіти, а концентрації речовини – в їхній десятиковий логарифм. За цими величинами побудували графіки, з яких за антилогарифмом концентрації до пробіту зі значенням 5 визначали летальну концентрацію антралю для кожного періоду експерименту [8, 10].

**Результати досліджень та їх обговорення.** Протягом 1 і 6 годин експерименту *D. magna* зберегли життєдіяльність за впливу досліджуваних концентрацій антралю (табл. 1).

За 24-годинної експозиції концентрацією 2,00 мг/л загинули 1-2 особини. За 48 год. досліду смертність спостерігалася за концентрацій 1,00 і 2,00 мг/л і становила 1-2 і 2-4 *D. magna* відповідно. Наприкінці біотестування (72 і 96 год.) летальність виявлено за впли-

ву усіх досліджуваних концентрацій препарату. У контрольній групі загибель за трьома паралельними дослідями спостерігалася станом на 72 год. (1 особина) і 96 год. (2 особини).

У кожній дослідній ємності обраховано смертність особин *D. magna* відносно контролю (табл. 2).

Найменша досліджувана концентрація (0,05 мг/л) має слабкий негативний вплив на виживання дафній (смертність – 7-11% за 72 і 96 год.). Смертність в ємностях з концентраціями 0,1-1,0 мг/л становила 25-36% станом на 96 год., проте ці показники перебувають за межами довірчих інтервалів для присвоєння водному розчину навіть найменшого класу токсичності. Статистично достовірною (50% і більше) смертність була лише в ємностях з найбільшою концентрацією (2,0 мг/л). Водночас у контролі смертність сягала 3-7% за цей же період. Експеримент вважається достовірним, якщо смертність у контролі не перевищує 10%, а у досліді становить не менше 50% [8]. Під час цього біотестування цих умов було дотримано.

Різниця між кількістю загинувших особин дафній у паралельних дослідях з однаковими концентраціями антралю незначна. Стандартне відхилення для

цього показника під час 24 год. експерименту становило 0,6 особин, 48 год. – 0,6-1,0 особин, 72 год. – 0-1,2, 96 год. – 0,6-1,5. Це свідчить про те, що вибірки піддослідних дафній реагували майже однаково на дію препарату.

Взаємозв'язок між збільшенням концентрації і смертністю ювенільних особин *D. magna* є тісним і прямопропорційним. Коефіцієнт кореляції між цими показниками для 24 год. становив 0,88; 48 год. – 0,98; 72 год. – 0,91 і 96 год. – 0,90 (p<0,05 в усіх випадках).

За графіками пробітних величин і десятикових логарифмів концентрацій антралю (рис. 1-3) визначено ЛК<sub>50</sub> (мг/л) для різної тривалості біотестування: для 48 год – 3,7; 72 год – 7,1; 96 год – 2,5. Середнє значення ЛК<sub>50</sub> для антралю становить 4,4 мг/л, а стандартне відхилення – 2,4 мг/л.

Загалом дія препарату на тест-об'єкти відбувається поступово, чим довше вона триває, тим вищою є смертність ювенільних дафній. Водночас з тривалістю такої дії знижується летальна доза (рис. 4).

Через незначну смертність у контролі ЛК<sub>50</sub> для 48 год. є меншою, ніж для 72 год.

Під час експерименту дафнії активно плавали й фільтрували

Таблиця 1

#### Кількість живих особин *Daphnia magna* Straus під час біотестування

Концентрація антралю, мг/л	Експозиція (год.)																				
	1			6			24			48			72			96					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
0 (контроль)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	10	10	9	9	10
0,05	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	9	8	8
0,10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	8	8	6	7	7
0,20	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	8	7	8	7	6
0,50	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	7	9	7	6	7	6
1,00	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	8	7	8	6	6	6	7	7	5
2,00	10	10	10	10	10	10	9	9	8	6	8	7	6	7	5	5	5	6	3		

Таблиця 2

#### Смертність особин *Daphnia magna* Straus відносно контролю (%)

Концентрація антралю, мг/л	Експозиція (год.)					
	1	6	24	48	72	96
0,05	0	0	0	0	7	11
0,10	0	0	0	0	21	28
0,20	0	0	0	0	18	25
0,50	0	0	0	0	21	32
1,00	0	0	0	13	28	36
2,00	0	0	13	30	38	50

