

Подострая токсичность, местнораздражающее и аллергизирующее действие экстракта копеечника Семенова (Hedysarum semenowii Regel & Herder)

А. С. Келеке¹, Л. Н. Ибрагимова¹✉, З. Б. Сакипова¹, Р. И. Кулманбетов¹,
Т. С. Нургожин¹, М. К. Сулейменов¹, Г. С. Ибадуллаева¹, А. Л. Ахелова¹, А. Ю. Гришина²

¹ Некоммерческое акционерное общество «Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова» (КазНМУ). 050012, Республика Казахстан, г. Алматы, ул. Толе Би, д. 94

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России). Центр экспериментальной фармакологии. 197022, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 14, литер A

✉ Контактное лицо: Ибрагимова Лилия Николаевна. E-mail: ibragimova.l@kaznmu.kz

ORCID: А. С. Келеке – <https://orcid.org/0000-0001-5502-6142>;

Л. Н. Ибрагимова – <https://orcid.org/0000-0002-8381-5330>;

З. Б. Сакипова – <https://orcid.org/0000-0003-4477-4051>;

Р. И. Кулманбетов – <https://orcid.org/0000-0002-9631-0112>;

Т. С. Нургожин – <https://orcid.org/0000-0002-8036-604X>;

М. К. Сулейменов – <https://orcid.org/0009-0005-6902-6262>;Г. С. Ибадуллаева – <https://orcid.org/0000-0002-1268-9867>;А. Л. Ахелова – <https://orcid.org/0000-0002-5118-3914>;А. Ю. Гришина – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>.

Статья поступила: 28.07.2025

Статья принята в печать: 13.10.2025

Статья опубликована: 17.10.2025

Резюме

Введение. Лекарственные растения, такие как копеечник Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) рода *Hedysarum* L., обладают богатым фитохимическим профилем и могут стать перспективной основой для разработки новых фармацевтических препаратов. Несмотря на известную фармакологическую активность многих видов *Hedysarum* L., профиль безопасности этих растений изучен недостаточно, что требует дополнительной оценки их токсичности и потенциальных побочных эффектов. В этой связи проведены исследования по определению подострой токсичности, местнораздражающего действия и аллергенности экстракта *Hedysarum semenowii* для оценки его безопасности и терапевтического потенциала.

Цель. Определение подострой токсичности, местнораздражающего действия и аллергенности экстракта копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder).

Материалы и методы. Исследование подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii* проводилось на беспородных крысах, где животным вводили экстракт надземной части растения перорально в дозах 500, 2000 и 5000 мг/кг в течение 28 дней, наблюдая за их состоянием. По окончании исследований подострой токсичности исследовали патологические изменения в печени и почках экспериментальных животных. Местнораздражающее и аллергенное действие оценивали на крысах и морских свинках соответственно с использованием визуальных методов и шкалы Дрейза.

Результаты и обсуждение. В ходе 28-дневного исследования подострой токсичности у животных не выявлено значимой токсичности, смертности или изменений в поведении. Масса тела, потребление корма и воды оставались стабильными. По результатам макроскопического и микроскопического исследования в печени и почках отмечены незначительные физиологические изменения, выраженность которых коррелировала с дозой введенного экстракта. Кроме того, экстракт не вызывал раздражения кожи или аллергенных реакций в тестах с участием крыс и морских свинок.

© Келеке А. С., Ибрагимова Л. Н., Сакипова З. Б., Кулманбетов Р. И., Нургожин Т. С., Сулейменов М. К., Ибадуллаева Г. С., Ахелова А. Л., Гришина А. Ю., 2025

© Keleke A. S., Ibragimova L. N., Sakipova Z. B., Kulmanbetov R. I., Nurgozhin T. S., Suleimenov M. K., Ibadullayeva G. S., Akhelova A. L., Grishina A. Yu., 2025

Заключение. В результате исследований экстракт *Hedysarum semenowii* продемонстрировал низкую токсичность, отсутствие раздражающего и аллергизирующего действий, что подтверждает его безопасность и перспективность для дальнейшего изучения в качестве потенциального терапевтического средства.

Ключевые слова: *Hedysarum semenowii*, подострая токсичность, местнораздражающее действие, аллергизирующее действие, доклинические исследования

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

Вклад авторов. А. С. Келеке и Л. Н. Ибрагимова разработали концепцию исследования, методологию и провели формальный анализ, а также выполнили экспериментальные исследования и подготовили первоначальный вариант рукописи. А. Ю. Гришина, А. С. Келеке и А. Л. Ахелова провели статистическую обработку и анализ данных. Р. И. Кулманбетов, М. К. Сулейменов и Г. С. Ибадуллаева внесли правки и участвовали в редактировании статьи. З. Б. Сакипова и Т. С. Нургожин обеспечили необходимые ресурсы, осуществляли руководство проектом и административное сопровождение. Все авторы прочитали и одобрили окончательный вариант статьи.

Для цитирования: Келеке А. С., Ибрагимова Л. Н., Сакипова З. Б., Кулманбетов Р. И., Нургожин Т. С., Сулейменов М. К., Ибадуллаева Г. С., Ахелова А. Л., Гришина А. Ю. Подострая токсичность, местнораздражающее и аллергизирующее действие экстракта копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder). Разработка и регистрация лекарственных средств. 2025;14(4):208–220. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2159>

Subacute toxicity, local irritant, and allergenic effects of *Hedysarum semenowii* extract

**Anel S. Keleke¹, Liliya N. Ibragimova¹✉, Zuriyadda B. Sakipova¹, Ruslan I. Kulmanbetov¹,
Talgat S. Nurgozhin¹, Marat K. Suleimenov¹, Galiya S. Ibadullayeva¹,
Aiman L. Akhelova¹, Anna Yu. Grishina²**

¹ Asfendiyarov Kazakh National Medical University. 94, Tole Bi str., Almaty, 050012, Republic of Kazakhstan

² Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University. Center for Experimental Pharmacology. 14A, Professora Popova str., Saint-Petersburg, 197022, Russia

✉ Corresponding author: Liliya N. Ibragimova. E-mail: ibragimova.l@kaznmu.kz

ORCID: Anel S. Keleke – <https://orcid.org/0000-0001-5502-6142>;

Liliya N. Ibragimova – <https://orcid.org/0000-0002-8381-5330>;

Zuriyadda B. Sakipova – <https://orcid.org/0000-0003-4477-4051>;

Ruslan I. Kulmanbetov – <https://orcid.org/0000-0002-9631-0112>;

Talgat S. Nurgozhin – <https://orcid.org/0000-0002-8036-604X>;

Marat K. Suleimenov – <https://orcid.org/0009-0005-6902-6262>;

Galiya S. Ibadullayeva – <https://orcid.org/0000-0002-1268-9867>;

Aiman L. Akhelova – <https://orcid.org/0000-0002-5118-3914>;

Anna Yu. Grishina – <https://orcid.org/0000-0003-2448-513X>.

Received: 28.07.2025

Accepted: 13.10.2025

Published: 17.10.2025

Abstract

Introduction. *Hedysarum semenowii* Regel & Herder of the genus *Hedysarum* L., possess a rich phyto-chemical profile and hold promise as a foundation for developing novel pharmaceuticals. Despite the recognized pharmacological activities of various *Hedysarum* L. species, their safety profiles have not been sufficiently studied, necessitating further investigation to evaluate their toxicity and potential adverse effects. To address this gap, a study was conducted to assess the subacute toxicity, local irritant effects, and allergenicity of *Hedysarum semenowii* extract, with the aim of determining its safety and therapeutic potential.

Aim. Determination of subacute toxicity, local irritant effect and allergenicity of the *Hedysarum semenowii* Regel & Herder extract.

