

Нұралы Ә.М.¹, Мутушев А.Ж.¹, Айтжан М.У.^{1,2}, Сейсенова А.Б.¹,
Кудьярова Ж.Б.^{1,2}, Байсейтов Д.А.^{1,3}

¹Научный производственно-технический центр “Жалын”,
г. Алматы, Казахстан

²Казахский Национальный Университет им. аль-Фараби,
г. Алматы, Казахстан

³Казахский Национальный Педагогический Университет им.Абая,
г. Алматы, Казахстан

ИЗУЧЕНИЕ ТОКСИЧНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ УГЛЕРОДНОЙ МАССЫ ГЕМОСОРБЕНТА

Аннотация. В последние годы методы экстракорпоральной детоксикации углеродными материалами получили должное признание и широкое развитие. Углеродные материалы для детоксикации крови на основе углей прочно заняли доминирующее положение среди сорбционных материалов. Это обусловлено, прежде всего, тем, что углеродные сорбенты обладают широкими возможностями подбора требуемых физико-химических и структурно-сорбционных характеристик. Установлено, что однократное пероральное введение биомассы крысам в дозе 75 мг/кг не вызывает каких – либо признаков интоксикации. При этом на протяжении всего периода наблюдения не было зарегистрировано гибели животных. Не выявлено половых различий в чувствительности крыс к действию препарата. В связи с отсутствием смертности в изученном диапазоне доз летальные дозы ЛД₁₀₀, ЛД₅₀, определить не удалось.

Ключевые слова: токсичность, безопасность, концентрация, пероральное введение, макроскопическое исследование, субстанция.

• • •

Түйіндеме. Соңғы жылдары көміртекті материалдарды пайдалана отырып, экстракорпоральды детоксикация әдістері мойындалды және кеңінен дамыды. Көмір негізіндегі қанды детоксикациялауға арналған көміртекті материалдар сорбциялық материалдардың арасында басымдыққа ие болды. Бұл, ең алдымен, көміртекті сорбенттердің қажетті физикалық-химиялық және құрылымдық сорбциялық сипаттамаларын таңдауға кең мүмкіндіктерге ие болуына байланысты болып отыр. Егеуқұйрықтарға 75 мг/кг дозада биомассаны бір реттік ішке қабылдау ешқандай интоксикация белгілерін тудырмайтыны анықталды. Сонымен қатар, бүкіл бақылау кезеңінде жануарлардың

өлімі тіркелмеді. Егеуқұйрықтардың препараттың әсеріне сезімталдығында жыныстық айырмашылықтар болған жоқ. Зерттелетін дозалар диапазонында өлім-жітімнің болмауына байланысты LD100 және LD50 өлімге әкелетін дозаларын анықтау мүмкін болмады.

Түйінді сөздер: уыттылық, қауіпсіздік, концентрация, ішке қабылдау, макроскопиялық зерттеу, зат.

• • •

Abstract. In recent years, methods of extracorporeal detoxification using carbon materials have received due recognition and widespread development. Carbon materials for blood detoxification based on coal have firmly taken a dominant position among sorption materials. This is due, first of all, to the fact that carbon sorbents have wide possibilities for selecting the required physicochemical and structural sorption characteristics. It has been established that a single oral administration of biomass to rats at a dose of 75 mg/kg does not cause any signs of intoxication. At the same time, no animal deaths were recorded throughout the entire observation period. There were no gender differences in the sensitivity of rats to the action of the drug. Due to the lack of mortality in the dose range studied, the lethal doses of LD100 and LD50 could not be determined.

Key words: toxicity, safety, concentration, oral administration, macroscopic examination, substance.

Введение. Доклинические исследования направлены на определение варианта лечения, который имеет наибольшую вероятность успешного применения, оценку его безопасность и подведение аргументированной научной базы до перехода к этапу клинических исследований. Актуальность доклинических исследований новых препаратов обусловлена тем, что это – доказательство безопасности вещества для здоровья человека [1-2]. Доклинические (неклинические) исследования проводят с целью оценки безопасности нового биологически активного вещества или готового лекарственного средства из него [1-2]. Целью токсикологического исследования является установление характера и выраженности действия фармакологического средства на организм экспериментальных животных и оценка его безопасности [3]. Согласно Требованиям к безопасности лекарственных средств на стадии доклинических исследований комплекс мер по обеспечению безопасности включает систематизацию, анализ данных и оценку: 1) токсичности субстанции и готовой лекарственной

формы при однократном введении; 2) токсичности субстанции и готовой лекарственной формы при многократном введении (подострой и хронической); 3) возможности развития привыкания и/или синдрома отмены лекарств, при применении субстанции или готового лекарственного препарата. Данное исследование острой токсичности препарата, введенного в однократной дозе в течение суток, регламентируется требованиями технического регламента РК «Требования к безопасности лекарственных средств» от 14 июля 2010 г. № 712 [3] и «Правилами государственной регистрации, перерегистрации и внесения изменений в регистрационное досье лекарственного средства, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗ РК №735 от 18 ноября 2009 г. [4-8].