**EVALUATION OF ANTRAL HEPATOPROTECTOR ACUTE TOXICITY IN ALTERNATIVE TEST-SYSTEMS**  
**Kuzminov B.P., Matysik S.I., Zazuliak T.S., Mykytchak T.I.\***

Lviv Danylo Halytsky National Medical University  
 \*Institute of Ecology of the Carpathians,  
 National Academy of Sciences of Ukraine

**Objective.** We studied the acute toxicity of Antral in *Daphnia magna* Straus.

**Materials and methods.** We determined the acute toxicity of Antral in the concentrations of 0.05; 0.10; 0.20; 0.50; 1.00 and 2.00 mg/l among 180 juvenile *Daphnia magna* Straus. The control group consisted of 30 individuals which were in the pure cultivation medium. The duration of the experiment made up 96 hours. The toxicity was determined by death not less than 50% of the experimental individuals during 1; 6; 24; 48; 72 and 96 hours. For  $LC_{50}$  calculation we used a percentage of the individuals perished in the experiment relative to the control. The percentage of mortality was transferred into probit and a concentration of the substance – into their decimal logarithm. According to these values

we had constructed the graphs from which we determined the lethal concentration of Antral by the antilogarithm of the concentration in probit with the meaning of 5 for each period of the experiment.

**Results.** Conditions for the determination of Antral acute toxicity in the alternative test systems were satisfied, and mortality in *Daphnia magna* Straus to 10% in the control and less than 50% by the exposure of different concentrations of the preparation indicates it. Dependence of the death in *Daphnia magna* Straus from studied Antral concentrations was determined. Coefficient of correlation among these indicators for 24 h made up 0.88; for 48 h – 0.98; for 72 h – 0.91 and for 96 h – 0.90 ( $p < 0.05$  in all cases). Average lethal Antral concentrations (mg/l) for the biotests of different duration: for 48 h – 3.7; for 2 h – 7.1; for 96 h – 2.5 were calculated according to the graphs of probit values. Average meaning of  $LC_{50}$  for Antral makes up 4.4 mg/l, standard deviation – 2.4 mg/l. Antral concentration of 2.0 mg/l (Grade 2 of toxicity) was proved to be a weakly toxic one.

**Keywords:** antral, toxicity, *Daphnia magna* Straus.

водне середовище безпосередньо біля осаду антралю, який у воді не розчинився. Це також підтверджує слабку токсичність препарату, якого піддослідні об'єкти цілеспрямовано не уникали.

За смертністю 50% тест-об'єктів відповідно до тривалості біотестування встановлено, що слабботоксичною (2 клас токсичності) є лише концентрація антралю 2,00 мг/л. Нижчі концентрації цієї речовини не виявляють гострої летальної токсичності.

Потрапляння антралю до природних водойм у концентраціях, менших за 2 мг/л, є безпечним для водної біоти.

#### Висновки

1. Умови визначення гострої токсичності антралю на альтернативних тест-системах дотримані, на що вказує смертність *Daphnia magna* Straus у контролі до 10%, а за експозиції різними концентраціями препарату – не менше 50%.

2. Встановлено залежність загибелі *Daphnia magna* Straus від досліджуваних концентрацій антралю. Коефіцієнт кореляції між цими показниками для 24 год. становив 0,88; 48 год. – 0,98; 72 год. – 0,91; 96 год. – 0,90 ( $p < 0,05$  в усіх випадках).

3. Розраховано за графіками пробітних величин і десяткових логарифмів середні смертельні концентрації антралю (мг/л) для різної тривалості біотестування: для 48 год. – 3,7; 72 год. – 7,1; 96 год. – 2,5. Середнє значення  $LC_{50}$  для антралю ста-

новить 4,4 мг/л, стандартне відхилення – 2,4 мг/л.

4. Доведено, що слабботоксичною (2 клас токсичності) є концентрація антралю 2,0 мг/л.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Фролов В.М. Антраль - ефективний препарат для

лечения заболеваний печени / В.М. Фролов, Г.С. Григорьева // Український медичний часопис. – 2003. – № 2 (34). – С. 65–68.

