

УДК 615.2 : 615.92

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА БИОАКТИВНЫХ КОМПОЗИЦИЙ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННОЙ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ ВИТАМИНАМИ И АМИНОКИСЛОТАМИ

А.В. Карамышева¹, Г.В. Сон¹,
Н.М. Перова¹, М.В. Мнихович¹,
С.А. Успенский², П.Л. Иванов²,
В.Н. Хабаров², М.А. Селянин²

¹ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзор
(Всероссийский научно-исследовательский
и испытательный институт медицинской
техники), 115478, г. Москва, Российская
Федерация

²АНО «Международный научно-
исследовательский центр инновационных
технологий МАРТИНЕКС», 111123,
г. Москва, Российская Федерация

Проведены экспериментальные исследования биологического действия отечественного препарата ГИАЛРИПАЙЕР-02 на основе гиалуроновой кислоты или ее соли модифицированной аскорбиновой кислотой и аминокислотами на белых крысах. Установлено, что препарат не оказал неблагоприятного воздействия на организм животных: гематологические, биохимические и иные показатели, характеризующие состояние систем и органов у животных, подвергавшихся воздействию исследуемых соединений, не имели статистически значимых отличий от аналогичных показателей контроля. На основании первого этапа исследований можно говорить о возможности использования данного нетоксичного соединения в косметологии для эстетической коррекции небольших дефектов лица (морщин, рубцов и т.д.), мезотерапии, биоревитализации, биорепарации, контурной пластики и в реконструктивной хирургии для замещения мягких тканей, в травматологии для замещения суставной жидкости.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, аскорбиновая кислота, аминокислоты, Гиалрипайер, токсичность.

Введение. Современный этап развития реконструктивной медицины отмечается существенным техническим перевооружением с большой долей участия достижений химической науки, которое заключается не только в синтезе новых соединений, но и в усовершенствовании уже разработанных, нашедших широкое применение в различных областях медицины. В этом смысле гиалуроновая кислота представляет собой продукт, привлекающий внимание специалистов в качестве объекта,

способного приобретать новые свойства при целенаправленной ее модификации [1].

В настоящее время препараты на основе гиалуроновой кислоты нашли прочное применение в косметологии для эстетической коррекции небольших дефектов лица (морщин, рубцов и т.д.), мезотерапии, биоревитализации, биорепарации, контурной пластики и в реконструктивной хирургии для замещения мягких тканей, в травматологии для замещения суставной жидкости, в сто-

Карамышева Анна Валериевна (Karamysheva Anna Valeriyevna), старший научный сотрудник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru

Сон Григорий Валентинович (Son Grigory Valentinovich), старший научный сотрудник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru

Перова Нина Михайловна (Perova Nina Mikhaelovna), кандидат медицинских наук, начальник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru

Мнихович Максим Валерьевич (Mnikhovich Maxim Valerievich), кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник отдела токсикологических испытаний и исследований материалов и медицинских изделий ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора (Всероссийский научно-исследовательский и испытательный институт медицинской техники), 115478, г. Москва, vniimt34@mail.ru, ведущий научный сотрудник Центральной патологоанатомической лаборатории ФГБУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека» РАМН (ФГБУ НИИМЧ РАМН), 117418, г. Москва, mlichmaxim@yandex.ru

Успенский Сергей Алексеевич (Uspenskiy Sergey Alekseevich), кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», 111123, г. Москва, s.a.uspenski@mail.ru

Иванов Павел Леонидович (Ivanov Pavel Leonidovich), научный сотрудник АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», 111123, г. Москва, ivanovpl@inbox.ru

Хабаров Владимир Николаевич (Khabarov Vladimir Nikolaevich), кандидат химических наук, генеральный директор АНО «Международный научно-исследовательский центр инновационных технологий МАРТИНЕКС», 111123, г. Москва, info@nc-martineks.ru

Селянин Михаил Анатольевич (Selyanin Mikhail Anatolyevich), президент группы компаний «Мартинекс», 111123, г. Москва, alo@martineks.ru



матологии для лечения пародонтита и гингивита [2].

