УДК 582.948.25:577.118 DOI: 10.31549/2542-1174-2025-9-1-87-97

Определение микроэлементов-поллютантов и токсичности извлечений из различных органов медуницы мягкой

Д.С. Круглов, В.В. Величко, К.И. Ершов

ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия

АННОТАЦИЯ

В в е д е н и е . Медуница мягкая *(Pulmonaria mollis)* – многолетнее корневищное гемикриптофитное растение, мезофитный эфемероид, имеющий дициклическое развитие. В связи с этим выделяют три вида сырья: корневища и корни – *Pulmonariae rhizomata et radices*, траву (генеративный побег) – *Pulmonariae herba* и листья (вегетативные) – *Pulmonariae folia*. Фитопрепараты, полученные из них, имеют различное действие, позволяющее рассматривать их как перспективное сырье для использования в фитотерапии. Однако растение может содержать не только элементы-токсиканты, но и гепатотоксичные пирролизидиновые алкалоиды.

Ц е л ь . Определение острой токсичности извлечений из разных органов медуницы мягкой на лабораторных животных *in vivo*.

М а т е р и а л ы и м е т о д ы . В качестве объектов исследования были использованы органы медуницы мягкой, произрастающей в сосновом бору в Колыванском районе Новосибирской области. Содержание микроэлементов-токсикантов (As, Cd, Pb, Hg, Be, Sr, Sb, Tl и U) в сырье определяли методом масс-спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Изучение острой токсичности проводили на 60 половозрелых белых неинбредных мышах стока CD-1 и 20 крысах Вистар.

Р е з у л ь т а т ы . Содержание микроэлементов-токсикантов в сырье оказалось ниже допустимых норм. Максимально возможные дозировки сухих экстрактов генеративных побегов, вегетативных листьев и корней, введенных мышам и крысам внутрижелудочно, не оказывали токсического действия на организм животных при наблюдении за ними в течение 14 дней.

В ы в о д ы . В различных морфологических видах лекарственного растительного сырья *Pulmonaria mollis* алкалоиды присутствуют в следовых количествах, а содержание элементов-токсикантов не выходит за пределы норм. Отсутствие токсичности у суммарного извлечения из генеративных побегов в сочетании с ранее установленной антианемической активностью позволяет рассматривать сырье *Pulmonariae herba* в качестве перспективного источника для создания фитопрепаратов для терапии анемических состояний.

Ключевые слова: *Pulmonaria mollis,* пирролизидиновые алкалоиды, микроэлементы-токсиканты, токсичность.

Образец цитирования: Круглов Д.С., Величко В.В., Ершов К.И. Определение микроэлементов-поллютантов и токсичности извлечений из различных органов медуницы мягкой // Journal of Siberian Medical Sciences. 2025;9(1):87-97. DOI: 10.31549/2542-1174-2025-9-1-87-97

Determination of toxic trace elements and toxicity of extracts from different organs of *Pulmonaria mollis*

D.S. Kruglov, V.V. Velichko, K.I. Ershov

Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia

ABSTRACT

I n t r o d u c t i o n . *Pulmonaria mollis* is a perennial rhizomatous hemicryptophytic plant, a mesophytic ephemeroid with a dicyclic development. In this regard, three types of raw materials are distinguished: rhizomes and roots – *Pul-*

Поступила в редакцию 01.02.2024
Прошла рецензирование 05.03.2024
Принята к публикации 12.03.2024

Автор, ответственный за переписку
Величко Виктория Владимировна: ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России. 630091, г. Новосибирск, Красный просп., 52.
E-mail: velichkvik@rambler.ru

Received 01.02.2024
Revised 05.03.2024
Accepted 12.03.2024

Corresponding author
Victoria V. Velichko: Novosibirsk State Medical University, 52, Krasny prosp., Novosibirsk, 630091, Russia.
E-mail: velichkvik@rambler.ru

monariae rhizomata et radices, grass (reproductive shoot) – *Pulmonariae herba*, and leaves (vegetative) – *Pulmonariae folia*. Phytopreparations from different organs of *Pulmonaria mollis* have different effects, allowing to consider them as promising raw materials for use in phytotherapy. However, the plant may contain not only toxic elements, but also hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids.

A i m . Determination of acute toxicity of extracts from different organs of *Pulmonaria mollis* in laboratory animals *in vivo*.

M a t e r i a l s a n d m e t h o d s . The organs of *Pulmonaria mollis*, which grows in a pine forest in the Kolyvansky district of the Novosibirsk region, were used as objects of research. The content of toxic trace elements (As, Cd, Pb, Hg, Be, Sr, Sb, Tl, and U) in the raw materials was determined by inductively coupled plasma mass spectroscopy. Acute toxicity was studied on 60 mature outbred albino mice (CD-1) and 20 Wistar rats.

R e s u l t s . The content of trace toxic elements in the raw materials turned out to be below acceptable standards. The maximal dosages of dry extracts of reproductive shoots, vegetative leaves and roots administered intragastrically to mice and rats did not have toxic effect on the animals during a 14-day follow-up.

C o n c l u s i o n . In different morphological types of medicinal raw materials of *Pulmonaria mollis*, alkaloids are present in trace amounts, and the content of trace toxic elements does not exceed the reference range. The absence of toxicity in the total extract from reproductive shoots, combined with the previously revealed anti-anemic activity, makes it possible to consider *Pulmonariae herba* raw materials as a promising source for development of preparations for the phytotherapy of anemic conditions.

Keywords: *Pulmonaria mollis,* pyrrolizidine alkaloids, toxic trace elements, toxicity.

