

## ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЙ ПРОФИЛЬ ПРЕПАРАТА АИМПИЛА В ХРОНИЧЕСКОМ ЭКСПЕРИМЕНТЕ НА КРЫСАХ

И.Д. Трещалин<sup>1</sup>, В.А. Голибродо<sup>1</sup>, М.И. Трещалин<sup>1</sup>, Н.В. Еремкин<sup>1</sup>, С.А. Цуркан<sup>2</sup>, Э.Р. Переверзева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБНУ «Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе»;

Россия, 119021 Москва, ул. Большая Пироговская, 11, стр. 1;

<sup>2</sup>ООО «Фармацевтический научный центр «ФармАксесс»»; Россия, 127322 Москва, ул. Милашенкова, 10, оф. 195

**Контакты:** Василиса Антоновна Голибродо vasilisa2006@gmail.com

**Введение.** Лекарственная терапия злокачественных опухолей, как правило, сопряжена с развитием побочных эффектов различной степени тяжести. Это связано с недостаточной избирательностью действия противоопухолевых агентов и, как следствие, высокой неспецифической токсичностью. Один из путей решения этой проблемы — создание таргетных лекарственных средств, обеспечивающих доставку активного агента непосредственно к опухолевым клеткам. В последние десятилетия были проведены многочисленные экспериментальные и клинические исследования таргетных препаратов, но только единицы из них продемонстрировали эффективность в клинической практике. Это обуславливает необходимость дальнейших поисков в этом направлении.

**Цель исследования** — выявление токсических свойств препарата аимпила, их зависимости от величины дозы и обратимости.

**Материалы и методы.** На беспородных крысах (самках и самцах) проведено токсикологическое изучение противоопухолевого препарата аимпила, разработанного в ООО «ФНЦ «ФармАксесс». Аимпила представляет собой нековалентный комплекс альфа-фетопротейна с атрактилозидом. Препарат в виде взвеси капсульной массы в крахмальном геле вводили перорально в 1 и 10 терапевтических дозах (0,1 и 1 мг/кг ежедневно в течение 30 сут). В ходе исследования определяли массу тела, проводили клинический и биохимический анализы крови, анализ мочи, снимали электрокардиограмму. На 1-е и 30-е сутки по окончании курса по 5 животных из каждой группы подвергали эвтаназии.

**Результаты.** Показано, что применение аимпила не оказывает влияния на изученные клинико-лабораторные показатели состояния животных. Гепато-, нефро-, кардио-, панкреа- и гастроинтестинальная токсичность проявляются только при патоморфологическом исследовании органов животных, получавших высокую дозу препарата. Повреждения печени, найденные при микроскопическом изучении, подтверждаются результатами биохимического анализа сыворотки крови, который выявил значимое увеличение уровня аспаратаминоминотрансферазы. Обнаруженные изменения обратимы в течение 30 дней.

**Выводы.** В целом из результатов работы следует, что лекарственная форма аимпила имеет благоприятный токсикологический профиль. Зависимость повреждающего действия препарата от величины примененной дозы и обратимость токсических эффектов позволяют рекомендовать изученную лекарственную форму аимпила для дальнейшего продвижения.

**Ключевые слова:** аимпила, альфа-фетопротейн, атрактилозид, хроническая токсичность, крысы

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-3-79-85

### TOXICOLOGICAL PROFILE OF AIMPILA DRUG IN CHRONIC EXPERIMENT ON RATS

I.D. Treshchalin<sup>1</sup>, V.A. Golibrodo<sup>1</sup>, M.I. Treshchalin<sup>1</sup>, N.V. Eremkin<sup>1</sup>, S.A. Tsurkan<sup>2</sup>, E.R. Pereverzeva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>G.F. Gause Institute of New Antibiotics; 11 Bldg. 1 Bol'shaya Pirogovskaya St., Moscow 119021, Russia;

<sup>2</sup>Pharmaceutical Scientific Center "PharmAccess" Ltd.; of. 195, 10 Milashenkova St., Moscow 127322, Russia

**Introduction.** As a rule, pharmacotherapy of neoplastic diseases is associated with side effects varying degrees of severity. This is determined by the insufficient selective action of antitumor agents and, as a result, high nonspecific toxicity. One way to solve this problem is the development of the targeted drugs, delivered the active agent to the tumor cells. Over the past decades many experimental and clinical studies were undertake, but only few of them have demonstrated clinical efficacy of targeted drugs. This determines the necessity of further search in this direction.