Materials and methods. The subacute toxicity study was performed using outbred rats, with the extract from aerial part of the plant administered orally at doses of 500, 2000, and 5000 mg/kg over a 28-day period. The condition of the animals was monitored throughout the study. At the conclusion of the subacute toxicity evaluation, pathological changes in the liver and kidneys of the experimental animals were examined. Local irritant and allergenic effects were assessed in rats and guinea pigs, respectively, employing visual inspection and the Draize scoring system.

Results and discussion. The 28-day subacute toxicity study revealed no significant toxicity, mortality, or behavioral changes in the animals. Body weight, food consumption, and water intake remained stable across all groups. According to the results of macroscopic and microscopic examination, minor physiological changes were noted in the liver and kidneys, the severity of which correlated with the administered doses of the extract. Furthermore, the extract did not induce skin irritation or allergenic reactions in tests involving rats and guinea pigs.

Conclusion. *Hedysarum semenowii* extract exhibited low toxicity and an absence of irritant and allergenic effects, affirming its safety and potential for further exploration as a therapeutic agent.

Keywords: *Hedysarum semenowii*, subacute toxicity, local irritant effect, allergenic effect, preclinical studies

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. Anel S. Keleke and Liliya N. Ibragimova developed the concept of the study, the methodology, conducted the formal analysis, performed the experimental studies, and prepared the initial version of the manuscript. Anna Yu. Grishina, Anel S. Keleke and Aiman L. Akhelova conducted the statistical analysis and data processing. Ruslan I. Kulmanbetov, Marat K. Suleimenov and Galiya S. Ibadullayeva contributed to the review and editing of the manuscript. Zuriyadda B. Sakipova and Talgat S. Nurgozhin provided the necessary resources, carried out project supervision and administrative support. All authors have read and approved the final version of the manuscript.

For citation: Keleke A. S., Ibragimova L. N., Sakipova Z. B., Kulmanbetov R. I., Nurgozhin T. S., Suleimenov M. K., Ibadullayeva G. S., Akhelova A. L., Grishina A. Yu. Subacute toxicity, local irritant, and allergenic effects of *Hedysarum semenowii* extract. *Drug development & registration*. 2025;14(4):208–220. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-4-2159>

ВВЕДЕНИЕ

Фитотерапия является одной из наидревнейших форм лечения заболеваний, к которой, по оценкам Всемирной организации здравоохранения, обращаются до 80 % населения мира для лечения и профилактики различных заболеваний [1, 2]. Лекарственные растения за счет обширного фитохимического профиля остаются источником активных ингредиентов для разработки новых лекарств [3]. Одним из таких перспективных видов для изучения является копеечник Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder), который преимущественно известен как кормовая культура для крупного рогатого скота [4].

Копеечники (род *Hedysarum* L. (sweetvetch), семейство *Fabaceae*) – широко известные лекарственные растения умеренного пояса северного полушария, применяемые как в медицине, так и в косметической практике [5]. Растения рода богаты биологически активными веществами, включая полисахариды, флавоноиды, сапонины, алкалоиды, хальконы и другие соединения, отвечающие за различную фармакологическую активность [6]. В частности, известно, что некоторые хальконы, выделенные из копеечника, демонстрируют значительные противовоспалительные и антипролиферативные свойства, ингибирующее действие на клеточные линии рака печени, легких и прямой кишки [7]. Кроме того, копеечники обладают антиоксидантными, кардиопротекторными и иммуномодулирующими свойствами, которые часто приписываются полисахаридам в их составе [6]. Также известно о возможном терапевтическом применении копеечника при лечении сердечно-сосудистых патологий, диабета и нейродегенеративных расстройств, таких как болезнь Альцгеймера [6, 8].

Несмотря на значительное количество данных о фармакологической активности представителей рода *Hedysarum*, опубликованные сведения об их безопас-

ности и токсичности остаются ограниченными. В то время как исследования, направленные на изучение терапевтического потенциала растений, продолжают углубляться, не меньше внимания требует оценка безопасности. В данном контексте изучение профиля безопасности *Hedysarum semenowii* представляет интерес, поскольку этот малоизученный центрально-азиатский вид является ближайшим родственником фармакопейного представителя рода *Hedysarum polystachys* Hand.-Mazz. [9]. Исследование острой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii* на беспородных мышах не выявило летальности или признаков интоксикации [10]. Невозможность определить LD₅₀ подчеркнула необходимость дополнительных исследований для выявления динамики «доза – реакция» и оценки долгосрочной безопасности растительного экстракта.

Таким образом, **целью данного исследования** была оценка подострой токсичности, местного раздражающего действия и аллергенности экстракта *Hedysarum semenowii* с использованием общепринятых методов *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Растительное сырье

Надземная часть *Hedysarum semenowii* Regel & Herder собрана в высокогорных участках Кегенского района в Алматинской области в период цветения в июле 2022 года и идентифицирована специалистами республиканского государственного предприятия на праве хозяйственного ведения «Институт ботаники и фитоинтродукции» Комитета лесного хозяйства и животного мира Министерства экологии и природных ресурсов Республики Казахстан [11], а также прошла первичную обработку в соответствии с требованиями надлежащей практики культивирования и сбора (GACP) [12].

Получение экстракта

В исследованиях применяли экстракт *Hedysarum semenowii*, полученный из высушенного и измельченного сырья трехэтапной мацерацией этанолом с концентрацией в диапазоне 50–95 % (об./об.) с постепенным снижением концентрации (95, 70, 50 %), с применением ультразвуковой обработки (ультразвуковая ванна RoHS, Китай). Удаление экстрагента проводили при помощи роторного испарителя (STEGLER, Китай) до получения густого экстракта с последующей лиофильной сушкой (ZIRBUS, Германия) до сухого экстракта [13]. Полученный экстракт хранили в герметичной баночке для образцов при температуре не выше 5 °C и использовали при необходимости.

Исследование подострой токсичности

Двадцать самцов и самок беспородных белых крыс массой 180–200 г были использованы для оценки подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*. Исследование проводилось в соответствии с руководством А. Н. Миронова [14] и основами руководства Организации экономического сотрудничества и развития (OECD)¹. Животные были случайным образом распределены на четыре экспериментальные группы по пять крыс обоих полов в каждой группе. Крысам в первой группе вводили 500 мг/кг экстракта, во второй группе – 2000 мг/кг, в третьей – 5000 мг/кг, а четвертая группа служила контрольной. Животные содержались в полипропиленовых клетках с мягкой подстилкой в условиях контролируемой лабораторной среды, при 12-часовом световом и темном циклах, температуре 22 ± 2 °C и влажности 50 %. Стандартный рацион для грызунов и вода предоставлялись *ad libitum* (без ограничения). Животные проходили период акклиматизации в течение пяти дней перед началом исследования, при этом перед введением дозы они находились на ночном голодании.

Изучение подострой токсичности проводили в течение 28 дней. Животным экспериментальных групп ежедневно вводили водный раствор испытуемого экстракта перорально при помощи зонда, контрольной группе вводили 1 мл / 100 г массы тела дистиллированной воды по той же схеме. Наблюдение за клиникой интоксикации проводилась в течение 2 ч после введения субстанции и в конце рабочего дня ежедневно. Для оценки подострой токсичности у животных определяли показатели, такие как общее состояние, потребление пищи и воды, поведенческие и неврологические изменения, моторные функции, а также наличие любых аномальных выделений. Также отслеживалась смертность.

¹ OECD. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4. Available at: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en.html. Accessed: 28.07.2025.

После завершения 28-дневного периода экспериментальных наблюдений было проведено вскрытие одного животного из каждой группы для макроскопического и микроскопического исследования печени и почек на наличие патологических изменений. Эвтаназия животных проводилась методом цервикальной дислокации, после чего органы готовились для дальнейшего гистопатологического анализа. Гистологическая оценка была проведена опытным гистологом и впоследствии проверена независимым экспертом для минимизации предвзятости и обеспечения последовательности интерпретации.