Citation example: Kruglov D.S., Velichko V.V., Ershov K.I. Determination of toxic trace elements and toxicity of extracts from different organs of *Pulmonaria mollis*. *Journal of Siberian Medical Sciences*. 2025;9(1):87-97. DOI: 10.31549/2542-1174-2025-9-1-87-97

ВВЕДЕНИЕ

Медуница мягкая (*Pulmonaria (P.) mollis* Wulf. ex Hornem.) – многолетнее корневищное гемикриптофитное растение, мезофитный эфемероид, имеющий дициклическое развитие [1]. В первый год внепочечного развития побег образует ползучее корневище с темно-зелеными крупными листьями, которые сохраняются до глубокой осени. Летом рост корневища прекращается, формируется почка возобновления и к осени образуется зачаточный, но полностью структурированный генеративный побег будущего года. Эти генеративные побеги медуницы, имеющие к началу зимнего покоя стебель с листьями и цветочными почками, трогаются в рост весной до схода снега, проходят короткие по времени стадии цветения и плодоношения и отмирают. После их отмирания трогаются в рост и развертывают листья – побеги следующего поколения – вегетативные. Таким образом, каждый побег в первый год своего развития обеспечивает длительную вегетацию, а во второй – рано образует цветки и отмирает, что позволяет сделать вывод о том, что эфемероидным ритмом у растения обладают лишь генеративные побеги. В этой связи для медуницы можно выделить три органа и, соответственно, три морфологических вида лекарственного растительного сырья: под-

INTRODUCTION

Pulmonaria (P.) mollis Wulf. ex Hornem. is a perennial rhizomatous hemicryptophytic plant, a mesophytic ephemeroid with a dicyclic development [1]. In the first year of the out-of-bud development, a shoot forms a creeping rhizome with large dark green leaves that remain until late autumn. In summer, the growth of the rhizome stops, a renewal bud is formed, and by autumn, a generative but fully structured reproductive shoot of the next year appears. These reproductive shoots of *P. mollis*, which have a stem with leaves and flower buds at the beginning of winter dormancy, begin to grow in spring before the snow melting, go through short phases of flowering and fruiting and die off. After their dying-off, the shoots of the next generation, vegetative, start to grow and put forth leaves. Thus, each shoot provides long vegetation in the first year of its development, and in the second, it forms flowers early and dies off, which leads to the conclusion that in this plant, only the reproductive shoots have are an ephemeroid rhythm. In this regard, three organs can be distinguished for *Pulmonaria* and, accordingly, three morphological types of medicinal raw materials: underground rhizomes and roots (*Pulmonariae rhizomata et radices*), grass (reproductive shoot) – *Pulmonariae herba*, and leaves (vegetative) – *Pulmonariae folia*.

земные корневища и корни (*Pulmonariae rhizomata et radices*), траву (генеративный побег) – *Pulmonariae herba* и листья (вегетативные) – *Pulmonariae folia*.

Следует заметить, что хотя медуница и является неморальным реликтом третичного периода, она имеет широкий ареал распространения от Урала до Читинской области России и обладает ресурсами производственных масштабов [2].

Фармакологические свойства фитопрепаратов медуницы различны в зависимости от используемого вида сырья. В частности, извлечения из подземных органов обладают контрацептивными свойствами [3], извлечения из надземных органов – антиоксидантными, антианемическими, дозозависимыми фибринолитическими и гемостатическими, а также диуретическими и желчегонными свойствами, что связано с наличием в их составе фенолокислот, кумаринов, оксикоричных кислот, флавоноидов и полисахаридов [4]. Важно отметить, что все эти исследования проводились или на объектах, представляющих собой неразделенную смесь цветоносных побегов и вегетативных листьев [5], или только на розеточных листьях [6]. В ходе проведенных нами исследований была показана разница как в химическом составе двух видов надземного сырья [7], так и в их специфической активности – в частности, было установлено наличие антианемического действия у извлечений из травы медуницы и отсутствие такового у извлечений из листьев [8], что, вероятнее всего, связано с различным микроэлементным статусом этих двух видов сырья медуницы [9].

Вместе с тем наличие в растениях семейства *Boraginaceae* пирролизидиновых алкалоидов, являющихся практически маркером данного семейства [10], ставит вопрос о токсичности фитопрепаратов из медуницы в связи с известной гепатотоксичностью этого класса алкалоидов. Кроме того, антианемическое действие фитопрепаратов медуницы связано с микроэлементами кроветворного комплекса, которых должно быть в растении вполне определенное количество. Однако при этом важно и содержание элементов-токсикантов, поскольку именно соотношением этих групп микроэлементов и будет определяться интервал между терапевтической и токсической дозами фитопрепарата. На настоящий момент Фармакопея XV издания нормирует содержание в лекарственном растительном сырье только таких элементов-токсикантов, как свинец, кадмий, мышьяк и ртуть. Вместе с

It should be noted that although *Pulmonaria* is a nemoral relict of the Tertiary period, it has a wide distribution range in Russia – from the Urals to the Chita region, and has production-scale resources [2].

Pharmacological properties of *Pulmonaria* phytopreparations are different depending on the type of raw material used. In particular, extracts from underground organs have contraceptive properties [3], extracts from aboveground organs have antioxidant, anti-anemic, dose-dependent fibrinolytic and hemostatic, as well as diuretic and choleretic properties, due to the presence of phenolic acids, coumarins, hydroxycinnamic acids, flavonoids and polysaccharides [4]. It is important to note that all these studies were conducted either on objects representing an undivided mixture of flowering shoots and vegetative leaves [5], or only on rosette leaves [6]. Our studies showed the difference both in the chemical composition of the two types of aboveground raw materials [7], and in their specific activity, in particular, the presence of anti-anemic effect in extracts from *Pulmonaria* herb and the absence of it in extracts from leaves [8], which is most likely due to the different trace element composition of these two types of *Pulmonaria* raw materials [9].

