

**ОТЧЕТ ЗА**  
**Експериментално изследване**  
**на хранителна добавка “МАОЛО”**  
**върху мъжки и женски бели мишки след**  
**перорално прилагане и ин витро изследване за**  
**цитотоксичност**

по договор от 03.07.2009 между Агенция по качество и  
безопасност на стоките – СМИЛО ЕООД и Фармацевтичен факултет  
на МУ- София

**ПРОИЗВОДИТЕЛ: СМИЛО ЕООД, София, България**

**ДАТА : 20.07.2009**

## СЪДЪРЖАНИЕ

1. Въведение.....	4
2. Материали и методи .....	4
2.1. Материали и методи .....	4
2.1.1. Хранителна добавка .....	4
2.2. Изследване за остра токсичност .....	5
2.2.1. Лабораторни животни .....	5
2.2.2. Наблюдавани параметри .....	6
2.2.3. Статистика .....	6
2.3. Изследване за цитотоксичност .....	7
2.3.1. Клетъчни култури.....	7
2.3.2. МТТ-тест .....	7
2.3.3. Статистика .....	7
3. Резултати.....	8
3.1. Остра токсичност .....	8
3.1.1. Смъртност на животните.....	8
3.1.2. Признаци на интоксикация .....	8
3.2. Изследване за цитотоксичност .....	9
4. Изводи.....	10
5. Литература .....	11

## **ТЕМА**

**Експериментално изследване на хранителна добавка “МАОЛО” върху мъжки и женски бели мишки след перорално прилагане и ин витро изследване за цитотоксичност**

## **СПОНСОР**

“Агенция по качеството и безопасност на стоките – СМИЛО” ЕООД, гр. София, ж.к. “Яворов” бл. 23, вх. 1 ап. 3., представлявано от д-р Атанас Смилов Смилов

## **ИЗСЛЕДОВАТЕЛИ**

Доц. доктор Н. Данчев, ДМ

Гл.ас. доктор Георги Момеков, ДФ

Гл.ас. доктор И. Николова, ДМ

М. Йорданова - лаборант

М. Томова – техн. сътрудник

## **ИЗСЛЕДОВАТЕЛСКИ ЦЕНТЪР**

Катедра “Фармакология, фармакотерапия и Токсикология”

Фармацевтичен Факултет

София, България

Ул. Дунав 2

1000 София, България

Тел:+3592-9236582

e-mail: nikolai.danchev@gmail.com

# 1. Въведение

От фирмата “СМИЛО” ЕООД беше предоставена следната хранителна добавка в твърди желатинови капсули за изследване на остра токсичност след перорално прилагане на мъжки и женски бели мишки и ин витро изследване за цитотоксичност:

## 2. Материали и методи

### 2.1. Материали и методи

#### 2.1.1. Хранителна добавка МАОЛО®:

Състав – растителни екстракти от:

<i>Hibisci sabdariffae flos.</i>	40 mg
<i>Pinus sibirica DuTour</i>	25 mg
<i>Curcumaе longae/xnthorrhizae rhizoma</i>	18 mg
<i>Origanum majorana</i>	15 mg
<i>Elettaria cardamomum</i>	12 mg
<i>Crocus sativus</i>	10 mg
<i>Artemisia dracunculus</i>	10 mg
<i>Coriandrum sativum</i>	
<i>Levisticum officinale</i>	
<i>Petroselinum crispum/neapolitanum</i>	
<i>Hyssopus officinalis</i>	
<i>Lichen islandicus</i>	< 4 mg

Помощни вещества: сорбитол, лактоза, силициев диоксид.

## 2.2. Изследване за остра токсичност

### 2.2.1. Лабораторни животни

За определяне на острата токсичност на продуктите бяха използвани 36 бели мишки линия Н – (18 мъжки и 18 женски) с тегло 18–20 g, получени от развъдника на БАН в Сливница, България. Мишките бяха разделени на 4 групи по 9 животни във всяка.

До началото на експеримента, животните бяха държани в продължение на една седмица във вивариума на Фармацевтичен Факултет, регистриран като животновъден обект, за да се аклиматизират, като беше поддържан режим на отглеждане и хранене както в развъдника. Всички използвани в експеримента животни бяха здрави и без каквито и да било физиологични отклонения.

Вид	мишки
Порода	Линия Н
Възраст (до експеримента)	8-10 седмици
Телесна маса	18-20 g
Пол	мъжки и женски
Брой животни	18
Храна	стандартна, сертифицирана
Пиене	вода, автопоилки
Температура на въздуха	20 – 24°C
Влажност	30-70%
Осветление	до 325 лукса на разстояние 1 м от пода; 12 часов режим на светлина/тъмно
Шум	до 85 дБ
Път на въвеждане на изследваните вещества	перорален
Продължителност на въвеждането	еднократно
Продължителност на наблюдението на всяко животно	14 дни
Вид на разтворите	водни разтвори
Статистически метод на обработка на данните	ISO 10993 – 11 и Eur. Ph. – 4 ed.

