

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОЙ ТОКСИЧНОСТИ И КУМУЛЯТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ХИТОЗАН

Асилова С.У., Акрамов В.Р., Гулямов Ё.Б., Мирзаев А.Б., Назаров Р.Б.

МОДИФИКАЦИЯ ЛАНГАН ХИТОЗАН ДОРИ ВОСИТАСИНИНГ ОВҚАТ ҲАЗМ ҚИЛИШ ОРҚАЛИ ЎТКИР ВА СУРУНКАЛИ ТОКСИКЛИКЛИГИ ВА КУМУЛЯТИВ ХОССАЛАРИНИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛ БАҲОЛАШ

Асилова С.У., Акрамов В.Р., Гулямов Ё.Б., Мирзаев А.Б., Назаров Р.Б.

EXPERIMENTAL EVALUATION OF ACUTE AND CHRONIC INTRAGASTRIC TOXICITY AND CUMULATIVE PROPERTIES OF THE DRUG MODIFIED CHITOSAN

Asilova S.U., Akramov V.R., Gulyamov E.B., Mirzaev A.B., Nazarov R.B.

Ташкентская медицинская академия

Мақсад: модификацияланган хитозан дори воситасининг овқат ҳазм қилиш орқали ўткир ва сурункали токсикликлиги ва кумулятив хоссаларини экспериментал баҳолаш. **Материал ва усуллар:** тадқиқот 36 оқ сичқонда, 122 оқ каламушда, 6 денгиз чўчқачасида ва 3 қуёнда ўтказилган. Мутаген активлигини баҳолаш учун микрометод сифатида лимфоцитларни култивация қилишдан фойдаланилди. Модификацияланган хитозан – бу остеогенезни тезлаштирувчи дори воситаси бўлиб, Ўзбекистон Республикаси физика ва кимё, полимерлар институтда ишлаб чиқарилган. **Натижалар:** дори воситасини бир мартаба per os 5000, 6500, 8000, 9000 ва 10000 мг/кг тана вазнига қабул қилингандан сўнг ҳайвонларда ўзгариш кузатилмади. Оқ каламушларда интоксикация ва ўлим кузатилмаганлиги боис бу дори воситасини кам токсикликли дори воситалари қаторига қўшишимизга асос бўла олади (4-синф). **Хулосалар:** модификацияланган хитозан ўткир ва сурункали токсик эффектга эга эмас, бундан ташқари буйрак фаолиятига ҳам таъсир кўрсатмайди, материал ва функционал кумуляцияга хоссаларига ҳам эга эмас.

Калит сўзлар: модификацияланган хитозан, лаборатор ҳайвонлар, ўткир токсиклик, буйрак функцияси.

Objective: Assessment of acute and chronic intragastric toxicity and cumulative properties of the drug modified chitosan. **Material and methods:** Studies were conducted on 36 white mice, 122 white rats, 6 guinea pigs and 3 rabbits. To detect mutagenic activity, a micromethod of culturing human whole blood lymphocytes was used. Modified chitosan – a drug intended for use as a means of accelerating osteogenesis, was developed at the Institute of Chemistry and Polymer Physics of the Academy of Sciences of the Republic of Uzbekistan. **Results:** After a single administration of the drug per os in doses of 5000, 6500, 8000, 9000 and 10000 mg/kg of body weight, changes in the behavior and functional state of animals were not observed. The absence of signs of intoxication and death of white rats makes it possible to attribute modified chitosan to low-toxic substances (Grade 4). **Conclusions:** Modified chitosan does not have an acute and chronic toxic effect, and also does not affect the indicators of kidney function, therefore, it does not have material and functional cumulation.

Key words: modified chitosan, laboratory animals, acute toxicity, kidney function.

Хитозан – уникальный природный биополимер, впервые полученный из хитина ракообразных в 1859 году. По химической структуре хитозан является сополимером D-глюкозамина и N-ацетил-D-глюкозамина [6]. В зависимости от эффективности реакции получают хитозаны с различной степенью деацетилирования, которые показывают процентное содержание D-глюкозамина в молекуле хитозана, например, если речь идет о хитозане со степенью деацетилирования, то это означает, что в молекуле хитозана в среднем содержится 85% D-глюкозаминовых остатков и 15% N-ацетил-D-глюкозаминовых остатков [5].

Хитозан имеет собственную биологическую активность, получается в результате переработки отходов хлопка и шелкопряда. Хитозан – природный

полимер, относится к группе парафармацевтиков, обладает лечебной фармацевтической активностью, биоразлагаемый на гликозамины и аминогликаны, выводится из организма свободно, не токсичный.