At the same time, the presence of pyrrolizidine alkaloids in plants of the *Boraginaceae* family, which are virtually a marker of this family [10], raises the question of the toxicity of phytopreparations from *Pulmonaria* due to the hepatotoxicity of this class of alkaloids. In addition, the anti-anemic effect of *Pulmonaria* phytopreparations is associated with microelements involved in hematopoiesis, of which there should be a well-defined amount in the plant. However, the content of toxic trace elements is also important, since it is the ratio of these groups of trace elements that will determine the range between therapeutic and toxic doses of a phytopreparation. At the moment, the Pharmacopoeia XV regulates the content of medicinal plant raw materials only of such toxic elements as lead, cadmium, arsenic and mercury. At the same time, the UNESCO Institute for Microelements lists Be, Sr, Sb, Tl and U as toxic elements, which have genotoxic, teratogenic, neurotoxic and carcinogenic effects, as well as delay in bone formation (strontium) [11].

AIM OF THE RESEARCH

Determination of the toxic element content and acute toxicity of extracts from different organs of *P. mollis* in laboratory animals *in vivo*.

MATERIALS AND METHODS

The organs of *P. mollis* growing in a pine forest in the Kolyvansky district of the Novosibirsk region

тем Институт микроэлементов ЮНЕСКО относит к токсичным элементам также Be, Sr, Sb, Tl и U, которые имеют генотоксическое, тератогенное, нейротоксическое и канцерогенное действие, а также задерживают формирование костей (стронций) [11].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение содержания токсических элементов и острой токсичности извлечений из разных органов растений медуницы мягкой на лабораторных животных *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объектов исследования были использованы органы медуницы мягкой, произрастающей в сосновом бору в Колыванском районе Новосибирской области (8 км на северо-запад от пос. Катковский, 55°12′ с.ш. и 82°42′ в.д.).

Генеративные побеги собирали в фазу цветения, листья – в фазу полного развития листовой пластинки, корневища с корнями – в фазу завершения вегетации. Надземные части срезали на высоте 5–7 см от уровня земли, очищали от примесей и доводили до воздушно-сухого состояния в естественных условиях. Подземные органы после извлечения промывали в течение 10–20 с в проточной холодной воде, затем отделяли остатки надземных частей выше корневой шейки и подвяливали на воздухе в течение суток, после чего разрезали на куски до 20 мм длиной (толстые корни и корневища дополнительно разрезали вдоль), затем сырье доводили до воздушно-сухого состояния.

Содержание микроэлементов в сырье определяли методом масс-спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой. Для контроля правильности определения использовали метод добавок [12]. Все измерения проводили на 12 пробах, и в дальнейшем была проведена статистическая обработка результатов с определением основных параметров выборки – среднее значение $\overline{x}$, стандартное отклонение среднего по выборке σ и доверительный интервал Δ по формулам [13]

$$\overline{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i;\ \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{x} - x_i)^2}{n-1}};\ \Delta = t \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

где t = 2,2 – критерий Стьюдента при числе степеней свободы $f = n - 1 = 11$.

Для проведения качественного анализа состава алкалоидов в сырье были получены суммарные извлечения из сырья с использованием в качестве экстрагента 2% водного раствора кис-

(8 km northwest of the Katkovsky settlement, 55°12′ N and 82°42′ E) were used as study objects.

Reproductive shoots were harvested in the flowering phase, leaves – in the phase of full development of the lamina, rhizomes with roots – in the phase of completion of vegetation. The aboveground parts were cut off at a height of 5–7 cm from ground level, cleaned of impurities and brought to an air-dry state in natural conditions. After extraction, the underground organs were washed for 10–20 s in running cold water, then the remains of the aboveground parts above the root neck were separated and dried in air for a day, after which they were cut into pieces up to 20 mm long (thick roots and rhizomes were additionally cut lengthwise), then the raw materials were brought to an air-dry state.

The content of trace elements in the raw materials was determined by inductively coupled plasma mass spectroscopy. The spike-recovery test was used to control the correctness of the determination [12]. All measurements were performed on 12 samples, and further statistical processing of the results was carried out with determination of the main parameters of the sample – the mean value $\overline{x}$, standard deviation of the mean σ, and confidence interval Δ according to the formulas [13]

$$\overline{x} = \frac{1}{n} \cdot \sum_{i=1}^{n} x_i;\ \sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} (\overline{x} - x_i)^2}{n-1}};\ \Delta = t \cdot \frac{\sigma}{\sqrt{n}},$$

where t = 2,2 in Student's test for the number of degrees of freedom $f = n - 1 = 11$.

For a qualitative analysis of the alkaloid composition in the raw materials, total extracts from the raw materials were obtained using 2% aqueous solution of hydrochloric acid as an extractant. The presence of alkaloids was determined by conducting a series of extraction reactions from the the raw materials with sedimentation reagents: Wagner-Bouchard, Dragendorff, Meyer, Marquis, Scheibler, Bertrand, Sonnenschein, tannin solution and picric acid solution [14].