Цель работы: Установление безопасности длительного применения биомассы в порошке, а также возможности развития синдрома его отмены у экспериментальных животных.

Задачи исследования:

1. Изучить токсичность порошка биомассы при пероральном, ежедневном введении в течение 60 суток.
2. Установить органы и системы организма, наиболее чувствительные к изучаемому препарату, определить характер и степень патологических изменений
3. Изучение токсического действия на организм животных препарата биомасса проводилось для уточнения, объединения и добавления сведений к информации о безопасности продукта на этапе доклинических изысканий, в момент регистрации и на протяжении всего жизненного цикла медицинского продукта.

Материалы и методы исследования. Достижение цели исследования возможно только при использовании животных. Для данного вида исследования были выбраны крысы как вид общепринятый для изучения острой токсичности [9-10]. Выбор концентраций соединения решался с учетом целей эксперимента и физиологических особенностей подопытных животных. Количество вводимых ингредиентов ограничивался рамками физиологических возможностей, массой и возрастом животных. Так, максимальные объемы перорального введения у крыс с массой 180-200 г составляют 1- 2 капсулы [11-13]. Для проведения экспериментов животные были разделены на следующие группы:

I группа – с введением биомасса в дозе 75мг/кг;

II группа – с введением биомассы в дозе 540 мг/кг.

Распределение по группам – животных распределяли по группам рандомизировано. В качестве критерия принималась масса тела таким образом, чтобы индивидуальное значение массы отклонялось от среднего значения не более чем на 20%.

Аппаратура и оборудование В работе использованы следующие приборы: весы торсионные (дискретность 0,001 г), РФ; весы аналитические «A@D Co., LTD, Japan (дискретность 0,002 г); весы технические «Ufesa», P.R.C (дискретность 0,1 г) для взвешивания животных; микроскоп прямого света DM2500 (Leica, Германия); микротом санный, РФ; pH-метр, РФ; шприцы одноразовые, стерильные (injekt luer duo 23Gx11/4" B.Braun Melsungen AG, Germany); микроскоп прямого света DM2500, Leica, Германия; микроскоп Axiostar plus HBO 50/ac, Zeiss, Германия; микротом ротационный Accu-Cut®SRM™200, Sakure, Japan; анализатор «Human Gmb», Германия; кардиокомплекс УСМЗ, РФ; спектрофотометр СФ-26, РФ; иммуноферментный РГП на ПХВ «НИИ кардиологии и внутренних болезней» МЗ РК лаборатория Экспериментальной медицины анализатор «Тесап», Австрия; дозатор пипеточный «BIONIT OYJ», Финляндия; аквадистиллятор ДЭ-4, РФ; центрифуга ОПН-8, РФ.

Методы исследования. Гематология. Определение количественных параметров системы крови проводилось с помощью анализатора «Human Gmb», Германия. Для оценки гематологических показателей кровь собиралась в пробирки с ЭДТА. Дополнительно форму эритроцитов и лейкоцитарную формулу определяли в мазках крови, окрашенных по Романовскому по стандартной методике [14-17].

Биохимия сыворотки крови. У животных собирали кровь объемом 3-4 мл в пробирки без антикоагулянта, после свертывания центрифугировали на 3000 об/мин в течение 15 минут для получения сыворотки. В сыворотке крови определяли следующие показатели: АЛТ, АСТ, триглицериды, общий белок, глюкоза, амилаза, общий холестерин, общий билирубин, альбумин, мочевины, креатинин. Определение биохимических показателей производили с помощью соответствующих диагностических наборов реагентов DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Германия, согласно инструкции, прилагаемой к наборам. Определение биохимических показателей крови проводили с помощью анализатора «Human Gmb», Германия.