Цель исследования

Оценка острой и хронической внутрижелудочной токсичности и кумулятивных свойств препарата модифицированный хитозан на белых мышах, белых крысах, морских свинках и кроликах.

Материал и методы

Эксперимент был проведен в ЦНИЛ на базе ТМА. Объект исследований: Модифицированный хитозан – препарат, предназначенный для использования в качестве средства, ускоряющего остеогенез. Разработан препарат в Институте химии и физики полимеров АН РУз.

Исследования проведены на различных видах лабораторных животных обоего пола: на 36 белых мышах, 122 белых крысах, 6 морских свинках и 3 кроликах. Для выявления мутагенной активности использован микрометод культивирования лимфоцитов цельной крови человека.

Белые мыши были разделены на 6 групп по 6 животных в каждой, 6-я группа служила контролем. Модифицированный хитозан вводили белым мышам однократно внутрижелудочно в дозе 5000, 6500, 8000, 9000 и 10000 мг/кг. Наблюдение за животными проводилось в течение 14 суток. Показателями воздействия препарата служили динамика изменения массы животного, состояние волосяного покрова, состояние слизистых оболочек глаз, подвижность, отношение к корму, время и характер интоксикации, ее тяжесть и обратимость, сроки гибели или выздоровления.

Результаты и обсуждение

Проведенный эксперимент показал, что у животных после однократного введения препарата per os в дозе 5000, 6500, 8000, 9000 и 10000 мг/кг массы поведение и функциональное состояние не менялись. Животные оставались подвижными, живо реагировали на внешние раздражители. Волосяной покров первые 6 дней был без изменений, но с 7 суток шерсть становилась блестящей, шелковистой. Визуально слизистая оболочка глаз и рта влажная, бледно-розового цвета, блестящая и гладкая. Животные хорошо потребляли корма и пили воду. Динамика массы белых мышей представлена в таблице 1.

Таблица 1

Зависимость динамики массы белых мышей (г) от вводимой дозы модифицированного хитозана (n=6), M±m

Доза препарата, мг/кг	Срок наблюдения, сут		
	фон	7	14
Контроль	19,08±0,38	19,08±0,38	19,08±0,38
5000	19,3±0,96	19,3±0,96	19,3±0,96
6500	18,0±0,38	18,0±0,38	18,0±0,38
8000	19,08±1,07	19,08±1,07	19,08±1,07
9000	19,2±0,38	19,2±0,38	19,2±0,38
10000	18,9±0,67	18,9±0,67	18,9±0,67

В первые часы, а также в последующие 14 дней наблюдения у животных всех опытных групп признаки интоксикации отсутствовали. Гибели белых мышей при введении доз 5000, 6500, 8000, 9000 и 10000 мг/кг не отмечалось. Из-за отсутствия гибели животных установить LD_{50} и максимально-переносимую дозу препарата для белых мышей не представлялось возможным.

Оценка острой внутрижелудочной токсичности модифицированного хитозана проведена также в опытах на 36 белых крысах. Животные подвергались однократному внутрижелудочному воздействию препарата в дозах 3500, 5000, 7000, 8500 и 10000 мг/кг. Изученные показатели соответствовали результатам тестирования на белых мышах. Признаков интоксикации и гибели белых крыс не выявлено, что позволяет отнести модифицированный хитозан в малотоксичным веществам

(IV класс). Следовательно, по классификации лекарственных средств по токсичности препарат модифицированный хитозан относится к малотоксичным веществам (IV класс) [1-4].

Оценивая токсичность лекарственных соединений нельзя полностью полагаться на данные острых опытов, так как установлено, что вещества, малотоксичные при разовом введении, могут оказаться высоко опасными при повторном воздействии на организм. Хроническое отравление возможно в случае материальной или функциональной кумуляции веществ в организме [1,2,7,8]. Изучение кумулятивных свойств модифицированного хитозана было проведено по Лиму, что позволяло оценить не только кумуляцию, но и привыкание. Опыты осуществлялись на 10 мышах обоего пола массой 18-20 г. Продолжительность эксперимента – 28 дней. Препарат вводили внутрижелудочно в дозе 5000 мг/кг. Ввиду отсутствия среднесмертельной дозы рассчитать $K_{кум.}$ не представилось возможным. За время наблюдения не каких-либо значимых изменений в поведении и функциональном состоянии животных не зафиксировано.

Параметры токсикометрии модифицированного хитозана при длительном внутрижелудочном введении ранее не изучались [7,8], что и послужило основанием для проведения исследований. Токсикологические исследования модифицированного хитозана проводили на 20 белых крысах массой 180-190 г, которые внутрижелудочно ежедневно в течение 3-х месяцев получали препарат. Животные были разделены на 2 группы по 10 особей. 1-я группа животных получала модифицированный хитозан в дозе 1000 мг/кг, 2-я группа служила контролем.