Данное исследование было проведено как исследование ранней фазы, направленное на оценку по-дострой токсичности экстракта *H. semenowii*. В связи с пилотным характером исследования его объем был ограничен целевым набором конечных точек.

Исследование местнораздражающего действия

Исследование местнораздражающего действия экстракта проводилось на двух группах крыс (по 5 животных в каждой группе, включая контрольную). У всех животных был предварительно выстрижен участок кожи размером 2,5 × 2,5 см на спине. На этот участок ежедневно наносили 0,5 г тестируемого экстракта в течение 30 дней. Экстракт аккуратно втирали в кожу при помощи стеклянной глазной лопаточки. Животным контрольной группы наносили только основу экстракта.

Наблюдения проводились ежедневно в течение двух часов после нанесения экстракта и в конце рабочего дня. Для оценки местнораздражающего действия использовались визуальные методы наблюдения за степенью раздражения, эластичности и тургора, а также наличием шелушения, корок или трещин. О степени раздражения кожи судили согласно стандартизированной дрейзовской шкале [15] фиксированием изменений в цвете кожи и появлении отека по шкале от 0 до 4 баллов (таблица 1). Соответствующие баллы каждого параметра суммировали и согласно суммарным баллам классифицировали степень раздражения: 0–2 – минимальное или отсутствие раздражения, 3–5 – слабое раздражение, 6–8 – умеренное или сильное раздражение.

Аллергизирующее действие

Исследование аллергизирующего действия экстракта проводили на 5 особях морских свинок методом конъюнктивальной пробы в течение 28 дней. Тестирование с помощью конъюнктивальной пробы проводили на 7, 14 и 28 день. Животным вводили по одной капле водного раствора экстракта глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под верхнее веко правого глаза. После на 1 мин прижимали слезно-носовой канал у внутреннего угла глаза. Левый глаз служил контролем, в который вводили по одной капле воды очищенной. Реакцию фиксировали

через 15 мин (быстрая реакция) и через 24–48 ч (гиперчувствительность замедленного типа) с оценкой по дрейзовской шкале для раздражения глаза (таблица 2) [16].

Таблица 1. Оценка раздражения кожного покрова по дрейзовской шкале

Table 1. Assessment of skin irritation on the Draize scale

№	Наименование параметра Parameter	Шкала оценивания Assessment scale
1	Цвет кожи Skin tone	0 – отсутствует покраснение 0 – no redness
		1 – очень слабое покраснение 1 – very slight redness
		2 – слабое покраснение 2 – slight redness
		3 – умеренное покраснение 3 – moderate redness
		4 – сильное покраснение 4 – severe redness
2	Отек кожи Skin edema	0 – отсутствует отек 0 – no edema
		1 – очень слабый отек 1 – very slight edema
		2 – слабый отек 2 – slight edema
		3 – умеренный отек 3 – moderate edema
		4 – сильный отек 4 – severe edema

Таблица 2. Оценка раздражения глаза по дрейзовской шкале

Table 2. Assessment of eye irritation on the Draize scale

№	Наименование параметра Parameter	Шкала оценивания Assessment scale
1	Внешний вид и размеры радужной оболочки глаза Appearance and size of the iris	0 – норма 0 – normal
		1 – складки выше нормы, гиперемия, отек, перикорнеальная инъекция (любое из этих проявлений или их сочетание), радужка все еще реагирует на свет (медленная реакция считается положительной) 1 – folds are above normal, hypemia, edema, pericorneal injection (any of these manifestations or a combination of them), the iris is still responding to light (a slow reaction is considered positive)
		2 – отсутствие реакции на свет, кровоизлияние, значительное повреждение (любое или все из перечисленного) 2 – lack of reaction to light, hemorrhage, significant damage (any or all of the above)

№	Наименование параметра Parameter	Шкала оценивания Assessment scale
2	Покраснение конъюнктивы Conjunctival redness	0 – сосуды в норме 0 – blood vessels are normal 1 – выраженное расширение сосудов 1 – pronounced vasodilation 2 – более диффузное, глубокое багрово-красное покраснение, отдельные сосуды трудноразличимы 2 – more diffuse, deep purplish-red redness, individual vessels are difficult to distinguish 3 – диффузное мясисто-красное покраснение 3 – diffuse fleshy red redness
3	Хемоз конъюнктивы Conjunctival chemosis	0 – отсутствие отека 0 – absence of edema 1 – любой отек выше нормы 1 – any edema is above normal 2 – очевидный отек с частичным выворотом век 2 – obvious edema with partial inversion of the eyelids 3 – отек с закрытием век примерно наполовину 3 – edema with eyelid closure approximately half 4 – отек с закрытием век наполовину до полного закрытия 4 – edema with eyelid closure half to full closure
4	Выделения конъюнктивы Conjunctival discharge	0 – отсутствие выделений 0 – no discharge 1 – любое количество выделений, отличное от нормы 1 – any amount of discharge other than normal 2 – выделения с увлажнением век и волосков около век 2 – discharge with moisturizing of the eyelids and hairs around the eyelids 3 – выделения с увлажнением век, волосков и значительной области вокруг глаза 3 – discharge with moisturizing of the eyelids, hairs, and a significant area around the eye

Этические принципы

Исследование по определению острой и подострой токсичности, местнораздражающего и аллергизирующего действия экстракта копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder) проводилось согласно протоколу исследования, одобренному решением Локальной этической комиссии на

заседании № 4 (140) от 3 мая 2023 года, на базе Национального исследовательского института фундаментальной и прикладной медицины имени Б. Атчабарова некоммерческого акционерного общества «Казахский национальный медицинский университет имени С. Д. Асфендиярова».

Статистический анализ

Численные результаты исследования подострой токсичности подверглись статистической обработке в виде средних значений с использованием программы GraphPad Prism версии 10. Значимые различия между группами определялись методом однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением теста Даннетта, где значение $p \leq 0,05$ считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Исследование подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*

В течение 28-дневного исследования подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii* в целом у животных обоих полов экспериментальных групп сохранялось нормальное физиологическое состояние. В первые часы после введения экстракта наблюдалась незначительная летаргия и послабление стула, которые носили кратковременный характер и не сопровождались другими клиническими проявлениями. Симптомы исчезали без какого-либо внешнего вмешательства и не прогрессировали в ходе дальнейшего наблюдения. За период наблюдения у крыс не

наблюдалось признаков выраженной интоксикации, в том числе изменений поведения, двигательной активности, неврологического статуса.

Анализ потребления воды и корма экспериментальными животными не выявил статистически значимых различий в средних суточных показателях ($p > 0,05$) между контрольной группой и экспериментальными группами, подвергшимися воздействию экстракта на всех уровнях дозировки (рисунки 1, 2). Кроме того, внутри каждой группы не было отмечено значительных изменений в потреблении воды и корма в течение периода эксперимента. Рисунки 1 и 2 иллюстрируют среднесуточное потребление воды и корма на 100 г веса тела соответственно. Точки данных представляют собой групповые средние значения за день, соединенные линиями для отображения тенденций с течением времени. Планки погрешностей представляют собой стандартные отклонения (SD).

Результаты дисперсионного анализа (ANOVA) показали отсутствие статистически значимых различий в массе тела между экспериментальными группами животных и контрольной группой ($p > 0,05$). В начале эксперимента животные всех групп имели схожие показатели массы тела. В течение всего эксперимента динамика изменения массы тела в экспериментальных группах не отличалась от контрольной группы, и у всех животных наблюдался небольшой прирост массы тела (рисунок 3, таблица 3). Эти результаты свидетельствуют о том, что введение экстракта не оказывало существенного влияния на массу тела животных.