Патоморфологическое исследование. Исследование включало некропсию, макроскопическое исследование, взвешивание и гистологическое исследование внутренних органов. После эфтаназии живот-

ные были тщательно обследованы на предмет наружных патологических признаков. Осмотр места введения препарата (ротовая полость) и ЖКТ позволил оценить местно-раздражающее действие исследуемого препарата. Было проведено макроскопическое исследование внутренних органов, грудной, брюшной полостей и их содержимого. У всех животных взвешивались: сердце, печень, почки, надпочечники, тимус, селезенка. Парные органы взвешивались вместе. Кроме абсолютного веса органов, определяли процентное соотношение массы органа к массе тела. У каждого вскрытого животного взяты органы и ткани и зафиксированы в 10% растворе нейтрального формалина, за исключением лимфатических узлов и кожи в месте укола, которые фиксировали в жидкости Буэна. Производился гистологический анализ следующих органов и тканей: кожа в месте укола (кусочек 10x10 мм), печень, почки, легкие, лимфатические узлы, селезенка, тимус. Зафиксированные образцы ткани проводили по стандартной методике спиртовой проводки (6 смен Dehyol absolute (Bio-Optica, Italy) (заменитель спирта) и 2 смены Bio Clear (Bio-Optica, Italy) (заменитель ксилола), с последующей заливкой в парафиновую среду HISTOMIX® EXTRA (Биовитрум, Россия). Из парафиновых блоков готовились парафиновые срезы на микротоме ротационном Accu-Cut®SRM™200 (Sakure, Japan). Полученные микропрепараты депарафинировали в 3-х сменах Bio Clear по 10 минут в каждой, обезжировали в 3-х сменах Dehyol absolute по 5 минут в каждой. Затем срезы промывали в проточной воде и окрашивали готовым раствором гематоксилина Майера (ДАКО, Дания) и 1% водным раствором эозина. После этого срезы обезвоживали в 3-х сменах Dehyol absolute и просветляли в 4-х сменах Bio Clear. Окрашенные срезы тканей заключили в среду для заключения препаратов Bio-M (Bio-Optica, Italy). Из окрашенных срезов были изготовлены микропрепараты на стеклах для микроскопии. Микроскопические исследования срезов тканей и внутренних органов проводили при помощи микроскопа прямого света DM2500 (Leica, Германия).

Результаты исследования. *Макроскопическое исследование после однократного применения биомассы в дозе 75 мг/кг.* После вскрытия на 15 сутки не отмечено микроциркуляторных изменений внутренних органов. Расположение внутренних органов брюшной и грудной полости у подопытных животных было правильным, не отмечалось ни их спаянности, ни резкого увеличения или уменьшения размеров. Язык чистый, с желтовато-серым налетом, ткань его на разрезах серо-красная, без кровоизлияний. Отверстия носа, ушей,

глаза – чистые, без выделений. Шея, грудь, живот, подмышечные и паховые области, естественные отверстия нормальное сложение, опухолей нет, гнойных выделений вокруг естественных отверстий нет, задний проход чистый. Макроскопическое исследование крыс после однократного применения биомасса в дозе 540 мг/кг. После вскрытия на 15-й день у крыс язык чистый, с желтоватым налетом, ткань его на разрезах серо-красная, без кровоизлияний; отверстия носа, ушей, глаза чистые, без выделений. Шея, грудь, живот, подмышечные и паховые области, естественные отверстия нормальное сложение, опухолей нет, гнойных выделений вокруг естественных отверстий нет, задний проход чистый.

Обсуждение результатов. Как показали проведенные исследования, однократное пероральное введение биомассы крысам в дозе 75 мг/кг не вызывает каких – либо признаков интоксикации. При этом на протяжении всего периода наблюдения не было зарегистрировано гибели животных. Не выявлено половых различий в чувствительности крыс к действию препарата. В связи с отсутствием смертности в изученном диапазоне доз летальные дозы ЛД₁₀₀, ЛД₅₀, определить не удалось.

Выводы. Однократное пероральное введение биомассы крысам в дозах от 75 до 540 мг/кг не вызывает симптомов интоксикации, патологических не обратимых изменений и гибели животных. Биомасса гемосорбента является малотоксичным средством при однократном применении.