The objects of the study in determining acute toxicity were samples of dry extract from three types of the raw materials. To obtain a dry extract, the raw materials were crushed and placed in a flask, filled with 20% ethyl alcohol at a ratio of 1:30. The flask was heated under reflux for 30 min on a boiling water bath, cooled with continuous stirring for 60 min. After cooling, the extract was centrifuged at 8000 rpm for 15 min to remove fine impurities. The supernatant was drained and the extractant was removed by convective extraction drying at a temperature of 30–40°C.

Acute toxicity was studied on 60 mature non-inbred albino mice (CD-1) of both sexes with a body weight of 28–35 g and 20 Wistar rats weighing 260–

лоты хлороводородной. Присутствие алкалоидов определяли проведением серии реакций извлечения из сырья с общеосадительными реактивами: Вагнера – Бушарда, Драгендорфа, Майера, Марки, Шейблера, Бертрана, Зонненшейна, раствором танина и раствором пикриновой кислоты [14].

Объектами исследования при определении острой токсичности служили образцы сухого экстракта из трех видов исследуемого сырья. Для получения сухого экстракта сырье измельчали и помещали в колбу, заливали 20% спиртом этиловым в соотношении 1:30. Колбу с присоединенным обратным холодильником выдерживали на кипящей водяной бане 30 мин, охлаждали при непрерывном перемешивании в течение 60 мин. После охлаждения экстракт центрифугировали со скоростью 8000 об./мин в течение 15 мин для удаления мелкодисперсных примесей. Надосадочную жидкость сливали и удаляли экстрагент конвективной сушкой извлечения при температуре 30–40 °С.

Изучение острой токсичности проводили на 60 половозрелых белых неинбредных мышах стока CD-1 обоего пола с массой тела 28–35 г и 20 крысах Вистар массой 260–310 г из вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск). Содержание животных осуществляли в соответствии с установленными правилами [15]. Лабораторные животные, соответствующие требованиям для включения в эксперимент, разделялись на группы с учетом пола, возраста, массы и принципа рандомизации. Экспериментальную работу проводили в соответствии с Правилами Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях, N 123 (Страсбург, 18 марта 1986 г.). Исследование одобрено локальным этическим комитетом НГМУ (протокол № 147 от 17.10.2022).

В эксперименте проводили определение переносимых, токсических и летальных доз сухих экстрактов при внутрижелудочном введении, причин наступления гибели животных в течение 14 дней наблюдения, изучение влияния сухих экстрактов на общее состояние, некоторые функциональные и морфологические показатели. Время непрерывного наблюдения составляло 8 ч после введения. Затем наблюдение за экспериментальными животными продолжали в течение 14 дней. В качестве параметров острой токсичности рассматривали изменение массы тела на 14-е сутки после введения сухих экстрактов, число павших и выживших животных.

310 g from the vivarium of the Institute of Cytology and Genetics (Novosibirsk). The animals were kept in accordance with the established rules [15]. Laboratory animals that met the inclusion criteria were divided into groups based on gender, age, weight, and the principle of randomization. Experiments were carried out in accordance with the Rules of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental or Other Scientific Purposes No. 123 (Strasbourg, March 18, 1986). The study was approved by the local Ethics Committee of the Novosibirsk State Medical University (Protocol No. 147 of 10/17/2022).

During the experiment, the tolerated, toxic and lethal doses of dry extracts under intragastric administration, the causes of death of animals during a 14-day follow-up were determined. The effect of dry extracts on the general condition, some functional and morphological parameters was studied. The time of continuous observation was 8 h after administration. The experimental animals were then followed up for 14 days. The change in body weight on the 14th day after the administration of dry extracts, the numbers of dead and surviving animals were considered as parameters of acute toxicity.

The dosage of the dry extract was carried out in milligrams per kilogram of body weight. The dry extract was administered twice intragastrically at the maximal total dose of 5,000 mg/kg to mice and 5,500 mg/kg to rats. The dry extract was dissolved in distilled water to the required volume of 1 ml for mice (20 g) and 6 ml for rats (300 g) with a 3-hour interval between administrations.

Statistical processing was performed according to the standard methods using the Student's test and the non-parametric Mann-Whitney test [13].

RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the results of determining the content of toxic trace elements.

Currently, there are no standards for the content of Be, Sr, Sb, Tl and U in the medicinal plant raw materials, so it is possible to assess the safe level based on the maximum permissible concentration of these elements in drinking water [16]. Taking into account the physiological range of maximal water consumption (2,5 l per day) [17], Table 2 shows the levels of the maximal safe intake of trace elements per day. To calculate the daily doses of the phytopreparation, we took into account that the usual daily dose of herbal medicinal product (HMP) is 10 g of raw materials.

The analysis of data on toxic trace elements shows that the content of toxic elements in the raw materials is lower than reference ranges. Therefore, phytoprepa-

Дозирование сухого экстракта проводилось в миллиграммах на килограмм массы тела. Введение сухого экстракта осуществляли двукратно внутрижелудочно в максимально возможной общей дозе 5000 мг/кг мышам и 5500 мг/кг крысам. Сухой экстракт растворяли в дистиллированной воде до необходимого объема – 1 мл/мышь (20 г), 6 мл/крыса (300 г) с интервалом между введениями 3 ч.

Статистическую обработку проводили по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента и рангового непараметрического критерия Манна – Уитни [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 приведены результаты определения содержания микроэлементов-токсикантов.

Нормы по содержанию Be, Sr, Sb, Tl и U в лекарственном растительном сырье на настоящий момент отсутствуют, поэтому можно провести оценку безопасного уровня исходя из предельно допустимой концентрации указанных элементов, приведенных в действующем стандарте на питьевую воду [16]. С учетом физиологических норм максимального потребления воды (2,5 л в сутки) [17] в табл. 2 приведены уровни максимального возможного безопасного потребления микроэлементов в сутки. Для расчетов суточных доз фитопрепарата мы учитывали, что обычная суточная доза лекарственного растительного препарата (ЛРП) составляет 10 г сырья.