За определяне на средната летална доза (LD50), изследвания продукт беше разтворен в изотоничен (0.9%) разтвор на натриев хлорид и въведени перорално, еднократно в обем 0.2 мл/10 г телесна маса. През първият ден след въвеждането всяко животно бе

наблюдавано непрекъснато за общо състояние, промяна в поведението, интензивност и характер на двигателната активност, наличие и характер на гърчове, координация на движенията, тонус на скелетната мускулатура, реакция към тактилни, звукови и светлинни дразнителни, честота и дълбочина на дишането, състояние на кожата и космената покривка, положение на опашката, количество и консистенция на фекалиите, честота и цвят на урината. Всяко животно бе наблюдавано в продължение на 14 дни. Всички животни (умрели и останали живи след 14ия ден) се подлагат на патологоанатомично изследване.

Изследването за остра токсичност и обработката на получените данни е по метода ISO 10993 – 11 и Eur. Ph. – 4 ed.. Този метод е одобрен от ЕМЕА, отговаря на изискванията на Евросъюза и при него се използват малко на брой животни с оглед спазване на етичните и екологичните изисквания. .

При провеждането на експеримента, екипът се ръководеше от хуманно отношение към животните в съответствие с международните препоръки, както и в съответствие с препоръките на Етичния Комитет към МУ, София, България за използване и работа с лабораторни животни.

### **2.2.2. Наблюдавани параметри**

**Гибел на животните:** леталитета се отчиташе ежедневно.

**Признаци на интоксикация:** през първият ден животното се наблюдава постоянно за първични признаци на интоксикация; в следващите дни животните се наблюдават ежедневно за признаци на интоксикация.

### **2.2.3. Статистика**

Обработката на получените данни за остра токсичност е по метода ISO 10993 – 11 и Eur. Ph. – 4 ed..

## **2.3. Изследване за цитотоксичност**

### **2.3.1. Клетъчни култури**

Човешката клетъчна линия HT-29 е закупена от Немския център за онкологични изследвания (DKFZ, Хайделберг, Германия). Клетките са култивирани в стерилни култивационни матрчета при стандартни условия (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в хранителна среда RPMI-1640 обогатена с L-глутамин и 10% фетален телешки серум. За поддържане на клетъчните култури в експоненциална фаза на растеж, 20% от клетъчната суспензия се отнема и се добавя 30% пълноценна среда, след отлепване от дъното на матрчето, последством обработка с трипсин (5-7 min при 37°C) 2-3 пъти седмично.

### **2.3.2. МТТ-тест**

МТТ-тестът се базира на редуцията на жълтото тетразолово багрило (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиевиъ бромид (МТТ) под действие сукцинатдехидрогеназите на функционално-интактните митохондрии на виталните клетки. Сукцинатдехидрогеназите катализират редуцията на до синьо-виолетови формазапови кристали. Процедурата бе проведена по класическия метод на Mosmann (1983), с някои модификации (Konstantinov et al, 1999). Клетките бяха поставени в 96-ямкови микроплаки при гъстота  $1 \times 10^4$  клетки/ямка и оставени да се адаптират в продължение на 24 ч преди добавянето на тестваното съединение. Разтворите на тествания продукт бяха приготвени непосредствено преди третирането (в DMSO) и подложени на серийно разреждане с хранителна среда RPM1640. 72 ч след третирането бе добавен разтвор на МТТ (в PBS) така, че крайната концентрация на реагента в хранителната среда бе 0.5 mg/ml. След 4 ч получените формазапови кристали бяха разтворени посредством добавяне на 5% НСНО в изопропанол. Абсорбцията бе измерена с помощта на вертикален спектрофотометър за отчитане на микроплаки (Labexim LMR-1) при 580 nm.

### **2.3.3. Статистика**

Есприменталните данни са представени като средна аритметична стойност  $\pm$  стандартно отклонение (SD). Статистическата значимост е оценена с помощта на t-test, при  $P \leq 0,05$  възприето за ниво на достоверност.