Показателями токсичности служили поведение животных, выживаемость, время наступления гибели, появление симптомов интоксикации, динамика массы животного, содержание гемоглобина, количество эритроцитов и лейкоцитов, тромбоцитов, СОЭ, эозинофилов, палочкоядерных, сегментоядерных, лимфоцитов, моноцитов в периферической крови, активность щелочной фосфатазы, АСТ и АЛТ, каталазы. Исследования проводили после завершения эксперимента.

Содержание гемоглобина, эритроцитов и лейкоцитов, тромбоцитов, СОЭ, эозинофилов, палочкоядерных, сегментоядерных, лимфоцитов, моноцитов в периферической крови исследовали классическим, общепринятым; активность ферментов щелочной фосфатазы, АСТ, АЛТ в сыворотке крови – с помощью биотестов фирмы Лахема (Чехия).

Физиологические и биохимические показатели определяли после завершения эксперимента.

За время эксперимента общее состояние опытных животных не отличалось от фоновых и контрольных показателей, симптомов интоксикации не наблюдалось, гибели животных не было. На коже местных изменений, очагового облысения и язв не обнаружено. Животные были опрятны, шерстяной покров гладкий, блестящий, корм охотно поедали (табл. 2), активны, адекватно реагировали на внешние раздражители.

Таблица 2
Динамика массы белых крыс (г) при внутрижелудочном многократном введении в течение 3-х месяцев модифицированного хитозана в дозе 1000 мг/кг, $M \pm m$

Группа животных	Время исследования, мес.				
	фон	1	2	3	восст. период
Контроль	140±4,1	148±4,3	157±4,2	165±7,6	173±7,9
Модифицированный хитозан	142±6,6	151±10,1	159±7,8	164±6,1	171±6,5

Примечание. Здесь и в табл. 3-5: $p < 0,05$.

Как видно из таблицы 2, статистически достоверных отставаний прироста массы тела у всех опытных животных по сравнению с контрольными животными не установлено.

Содержание гемоглобина, количество эритроцитов, лейкоцитов и СОЭ в периферической крови статистически значимо от контроля не отличались (табл. 3). Содержание тромбоцитов у интактных животных составило $525,0 \pm 0,23$ против $475,2 \pm 32,4$ в контроле ($p > 0,05$). Не выявлено статистически значимых изменений количества палочкоядерных (в опытной и контрольной группе соответственно $1,83 \pm 0,57$ и $1,33 \pm 0,19\%$), сегментоядерных ($31,67 \pm 2,5$ и $31,5 \pm 1,92\%$) и таких факторов естественного иммунитета как эозинофилы, моноциты и лимфоциты (табл. 4).

Результаты, приведенные в таблице 5, позволяют сделать вывод, что у опытных животных активность ферментов щелочной фосфатазы, АСТ, АЛТ и каталазы в крови не отличались от контрольных значений, статистически достоверные различия в активности изученных ферментов в крови опытных крыс по сравнению с контрольными результатами не установлены.

Таблица 3
Показатели периферической крови белых крыс после внутрижелудочного введения в течение 3-х месяцев модифицированного хитозана в дозе 1000 мг/кг, $M \pm m$

Группа животных	Нв, г/л	Эритроциты, $10^{12}/л$	Лейкоциты, $10^9/л$	СОЭ, мм/ч
Контроль	119,1±5,3	6,02±0,3	11,22±0,63	2,67±0,1
Модифицированный хитозан	114,5±6,1	5,80±0,25	11,67±0,75	2,83±0,29

Таблица 4
Содержание факторов естественного иммунитета (%) в периферической крови белых крыс после внутрижелудочного введения в течение 3-х месяцев модифицированного хитозана в дозе 1000 мг/кг, $M \pm m$

Группа животных	Эозинофилы	Моноциты	Лимфоциты
Контроль	2,7±0,57	6,5±0,96	71,3±2,68
Модифицированный хитозан	3,17±0,39	7,5±0,77	72,5±2,29

Биохимические показатели сыворотки крови животных опытной и контрольной групп представлены в таблице 5.

Таблица 5
Биохимические показатели сыворотки крови белых крыс после внутрижелудочного введения в течение 3-х месяцев модифицированного хитозана в дозе 1000 мг/кг, $M \pm m$

Группа животных	Щелочная фосфатаза, моль/л.ч	АСТ, ммоль/л.ч	АЛТ, ммоль/л.ч	Каталаза, Мкат/л
Контроль	0,37±0,01	0,31±0,02	0,23±0,025	23,01±2,14
Модифицированный хитозан	0,38±0,02	0,30±0,04	0,22±0,013	21,04±1,16

Таким образом, результаты гематологических, биохимических исследований и изучения показателей факторов естественного иммунитета свидетельствуют об отсутствии у модифицированного хитозана токсического эффекта.