Анализ данных по микроэлементам-токсикантам показывает, что в сырье содержание элементов-токсикантов ниже допустимых норм. Следовательно, фитопрепараты, приготовленные из всех видов сырья медуницы мягкой, не должны оказывать токсического действия на живой организм.

rations produced from all types of *P. mollis* raw materials should not have toxic effect on a living organism.

The qualitative analysis of the raw materials for the presence of alkaloids did not give a positive analytical signal with any of 9 sedimentation reagents, which indicates the absence of alkaloids or their insignificant content – below the sensitivity of reactions threshold. At the same time, it can be noted that, in general, the contamination of underground organs and vegetative leaves with toxic elements is higher than that of reproductive shoots, which is explained by two factors – the exogenous nature of raw material contamination and the short life span of reproductive shoots.

To determine the acute toxicity of dry extracts of rhizomes and roots, reproductive shoots, and vegetative leaves of *P. mollis*, the general condition of the animals was assessed (behavior, appearance, motor activity, food and water intake, response to external stimuli, and the total weight); as well as took into consideration the nature of clinical manifestations of intoxication, possible fatal outcome, and morphological changes in internal organs.

The choice of the highest dose was explained by the limit for intragastric administration to mice. According to Russian recommendations [18], it is allowed single drug administration in a volume of up to 1 ml per mouse (20 g), which in our case was 50 ml/kg, or 2500 mg/kg; in double administration – 5000 mg/kg. For two weeks, no deaths of animals were observed and no changes in appearance, behavior, or motor activity were detected. When weighing the mice at the end of the experiment (after 14 days), all the animals gained weight evenly (Table 3).

According to the Student's test, a significant, 7,5% (at a significance level of 95%) increase in body weight was observed only in mice receiving extract from reproductive shoots. Mice that received extracts from

Таблица 1. Содержание микроэлементов-токсикантов по органам растения (мкг/г)
Table 1. The content of toxic trace elements in plant organs (μg/g)

Элемент Element	Корневища с корнями Rhizomes with roots			Листья Leaves			Трава Grass		
	$\bar{x}$	σ	Δ	$\bar{x}$	σ	Δ	$\bar{x}$	σ	Δ
Бериллий / Beryllium (Be)	0,018	0,09	0,0057	0,013	0,006	0,004	0,003	0,0027	0,0017
Кадмий / Cadmium (Cd)	0,47	0,15	0,095	0,08	0,03	0,019	0,12	0,035	0,022
Мышьяк / Arsenic (As)	0,147	0,035	0,022	0,27	0,04	0,025	0,2	0,05	0,032
Свинец / Lead (Pb)	0,53	0,15	0,095	0,61	0,2	0,13	0,36	0,1	0,06
Стронций / Strontium (Sr)	84,8	8,4	5,3	53,5	5,1	3,2	33,7	4,8	3,1
Сурьма / Antimony (Sb)	0,015	0,002	0,0013	0,011	0,0016	0,001	0,01	0,001	0,0006
Ртуть / Mercury (Hg)	0,005	0,0026	0,0017	0,013	0,006	0,0038	0,004	0,002	0,001
Таллий / Thallium (Tl)	0,015	0,004	0,0025	0,025	0,0015	0,001	0,005	0,0014	0,001
Уран / Uranium (U)	0,005	0,0012	0,0008	0,009	0,002	0,0013	0,01	0,003	0,0016

Таблица 2. Уровни максимально возможного безопасного потребления микроэлементов в сутки
Table 2. Levels of the maximal safe daily intake of trace elements

Элемент Element	Максимальное содержание в сырье с учетом доверительного интервала, мкг/г Maximal content in the raw materials, taking into account the confidence interval, μg/g			Норма по ГФ, мкг/г [14] ST reference value, μg/g [14]	Количество в суточной дозе ЛРП, мкг Content in a daily dose of HMP, μg			Максимальное количество в дневной норме воды питьевой, мкг [16, 17] Maximal content of drinking water for daily intake, μg [16, 17]
	корневища с корнями rhizomes with roots	листья leaves	трава grass		корневища с корнями rhizomes with roots	листья leaves	трава grass	
Бериллий / Beryllium (Be)	0,024	0,017	0,0047	–	0,24	0,17	0,047	0,5
Кадмий / Cadmium (Cd)	0,565	0,099	0,142	1,0	–	–	–	–
Мышьяк / Arsenic (As)	0,169	0,295	0,232	0,5	–	–	–	–
Свинец / Lead (Pb)	0,625	0,74	0,42	6,0	–	–	–	–
Стронций / Strontium (Sr)	90,1	56,7	36,8	–	901,0	567,0	368,0	17500,0
Сурьма / Antimony (Sb)	0,0163	0,012	0,0106	–	0,163	0,12	0,11	12,5
Ртуть / Mercury (Hg)	0,0067	0,0168	0,005	0,1	–	–	–	–
Таллий / Thallium (Tl)	0,0175	0,024	0,006	–	0,175	0,24	0,06	0,25
Уран / Uranium (U)	0,0058	0,0103	0,0116	–	0,058	0,1	0,12	37,5

ГФ – Государственная Фармакопея; ЛРП – лекарственный растительный препарат.
ST – State Pharmacopoeia; HMP – herbal medicinal product.