Чрезвычайно актуальной задачей является реализация адресной доставки биологически активных соединений к конкретным клеточным структурам организма для стимуляции их метаболизма. Одним из способов решения таких задач стал выпуск препарата ГИАЛРИПАЙЕР-02, который включает в себя матрицу-носитель, в качестве модифицированной гиалуроновой кислоты и химически привитых к ней низкомолекулярных компонентов в виде аминокислот и витаминов [3].

Актуальность проблемы разработки и, соответственно, оценки биологической безопасности, новых гелевых лечебных материалов не вызывает сомнения, так как эти изделия имеют прямой контакт часто с пораженными тканями человека, обуславливая тем самым поступление лекарственных средств с возможным неблагоприятным воздействием на организм пациента в целом.

Целью исследования являлось получение информации о возможном нежелательном воздействии материалов на организм человека при практическом их применении.

Задачей исследования было изучение и оценка биологического действия вновь разработанных материалов в эксперименте, который бы наиболее близко отвечал условиям практического применения материалов, с целью экстраполяции результатов на организм человека.

Материалы и методы исследования. Материал представляет собой прозрачное бесцветное однородное студенистое вещество на основе водного раствора гиалуроновой кислоты

и сополимера гиалуроновой кислоты с аскорбилфосфатом натрия или магния, полученного методом твердофазной модификации [4], в который введены функциональные добавки в виде аминокислот. Компоненты ГИАЛРИПАЙЕР-02 и их количества приведены в таблице 1.

Материал выпускается в стеклянных шприцах или флаконах. Все образцы стерилизованы паровым методом в соответствии с МУ 287-113 или ГОСТ Р ИСО 11134.

Испытания образцов проводили с применением санитарно-химических и токсикологических видов их оценки. Санитарно-химические испытания проводят с помощью интегральных и специфических методов – оценивается химическая стабильность материала, природа мигрирующих из изделий химических соединений и их потенциальная опасность; устанавливающие стерильность и апиrogenность материала. Оценка возможного токсического действия представленных на испытания материалов проводилась в соответствии с документами: ГОСТ Р ИСО 10993–2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий»; «Ч. 2. Требования к обращению с животными»; ГОСТ ISO 10993–2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий; «Ч. 1. Оценка и исследования»; «Ч. 3 Исследование генотоксичности, канцерогенности и токсического действия на репродуктивную функцию»; «Ч. 4 Исследование изделий, взаимодействующих с кровью»; «Ч. 5 Исследования на цитотоксичность: методы in vitro»; «Ч. 6 Исследование местного действия после имплантации»; «Ч. 10 Исследование раздражающего и сенсибилизи-

Таблица 1

Состав ГИАЛРИПАЙЕР-02

Состав ГИАЛРИПАЙЕР-02	Масс. %	Производство
Гиалуронат натрия	0,5–0,7	Shiseido CO., LTD Kakegawa factory, Япония
Мод. ГК с витамином С фосфат Mg	0,3–0,8	ТУ 9358-005-12466809-98 (ФСП 42-0093-0221-00)
Глицин	0,1–0,3	ГОСТ 5860
Пролин-L	0,1–0,3	Panreac, Испания
Лизин-L-моноклорид	0,1–0,3	ТУ 6-09-4077-79
Хлористый натрий	0,1–0,2	Amresco, Германия
Фосфатный буфер	1,0	Amresco, Германия
Вода дистиллированная	до 100	ВФС 42-2619-76

рующего действия»; «Ч. 11 Исследование общетоксического действия»; «Ч. 12. Подготовка проб и контрольные образцы»; ГОСТ Р 52770–2007 «Изделия медицинские. Требования безопасности. Методы санитарно-химических и токсикологических испытаний»; ГОСТ Р 51148–98 «Изделия медицинские. Требования к образцам и документации, представляемым на токсикологические, санитарно-химические испытания, испытания на стерильность и пирогенность»; ГФ XII. ОФС 42-0061-07. Пирогенность.

