

ИЗУЧЕНИЕ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ТОКСИЧНОСТИ РАСТВОРОВ ДЕКСТРАНОВ ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ СУПРАМИКРОСТРУКТУРИРОВАННОЙ СУБСТАНЦИИ

В.И. Кочкаров¹
О.О. Новиков¹
Е.Т. Жилиякова¹
М.Ю. Новикова¹
Л.М. Даниленко¹
М.В. Покровский²

¹⁾ *Белгородский
государственный
университет*

²⁾ *Курский государственный
медицинский университет*

*e-mail:
Kochkarov@bsu.edu.ru*

В статье изложены сравнительные данные об острой и хронической токсичности растворов, приготовленных из декстранов различной степени измельченности. Приводятся характеристики функционального состояния внутренних органов после 2-недельного внутривенного введения препаратов и после последующей 2-недельной отсидки. Также представлены данные ряда биохимических параметров, используемых в токсикологии в качестве маркеров повреждения внутренних органов: общего белка сыворотки крови, мочевины, креатинина, глюкозы, аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ). Результаты исследования показали, что предварительное измельчение декстрана 40 не приводит к негативному влиянию исследуемых препаратов на функциональное состояние внутренних органов, процессы кроветворения, не вызывает агранулоцитоза, интоксикации, не обладает аллергизирующим действием. Таким образом, предварительное измельчение декстрана не приводит к увеличению его токсических свойств.

Ключевые слова: декстран 40000, острая токсичность, субхроническая токсичность.

Введение. История клинического применения препаратов на основе декстранов насчитывает более 55 лет. Современные препараты декстранов существенно отличаются от применявшихся еще 30-40 лет назад, поскольку, современные технологии позволили улучшить их очистку от иммуногенных ингредиентов и получить распределение по молекулярному весу в более узком диапазоне. Различают два типа декстрановых препаратов: препараты на основе декстрана с молекулярным весом 40000 дальтон (Декстран 40000), инфузионный раствор «Реополиглюкин» и препараты на основе декстрана с молекулярным весом 60000/70000 дальтон. Декстрановые препараты широко применяются в клинической практике, и следует отметить, что наиболее часто встречающимся осложнением при их применении является вероятность появления анафилактических реакций, которые могут приводить к тяжелым последствиям.

Основным неблагоприятным действием декстранов является способность вызывать различные аллергические и псевдоаллергические реакции. Так, по оценкам европейских специалистов, частота возникновения реакций на декстран составляет 0.032% причем частота, связанная с угрозой для жизни, – 0.008%. Анализ проводился на 200906 пациентах. По данным FDA, за период 1986-1998 гг. среди 1.7 млн. случаев применения декстрановых препаратов было выявлено 11 случаев серьезных последствий.

Анафилактические реакции могут вызывать многие лекарственные препараты: антибиотики, рентгеноконтрастные препараты, релаксанты, различные полимеры и пр. Любой препарат, в состав которого входит полимер, может вызывать такие реакции.

Анафилактическая реакция – это взаимодействие антигена с антителами, которые связываются с поверхностью клеток-эффекторов, и при этом происходит высвобождение медиаторов иммунного ответа: гистамина, фактора активации тромбоцитов, серотонина, лейкотриенов, цитокинов и простагландинов. Реакция III типа – когда образуется

стойкий комплекс между антигеном (декстран) и антителом. Комплекс активирует систему комплимента. Для декстрановых препаратов было показано наличие фактора комплимента [1].

Существуют также данные о возможности ингибирования образования иммунного комплекса с помощью Декстрана 1 (Промит-Инфузия). Приводятся данные по успешному применению Промита (Pharmacia AB, Uppsala, Sweden) на более чем 60 000 больных, которым вводили декстрановые растворы. В реакции участвуют как Т-, так и В-лимфоциты. Т-лимфоциты распознают макромолекулярный носитель, а В-лимфоциты распознают гаптен (гликозидную связь в декстране). Чаще всего декстрановые препараты вызывают образование анафилактической реакции III типа [2].

С учетом возможности влияния степени измельченности декстрана на его токсикологические свойства, целью настоящего исследования явилось изучение острой и субхронической токсичности растворов декстрана 40, приготовленных из субстанций различной степени измельченности.