**Objective:** to investigate the toxicity of aimpila, its correlation with dose and reversibility.

**Materials and methods.** Toxicological study of aimpila, developed by Pharmaceutical Scientific Center "PharmAccess" Ltd. (Moscow), was performed in male and female outbred rats. Aimpila is atractyloside alpha-fetoprotein noncovalent complex. Capsule mass of the drug in starch gel was administrated per os at the 1 and 10 therapeutic dose ( $30 \times 0.1$  mg/kg or  $30 \times 1$  mg/kg with 24-h interval). Dynamics of body weight, hematological parameters, blood biochemical parameters, electrocardiography and urinalysis were performed for all animals. 5 animals in each group were sacrificed 1 and 30 days post treatment.

**Results.** The results of the study demonstrate that the treatment with aimpila does not produce any changes in examined clinical-labora-

tory parameters. Liver, renal, cardio, pancreatic and gastrointestinal toxicity of aimpila have been documented by microscopic pathology observation only in groups of rats, treated with high dose of drug. Histopathological findings of hepatotoxicity were supported by the results of clinical chemistry. Marked elevation of aspartate aminotransferase in serum was found after high dose aimpila treatment. These abnormalities were reversible during a month.

**Conclusion.** The overall result of this study suggests the aimpila formulation has favorable toxicological profiles. Dose dependence and reversibility of toxic effects allows us to recommend it to further advance.

**Key words:** aimpila, alpha-fetoprotein, atractyloside, chronic toxicity, rats

## Введение

Лекарственная терапия злокачественных опухолей, как правило, сопряжена с развитием побочных эффектов различной степени тяжести. Это связано с недостаточной избирательностью действия противоопухолевых агентов и, как следствие, высокой неспецифической токсичностью. Один из путей решения этой проблемы — создание таргетных лекарственных средств, обеспечивающих доставку активного агента непосредственно к опухолевым клеткам. Несмотря на то что в последние десятилетия были проведены многочисленные экспериментальные и клинические исследования таргетных препаратов, основанных на различных принципах направленной доставки цитотоксических веществ к клеткам-мишеням, лишь единицы из них продемонстрировали эффективность в клинической практике, что обуславливает необходимость дальнейших поисков в этом направлении.

В ООО «ФНЦ «ФармАксесс»» разработан таргетный противоопухолевый препарат аимпила, в котором в качестве средства направленной доставки используется альфа-фетопропротеин (АФП) [1]. Выбор АФП в данном случае обусловлен как имеющимся положительным опытом его применения для лечения опухолей, клетки которых несут рецепторы к АФП на своей поверхности, так и его свойствами транспортного белка, способного образовывать нековалентные комплексы с различными биологически активными веществами [2–5]. Так, при создании препарата аимпила был получен нековалентный комплекс АФП с атрактилозидом (АТР) — природным гликозидом, выделенным из растения *Atractylis gummifera*. Механизм цитотоксического действия АТР связан с воздействием на митохондриальную функцию клеток [6, 7], вызывающим их апоптоз. В экспериментах на сингенных перевиваемых опухолях продемонстрирована высокая противоопухолевая активность комплекса. Для дальнейшего продвижения аимпила необходимо изучение ее токсических свойств.

## Материалы и методы

Изучение хронической токсичности препарата аимпила было проведено на 60 неинбредных кры-

сах — самцах и самках массой тела 150–180 г. После 2-недельного карантина было сформировано 6 групп животных (по 3 группы самцов и самок) по 10 особей. Крысам экспериментальных групп перорально вводили взвесь капсульной массы аимпила в 1 % крахмальном геле в течение 30 дней с интервалом 24 ч. Была использована капсульная масса следующего состава: 0,001 г субстанции аимпила; 0,02 г лактозы; 0,112 г микрокристаллической целлюлозы 102; 0,007 г кремния диоксида коллоидного. Разовые дозы, эквивалентные 1 и 10 терапевтическим дозам, составляли 0,1 и 1 мг/кг соответственно. Величина терапевтической дозы для крыс была получена при пересчете с эффективной терапевтической дозы для мышей с использованием  $k_m$ -фактора.

Клинико-лабораторные и патоморфологические исследования проводили в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8]. Перед началом введения определяли фоновые показатели (массу тела, клинический анализ крови). На протяжении всего эксперимента наблюдали за состоянием и поведением животных, регистрировали изменения массы тела. Гематологическое исследование производили на 1, 8 и 16-й дни во время курса и на 1, 3, 5, 7, 10, 20 и 30-е сутки после окончания курса введений препарата. Кровь брали из хвостовой вены и при помощи автоматического гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Diatron, Австрия) устанавливали количество лейкоцитов, эритроцитов, гемоглобина, тромбоцитов, лейкоцитарную формулу, величину гематокрита. На 1-й и 30-й дни по окончании курса введений с помощью автоматического биохимического анализатора ChemWell (Awareness Technology, Inc., США) в сыворотке крови определяли уровни аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), щелочной фосфатазы, креатинина, мочевины, билирубина (прямого и общего), общего белка, альбумина, глюкозы. На 1-й и 30-й дни после курса введений, используя электрокардиограф ЭК1Т-07 («Аксион», Россия), регистрировали электрокардиограмму во II стандартном отведении, определяли суточный диурез и осуществляли клинический анализ мочи (рН, лейкоциты, эритроциты, кетоновые тела, белок, уробилиноген, удельный вес, глюкоза,