Качественный анализ сырья на присутствие алкалоидов не дал положительного аналитического сигнала ни с одним из 9 общеосадительных реактивов, что свидетельствует об отсутствии алкалоидов или их незначительном содержании – ниже порога чувствительности реакций. В то же время можно отметить, что в целом загрязненность токсическими элементами подземных органов и вегетативных листьев выше, чем генеративных побегов, что объясняется двумя факторами – экзогенным характером загрязнения сырья и небольшой продолжительностью жизни генеративного побега.

Для определения острой токсичности сухих экстрактов корневищ и корней, генеративных побегов, вегетативных листьев медуницы оценивали общее состояние животных (следили за поведением, внешним видом, двигательной активностью, потреблением пищи и воды, реакцией на внешние раздражители, общей массой); принимали во внимание характер клинических проявлений интоксикации, возможный летальный исход и морфологические изменения внутренних органов.

Выбор наивысшей дозы объяснялся пределом для внутрижелудочного пути введения мышам. Согласно российским рекомендациям [18], допускается введение препарата в объеме до 1 мл/мышь (20 г) однократно, что в нашем случае other raw materials did not show a significant increase in body weight. A similar result was obtained using the non-parametric Mann-Whitney rank test [13].

Due to the fact that the anti-anemic effect of extracts from reproductive shoots of *P. mollis* was revealed during experiments in rats, the acute toxicity of this dry extract in rats was additionally determined. The doses were calculated similarly to the doses for mice, based on the permissible volume of up to 6 ml per rat (300 g) for single intragastric administration of the preparation, which in our case was 20 ml/kg, or 2750 mg/kg; for double administration – 5500 mg/kg. During a 14-day follow-up, there were also no changes in the appearance, behavior, or motor activity of the animals.

Thus, the analysis of the results of the acute toxicity study allowed to establish that the maximal dosages for intragastric administration of dry extracts from reproductive shoots, vegetative leaves and roots of *P. mollis* to mice and rats in the maximal volume for this route of administration does not have a toxic effect on the animal body during the 14-day follow-up.

The results of the experiment revealed the absence of mortality in animals that received dry extracts of reproductive shoots, vegetative leaves and roots of *P. mollis* (Table. 3), which made it impossible to determine the parameters of acute toxicity using probit analysis (LD_{10}, LD_{50}, LD_{90} (LD – lethal dose)). Due to the absence of deaths during the

Таблица 3. Масса тела животных (г) после двукратного внутрижелудочного введения сухого экстракта медуницы мягкой, X ± m
Table 3. Animal body weight (g) after double intragastric administration of *P. mollis* dry extract, X ± m

Показатель Indicator	Сухой экстракт генеративных побегов Dry extract of reproductive shoots	Сухой экстракт вегетативных листьев Dry extract of vegetative leaves	Сухой экстракт корней Dry extract of roots
Средняя масса тела до введения, г Average body weight before administration, g	34,3 ± 1,3	35,8 ± 1,7	36,3 ± 1,5
Средняя масса тела на 14-е сутки, г Average body weight on the 14th day, g	36,9 ± 0,8	38,3 ± 2,8	37,6 ± 1,6
Прирост массы тела, г Body weight increase, g	2,6	–	–
Прирост массы тела, % Body weight increase , %	7,5	–	–

Примечание. Прочерк означает, что значение статистически не значимо.
Note. A dash means that the value is not statistically significant.

составило 50 мл/кг, или 2500 мг/кг; при двукратном введении – 5000 мг/кг. В течение двух недель не наблюдали гибели животных и не выявили никаких изменений внешнего вида, поведения и двигательной активности. При взвешивании мышей в конце эксперимента (через 14 дней) отмечено, что все животные равномерно прибавили в массе (табл. 3).

По критерию Стьюдента значимый (при уровне значимости 95 %) прирост массы тела – 7,5 % наблюдался только у мышей, получавших экстракт из генеративных побегов. Мыши, получавшие экстракты из других видов сырья, значимого прироста массы тела не показали. Аналогичный результат был получен и при использовании рангового непараметрического критерия Манна – Уитни [13].

В связи с тем, что антианемическое действие извлечений из генеративных побегов медуницы мягкой было установлено в ходе экспериментов на лабораторных животных – крысах, дополнительно проверили острую токсичность этого сухого экстракта на крысах. Дозы были рассчитаны аналогично дозам для мышей, исходя из допустимого объема до 6 мл на крысу (300 г) при внутрижелудочном введении препарата однократно, что в нашем случае составило 20 мл/кг, или 2750 мг/кг; при двукратном введении – 5500 мг/кг. В течение 14 дней наблюдения также не было выявлено никаких изменений внешнего вида, поведения и двигательной активности животных.

Таким образом, анализ полученных результатов изучения острой токсичности позволил установить, что максимально возможные дозировки для введения сухих экстрактов генеративных

experiment, there was no need for autopsy to collect morphological material. This indicates the safety of the preparation. Further study of subchronic toxicity will reveal functional disorders that may occur in intragastric administration of the extract.

Owing to the absence of fatal outcomes in the maximal dosage, LD_{50} for dry extracts from reproductive shoots, vegetative leaves and roots of *P. mollis* in intragastric administration should be equal 5000 mg/kg for mice and 5500 mg/kg for rats, which allows to attribute the preparations to class 4 (low toxic substances) according to the current regulatory documentation [19].