Материалы и методы исследования. Опыты проводили на половозрелых крысах линии Wistar массой 90-110 г. Животным обоего пола растворы декстрана для инъекций вводили внутривенно в дозах 2. О токсическом действии препарата судили по общему состоянию животных и их выживаемости, LD₅₀. Подсчет выживших и погибших животных проводился на 3 сутки после затравки препаратами, с последующим наблюдением за выжившими животными на протяжении 2-недель. На основании полученных результатов рассчитывалось LD₅₀ по методу Штабского.

При изучении субхронической токсичности использовали раствор декстрана 40 для инъекций.

В качестве контроля использовали данные, полученные на интактных животных (внутривенное введение соответствующего объема физиологического раствора для инъекций).

Эксперименты по изучению субхронической токсичности проводили на обоеполах половозрелых крысах линии Wistar, возраст крыс на момент начала кормления препаратами равнялся 12–15 неделям. Животные рандомизированы по массе и полу. Животных содержали в лаборатории НОЦ «Фармация» Белгородского государственного университета – по 6 животных в клетке площадью 1600 кв. см, при световом режиме 12-12, кормили сухим (крупя, зерно, хлеб) и сочным (капуста, морковь, свекла) кормом, в соответствии с приказом МЗ СССР N1179 от 10 октября 1983 г. «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения». Дополнительно на всем протяжении исследования используется гранулированный лабораторный корм (сертификат № РОСС RU/ПО81.ВОО.365 ГОСТ 50258-92).

Подопытные крысы были разделены на 5 групп (по 12 животных в группе) в соответствии с 5 сериями опытов:

I серия – контрольная (ежедневное внутривенное введение физиологического раствора для инъекций);

II серия – раствор для инъекций Декстрана 40000;

III серия – раствор для инъекций, приготовленный из предварительно измельченного в течение 5 мин. Декстрана 40000;

IV серия – раствор для инъекций, приготовленный из предварительно измельченного в течение 15 мин. Декстрана 40000;

V серия – раствор для инъекций, приготовленный из предварительно измельченного в течение 30 мин. Декстрана 40000;

Через 7 дней после нахождения крыс в виварии в стандартных условиях содержания и кормления определяли массу тела, число и ритмичность дыхания (визуально), оценивали общее состояние животных (двигательную активность, поведение, потребление корма и воды, реакцию на раздражители, состояние видимых слизистых, кожи, подкожной жировой ткани и волосяного покрова). Животные находились под наблюдением 28 дней, в течение 14 дней применяли исследуемые препараты, далее препарат отменяли, и половина животных из каждой группы находилась под наблюдением в течение еще двух недель «отмывки». При этом ежедневно контролировали интегральные показатели общего состояния, массу тела.

На 14 и 28-й день опыта у крыс под эфирным наркозом из полости правого желудочка проводился забор пробы крови для проведения гематологических и биохимических исследований. После окончания хронического эксперимента проводили эвтаназию крыс передозировкой диэтилового эфира для патоморфологических исследований внутренних органов и тканей. Проводили некропсию тел животных. При некропсии исследовали внешнее состояние тела, внутренних поверхностей и проходов, грудной, брюшной и тазовой полостей с находящимися в них органами и тканями, шею с органами и тканями. Органы и ткани или их части фиксировали в 10% формалине.

Для характеристики функционального состояния внутренних органов после 2-недельного внутривенного введения препаратов и после последующей 2-недельной отсидки в сыворотке венозной крови определяли ряд биохимических параметров, используемых в токсикологии в качестве маркеров повреждения внутренних органов: общего белка сыворотки крови, мочевины, креатинина, глюкозы, аспаратаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ).

Общий белок в сыворотке крови определяли биуретовым методом с использованием набора реактивов «Биоконт» – «Общий белок» (МП «АГАТ», Москва). На фотоколориметре КФК-3 определяли креатинин в сыворотке крови (унифицированным методом по реакции Яффе с предварительным депротеинированием), АСТ и АЛТ (по Райтману-Френкелю), содержание мочевины (уреазный фенол/гипохлоритный метод), глюкозы (глюкозооксидазным методом, с депротеинизацией) с использованием наборов реагентов №1, №2, №3 для клинической биохимии, «Vital Diagnostics», ООО «Витал Диагностикс СПб». Количество гемоглобина в крови определяли колориметрическим гемоглобинцианидным методом (метод Драбкина) с использованием набора реактивов «Синтакон» (г. Санкт-Петербург). Исследование биохимических параметров крови проводилось на приборах, прошедших метрологический контроль.