нитраты) с использованием автоматического анализатора мочи Laura Smart (Erba Lachema, Чехия).

Половину животных из каждой группы подвергали эвтаназии на 1-е сутки после окончания курса, остальных — спустя 30 сут после окончания курса. Животных обследовали на предмет внешних патологических признаков. На вскрытии проводили макроскопическое исследование состояния органов грудной и брюшной полости. Сердце, печень, почку, селезенку, тимус взвешивали при помощи весов CE153-C («Сартогосм», Россия) и определяли их массовые коэффициенты.

Для патоморфологического исследования были взяты печень, почки, сердце, легкие, желудок, все отделы кишечника, поджелудочная и щитовидная железы, надпочечник, мочевой пузырь, тимус, селезенка, лимфатические узлы, у самцов — семенник, у самок — матка и яичник. Участки органов фиксировали в 10 % нейтральном формалине, по стандартной методике заливали в парафин, гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Все полученные количественные данные подвергали статистической обработке при помощи компьютерных программ StatPlus 2006 и Microsoft Excel с использованием критерия *t* Фишера–Стьюдента. Отличия считали достоверными при  $p \leq 0,05$ .

### Результаты

Токсикологическое исследование показало, что ежедневное пероральное введение аимпилы в течение 30 дней в дозах, эквивалентных 1 и 10 терапевтическим, хорошо переносится животными, не вызывает их гибели. Изученные клинико-лабораторные показатели на протяжении всего исследования оставались в пределах физиологической нормы и не отличались от контроля. Даже при превышении терапевтической дозы в 10 раз никаких клинических проявлений гемато-, нефро- и кардиотоксичности обнаружено не было.

У крыс, получавших аимпилу в разовой дозе, 10-кратно превышающей терапевтическую, при биохимическом исследовании сыворотки крови на 1-е сутки по окончании курса введений препарата были выявлены признаки гепатотоксичности в виде увеличения активности АСТ (рис. 1). На этом же сроке наблюдения при патоморфологическом исследовании были обнаружены изменения в ткани печени в виде микронекрозов, мелких кровоизлияний, белковой и жировой дистрофии небольших групп гепатоцитов (рис. 2). К концу эксперимента уровень АСТ возвращался к нормальным значениям, структура печени восстанавливалась.

Патоморфологическое исследование также показало, что при 10-кратном превышении терапевтической дозы препарат вызывает повреждения разной

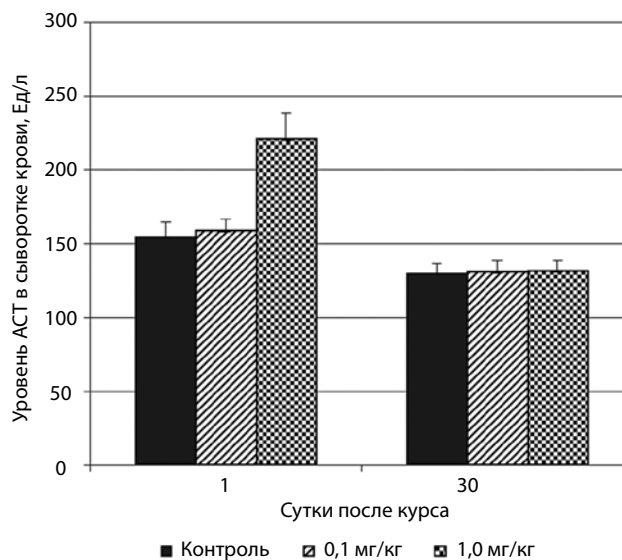


Рис. 1. Активность АСТ в сыворотке крови самцов крыс на 1-е и 30-е сутки после курса введений аимпилы