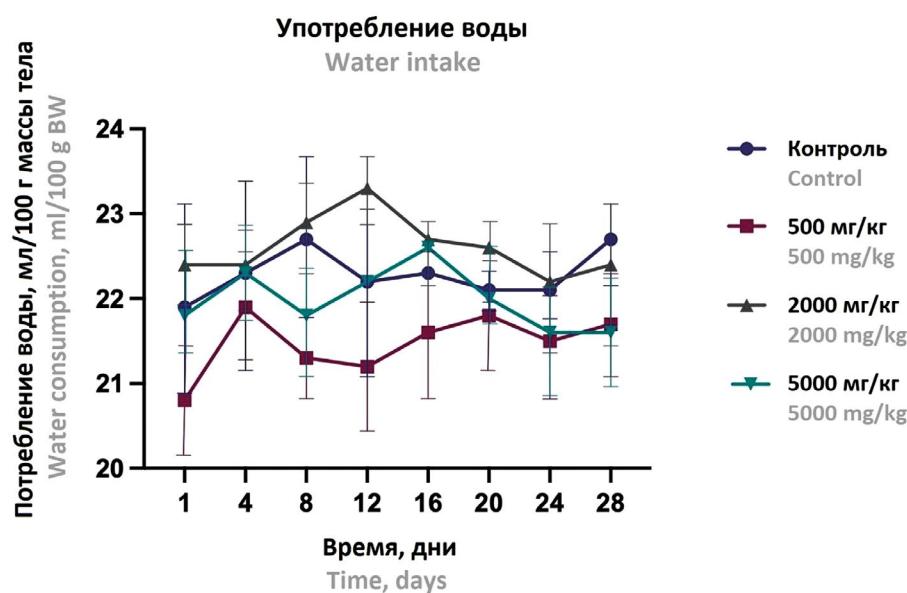


Рисунок 1. Потребление воды на 100 г массы тела экспериментальных животных при исследовании подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*

Figure 1. Water consumption per 100 g of body weight of experimental animals in the study of subacute toxicity of *Hedysarum semenowii* extract

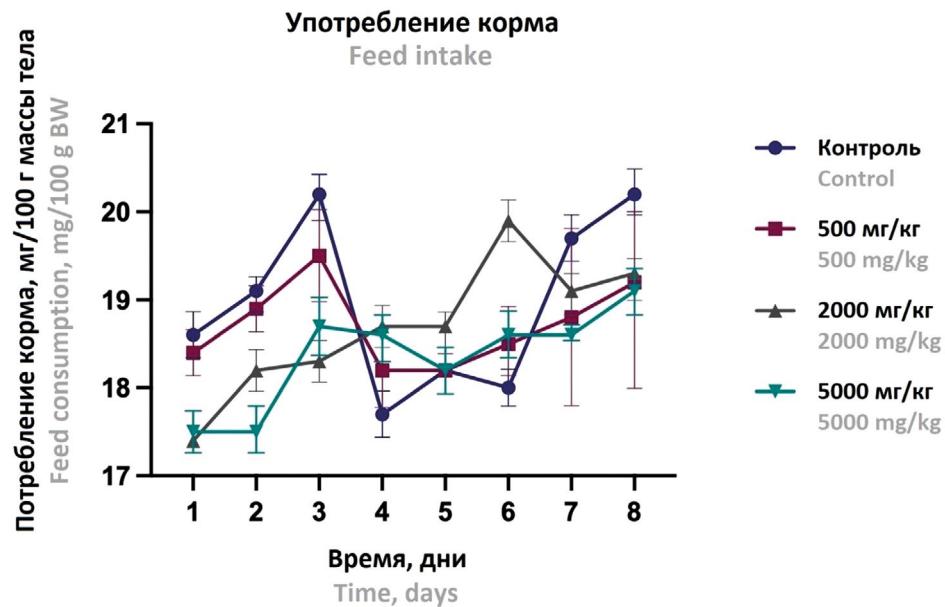


Рисунок 2. Потребление корма на 100 г массы тела экспериментальных животных при исследовании подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*

Figure 2. Feed consumption per 100 g of body weight of experimental animals in the study of subacute toxicity of *Hedysarum semenowii* extract

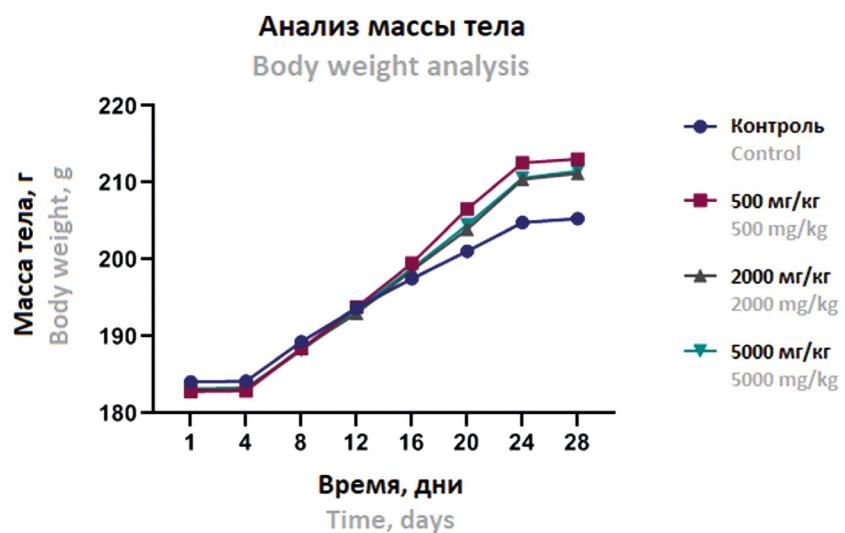


Рисунок 3. Динамика массы тела экспериментальных животных при исследовании подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*

Figure 3. Dynamics of body weight of experimental animals in the study of subacute toxicity of *Hedysarum semenowii* extract

За весь 28-дневный период исследований не было зарегистрировано случаев смертности среди животных, которым вводили экстракт, даже при дозе 5000 мг/кг массы тела. Это позволяет предположить, что LD₅₀ для исследуемого растительного экстракта *Hedysarum semenowii* значительно превышает 5000 мг/кг массы тела.

Макроскопическое исследование при изучении подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*

При вскрытии животных экспериментальной группы, получавших экстракт копеечника Семенова в течение двух недель, было отмечено, что внутренние

Таблица 3. Данные массы тела экспериментальных животных при исследовании подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*

Table 3. Data on the body weight of experimental animals in the study of subacute toxicity of *Hedysarum semenowii* extract

Дни Days	Масса тела экспериментальных животных Body weight of experimental animals			
	Контроль Control	500 мг/кг 500 mg/kg	2000 мг/кг 2000 mg/kg	5000 мг/кг 5000 mg/kg
1	184,1 ± 4,3	182,8 ± 3,7	183,1 ± 3,9	183,2 ± 3,7
4	184,2 ± 4,3	182,9 ± 3,7	183,2 ± 3,9	183,3 ± 3,7
8	189,3 ± 4,0	188,4 ± 3,6	188,4 ± 3,7	188,2 ± 3,3
12	193,7 ± 3,5	193,8 ± 3,7	193,0 ± 3,4	193,5 ± 3,2
16	197,5 ± 3,8	199,5 ± 3,7	198,6 ± 3,6	198,8 ± 3,6
20	201,1 ± 3,9	206,6 ± 3,9	203,9 ± 3,0	204,5 ± 2,9
24	204,8 ± 4,0	212,6 ± 4,0	210,4 ± 3,4	210,6 ± 2,6
28	205,3 ± 4,2	213,1 ± 4,0	211,2 ± 3,5	211,5 ± 2,7

органы животных анатомически правильны по форме и положению. Величина и форма сердца у животных, которые принимали исследуемый экстракт, не изменились. Мышца сердца была коричневатой, плотной. Печень также обычной величины и формы. Ткань печени – красно-коричневого цвета, упругой консистенции. Величина и форма почек не отличались от контрольной группы, капсула легко снималась. На разрезе почек отчетливо различалось корковое и мозговое вещество.