Список литературы

1 Правила доклинических (неклинических) исследований в Республике Казахстан, приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан № 697 от 12 ноября 2009 года;

2 Правила проведения доклинических исследований, медико-биологических экспериментов и клинических испытаний в Республике Казахстан, приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан № 745 от 19 ноября 2009 г.;

3 Технический регламент «Требования к безопасности лекарственных средств», постановление Правительства РК от 14 июля 2010 года № 712;

4 Правила государственной регистрации, перерегистрации и внесения изменений в регистрационное досье лекарственного средства, изделий медицинского назначения и медицинской техники, приказ Министра здравоохранения РК №735 от 18 ноября 2009 года;

5 Надлежащая лабораторная практика. Основные положения, приказ Министра индустрии и торговли РК от 29 декабря 2006 года № 575 Госстандарт РК;

6 Надлежащая лабораторная практика. Основные положения, приказ Министра индустрии и торговли РК от 29 декабря 2006 года № 557 Госстандарт РК;

7 Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /под ред. Р.У. Хабриева.-2-изд., перераб и доп. -М.:ОАО Издательство Медицина, Москва. - 2005. – С. 832;

8 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986 (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и научных целях);

9 Регламентация экспериментов на животных – этика, законодательства, альтернативы/ Под ред. Н. А. Горбуновой. – М. – 1998;

10 Приказ Министра здравоохранения № 26 МЗ РК от 11 января 2012 г.;

11 Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия)/под. ред. проф. И.В. Санюцкого.-М.-Медицина. -1970. – С.342.

12 Куценко С.А. Основы токсикологии. М.-Медицина, - 2004. – С. 452;

13 Гланц С. Медико-биологическая статистика.-М.-Практика. -1999. – С.215.

14 Камышников В.С. Методы клинических лабораторных исследований.- МЕДпресс- информ.- 2011.- 5-е изд. – 752 с.

15 Нуралы А.М., Акназаров С.Х., Нуралиев М.А., Абдрешов С.Н., Кожамжарова А.С. – «Получение и пористая структура углеродных гемосорбентов»-Вестник КазНМУ №1-2020-С.469-471.

16 Нуралы С.Х., Акназаров С.Х., Есин Апайдин Варол, Есимсыитова З.Б., Кожамжарова А.С., Амзеева Ю.М., Мутушев А.Ж., Бексеитова К.С., Абдрешов С.Н. - Разработка и исследование гемосорбционного материала с сотовой структурой -Вестник КазНМУ №4 – 2019 – С.308-311 .

17 Акназаров С.Х., Панов С.А., Бийсенбаев М.А., Павлюков А.В., Головченко О.Ю., Нуралы А.М., Амзеева У.М. - Сорбенты из растительного волокна для медицинского применения - Монография - Казахский университет. - 2020. - 158 с. ISBN 978-601-04-5083-7

References

1 Pravila doklinicheskikh (neklinicheskikh) issledovanij v Respublike Kazahstan, prikaz Ministra zdravoohraneniya Respubliki Kazahstan № 697 ot 12 noyabrya 2009 goda;

2 Pravila provedeniya doklinicheskikh issledovanij, mediko-biologicheskikh eksperimentov i klinicheskikh ispytaniy v Respublike Kazahstan, prikaz Ministra zdravoohraneniya Respubliki Kazahstan № 745 ot 19 noyabrya 2009 g.;

3 Tekhnicheskij reglament "Trebovaniya k bezopasnosti lekarstvennyh sredstv", postanovlenie Pravitel'stva RK ot 14 iyulya 2010 goda № 712;

4 Pravila gosudarstvennoj registracii, pereregistracii i vneseniya izmenenij v registracionnoe dos'e lekarstvennogo sredstva, izdelij medicinskogo naznacheniya i medicinskoj tekhniki, prikaz Ministra zdavoohraneniya RK №735 ot 18 noyabrya 2009 goda;

5 Nadlezhashchaya laboratornaya praktika. Osnovnye polozheniya, prikaz Ministra industrii i torgovli RK ot 29 dekabrya 2006 goda № 575 Gosstandart RK;

6 Nadlezhashchaya laboratornaya praktika. Osnovnye polozheniya, prikaz Ministra industrii i torgovli RK ot 29 dekabrya 2006 goda № 557 Gosstandart RK;

7 Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv /pod red. R.U. Habrieva.-.-2-izd., pererab i dop. -M.:OAO Izdatel'stvo Medicina, Moskva. - 2005. – S. 832;

8 European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986 (Evropejskaya konvenciya o zashchite pozvonochnyh zhivotnyh, ispol'zuemyh v eksperimental'nyh i nauchnyh celyah);

9 Reglamentaciya eksperimentov na zhivotnyh –etika, zakonodatel'stva, al'ternativy/ Pod red. N. A. Gorbunovoj. – M. – 1998;

10 Prikaz Ministra zdavoohraneniya № 26 MZ RK ot 11 yanvarya 2012 g.;

11 Metody opredeleniya toksichnosti i opasnosti himicheskikh veshchestv (toksikometriya)/pod. red. prof. I.V. Sanockogo.-M.-Medicina. -1970. – C.342.