2. Колесникова Е.В. Неалкогольная жировая болезнь печени и артериальная гипертензия: чего мы достигли в понимании

Рисунок 2

**Графік для розрахунку  $LC_{50}$  за експозиції 48 годин (у цьому і наступних рисунках: п – пробіт)**

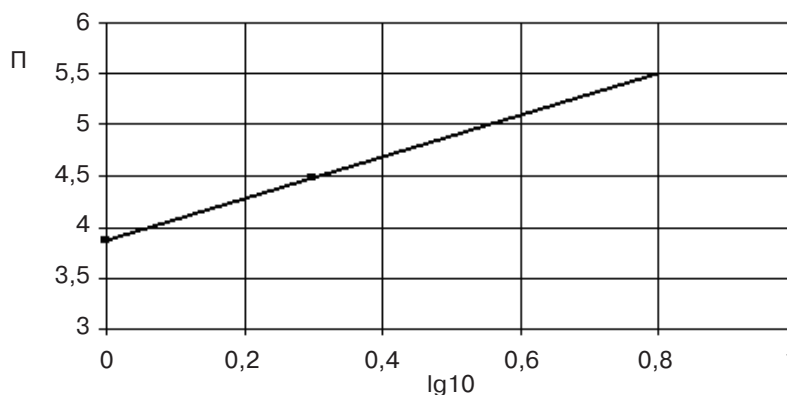
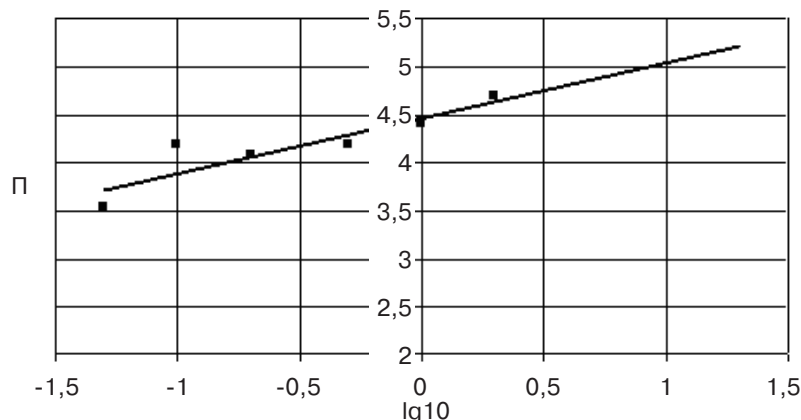


Рисунок 2

**Графік для розрахунку  $LC_{50}$  за експозиції 72 години**



проблеми / Е.В. Колесникова // Український медичний часопис. – 2014. – № 3 (101). – С. 61–66.

3. Бабак О.Я. Опыт применения препарата антраль в составе комплексной терапии неалкогольной жировой болезни печени / О.Я. Бабак, Г.Д. Фадеев, Е.В. Колесникова // Здоров'я України. – Темат. номер: Гастроентерологія. Гепатологія. Колопроктологія. – 2010. – № 1. – С. 26–27.

4. Місце Антралю у комплексному лікуванні хворих з патологією печінки [підгот. О. Татаренко] // Здоров'я України. – Темат. номер: Гастроентерологія. Гепатологія. Колопроктологія. – 2010. – № 3. – С. 50–51.

5. Урбанович А.М. Неалкогольний стеатогепатит у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу: сучасний погляд на проблему [Електронний ресурс] / А.М. Урбанович. – Режим доступу : <http://medstrana.com/articles/140>.

6. Борисов С.О. Ефективність препарату антраль у комплексному лікуванні обструктивної нефропатії та інфекції сечових шляхів / С.О. Борисов, Ф.І. Костев // Сепсис, проблеми діагностики, терапії та профілактики :

наук.-практ. конф. з міжнародною участю: матер. конф. – Харків, 2006. – С. 51–52.

7. Брагинский Л.П. Методологические аспекты токсикологического биотестирования на *Daphnia magna* Str. и других ветвистоусых ракообразных / Л.П. Брагинский // Гидробиологический журнал. – 2000. – Т. 36, № 5.1. – С. 50–71.

8. Коновець І.М. Біотестування токсичності поверхневих вод та донних відкладів за допомогою гіллястовусих ракоподібних *Daphnia magna* Straus та *Ceriodaphnia affinis* Lilljeborg / І.М. Коновець, Л.С. Кіпніс // Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод. – К., 2006. – С. 361–385.

9. Методи гідроекологічних досліджень поверхневих вод ; за ред. В.Д. Романенко. – К. : Логос, 2006. – С. 340–364.