Микроскопическое исследование при исследовании подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii*

В рамках исследований подострой токсичности было проведено микроскопическое исследование тканей печени и почек крыс, которым вводили различные концентрации экстракта *Hedysarum semenowii*, а также контрольной группы.

Соответствующие микрофотографии печени и почек экспериментальных животных, получавших изучаемый растительный экстракт *Hedysarum semenowii*, и контрольной группы представлены на рисунке 4.

Рисунок 4 описывает следующую гистологическую картину печени и почек контрольной и экспериментальных групп.

- **Контрольная группа.** Гепатоциты печени расположены в пластинах толщиной в 1–2 клетки; полигональные клетки с круглыми, центрально расположенным ядрами и обильной эозинофильной цитоплазмой с мелкими базофильными гранулами (стрелкой отмечена центральная печеночная вена). Клубочковые капиллярные петли почек тонкие и нежные; эндотелиальные и мезангальные клетки в нормальном количестве; окружающие канальцы в норме (стрелкой отмечены клубочки).
- **Экспериментальная группа 500 мг/кг.** Структура печени не изменена, отмечаются очаги межбалочного отека (красная стрелка) и полнокровие

синусоидов (желтые стрелки). Гистологическое строение почек сохранено, отмечается очаговое полнокровие сосудов (красная стрелка) и гомогенизация эпителия канальцев (желтые стрелки).

- **Экспериментальная группа 2000 мг/кг.** Строение печени сохранено, отмечается выраженное полнокровие сосудов и синусоидов (красная стрелка), гепатоциты в состоянии паренхиматозной дистрофии (желтые стрелки). Строение почек сохранено, отмечается полнокровие сосудов (красная стрелка), диапедезные кровоизлияния в клубочках (желтая стрелка) и очаги некробиоза эпителия канальцев (черная стрелка).
- **Экспериментальная группа 5000 мг/кг.** Гепатоциты в состоянии тяжелой дистрофии с крупноклеточными изменениями, ядра гомогенные, с заметными ядрышками (красные стрелки), синусоиды с выраженной полнокровием и фокусами кровоизлияния (желтые стрелки). В почках отмечается полнокровие сосудов, диапедезные кровоизлияния в клубочках (красные стрелки), очаги некробиоза (желтые стрелки) и фокусы некроза эпителия канальцев (черная стрелка).

Результаты гистологических исследований показали, что многократное введение экстракта *Hedysarum semenowii* в течение 28 дней не приводит к гибели животных и не оказывает существенного токсического воздействия на жизненно важные органы, такие как печень и почки. При более низких и умеренных дозах морфология тканей оставалась сопоставимой с контрольной группой. Тем не менее у животных, которым вводили самую высокую дозу препарата (до 5000 мг/кг), наблюдались дозозависимые морфологические изменения в печени и почках. К ним относились умеренное полнокровие сосудов, очаговый межтрабекулярный отек, а также паренхиматозная дистрофия гепатоцитов и эпителия почечных канальцев. Хотя эти изменения не сопровождались явными клиническими симптомами или смертностью, они могут отражать ранние или субклинические изменения.

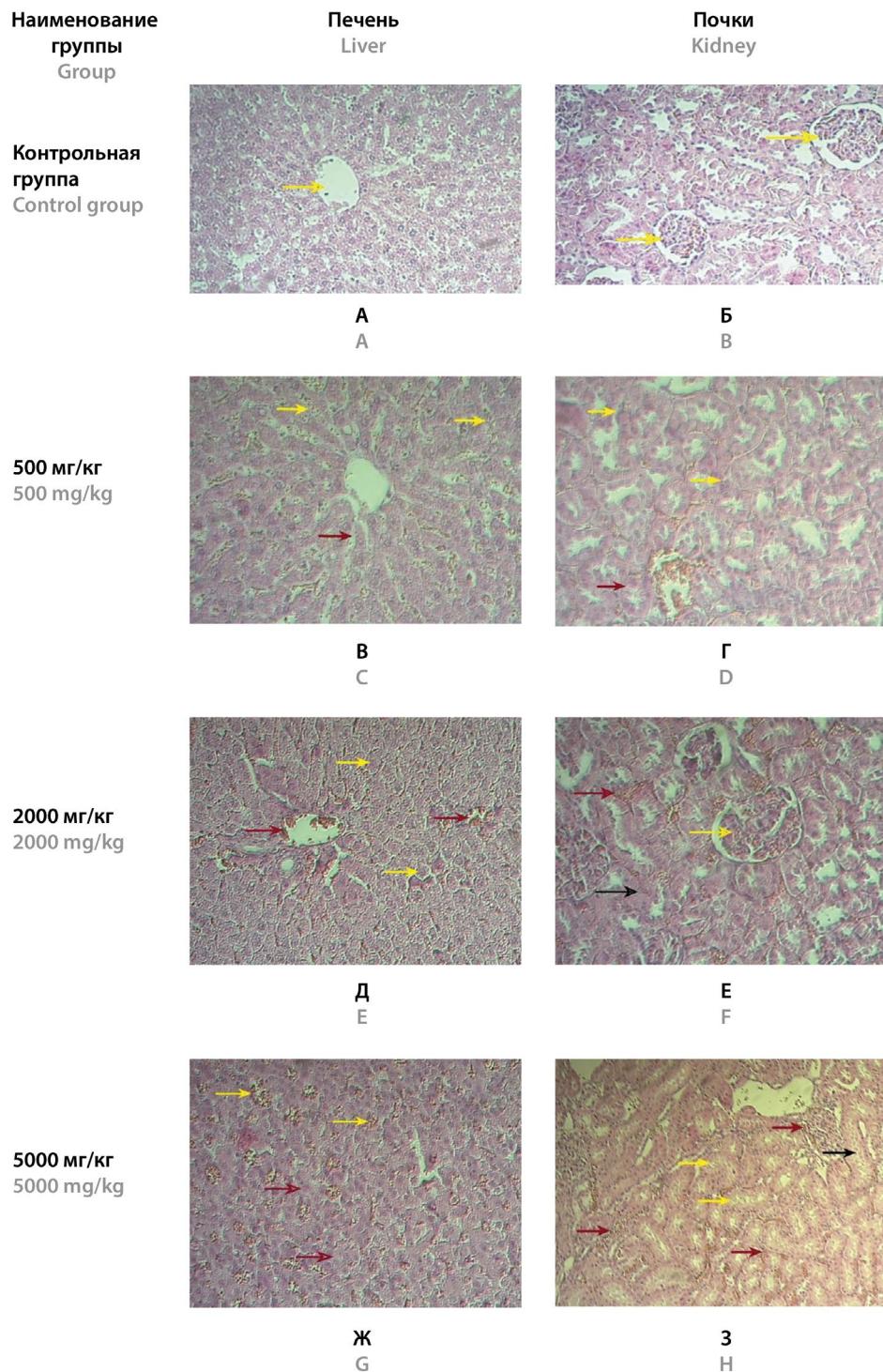


Рисунок 4. Изображения органов (печень и почки) экспериментальных животных после исследования подострой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii* (окраска гематоксилином и эозином, $\times 200$)

Figure 4. Micrographs of organs (liver and kidneys) of experimental animals after a study of subacute toxicity of *Hedysarum semenowii* extract (Hematoxylin and eosin staining, $\times 200$ magnification)

ческие токсические реакции при высоких дозах. Наблюдаемые гистологические изменения могут отражать адаптивные или ранние патологические реакции, что подчеркивает необходимость дальнейшего изучения в долгосрочных исследованиях для полной

оценки потенциального риска. Однако эти результаты следует интерпретировать в контексте высоких доз экстракта, сопоставимых с дозами в исследованиях острой токсичности, которые тем не менее не привели к летальному исходу.