Для оценки показателей, характеризующих функциональное состояние органов и систем организма в эксперименте на крысах, использовали следующий перечень тестов:

интегральные показатели (внешний вид, поведение животных, состояние кожных покровов и слизистой, шерсти, потребление пищи и воды); функции печени оценивались по показателям: активность аланиновой трансаминазы (АЛТ, Ед/л), аспарагиновой трансаминазы (АСТ, Ед/л), щелочной фосфатазы (ЩФ, Ед/л), содержание креатинина (мг/дл). Рассчитывали также коэффициент де Ритиса (отношение аспарагиновой к аланиновой трансаминазе) как диагностический критерий. Выбор тестов был определен необходимостью оценить состояние систем и органов, отвечающих за метаболизм, детоксикацию и способность к элиминации. Все биохимические показатели определяли на полуавтоматическом фотометрическом анализаторе «Stat Fax 1904 Plus» в комплексе с проточной кюветой «Mosquito 2400» производства фирмы «Awarenes Technology inc», США. Гематологические показатели периферической крови: содержание гемоглобина, подсчет числа эритроцитов определяли на анализаторе «Stat Fax 1904 Plus», подсчет лейкоцитов в камере

Горяева при помощи микроскопов МБИ-15, «ЛОМО», СССР и Olympus CX41RT с видеокамерой EVS color VEC-335. Цветной показатель определяли с помощью СФ НІТАСНІ U-2800, «Hitachi». Морфологическую оценку токсического и общераздражающего воздействия препарата проводили на серийных срезах внутренних органов, залитых в парафин и окрашенных гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Возможное аллергенное действие материалов изучали в опыте на белых крысах с применением провокационной внутрикожной пробы и проведении серологической диагностической реакции с сывороткой крови с целью выявления наличия комплекса «антиген-антитело» по реакции дегрануляции тучных клеток (РДТК). При наличии сенсибилизирующего эффекта у испытуемого материала в месте введения аллергена образуются гиперемия, отек, папула, шелушение кожи, реакция воспаления (воспаления), инфильтраты, некроз. Дополнительным тестом при оценке сенсибилизирующего действия служило определение коэффициента массы иммунокомпетентных органов (тимуса и селезенки) и их соотношение. Контролем служили крысы, которым в аналогичных условиях вводили стерильный физиологический раствор. По окончании эксперимента животных умерщвляли путем декапитации, изучали гематологические и биохимические показатели крови, определяли весовые коэффициенты внутренних органов по формуле:

$$K = M_{\text{органа, мг}} / M_{\text{тела, г}}$$

Статистическая обработка результатов наблюдений проводилась с использованием компьютерной программы вычисления оценки среднеквадратического отклонения результатов измерения от нормального распределения и вы-

Таблица 2

Биохимические показатели сыворотки крови при изучении ГИАЛРИПАЙЕР-02

КОНТРОЛЬ					
Показатель	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	Коэффициент де Ритиса	ЩФ, Ед/л	Креатинин, мг/дл
М	44,23	219,38	4,86	120,11	0,59
м	3,66	14,77	0,31	7,88	0,21
ОПЫТ Материал ГИАЛРИПАЙЕР-02					
М	43,17	215,70	4,99	118,98	0,57
м	3,19	14,22	0,39	12,38	0,05

числения доверительных границ погрешности результатов измерений. В таблицах с результатами испытаний приведены значения $M \pm m$.

Результаты и обсуждение. Изучение возможного токсического действия проводили в условиях подкожной имплантации материала ГИАЛРИПАЙЕР-02 в разрешающей дозе для человека (4,5 мл), в пересчете на массу одного животного (0,02 мл), белым крысам-самкам. Наблюдение за животными через 30 мин после введения разрешающей дозы, через 24 ч эксперимента не выявило наличия аллергической реакции – гиперчувствительности замедленного типа. На протяжении всего периода наблюдения (21 день) не отмечено гибели опытных животных, изменений внешнего вида, поведения, поедаемости корма, двигательной активности по сравнению с контрольной группой животных. При обследовании животных с помощью лабораторных методов исследования изменений гематологических и биохимических показателей не выявлено.