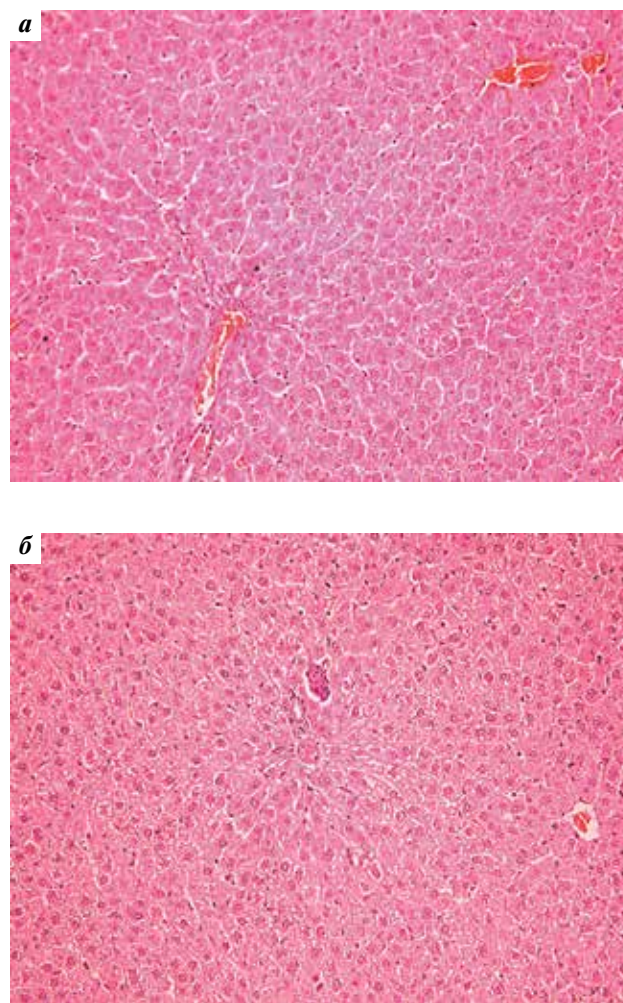


Рис. 2. Печень ( $\times 20$ ): а — интактный контроль; б — аимпила 1 мг/кг  $\times 30$  сут, 1-е сутки после курса введений: очаг микронекроза вблизи триады



степени выраженности в тканях почек, сердца, желудка и поджелудочной железы.

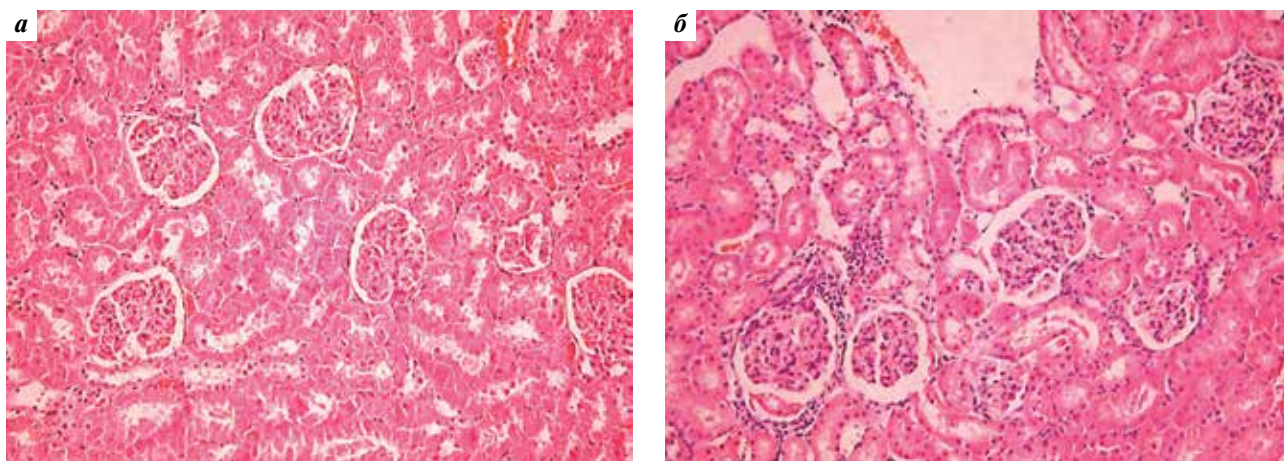
Хотя показатели суточного диуреза, состав мочи, уровень креатинина и мочевины в сыворотке крови не изменялись, 10-кратное превышение терапевтической дозы приводило к возникновению повреждений структуры почек. На 1-е сутки после окончания введений препарата в корковой и юкстамедуллярной зонах почек были обнаружены периваскулярный отек, дистрофические и деструктивные изменения эпителия извитых канальцев (рис. 3). Деструктивным процессам подвергались и отдельные клубочки, повреждение которых завершалось рубцеванием.