В целом многократное введение экстракта *Hedysarum semenowii* удовлетворительно переносилось подопытными животными и не вызывало значительных гистологических нарушений в основных органах, что подтверждает низкий уровень токсичности экстракта в условиях подострого воздействия. Однако дозозависимые реакции тканей при высоких дозах подчеркивают важность тщательного выбора дозы в будущих токсикологических исследованиях и потенциальном фармакологическом применении.

Изучение местнораздражающего действия

В ходе проведения исследования местнораздражающего действия экстракта *Hedysarum semenowii* на крысах в составе двух групп по пять особей признаки раздражения кожи у экспериментальных животных не были выявлены. Ежедневное нанесение экстракта с последующей визуальной оценкой состояния кожи в течение двух часов после нанесения и в конце рабочего дня не вызвало никаких отклонений в цвете, тургоре, эластичности или толщине кожных складок. Также не было обнаружено шелушений, корок или трещин. Согласно оценке состояния кожи по стандартизированной дрейзовской шкале, в экспериментальной группе на протяжении всего 30-дневного периода наблюдения кожные реакции оставались в пределах 0–2 баллов, что соответствует минимальной или отсутствующей реакции на раздражение. В контрольной группе, где использовалась основа экстракта, также не было зафиксировано признаков раздражения.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что экстракт *Hedysarum semenowii*, применяемый в указанных дозировках и условиях, не вызывает местного раздражающего действия на кожу крыс, что подтверждает его безопасность в данном аспекте.

Аллергизирующее действие

В ходе исследования аллергизирующего действия экстракта *Hedysarum semenowii* у большинства морских свинок не было выявлено признаков раздражения или воспаления слизистой оболочки глаза на протяжении 28-дневного периода наблюдения. Однако у двух животных из экспериментальной группы было отмечено незначительное покраснение конъюнктивы, соответствующее 1 баллу по дрейзовской шкале: сосуды были расширены выше нормы, но без других проявлений раздражения. Эти изменения были временными и исчезали в течение 24 ч без последствий.

Прочие параметры, такие как отек (хемоз), выделения и состояние радужной оболочки, оставались в пределах нормы, как и у контроля. Радужная оболочка обрабатываемого глаза всех животных реагировала на свет, что свидетельствует об отсутствии серьезных повреждений или воспалительных процессов.

Таким образом, за исключением кратковременного покраснения у пары особей, экстракт *Hedysarum semenowii* не вызвал значительных аллергических реакций или раздражений, что подтверждает его безопасность в условиях данного эксперимента.

ОБСУЖДЕНИЕ

Данное исследование представляет комплексную оценку подострой токсичности, местного раздражающего и аллергенного потенциала экстракта *Hedysarum semenowii* на моделях грызунов. Пероральное введение экстракта в дозах до 5000 мг/кг в течение 28 дней не привело к смертности или значительным изменениям поведения. Стабильный вес тела, потребление воды и пищи во всех группах, а также отсутствие неблагоприятных клинических симптомов свидетельствуют о хорошей системной переносимости экстракта. Гистологические исследования выявили только легкие дозозависимые изменения, такие как синусоидальная закупорка и изменения эпителия канальцев, без признаков необратимого повреждения органов.

Вышеперечисленные результаты согласуются с предыдущими токсикологическими исследованиями растительных экстрактов других представителей семейства *Fabaceae*, обычно используемых в народной медицине [17–20]. Например, *Psoralea corylifolia* L. продемонстрировал отсутствие токсичности в исследованиях как острой, так и подострой токсичности на мышах и крысах [17]. Аналогичным образом повторное введение *Arachis hypogaea* L. не вызвало значительных физиологических и поведенческих изменений, за исключением незначительных сдвигов веса печени и почек, которые не сопровождались изменениями биохимических параметров [18].

Безопасность экстракта *H. semenowii* дополнительно подтверждается сравнениями с исследованиями видов, принадлежащих к роду *Astragalus* L., с которым часто сравнивают виды рода *Hedysarum* L. и считают примесями в составе растительных препаратов [21, 22]. Исследования *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. не показали значительных различий в гистологии органов, гематологических параметрах или клинических признаках токсичности как у крыс, так и у собак [19]. Кроме того, введение *A. membranaceus* и его политравяных препаратов крысам Sprague Dawley как в острый, так и в субхронический исследованиях не приводило к смертности или неблагоприятным клиническим признакам при дозах до 4000 мг/кг/день, несмотря на некоторые обратимые нежелательные реакции, которые оставались в физиологических пределах [20].

По сравнению с этими видами экстракт *H. semenowii* продемонстрировал аналогичный уровень, не вызывающий видимых отрицательных эффектов (NOAEL), что указывает на низкую токсичность. Более того, отсутствие местного раздражения кожи или

аллергических реакций конъюнктины в данном исследовании дополнительно подтверждает хорошую переносимость экстракта, что является ключевым соображением для разработки натуральных фармацевтических продуктов.

Умеренные гистопатологические реакции, наблюдаемые в печени и почках, такие как застой и очаговый некроз при самой высокой дозе, вероятно, представляют собой физиологическую адаптацию или временные клеточные реакции на компоненты экстракта, а не системную токсичность. Эта интерпретация согласуется с пороговыми значениями рекомендаций OECD¹ для приемлемых гистологических изменений в исследованиях подострой токсичности.

Учитывая растущий интерес к фитотерапии и зафиксированной фармакологической активности видов *Hedysarum* L. – антиоксидантной, иммуномодулирующей и гепатопротекторной [6], представленные данные по безопасности обеспечивают существенную основу для будущей оценки их фармакокинетики и хронической токсичности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Профиль безопасности экстракта копеечника Семенова был всесторонне изучен посредством серии неклинических исследований, включающих оценку подострой токсичности, а также местнораздражающего и аллергизирующего действия. Совокупные результаты этих исследований дают ценную информацию о потенциальных рисках, связанных с применением экстракта, и его пригодности для терапевтического применения.

Исследования по оценке подострой токсичности показали, что введение экстракта *Hedysarum semenowii* животным не приводило к проявлению токсичности или смертности. Легкие гистопатологические изменения в печени и почках, вероятно, указывают на временные адаптивные реакции на компоненты экстракта. Эти результаты попадают в приемлемый диапазон для подострых исследований, определенный руководящими принципами OECD. Отсутствие значительных неблагоприятных эффектов в отношении жизненно важных органов дополнительно подтверждает безопасность экстракта при использовании в терапевтических дозах.

Однако, несмотря на то, что результаты исследования подтверждают низкую подострую токсичность экстракта *Hedysarum semenowii* в диапазоне исследуемых доз, следует признать несколько ограничений. Поскольку проведенное исследование имеет ранний поисковый характер, дизайн был ограничен логисти-

ческими и аналитическими факторами. Отсутствие положительной контрольной группы и исключение функционального и гистологического анализа органов, кроме печени и почек, может ограничить надежность токсикологического сравнения и полноту профиля токсичности. Эти ограничения подчеркивают необходимость более обширных последующих исследований, включающих более широкие панели контрольных точек.

Оценка местнораздражающего и аллергизирующего действия подтвердила безопасность экстракта. Тесты, проведенные на крысах и морских свинках, не выявили признаков раздражения, воспаления или серьезных аллергических реакций при нанесении экстракта на кожу или конъюнктиву соответственно. Отсутствие аллергизирующих свойств, о чем свидетельствует отсутствие кожных и глазных нежелательных реакций, подчеркивает благоприятный профиль безопасности экстракта.

В совокупности результаты неклинических исследований свидетельствуют о том, что экстракт растения *Hedysarum semenowii* можно считать безопасным для применения в терапевтических целях. Отсутствие токсичности, смертности, местного раздражающего действия и аллергизирующих свойств подтверждает его перспективность как потенциального кандидата для использования в дальнейшей фармацевтической разработке.