Исследования функционального состояния почек крыс через 1 и 3 месяца после внутрижелудочного введения модифицированного хитозана в дозе 1000 мг/кг показали, что диурез опытных крыс не отличался статистически от контрольных значений. Состояние азотистого обмена, критерием, которого служит содержание мочевины в крови, не имело отклонений от контроля (табл. 6). Сахар и белок в моче животных как опытной, так и контрольной группы отсутствовал в течение всего эксперимента. Кислотность мочи во всех изученных группах в течение всего опыта не изменялась, pH составлял 7,0.

Таблица 6
Показатели функции почек белых крыс через 1 и 3 месяца после внутрижелудочного введения модифицированного хитозана в дозе 1000 мг/кг

Показатель	Срок наблюдения, день	
	30-й	90-й
Суточный диурез, мл	5,98±0,33 6,5±0,40	2,61±0,10 2,47±0,14
Мочевина крови, ммоль/л	3,9±0,15 4,8±0,17	4,6±0,13 4,7±0,12

Примечание. В числителе показатели интактных животных, в знаменателе – опытной группы; $p < 0,05$.

Патологических изменений в содержании осадков мочи не обнаружено. Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что препарат в дозе 1000 мг/кг не оказывает токсического действия на функции почек.

Таким образом, установлено, что модифицированный хитозан не обладает острым и хроническим токсическим эффектом, а также не влияет на показатели функции почек. Следовательно, не обладает материальной и функциональной кумуляцией.

Литература

1. Абдиева М.О. Изучение токсичности влияния модифицированного хитозана на репродуктивную систему и экспериментальное обоснование его применения при остеопорозе // Новости дерматовенерол. и репрод. здоровья. – 2016. – Т. 73-74, №1-2. – С. 7-8.
2. Азимов Ж. Модель бактерицидной активности олигомер хитозана // Узбекский биол. журн. – 2015. – №6 – С. 11-14.
3. Асилова С.У. Экспериментальные морфологические и токсикологические исследования посттравматического остеопороза костей // Актуальные проблемы травматологии и ортопедии. – Самарканд, 2014. – С. 55-56.
4. Аспиз М.Е. О регенерации кожных желез и волос у

некоторых млекопитающих // Тр. Ин-та морфологии животных. – 1954. – №11. – С. 35-37.

5. Беседина Е.А., Сороцкая В.Н. Зависимость минеральной плотности костной ткани от весоростового коэффициента // Вестн. новых мед. технологий. – 2000. – №1. – С. 105

6. Варпаховская И.И. Хитин и хитозан // Рос. аптеки. – 2000. – №8. – С. 26-28.

7. Родионова С.С., Зацепин С.Т., Швец В.Н., Матковская Т.А. Использование бисфосфанатов для лечения системного остеопороза // Ортопед., травматол. и протезирование. – 1989. – №3. – С.51-56.

8. Zargar V., Ashgari M. A Review on Chitin and Chitosan Polymers: Structure, Chemistry, Solubility, Derivatives, and Applications, Copyright © 2015 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ВНУТРИЖЕЛУДОЧНОЙ ТОКСИЧНОСТИ И КУМУЛЯТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА МОДИФИЦИРОВАННЫЙ ХИТОЗАН

Асилова С.У., Акрамов В.Р., Гулямов Ё.Б., Мирзаев А.Б., Назаров Р.Б.

Цель: оценка острой и хронической внутрижелудочной токсичности и кумулятивных свойств препарата модифицированный хитозан. **Материал и методы:** исследования проводились на 36 белых мышах, 122 белых крысах, 6 морских свинках

и 3 кроликаx. Для выявления мутагенной активности использован микрометод культивирования лимфоцитов цельной крови человека. Модифицированный хитозан – препарат, предназначенный для использования в качестве средства, ускоряющего остеогенез, разработан в Институте химии и физики полимеров АН РУз. **Результаты:** после однократного введения препарата *per os* в дозах 5000, 6500, 8000, 9000 и 10000 мг/кг массы тела изменений в поведении и функциональном состоянии животных не наблюдалось. Отсутствие признаков интоксикации и гибели белых крыс позволяет отнести модифицированный хитозан в малотоксичным веществам (4 класс). **Выводы:** модифицированный хитозан не обладает острым и хроническим токсическим эффектом, а также не влияет на показатели функции почек, следовательно, не обладает материальной и функциональной кумуляцией.

Ключевые слова: модифицированный хитозан, лабораторные животные, острая токсичность, функции почек.