Повреждающее действие аймпилы на структуру сердечной мышцы проявлялось только у отдельных животных, получавших препарат в разовой дозе, 10-кратно превышающей терапевтическую. Оно выражалось в появлении единичных небольших очагов отека интерстиция, в области которого

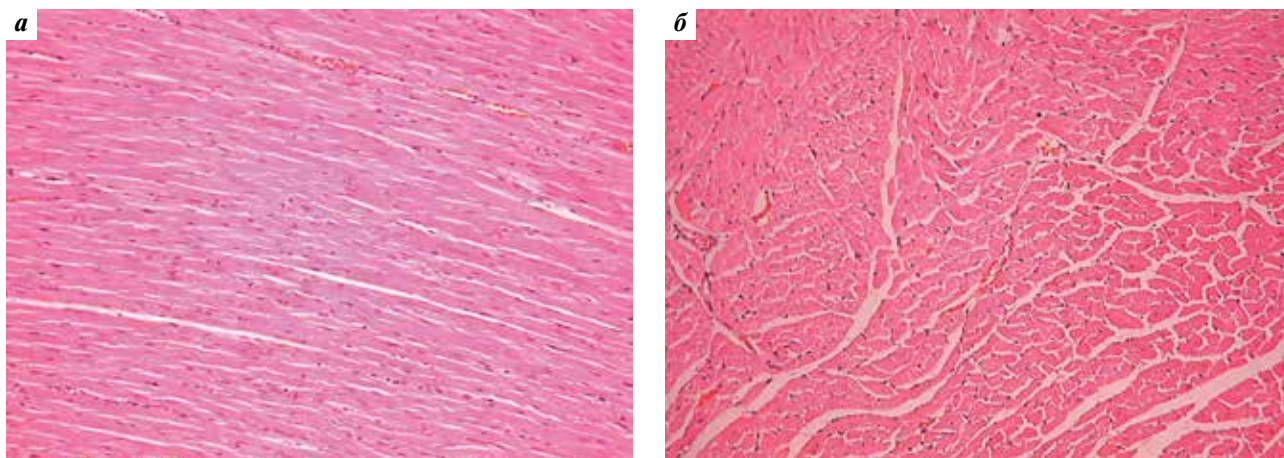
кардиомиоциты имели признаки токсической кардиомиопатии (рис. 4). В течение 30 дней происходило полное восстановление структуры миокарда.

При курсовом применении аймпилы в высокой дозе у 2 крыс сразу по окончании курса введений были обнаружены признаки панкреатоксического действия в виде резкого полнокровия капилляров в островках Лангерганса (рис. 5). У отдельных животных в части островков были найдены кровоизлияния. Через 30 дней после окончания введений у 1 самца был обнаружен очаг некроза вблизи крупного протока.

Ежедневное пероральное применение аймпилы в течение 30 дней в обеих изученных дозах вызывало местно-тканевые реакции в слизистой оболочке желудка. При курсовом применении препарата в однократной терапевтической дозе морфологические изменения слизистой оболочки были умеренно выражены и обратимы. Десятикратное превышение терапевтической дозы приводило к возникновению



**Рис. 3.** Почка ( $\times 20$ ): а — интактный контроль; б — юкстамедуллярная зона, аймпил 1 мг/кг  $\times$  30 сут, 1-е сутки после курса: сильный периваскулярный отек, резкое расширение просвета капсулы клубочков, очаги деструкции извитых канальцев



**Рис. 4.** Миокард ( $\times 20$ ): а — интактный контроль; б — аймпил 1 мг/кг  $\times$  30 сут, 1-е сутки после курса: умеренный отек интерстиция, очаги токсической кардиомиопатии



атрофических и деструктивных изменений покровно-ямочного эпителия и эпителия желез (рис. 6). У отдельных животных повреждения эпителия желез завершались формированием кист либо склерозированием очагов деструкции.

### Обсуждение

Фармацевтическая субстанция аймпилла представляет собой нековалентный комплекс АФП и АТР — гликозида растительного происхождения. Многочисленные экспериментальные исследования, проведенные на крысах, кроликах и обезьянах, продемонстрировали, что АФП является безопасным соединением [9]. Длительное (до 3 мес) ежедневное внутривенное, подкожное или внутрибрюшинное введение АФП в дозах, значительно превышающих терапевтические, не вызывало у животных каких-либо токсических реакций. Так, при подкожном введении препарата приматам

в дозах, 100- и 1000-кратно превышающих терапевтическую, не удалось обнаружить изменений клеточного состава периферической крови, структуры и функции сердечно-сосудистой системы, печени, почек, щитовидной железы и коры надпочечников [9].