Таким образом, комплексная оценка профиля безопасности экстракта копеечника Семенова позволила определить его потенциальную пригодность для терапевтического использования, закладывая основу для будущих исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- Builders P. F., editor. *Herbal Medicine*. London: IntechOpen; 2019. 314 p. DOI: 10.5772/intechopen.69412.
- Maung T. M., Deborah S., Tun A. A., Jian T. S., Subramaniam Y., Pillai J., Johnson J. Traditional medicine vs. modern medicine in rural area of Kedah State, Malaysia. *IOSR*. 2019;14(1):5–8.
- Wanjiru J. N., Maitho T. E., Mbaria J. M., Moriasi G. A. Subacute Toxicity Effects of the Aqueous Shoot Extract of *Yushania alpina* (K. Schum.) W. C. Lin in Sprague Dawley Rats: An Appraisal of Its Safety in Ethnomedicinal Usage. *Journal of Toxicology*. 2022;6283066. DOI: 10.1155/2022/6283066.
- Keleke A. S., Ibragimova L. N., Zhumashova G. T., Sabitova A. G., Sultanov E. Sh., Sakipova Z. B. Kazakh plant species of the genus *Hedysarum* L.: distribution, botanical description and profile of pharmacological activity. *Pharmacy of Kazakhstan*. 2023;3(248):297–306. DOI: 10.53511/pharmkaz.2023.74.33.045.
- Behera S., Kamila P. K., Rout K. K., Barik D. P., Panda P. C., Naik S. K. An efficient plant regeneration protocol of an industrially important plant, *Hedychium coronarium* J. Koenig and establishment of genetic & biochemical fidelity of the regenerants. *Industrial Crops and Products*. 2018;126:58–68. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.09.058.

¹ OECD. Test No. 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4. Available at: https://www.oecd.org/en/publications/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en.html. Accessed: 28.07.2025.

6. Gao X., Ren C., Li L., Zhao H., Liu K., Zhuang M., Lv X., Zhi X., Jiang H., Chen Q., Zhao X., Li Y. Pharmacological action of *Hedysarum polysaccharides*: a review. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1119224. DOI: 10.3389/fphar.2023.1119224.
7. Liu Y., Zhang J., Wen R., Tu G.-Z., Chen H.-B., Liang H., Zhao Y.-Y. Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated chalcones from *Hedysarum gmelinii*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2018;20(11):1009–1018. DOI: 10.1080/10286020.2018.1450390.
8. Vesnina A., Milentyeva I., Le V., Fedorova A., Altshuler O., Prosekov A. Quercetin isolated from *Hedysarum neglectum* Ledeb. as a preventer of metabolic diseases. *Foods and Raw Materials*. 2024;192–201. DOI: 10.21603/2308-4057-2025-1-633.
9. Cao J.-N., Han C.-R., Yang Y.-C. Characterization of the complete chloroplast genome of *Hedysarum polybotrys* var. *alaschanicum* (Fabaceae) and its phylogeny. *Mitochondrial DNA Part B*. 2021;6(11):3312–3313. DOI: 10.1080/23802359.2021.1994900.
10. Келеке А. С., Туруспаева Ж. Ж., Ибрагимова Л. Н. Исследование острой токсичности экстракта *Hedysarum semenowii* Regel & Herder extract. В сб.: Материалы XIV всероссийской научной конференции с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». 28 марта – 2 апреля 2024 г. Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет; 2024. С. 430–431.
11. Джумабаева А. М., Кожамжарова А. С., Ибрагимова Л. Н., Тернинко И. И., Сурбееева Е. С., Сакипова З. Б. Анализ этанольных извлечений корней *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. методом ГХ/МС. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2023;12(3):80–88 DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-80-88.
12. Кадыrbай А., Сакипова З. Б., Криштанова Н. А., Ибрагимова Л. Н., Ибраева М. Б., Сакипов А. Е., Бекболатова Э. Н., Ридванов Ч., Сермухамедова О. В., Адилбек Е., Сейдуали Т. Е., Анартаева А. Х., Казим А. Ю. Разработка оптимальной технологии сушки лекарственного растительного сырья из полыни осенней (*Artemisia serotina* Bunge) на основе сравнительного анализа. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2023;12(4):80–90. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1578.
13. Келеке А. С., Сакипова З. Б., Ибрагимова Л. Н., Туруспаева Ж. Ж. Способ получения растительного экстракта из травы копеечника Семенова (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder). Патент Республики Казахстан № 9815. 22.11.2024. Доступно по: <https://gosreestr.kz/UtilityModel/Details?docNumber=398329> Ссылка активна на 03.07.2025.
14. Миронова А. Н., ред. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012. 944 с.
15. Wilson S. L., Ahearne M., Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*. 2015;327:32–46. DOI: 10.1016/j.tox.2014.11.003.
16. Mochizuki H., Suyama S., Cha J. Y., Ho P.-S., Shimo A. Optimization of a histamine-induced allergic conjunctivitis model in Guinea pigs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2022;113:107133. DOI: 10.1016/j.vascn.2021.107133.
17. Uthirapathy S., Krishnasamy G., Periyasamy G., Elango-van R. Toxicity Profiles of the Hydroalcoholic Seed Extract of *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae) in Wistar Rats. *Medicina Balear*. 2022;37(3):120–126. DOI: 10.3306/AJHS.2022.37.03.120.
18. Cosselin J. F., Spring de Almeida A., de David Antoniazzi C. T., Qader Kudsi S., Martiele Engelmann A., Gaube Guex C., Sorraia de Oliveira J., Theisen M. C., Santos Ritter C., Henrique Doleski P., da Silva Brum E., Padilha Danelogare D., Spat Peres D., Guedes Pintos F., Melazzo de Andrade C., Bitencourt Rosa Leal D., Marchesan Oliveira S., de Freitas Bauermann L., Cougo Riéffel R., Rorato Sagrillo M., Kolinski Machado A., Soares Santos A. R., Trevisan G. Hydroalcoholic Extract of Leaf of *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) Did Not Induce Toxic Effects in the Repeated-Dose Toxicity Study in Rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020;115:104683. DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104683.
19. Yu S.-Y., OuYang H.-T., Yang J.-Y., Huang X.-L., Yang T., Duan J.-P., Cheng J.-P., Chen Y.-X., Yang Y.-J., Qiong P. Subchronic Toxicity Studies of *Radix Astragali* Extract in Rats and Dogs. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;110(2):352–355. DOI: 10.1016/j.jep.2006.09.024.
20. Song J., Lee D., Min B., Bae J.-S., Chang G. T., Kim H. Safety Evaluation of *Astragalus* Extract Mixture HT042 and Its Constituent Herbs in Sprague-Dawley Rats. *Phytomedicine*. 2017;32:59–67. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.03.005.
21. Zhang Y., Li Y., Bian T., Sun Y., Zhang Z., Liu T., Gao F., Wang Y., Cao R., Xin E., Yan X. *Hedysari Radix Praeparata Cum Melle* Repairs Impaired Intestinal Barrier Function and Alleviates Colitis-Associated Colorectal Cancer via Remodeling Gut Microbiota and Metabolism. *Journal of Functional Foods*. 2023;108:105748. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105748.
22. Zhang Y., Niu J., Zhang S., Si X., Bian T.-T., Wu H., Li D., Sun Y., Jia J., Xin E., Yan X., Li Y. Comparative Study on the Gastrointestinal- and Immune-Regulation Functions of *Hedysari Radix Praeparata Cum Melle* and *Astragali Radix Praeparata Cum Melle* in Rats with Spleen-Qi Deficiency Based on fuzzy matter-element analysis. *Pharmaceutical Biology*. 2022;60(1):1237–1254. DOI: 10.1080/13880209.2022.2086990.