CONCLUSION

The study has showed the following:

1) in different morphological types of medicinal plant raw materials of *P. mollis*, alkaloids, if present, are found in trace amounts, and the content of toxic trace elements does not exceed the reference range;

2) in terms of acute toxicity, the extracts from all types of *P. mollis* raw materials belong to the hazard class 4 (low-toxic substances);

3) when the total extract from reproductive shoots was administered in the maximal dosage, the experimental animals showed an increase in body weight by 7,4%;

4) the absence of toxicity in the total extract from reproductive shoots in combination with the anti-anemic activity previously found allows to consider this medicinal plant raw materials as a promising preparation for the phytotherapy of anemic conditions.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

побегов, вегетативных листьев и корней медуницы мягкой мышам и крысам внутрижелудочно в максимально возможном для данного пути введения объеме не оказывает токсического действия на организм животных при наблюдении за ними в течение 14 дней.

Результаты эксперимента выявили отсутствие летальности у животных, получавших сухие экстракты генеративных побегов, вегетативных листьев и корней медуницы мягкой (см. табл. 3), что не позволило установить параметры острой токсичности методом пробит-анализа ($ЛД_{10}$, $ЛД_{50}$, $ЛД_{90}$ (ЛД – летальная доза)). Из-за отсутствия смертельных исходов на протяжении эксперимента отсутствовала необходимость вскрытия животных и забора морфологического материала. Это говорит о безопасности препарата. Дальнейшее изучение субхронической токсичности позволит выявить функциональные нарушения, которые могут возникнуть при внутрижелудочном введении экстракта.

Из-за отсутствия летальных случаев при максимально возможной дозировке $ЛД_{50}$ для сухих экстрактов генеративных побегов, вегетативных листьев и корней медуницы мягкой при внутрижелудочном введении мышам должна составлять 5000 мг/кг, а при внутрижелудочном введении крысам – 5500 мг/кг, что позволяет отнести изучаемый препарат к 4-му классу (малотоксичные вещества) согласно действующей нормативной документации [19].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало:

1) в различных морфологических видах лекарственного растительного сырья медуницы мягкой алкалоиды если и присутствуют, то в следовых количествах, а содержание элементов-токсикантов не выходит за пределы норм;

2) по острой токсичности извлечения из всех видов сырья медуницы мягкой относятся к 4-му классу опасности – малотоксичным веществам;

3) при введении суммарного извлечения из генеративных побегов в максимально возможных дозах подопытные животные показали прирост массы тела на 7,4 %;

4) отсутствие токсичности у суммарного извлечения из генеративных побегов в сочетании с ранее установленной антианемической активностью позволяет рассматривать данное лекарственное растительное сырье в качестве перспективного препарата для фитотерапии анемических состояний.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Meeus S., Janssens S., Helsen K., Jacquemyn H. Evolutionary trends in the distylous genus *Pulmonaria* (Boraginaceae): Evidence of ancient hybridization and current interspecific gene flow// Mol. Phylogenet. Evol. 2016:98:63-73. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.11.022.
2. *Pulmonaria* L. – Медуница// Флора Сибири: в 14 т. / сост. В.М. Доронькин и др. Новосибирск: Наука; Сиб. издат. фирма РАН, 1997. Т. 11: Pyrolaceae – Lamiaceae (Labiatae). С. 117–119.
3. Мац М.Н., Корхов В.В., Богаткина В.Ф. и др. Контрацептивные свойства галеновых препаратов из некоторых растений семейства бурачниковых// Растительные рессурсы. 1982;18(1):87-91.
4. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность /отв. ред. А.Л. Буданцев. СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2011. Т. 4: Семейства Capriofoliaceae-Lobeliaceae. 630 с.
5. Cohen J.I. A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae: evolutionary relationships, taxonomy, and patterns of character evolution// Cladistics. 2013;30(2):139-169. DOI: 10.1111/cla.12036.
6. Бубенчикова В.Н., Казакова В.С. Медуница неясная – новый источник полисахаридов// Фармация. 2008;2:19-21.

REFERENCES

1. Meeus S., Janssens S., Helsen K., Jacquemyn H. Evolutionary trends in the distylous genus *Pulmonaria* (Boraginaceae): Evidence of ancient hybridization and current interspecific gene flow. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2016:98:63-73. DOI: 10.1016/j.ympev.2015.11.022.
2. Doronkin V.M. et al. (1997). *Pulmonaria* L. – Pulmonaria. In *Flora of Siberia: in 14 volumes*. Novosibirsk: Nauka. Siberian Publishing House RAS, Vol. 11: Pyrolaceae – Lamiaceae (Labiatae). P. 117–119. (In Russ.)
3. Matz M.N., Korkhov V.V., Bogatkina V.F. et al. Contraceptive properties of galenic preparations from some plants of the *Boraginaceae* family. *Rastitelnye resursy*. 1982;18(1):87-91. (In Russ.)
4. Budantsev A.L. (ed.) (2011). *Plant Resources of Russia: Wild Flowering Plants, Their Composition and Biological Activity*. St. Petersburg; Moscow. Vol. 4: Caprifoliaceae-Lobeliaceae Families. 630 p. (In Russ.)
5. Cohen J.I. A phylogenetic analysis of morphological and molecular characters of Boraginaceae: evolutionary relationships, taxonomy, and patterns of character evolution. *Cladistics*. 2013;30(2):139-169. DOI: 10.1111/cla.12036.
6. Bubenchikova V.N., Kazakova V.S. Lungwort (Pulmonaria obscura L.) Is a new source of polysaccharides. *Pharmatsya*. 2008;2:19-21. (In Russ.)