Напротив, АТР является высокотоксичным соединением. Попытки использования АТР в терапии злокачественных новообразований связаны с его способностью как к угнетению окислительного фосфорилирования [10, 11], так и к ингибированию анаэробного гликолиза [12–14], что в совокупности приводит к энергетическому истощению и последующему апоптозу опухолевых клеток. Однако выраженные нефротоксические свойства соединения препятствовали его использованию в качестве лекарственного средства. Даже однократное внутрибрюшинное введение АТР крысам в дозе, составляющей 1/3 от расчетной дозы, вызывающей гибель 50 % животных

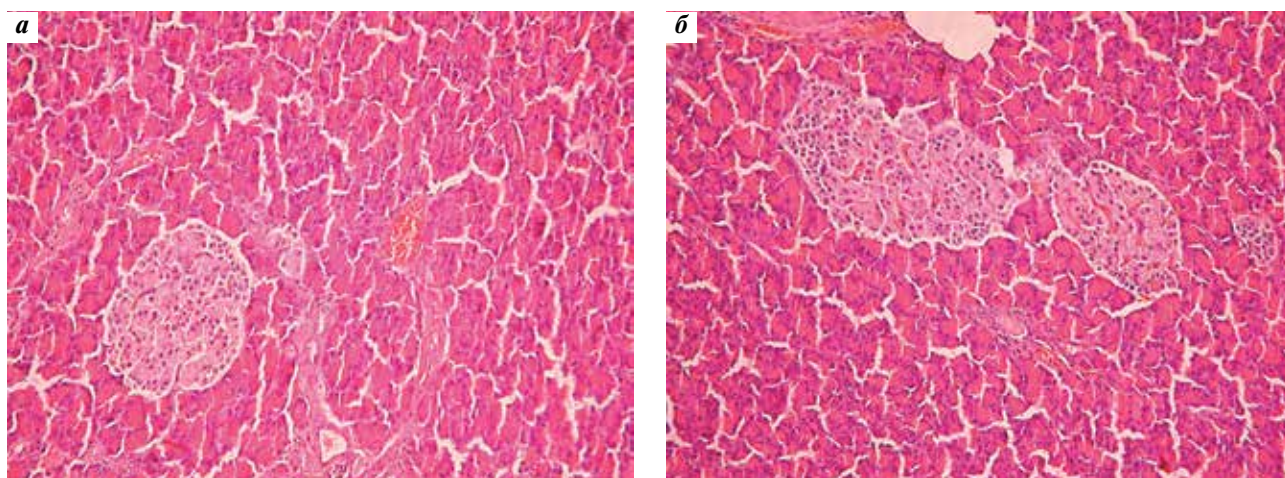


Рис. 5. Поджелудочная железа ( $\times 20$ ): а — интактный контроль; б — аймпилла 1 мг/кг  $\times 30$  сут, 1-е сутки после курса: полнокровие капилляров в островке

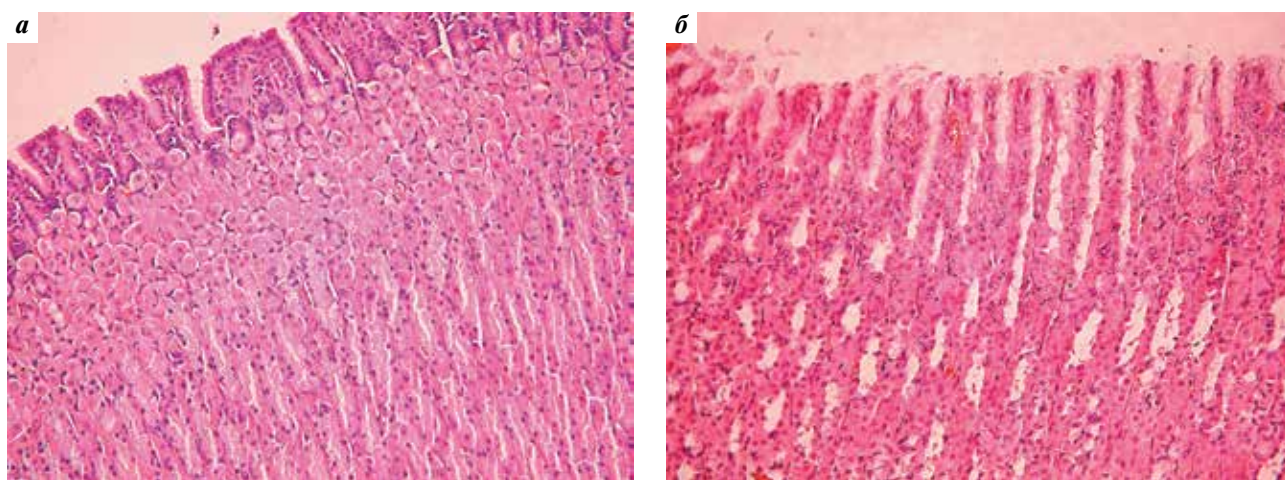


Рис. 6. Желудок ( $\times 20$ ): а — интактный контроль; б — аймпилла 1 мг/кг  $\times 30$  сут, 1-е сутки после курса: атрофия эпителия желез с замещением клетками покровно-ямочного эпителия, просвет желез резко расширен