REFERENCES

1. Builders P. F., editor. *Herbal Medicine*. London: IntechOpen; 2019. 314 p. DOI: 10.5772/intechopen.69412.
2. Maung T. M., Deborah S., Tun A. A., Jian T. S., Subramaniam Y., Pillai J., Johnson J. Traditional medicine vs. modern medicine in rural area of Kedah State, Malaysia. *IOSR*. 2019;14(1):5–8.
3. Wanjiru J. N., Maitho T. E., Mbaria J. M., Moriasi G. A. Subacute Toxicity Effects of the Aqueous Shoot Extract of *Yushania alpina* (K. Schum.) W. C. Lin in Sprague Dawley Rats: An Appraisal of Its Safety in Ethnomedicinal Usage. *Journal of Toxicology*. 2022;6283066. DOI: 10.1155/2022/6283066.
4. Keleke A. S., Ibragimova L. N., Zhumashova G. T., Sabitova A. G., Sultanov E. Sh., Sakipova Z. B. Kazakh plant species of the genus *Hedysarum* L.: distribution, botanical description and profile of pharmacological activity. *Pharmacy of Kazakhstan*. 2023;3(248):297–306. DOI: 10.53511/pharmkaz.2023.74.33.045.

5. Behera S., Kamila P.K., Rout K.K., Barik D.P., Panda P.C., Naik S.K. An efficient plant regeneration protocol of an industrially important plant, *Hedychium coronarium* J. Koenig and establishment of genetic & biochemical fidelity of the regenerants. *Industrial Crops and Products*. 2018;126:58–68. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.09.058.
6. Gao X., Ren C., Li L., Zhao H., Liu K., Zhuang M., Lv X., Zhi X., Jiang H., Chen Q., Zhao X., Li Y. Pharmacological action of *Hedysarum* polysaccharides: a review. *Frontiers in Pharmacology*. 2023;14:1119224. DOI: 10.3389/fphar.2023.1119224.
7. Liu Y., Zhang J., Wen R., Tu G.-Z., Chen H.-B., Liang H., Zhao Y.-Y. Anti-inflammatory and antiproliferative prenylated chalcones from *Hedysarum gmelinii*. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2018;20(11):1009–1018. DOI: 10.1080/10286020.2018.1450390.
8. Vesnina A., Milentyeva I., Le V., Fedorova A., Altshuler O., Prosekov A. Quercetin isolated from *Hedysarum neglectum* Ledeb. as a preventer of metabolic diseases. *Foods and Raw Materials*. 2024;192–201. DOI: 10.21603/2308-4057-2025-1-633.
9. Cao J.-N., Han C.-R., Yang Y.-C. Characterization of the complete chloroplast genome of *Hedysarum polybotrys* var. *alaschanicum* (Fabaceae) and its phylogeny. *Mitochondrial DNA Part B*. 2021;6(11):3312–3313. DOI: 10.1080/23802359.2021.1994900.
10. Keleke A. S., Turuspaeva Zh. Zh., Ibragimova L. N. The study of acute toxicity of *Hedysarum semenowii* Regel & Herder extract. In: The XIV All-Russian scientific conference with international participation "Young pharmacy – the potential of the future". March 28 – April 2, 2024. St. Petersburg: Saint Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University; 2024. P. 430–431. (In Russ.)
11. Jumabayeva A. M., Kozhamzharova A. S., Ibragimova L. N., Terninko I. I., Surbeeva E. S., Sakipova Z. B. Screening of the Alcohol Fraction of *Ferula akitschkensis* B. Fedtsch. ex Koso-Pol. by GC/MS Method. *Drug development & registration*. 2023;12(3):80–88. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-3-80-88.
12. Kadyrbay A., Sakipova Z. B., Krishtanova N. A., Ibragimova L. N., Ibrayeva M. B., Sakipov A. E., Bekbolatova E. N., Ridvanov Ch., Sermukhamedova O. V., Adilbek Y., Seidali T. Y., Anartayeva A. K., Kazim A. U. Development of Optimal Technology for Drying Herbal Medicinal Raw Materials from Autumn Wormwood (*Artemisia serotina* Bunge) Based on Comparative Analysis. *Drug development & registration*. 2023;12(4):80–90. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-4-1578.
13. Keleke A. S., Sakipova Z. B., Ibragimova L. N., Turuspaeva Zh. Zh. Method for obtaining a plant extract from the grass of the Semenov's kopeck (*Hedysarum semenowii* Regel & Herder). Patent of the Republic of Kazakhstan No. 9815. 22.11.2024. Available at: <https://gosreestr.kz/Utilitymodel/Details?docNumber=398329/> Accessed: 03.07.2025. (In Russ.)
14. Mironova A. N. Guidelines for conducting preclinical studies of medicines. Part 1. Moscow: Grif i K; 2012. 944 p. (In Russ.)
15. Wilson S. L., Ahearn M., Hopkinson A. An overview of current techniques for ocular toxicity testing. *Toxicology*. 2015;327:32–46. DOI: 10.1016/j.tox.2014.11.003.
16. Mochizuki H., Suyama S., Cha J. Y., Ho P.-S., Shimoi A. Optimization of a histamine-induced allergic conjunctivitis model in Guinea pigs. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2022;113:107133. DOI: 10.1016/j.vascn.2021.107133.
17. Uthirapathy S., Krishnasamy G., Periyasamy G., Elango-van R. Toxicity Profiles of the Hydroalcoholic Seed Extract of *Psoralea corylifolia* L. (Fabaceae) in Wistar Rats. *Medicina Balear*. 2022;37(3):120–126. DOI: 10.3306/AJHS.2022.37.03.120.
18. Cossetin J. F., Spring de Almeida A., de David Antoniazzi C. T., Qader Kudsi S., Martiele Engelmann A., Gaube Gueix C., Soraila de Oliveira J., Theisen M. C., Santos Ritter C., Henrique Doleski P., da Silva Brum E., Padilha Danelogare D., Spat Peres D., Guedes Pintos F., Melazzo de Andrade C., Bitencourt Rosa Leal D., Marchesan Oliveira S., de Freitas Bauermann L., Cougo Riéffel R., Rorato Sagrillo M., Kolinski Machado A., Soares Santos A. R., Trevisan G. Hydroalcoholic Extract of Leaf of *Arachis hypogaea* L. (Fabaceae) Did Not Induce Toxic Effects in the Repeated-Dose Toxicity Study in Rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2020;115:104683. DOI: 10.1016/j.yrtph.2020.104683.
19. Yu S.-Y., OuYang H.-T., Yang J.-Y., Huang X.-L., Yang T., Duan J.-P., Cheng J.-P., Chen Y.-X., Yang Y.-J., Qiong P. Subchronic Toxicity Studies of *Radix Astragali* Extract in Rats and Dogs. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007;110(2):352–355. DOI: 10.1016/j.jep.2006.09.024.
20. Song J., Lee D., Min B., Bae J.-S., Chang G. T., Kim H. Safety Evaluation of *Astragalus* Extract Mixture HT042 and Its Constituent Herbs in Sprague-Dawley Rats. *Phytomedicine*. 2017;32:59–67. DOI: 10.1016/j.phymed.2017.03.005.
21. Zhang Y., Li Y., Bian T., Sun Y., Zhang Z., Liu T., Gao F., Wang Y., Cao R., Xin E., Yan X. *Hedysari Radix Praeparata Cum Melle* Repairs Impaired Intestinal Barrier Function and Alleviates Colitis-Associated Colorectal Cancer via Remodeling Gut Microbiota and Metabolism. *Journal of Functional Foods*. 2023;108:105748. DOI: 10.1016/j.jff.2023.105748.
22. Zhang Y., Niu J., Zhang S., Si X., Bian T.-T., Wu H., Li D., Sun Y., Jia J., Xin E., Yan X., Li Y. Comparative Study on the Gastrointestinal- and Immune-Regulation Functions of *Hedysari Radix Praeparata Cum Melle* and *Astragali Radix Praeparata Cum Melle* in Rats with Spleen-Qi Deficiency Based on fuzzy matter-element analysis. *Pharmaceutical Biology*. 2022;60(1):1237–1254. DOI: 10.1080/13880209.2022.2086990.