7. Kruglov D.S. Trace element structure of the most widespread plants of genus Pulmonaria // Chronicles of Young Scientists. 2012;3(3):223-226.
8. Kruglov D.S., Fursa N.S. Chemical structure of different morphological parts of Pulmonaria mollis // Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology: Book of abstracts of the 4th Annual Russia-Korean Conference. Novosibirsk, 2012. P. 38.
9. Kruglov D.S. Arzneipflanzen zur Prävention von Eisenmangel // Die Zeitschrift der Österreichischen Gesellschaft für Phytotherapie. 2018;3:15.
10. El-Shazly A., Wink M. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the Boraginaceae structures, distribution, and biological properties//Diversity. 2014;6(2):188-282; DOI: 10.3390/d6020188.
11. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 960 с.
12. МУК 4.1.1483-03. Определение содержания химических элементов в диагностируемых биосубстратах, препаратах и биологически активных добавках методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной аргоновой плазмой: методические указания. М., 2003. 36 с.
13. Никитин В.И. Первичная статистическая обработка экспериментальных данных. Самара, 2017. 80 с.
14. Государственная Фармакопея. XV изд. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ (дата обращения: 11.10.2024).
15. ГОСТ 33215-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур. М.: Стандартинформ, 2016. 13 с.
16. Об утверждении Санитарных правил и норм СанПиН 1.2.3685-21 «Гигиенические нормативы и требования к обеспечению безопасности и (или) безвредности для человека факторов среды обитания»: постановление главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 2. URL: https://dou.su/files/docs/SP123685_21.pdf (дата обращения: 11.10.2024).
17. Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации: методические рекомендации МР 2.3.1.0253-21. URL: https://sh25-pyatigorsk-r07.gosweb.gosuslugi.ru/netcat_files/32/315/MR_2.3.1.0253_21.pdf (дата обращения: 11.10.2024).
18. Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К., 2012. 944 с.
19. ГОСТ 12.1.007-76 Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. М.: Стандартинформ, 2007. 7 с.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Круглов Дмитрий Семенович – канд. техн. наук, доцент кафедры фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-1904-7901.

7. Kruglov D.S. Trace element structure of the most widespread plants of genus Pulmonaria. *Chronicles of Young Scientists*. 2012;3(3):223-226.
8. Kruglov D.S., Fursa N.S. (2012). Chemical structure of different morphological parts of Pulmonaria mollis. *Current Issues of Natural Products Chemistry and Biotechnology: Book of abstracts of the 4th Annual Russia-Korean Conference*. Novosibirsk. P. 38.
9. Kruglov D.S. Arzneipflanzen zur Prävention von Eisenmangel. *Die Zeitschrift der Österreichischen Gesellschaft für Phytotherapie*. 2018;3:15.
10. El-Shazly A., Wink M. Diversity of pyrrolizidine alkaloids in the Boraginaceae structures, distribution, and biological properties. *Diversity*. 2014;6(2):188-282; DOI: 10.3390/d6020188.
11. Rebrov V.G., Gromova O.A. (2008). *Vitamins, Macro- and Microelements*. Moscow: GEOTAR-Media. 960 p. (In Russ.)
12. Guidelines 4.1.1483-03 (2003). Determination of content of chemical elements in biosubstrates, preparations and dietary supplements by inductively coupled plasma mass spectroscopy. Moscow. 36 p. (In Russ.)
13. Nikitin V.I. (2017). *Primary Statistical Processing of Experimental Data*. Samara. 80 p. (In Russ.)
14. State Pharmacopoeia. XV ed. URL: https://pharmacopoeia.regmed.ru/pharmacopoeia/izdanie-15/ (accessed 11.10.2024).
15. GOST 33215-2014 (2016). Guidelines for laboratory animal care. Rules of equipment of premises and organization of procedures. Moscow: Standartinform. 13 p. (In Russ.)
16. On the approval of SanPiN Sanitary Rules and Regulations 1.2.3685-21 “Hygienic standards and requirements for ensuring the safety and (or) harmlessness of environmental factors for humans”: Resolution of the Chief State Sanitary Physician of the Russian Federation dated 28.01.2021 N 2. URL: https://dou.su/files/docs/SP123685_21.pdf (accessed 11.10.2024).
17. Norms of physiological requirements of energy and nutrients for different population groups of the Russian Federation: Guidelines 2.3.1.0253-21. URL: https://sh25-pyatigorsk-r07.gosweb.gosuslugi.ru/netcat_files/32/315/MR_2.3.1.0253_21.pdf (accessed 11.10.2024).
18. Mironov A.N., Bunyatyan N.D., Vasiliev A.N. et al. (2012). *Guidelines for Preclinical Studies of Medicines*. Moscow: Grif & Company. 944 p. (In Russ.)
19. GOST 12.1.007-76 (2007). System of occupational safety standards. Harmful substances. Classification and general safety requirements. Moscow: Standartinform. 7 p. (In Russ.)

ABOUT THE AUTHORS

Dmitry S. Kruglov – Cand. Sci. (Tech.), Associate Professor, Department of Pharmacognosy and Botany, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-1904-7901.
Victoria V. Velichko – Cand. Sci. (Pharmaceut.), Head, Department of Pharmacognosy and Botany, Novosi-

Величко Виктория Владимировна – канд. фармацевт. наук, заведующий кафедрой фармакогнозии и ботаники ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0002-9224-9350.

Ершов Константин Игоревич – канд. биол. наук, доцент кафедры фармакологии, клинической фармакологии и доказательной медицины ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Россия. ORCID: 0000-0003-4139-036X.

birsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0002-9224-9350.

Konstantin I. Ershov – Cand. Sci. (Bio.), Associate Professor, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Evidence-Based Medicine, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russia. ORCID: 0000-0003-4139-036X.