(ЛД<sub>50</sub>), приводило к повреждению структуры и функции почек [15]. Уже через 180 мин после введения возникал тубулярный некроз клеток дистального отдела проксимальных канальцев, который сопровождался увеличением количества выделенной мочи, повышенной экскрецией альбуминов, глюкозы, кетоновых тел и повышением содержания калия в моче. При биохимическом анализе сыворотки крови было выявлено увеличение содержания мочевины в 3 раза и небольшое повышение уровня креатинина. Прямое повреждающее действие на ткань почек было установлено и в экспериментах на собаках [16].

Данные литературы о влиянии АТР на структуру и функцию печени экспериментальных животных при парентеральном применении противоречивы. Так, F. Carpenedo и соавт., изучая токсичность АТР на крысах, не обнаружили у него гепатотоксических свойств [15], тогда как другими авторами в экспериментах на крысах и мышах были получены данные о гепатотоксическом действии соединения [17, 18]. У мышей при хроническом внутрибрюшинном введении АТР патологические изменения в ткани печени сопровождались значительным повышением активности АЛТ, АСТ и щелочной фосфатазы в сыворотке крови [18].

Токсические эффекты, возникающие при употреблении АТР внутрь, были описаны при отравлении людей и домашних животных *Atractylis gummifera* и другими растениями, содержащими этот гликозид [7]. Гибель людей наступала на фоне гипогликемической комы, которая сопровождалась острой печеночной недостаточностью [19–21]. У людей, выживших после отравления, при биопсии печени были выявлены центрлобулярные некрозы и жировая дистрофия гепатоцитов, расположенных по периферии печеночных долек [21], повышение активности АСТ и лактатдегидрогеназы в крови в 5–10 раз [22]. Во многих случаях некротические изменения были найдены не только в печени, но и в почках [5, 23, 24]. Некрозу подвергались как извитые канальцы, так и канальцы петли Генле [21].

Выявленные в данном исследовании токсические свойства фармацевтической субстанции аймпилы, проявляющиеся при значительном превышении терапевтической дозы препарата, по-видимому, не свя-

заны с токсичностью АФП, а определяются свойствами АТР. В целом результаты, характеризующие нефро- и гепатотоксичность аймпилы, согласуются с данными литературы о морфофункциональных изменениях, возникающих в печени и почках под действием АТР. Слабо выраженные кардиотоксические свойства аймпилы проявлялись у отдельных животных только морфологически. По данным экспериментальных исследований, применение АТР не оказывает влияния на сердце. Отсутствие повреждений структуры сердца и метаболических изменений в нем авторы объясняют тем, что АТР не проникает в кардиомиоциты [15]. Однако в отдельных клинических наблюдениях приводятся патофизиологические признаки повреждения миокарда, которые объясняются токсическим воздействием АТР на реактивность сосудов сердца [25]. Проявление кардиотоксичности аймпилы, по нашему мнению, может быть связано как с изменением биодоступности АТР, примененного в данной лекарственной форме, так и с его влиянием на сократительную способность гладкомышечных клеток стенки артерий миокарда [25].

С изменением реактивности сосудистой системы под действием АТР могут быть связаны и единичные случаи нарушения гемодинамики в поджелудочной железе при длительном применении аймпилы в высокой дозе.

Таким образом, разработанная лекарственная композиция позволила нивелировать тяжелые побочные эффекты цитотоксического компонента препарата и создать новое противоопухолевое средство, которое можно отнести к малотоксичным соединениям.

### Заключение

Из результатов работы следует, что курсовое применение препарата в терапевтической дозе не оказывает влияния на структуру и функцию основных органов и систем крыс. При значительных передозировках возможно возникновение явлений гепато-, нефро-, кардио- и панкреатотоксичности. Зависимость повреждающего действия препарата от величины примененной дозы и обратимость токсических эффектов позволяют рекомендовать изученную лекарственную форму аймпилы для дальнейшего изучения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Biological activities of alpha-fetoprotein. Vol. 1. Ed. by G.J. Mezejewsky, H.J. Jakobson. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1987. Pp. 3–19.
2. Абелев Г.И. 25 лет изучения  $\alpha$ -фетопротеина. Онтогенез 1989;20(6):607–15.
3. Решетников С.С. Иммуноферментный анализ альфа-фетопротейна, использование в диагностике заболеваний человека. В сб.: Диагностическая значимость выявления маркеров фетоплацентарного комплекса в контроле
- развития беременности и онкозаболеваний. Кольцово, 2005. С. 9–30.
4. Эренпрейс Я.Г. Эмбриональные свойства опухолевых клеток: факты и гипотезы. Экспериментальная онкология 1982;4(6):13–8.