Подсчет количества эритроцитов и лейкоцитов производили унифицированным методом в камере Горяева, лейкоцитарную формулу определяли методом дифференциального морфологического исследования форменных элементов крови по Романовскому, подсчет количества тромбоцитов производили в мазках крови по Фолио.

Результаты подвергали статистической обработке путем расчета средней арифметической (M), ошибки средней арифметической ($\pm m$) и оценки достоверности различий сравниваемых параметров по критерию Стьюдента, для статистических расчетов использовался пакет программ «Microsoft Excel-2005».

За время наблюдения в течение 14 суток в группе животных, получавших растворы для инъекций декстрана 40000 в дозе 2 мл смертности животных не было.

Результаты исследования. После прекращения приема препаратов в течение 14 суток «отмывки» гибели животных не наблюдалось ни в одной из экспериментальных групп.

Масса тела. При 14-дневном внутривенном введении растворов декстрана 40 в дозах 2 мл наблюдается динамика массы тела крыс, сопоставимая с динамикой массы в контрольной серии экспериментов. Также двухнедельное внутривенное введение растворов декстрана 40000 в дозе 2 мл не оказывает достоверного влияния на потребление крысами корма и воды.

Результаты ежедневного наблюдения за экспериментальными животными свидетельствуют о том, что двухнедельное внутривенное введение препаратов декстрана 40000 в дозах 2 мл не оказывает влияния на состояние интактных участков кожи, видимых слизистых, подкожной жировой клетчатки, волосяного покрова. Поведение и двигательная активность животных существенно не изменялась.

В дальнейшем проводилось исследование клеток крови, которое показало, что и в контрольной группе, и в группах серий экспериментов на 14-й день опытов число эритроцитов в периферической крови крыс в среднем соответствовало нормальному уровню эритроцитов в периферической крови этого вида животных.

Полученные данные подтверждают, что исследованные препараты не оказывают негативного влияния на эритропоэз. Аналогично во всех сериях экспериментов число лейкоцитов и тромбоцитов и содержание гемоглобина в периферической крови у крыс соответствовало норме для этого вида животных. Также не обнаружено статистически значимых изменений лейкограммы в сравнении с контрольной группой животных.

Таким образом, не отмечается выраженного негативного влияния исследуемых препаратов в применяемых дозах на процессы кроветворения, функциональное состояние печени и, как следствие, на свертывающую систему крови, кроме того, как следует из результатов лейкограммы, все растворы декстрана 40 не вызывают агранулоцитоза, интоксикации, не обладают аллергизирующим действием.

В последующем, с целью оценки возможного токсического действия растворов декстрана 40 для инъекций на печень, почки и сердце, на 14-й день от начала введения препаратов и через 14 дней после их отмены определяли биохимические маркеры повреждения внутренних органов: общий белок, глюкозу, мочевины, креатинин, активность АЛТ и АСТ в сыворотке венозной крови крыс.

Сумма белков сыворотки крови, так называемый общий белок, является интегральным показателем, используемым в токсикологических исследованиях для оценки состояния белково-синтетической функции печени и общего состояния экспериментальных животных, подвергающихся воздействию исследуемых препаратов. Как показали результаты исследования, концентрация общего белка достоверно не отличалась от зарегистрированных в контрольных экспериментах.

Содержание глюкозы в сыворотке крови под влиянием исследуемых препаратов не выходило за физиологические пределы этого показателя у крыс и практически не отличалось от таковых в контрольной серии экспериментов. Это позволяет сделать заключение о том, что исследованные препараты не оказывают негативного влияния на углеводный обмен.

Следует отметить, что уровень мочевины в крови экспериментальных животных, которым в течение 14 дней внутривенно вводились соответствующие растворы декстрана 40, статистически достоверно не отличается от зарегистрированного в контрольных экспериментах. Полученные данные свидетельствуют о том, что данные препараты не оказывают статистически значимого влияния на фильтрационную функцию почек. Аналогичная тенденция наблюдалась при определении уровня креатинина, что указывает на отсутствие негативного влияния исследуемых препаратов на концентрационную функцию почек.