## 3. Резултати

### 3.1. Остра токсичност

#### 3.1.1. Смъртност на животните

Получените данни представени на таблица 1, не позволяват да се определи стойността на средната летална доза - LD50 при еднократно перорално приложение на мъжки и женски животни, т.к. дори в най-високата доза от 10 g/kg т.м. не се наблюдава леталитет на мишките:

#### МАОЛО

Доза mg/kg	Път на въвеждане - перорален	
	Мъжки мишки (умрели/живи)	Женски мишки (умрели/живи)
5000	0/9	0/9
10000	0/9	0/9

#### 3.1.2. Признаци на интоксикация

Не са наблюдавани признаци на интоксикация през първите 24 часа, освен известно потискане на мускулния тонус, който се проявява между 2ия и 4ия час след инжектирането. По-нататъшна промяна в мускулния тонус не е наблюдавана. Не са наблюдавани промени в размера на зениците, положението на опашката, координацията на движенията, поведението, лакримация и саливация. Пероралното въвеждане на разтворите не променя честотата и дълбочината на дишането, не променя честотата и консистенцията на фекалиите, както и не се променя количеството, цвета и прозрачността на урината.

При патологоанатомичните изследвания не са установени макроскопски изменения на вътрешните органи.



### 3.2. Изследване за цитотоксичност

Цитотоксичността на МАОЛО е проучена върху човешката клетъчна линия (НТ-29), която е валидирана моделна система, репрезентативна за клетките от чревния епител - клетъчна популация, която нормално е изложена на високи концентрации ксенобиотици при перорален прием. Резултатите от проведеното проучване за антипролиферативна и цитотоксична активност на МАОЛО са представени на таблица 2.

**ТАБЛИЦА 1. Проучване на цитотоксичната активност на МАОЛО върху НТ-29 клетки.**

Концентрация (mg/ml)	% Витални клетки
0	100,0 ± 5,6
0,0125	101,2 ± 4,4
0,025	102,1 ± 2,5
0,05	100,5 ± 1,7
0,1	99,3 ± 4,1
0,2	97,8 ± 4,7

Както се вижда от представените данни, в условията на избраната експериментална система (72 ч непрекъсната експозиция, концентрация на тестваните продукти от 0,125 до 0,200 mg/ml) изследваният продукт МАОЛО<sup>®</sup> не повлиява жизнеността и пролиферативната активност на проучваната клетъчна линия. Дори при най-високата изследвана концентрация (съответстваща на 0,103 mg/ml активни субстанции) не се наблюдава статистически значимо намаляване на виталността на клетките, в сравнение с нетретираната контрола.

## 4. Изводи

Хранителната добавка МАОЛО беше изследвана за остра токсичност при мишки и ин витро за цитотоксичност при модел на чревен епител.

Съгласно ISO 10993-11, LD<sub>50</sub> стойността представлява количеството материал даван еднократно, който предизвиква гибел на 50% от третираните с тестваното вещество животни. Тази стойност позволява да се определи краткосрочния токсикологичен потенциал (остра токсичност) на изследваните субстанции, при определен път на въвеждане в случая перорално, който е бъдещия път на прилагане на добавките при хора. При определяне на острата перорална токсичност беше установено, че LD<sub>50</sub> на МАОЛО е > 10 000 mg/kg т. м. По класификацията на Hodge и Sterner тази стойност се отнася към клас V, т.е. към групата на практически нетоксичните вещества, след перорално прилагане на бели мъжки и женски мишки.

Получените резултати за цитотоксичност дават основание да се направи заключение, че хранителна добавка МАОЛО® е нетоксичен продукт по отношение на човешка клетъчна линия - модел на чревен епител *ин витро* дори при прилагане във супрафизиологични концентрации.

В заключение, предоставеният от “Агенция качеството и безопасност на стоките – СМИЛО” ЕООД продукт - хранителна добавка МАОЛО е практически нетоксична при перорално приложение върху мъжки и женски бели мишки и не проявява цитотоксичност при ин витро модел на чревен епител (клетъчна линия НТ-29).

20.07.2009

Подпис:

Доц. доктор Н. Данчев, ДМ, Зав. Катедра “Фармакология,  
Фармакотерапия и Токсикология, Фармацевтичен култет, София

Гл. ас. доктор Герги Момеков

Гл.ас. доктор И. Николова, ДМ

Медицински лаборант М. Йорданова

## 5. Литература

Hodge HC, Sterner JH. Tabulation of toxicity classes. *Am. Ind. Hyg.* (1949) 10:93 –96.

ISO. 2006. Biological Evaluation of Medical Devices - Part 11: Tests for Systemic Toxicity (First edition 1993-12-15). ISO 10993-11. Geneva: International Organization for Standardization (ISO)

Eur. Ph. – 4 ed.. Testing for acute systemic toxicity. Strasbourg, France: Council of Europe - European Directorate for the Quality of Medicines, 1999.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 1983; 65 (1-2): 55–63.

Konstantinov S.M., Eibl H., Berger M.R. BCR-ABL influences the antileukemic efficacy of alkylphosphocholines. *Br. J. Haematol* 1999; 107 (2): 365-374.