5. Neame P.B., Pillay V.K. Spontaneous hypoglycaemia, hepatic and renal necrosis following the intake of herbal medicines. *S Afr Med J* 1964;38:729–32. PMID: 14208883.
6. Klingenberg M., Grebe K., Scherer B. The binding of atractylate and carboxy-atractylate to mitochondria. *Eur J Biochem* 1975;52(2):351–63. PMID: 1175588.
7. Stewart M.J., Steenkamp V. The biochemistry and toxicity of atractyloside: a review. *Ther Drug Monit* 2000;22(6):641–9. PMID: 11128230.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К., 2012. Ч. 1. С. 13–24.
9. Черешнев В.А., Родионов С.Ю., Черкасов В.А. и др. Альфа-фетопротеин. Екатеринбург, 2004. С. 104–19.
10. Bruni A., Contessa A., Luciani S. Atractyloside as an inhibitor of energy transfer reactions in liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1962;60:301–11. PMID: 6552848.
11. Bruni A., Luciani S., Bortignon C. Competitive reversal by adenine nucleotides of atractyloside effect on mitochondrial energy transfer. *Biochim Biophys Acta* 1965;97:434–41. PMID: 14323588.
12. Obatomi D.K., Bach P.H. Atractyloside nephrotoxicity: *in vitro* studies with suspensions of rat renal fragments and precision-cut cortical slices. *In Vitro Mol Toxicol* 2000;13(1):25–36. PMID: 10900405.
13. Obatomi D.K., Thanh N.T., Brant S., Bach P.H. The toxic mechanism and metabolic effects of atractyloside in precision-cut pig kidney and liver slices. *Arch Toxicol* 1998;72(8):524–30. PMID: 9765068.
14. Pocciari F., Silano V. Effect of atractyloside on glucose and pyruvate metabolism in rat diaphragm muscle. *Biochem J* 1968;107(2):305–9. PMID: 5641884.
15. Carpenedo F., Luciani F., Scaravilli F. et al. Nephrotoxic effect of atractyloside in rats. *Arch Toxicol* 1974;32(3):169–80. PMID: 4479740.
16. Koechel D.A., Krejci M.E. Extrarenal and direct renal actions of atractyloside contribute to its acute nephrotoxicity in pentobarbital-anesthetized dogs. *Toxicology* 1993;79(1):45–66. PMID: 8475499.
17. Hedili A., Warnet J., Thevenin M. et al. Biochemical investigation of *Atractylis gummifera* L. hepatotoxicity in the rat. *Arch Toxicol Suppl* 1989;13:312–5. PMID: 2774952.
18. Wang Y., Han T., Xue L.M. et al. Hepatotoxicity of kaurene glycosides from *Xanthium strumarium* L. fruits in mice. *Pharmazie* 2011;66(6):445–9. PMID: 21699085.
19. Bhoola K.A. Clinico-pathologic and biochemical study of the toxicity of *Callilepis laureola* (Impila) [M. D.]. Durban: University of Natal, 1983. Pp. 28–33.
20. Hamouda C., Hédhili A., Ben Salah N. et al. A review of acute poisoning from *Atractylis gummifera* L. *Vet Hum Toxicol* 2004;46(3):144–6. PMID: 15171492.
21. Wainwright J., Schonland M.M. Toxic hepatitis in black patients in natal. *S Afr Med J* 1977;51(17):571–3. PMID: 867172.
22. Watson A.R., Coovadia H.M., Bhoola K.D. The clinical syndrome of Impila (*Callilepis laureola*) poisoning in children. *S Afr Med J* 1979;55(8):290–2. PMID: 441880.
23. Obatomi D.K., Bach P.H. Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside. *Food Chem Toxicol* 1998;36(4):335–46. PMID: 9651051.
24. Seedat Y.K., Hitchcock P.J. Acute renal failure from *Callilepis laureola*. *S Afr Med J* 1971;45(30):832–3. PMID: 5128528.
25. Song R., Bian H., Huang X., Zhao K.S. Atractyloside induces low contractile reaction of arteriolar smooth muscle through mitochondrial damage. *J Appl Toxicol* 2012;32(6):402–8. DOI: 10.1002/jat.1688. PMID: 21598287.