12 *Kucenko S.A.* Osnovy toksikologii. M.-Medicina. - 2004. – C. 452;

13 *Glanc S.* Mediko-biologicheskaya statistika.-M.-Praktika. -1999. – S.215.

14 *Kamyshnikov V.S.* Metody klinicheskikh laboratornyh issledovanij.-MEDpress- inform. - 2011.- 5-e izd. – 752 s.

15 *Nuraly A.M., Aknazarov S.H., Nuraliev M.A., Abdreshov S.N., Kozhamzharova A.S.* – «Poluchenie i poristaya struktura uglerodnyh gemosorbentov»- Vestnik KazNMU №1-2020-S.469-471.

16 *Nuraly S.H. Aknazarov S.H., Esin Apajdin Varol, Esimsyitova Z.B., Kozhamzharova A.S., Amzeeva YU.M., Mutushev A.ZH., Bekseitova K.S., Abdreshov S.N.* - Razrabotka i issledovanie gemosorbcionnogo materiala s sotovoj strukturoj -Vestnik KazNMU №4 – 2019 – S.308-311 .

17 *Aknazarov S.H., Panov S.A., Bijsenbaev M.A., Pavlyukov A.V., Golovchenko O.YU., Nuraly A.M., Amzeeva U.M.* - Sorbenty iz rastitel'nogo volokna dlya medicinskogo primeneniya - Monografiya - Kazahskij universitet. - 2020. – 158 s. ISBN 978-601-04-5083-7

Сведения об авторах

Нуралы Әсия Мамбетқызы, PhD-докторант, beregichtoest777@mail.ru, Дизайн Исследования, Проведение Исследований, Анализ Результатов.

Мутушев Алибек Жумабекович, PhD, alibek_090@mail.ru, Дизайн Исследования, Проведение Исследований, Анализ Результатов.

Айтжан Меңтай Улдаханқызы, PhD-докторант, mentay1000@gmail.com, Литературный Поиск, Подготовка Публикации.

Сейсенова Акнур Бердибаевна, PhD-докторант, Анализ результатов, Обсуждение.

Кудьярова Жанар Баймаханқызы, кандидат химических наук, zhanar_kudyarova@mail.ru, Анализ Результатов, Обсуждение.

Байсейітов Даурен Алмасович, PhD, dauren_b91@mail.ru, Анализ Результатов, Обсуждение.

Авторлар туралы мәліметтер:

Нұралы Әсия Мәмбетқызы, PhD-докторант, beregichtoest777@mail.ru, Зерттеуді жобалау, зерттеу жүргізу, нәтижелерді талдау.

Мутушев Әлібек Жұмабекұлы, PhD, alibek_090@mail.ru, Зерттеуді жобалау, зерттеу жүргізу, нәтижелерді талдау.

Айтжан Меңтай Ұлдаханқызы, PhD-докторант, mentay1000@gmail.com, Әдеби ізденіс, Басылымды дайындау.

Сейсенова Акнұр Бердібайқызы, PhD-докторант, Нәтижелерді талдау, Талқылау.

Құдырова Жанар Баймаханқызы, химия ғылымдарының кандидаты, zhanar_kudyarova@mail.ru, Нәтижелерді талдау, Талқылау.

Байсейітов Дәурен Алмасұлы, PhD, dauren_b91@mail.ru, Нәтижелерді талдау, Талқылау.

Information about the authors

Nuraly Asiya Mambetkyzy, PhD-doctoral student, beregichtoest777@mail.ru, Research Design, Research Conduct, Results Analysis.

Mutushev Alibek Zhumabekovich, PhD, alibek_090@mail.ru, Research Design, Research Conduct, Results Analysis.

Aitzhan Mentay Uldahankyzy, PhD-doctoral student, mentay1000@gmail.com, Literary Search, Preparation of Publication.

Seisenova Aknur Berdibaevna, PhD-doctoral student, Analysis of Results, Discussion.

Kudyarova Zhanar Baimahankyzy, Candidate of Chemical Sciences, zhanar_kudyarova@mail.ru, Analysis of Results, Discussion.

Baiseitov Dauren Almasovich, PhD, dauren_b91@mail.ru, Analysis of Results, Discussion.

Благодарность. Авторы благодарят ГНС ТОО НПТЦ «Жалын» Акназарова С.Х., ВНС ТОО НПТЦ «Жалын» Биисенбаева М.А., зам. генерального директора Тулейбаеву Ш.А. за содействие в организации и осуществлении исследований.