В клинической лабораторной практике повышенная активность АСТ и АЛТ определяется при заболеваниях сердца и печени. В частности, при повреждении печени в сыворотке крови повышается активность АСТ и АЛТ. В наших экспериментах определение активности АСТ и АЛТ в сыворотке крови использовано для суждения о возможности токсического действия препаратов на сердце и печень. Как показали результаты проведенных исследований, введение растворов декстрана для инъекций не приводит к статистически значимому повышению активности АЛТ и АСТ, по сравнению с контрольной серией экспериментов.

Заключение. Как показали результаты изучения острой и субхронической токсичности инъекционных растворов, приготовленных из субстанции различной измельченности декстрана 40, изучаемые препараты при однократном введении не оказывают дозозависимого токсического действия, не вызывая гибели животных в течение первых 3 суток наблюдения. Достоверных отличий в острой токсичности у исследуемых препаратов не обнаружено. Согласно классификации К.К.Сидорова их можно отнести к малотоксичным препаратам.

Исследование субхронической токсичности проводилось в два этапа: 1 этап – ежедневное, в течение 14 дней, внутривенное введение растворов декстрана 40000 в дозах 2 мл, на 14 сутки – плановое выведение половины животных путем передозировки диэтилового эфира, забор крови для количественного и биохимического анализа, забор органов для морфологических и гистологических исследований; 2 этап – отмена введения препарата и отсидка животных в течение последующих 14 дней, на 28 сутки от начала введения препаратов – плановое выведение оставшейся половины животных путем передозировки диэтилового эфира, забор крови для количественного и биохимического анализа, забор органов для морфологических и гистологических исследований.

За время наблюдения в течение 14 суток в группе животных, получавших растворы декстрана 40000 для инъекций смертности животных не было. После прекращения приема препаратов, в течение 14 суток «отмывки», гибели животных также не наблюдалось ни в одной из экспериментальных групп.

В печени, почках и миокарде патологических изменений при введении испытуемых препаратов, отличных от имеющихся у крыс контрольной группы, нет.

Изложенное дает основание считать, что восьмикратные дозы растворов декстрана 40 не выявляют признаков токсического действия на печень, почки и миокард.

Таким образом, по результатам проведенных экспериментов можно сделать вывод, что изучаемые препараты, приготовленные из субстанций декстрана 40 различной измельченности, являются малотоксичными как при однократном приеме, так и при длительном введении, и могут быть рекомендованы для клинического изучения.

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 годы, Государственный контракт № 14.740.11.0119 от 08 сентября 2010 года, проект «Комплексные фармакологические и технологические исследования ряда субмикроструктурированных (наноструктурированных) фармацевтических субстанций с доказанными измененными физико-химическими свойствами».

Литература

1. Heiin, H. Incidence, pathomechanism and prevention of dextran – induced anaphylactoid / anaphylactic reactions in man / H. Heiin, W. Richter, K. Messmer et al. // Dev. Biol. Stand. – 1980. – Vol. 48. – P.179-189.

2. Lehman, G. Schverer Zwischenfall nach i.v.- Application van 10 ml (0.6) 6% igen Dextran 60 bei einem gesunden Prabendem / G. Lehman, F. Asskali, H. Forster. // Der Anaesthesist. – 2002. – Vol.51. – N 10. – P.820-824.

THE STUDY OF ACUTE AND CHRONIC TOXICITY OF SOLUTIONS OBTAINED FROM DEXTRAN SUPRAMICROSTRUCTURAL SUBSTANCES

B.I. Kochkarov¹
O.O. Novikov¹
E.T. Zhilyakova¹
M.Yu. Novikova¹
L.M. Danilenko¹
M.V. Pokrovskiy²

¹⁾ *Belgorod State University*

²⁾ *Kursk State Medical University*

e-mail: Kochkarov@bsu.edu.ru

The paper presents comparative data on acute and chronic toxicity of solutions prepared from dextran of varying fineness. It summarizes the characteristics of the functional state of internal organs after a 2-week intravenous medications and follow-up after 2 weeks of his release. Also it presents series of biochemical parameters used in toxicology as markers of damage to internal organs: the total serum protein, urea, creatinine, glucose, aspartateaminotransferase (AST), alanineaminotransferase (ALT). The results of the given research showed that the preliminary crushing dextran 40 does not lead to adverse effects of drugs under study on the functional state of internal organs, processes, blood, do not cause agranulocytosis, intoxication, have no allergenic effect. Thus, the preliminary crushing dextran does not lead to an increase in its toxic properties.

Key words: dextran 40000, acute toxicity, sub chronic toxicity.