10. U.S. EPA. Short-term methods for estimation the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms ; 2-nd ed. – Report EPA/600/4-89/001/ – 1989.

#### REFERENCES

1. Frolov V.M., Grigorieva H.S. Ukrainskyi medychnyi chasopys. 2003 ; № 2 (34) : 65–68 (in Russian).

2. Kolesnikova E.V. Ukrainskyi medychnyi chasopys. 2014 ; № 3 (101) : 61–66 (in Russian).

3. Babak O.Ya., Fadeenko G.D., Kolesnikova E.V. Zdorovia Ukrainy (Hastroenterolohiia. Hepatolohiia. Koloproktolohiia). 2010 ; 1 : 26–27 (in Russian).

4. Tatarenko O. Zdorovia Ukrainy (Hastroenterolohiia. Hepatolohiia. Koloproktolohiia). 2010 ; 3 : 50–51 (in Ukrainian).

5. Urbanovich A.M. Nealkoholnyi steatohepatyt u patsientiv z tsukrovym diabetom 2-go typu: suchasnyi pohliad na problemu [Nonalcoholic Steatohepatitis in the Patients with Non-Insulin Dependent Diabetes : A Modern Approach to a Problem]. Available at : <http://medstrana.com/articles/140> (in Ukrainian).

6. Borysov S.O., Kostiev F.I. Efektyvnist preparatu Antral v kompleksnomu likuvanni obstruktyvnoi nefropatii ta infektsii sechovykh shliakhiv [Efficiency of the Antral Preparation in a Complex Treatment of the Obstructive Nephropathy and Infections of Urinary Tract]. In : Sepsys, problemy diahnozyky, terapii ta profilaktyky: nauk.-prakt. konf. z mizhnarodnoiu uchastiu: mater. konf. [Sepsis, Problems in Diagnostics, Therapy, and Prophylaxis : Sci.-Pract. Conf.: Conf. Mater.]. Kharkiv ; 2006 : 51–52 (in Ukrainian).

7. Braginskii L.P. Gidrobiologicheskii zhurnal. 2000 ; 36 (5.1) : 50–71 (in Russian).

8. Konovets I.M., Kipnis L.S. Biotestuvannya toksychnosti poverkhnivykh vod ta donnykh vidkladiv za dopomohoiu hillyastovusykh rakopodibnykh *Daphnia magna* Straus ta *Ceriodaphnia affinis* Lillieborg [Biotesting of the Toxicity of Surface Water and Bottom Sediments with the Help of *Daphnia Magna* Straus and *Ceriodaphnia Affinis* Lilljeborg]. In : Metody hidroekolohichnykh doslidzhen poverkhnivykh vod [Methods for Hydroecological Research of the Surface Water]. Kyiv : Logos ; 2006 : 361–385 (in Ukrainian).

9. Romanenko V.D. (ed.) Metody hidroekolohichnykh doslidzhen poverkhnivykh vod [Methods for Hydroecological Research of the Surface Water]. Kyiv : Logos ; 2006 : 340–364 (in Ukrainian).

10. U.S. EPA. Short-term Methods for Estimation the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. 2-nd ed. – Report EPA/600/4-89/001/ – 1989.

Надійшла до редакції 20.01.2016

Рисунок 3

Графік для розрахунку ЛК<sub>50</sub> за експозиції 96 годин

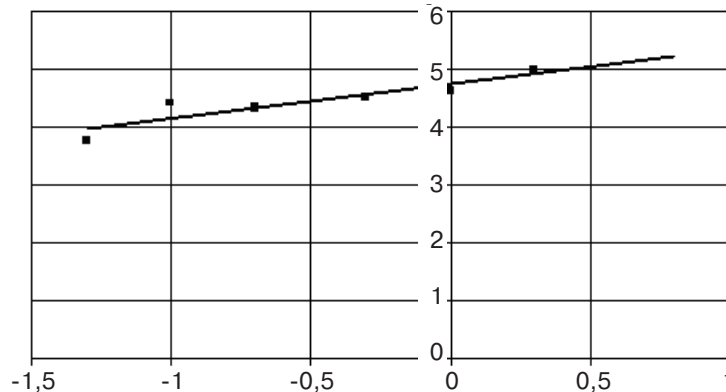


Рисунок 4

Залежність ЛК<sub>50</sub> від часу дії різних концентрацій антралю