Результаты обследования животных с помощью лабораторных методов исследования приведены в таблицах 2, 3.

Как следует из результатов, приведенных в таблицах 2–4, обследование животных с помощью методов лабораторного исследования не выявило отличий в изучавшихся показателях у опытных крыс по сравнению с контролем.

По результатам эксперимента с использованием провокационной внутрикожной пробы, сенсибилизирующего действия вытяжек из образцов, о наличии которого судили по РДТК, и раздражающего действия на кожу не обнаружено. РДТК составила 3,2 и 3,6% при значении показателя 10–15%, рассматриваемом как слабая реакция. На вскрытии животных макроскопически не выявлено патологических изменений внутренних органов и тканей подопытных животных. Образцы материала заключены в тонкие прозрачные соединительно-тканые капсулы без признаков воспаления. Коэффициенты массы внутренних органов, в том числе иммунокомпетентных (тимус, селезёнка), опытных животных не имеют статистически достоверных отличий от аналогичных показателей контроля. Вытяжки из образцов не проявили гемолитического действия в опытах *in vitro* с изолированными эритроцитами кроли-

Таблица 3

Гематологические показатели периферической крови крыс при изучении ГИАЛРИПАЙЕР-02

КОНТРОЛЬ				
Показатель	L, тыс/мкл	Er, млн/мкл	Hb, г/л	Цветной показатель
$M \pm m$	7,31±0,87	5,65±0,25	168,13±4,12	0,95±0,01
ОПЫТ Материал ГИАЛРИПАЙЕР-02				
$M \pm m$	7,50±1,09	5,34±0,85	170,42±8,30	0,94±0,03

Значения относительной массы внутренних органов опытных и контрольных крыс приведены в таблице 4.

Таблица 4

Масса тела и весовые коэффициенты внутренних органов крыс при изучении ГИАЛРИПАЙЕР-02

Показатели	контроль	ГИАЛРИПАЙЕР-02
Масса тела	285,50±9,50	278,40±10,70
Тимус	1,15±0,15	1,34±0,17
Печень	30,96±1,46	31,23±1,79
Селезёнка	2,88±0,28	2,52±0,33
Тимус/селезёнка	0,46±0,08	0,57±0,10
Почки	5,96±0,06	6,14±0,08
Масса тела 1	286,75±10,70	279,20±11,70

ков: гемолиз 0,11 и 0,15% при допустимом значении показателя менее 2%.

Результаты проведенных исследований показали, что нет различий в изученных показателях органов и систем, отвечающих за детоксикационную функцию печени и выделительную функцию почек, у животных при воздействии материала ГИАЛРИПАЙЕР-02.

Анализируя все показатели, по которым оценивали сенсibiliзирующее действие гелевого материала: отрицательная провокационная внутрикожная проба, значения показателя дегрануляции тучных клеток, равные 3,2 и 3,6%, отсутствие отличий от контроля весовых коэффициентов иммунокомпетентных органов – тимуса и селезенки и соотношения показателей весовых коэффициентов тимус/селезенка, можно сделать вывод о том, что изученные материалы не обладают аллергенным действием.

Оценивая морфологическую структуру внутренних органов лабораторных животных,

можно сделать следующее заключение: ГИАЛРИПАЙЕР-02 не обладает местным раздражающим эффектом. Токсического воздействия на внутренние органы лабораторных животных не оказывает.

Заключение. Результаты проведенных исследований не выявили изменений в гематологических, биохимических и иных показателях, характеризующих состояние жизненно важных систем и органов у животных, подвергавшихся воздействию исследуемых соединений, что позволяет сделать вывод о возможности применения изученных материалов по назначению. Материал гелевый на основе модифицированной гиалуроновой кислоты водосодержащий стерильный ГИАЛРИПАЙЕР-02 ТУ 9398-004-58568834-2009, организация-изготовитель ООО «Лаборатория ТОСКАНИ» нетоксичен, стерилен, отвечает требованиям нормативной документации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Carole E. Schante, Guy Zuber, Corinne Herlinb, Thierry F. Vandamme Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V. 85. – P. 469–489.

2. Хабаров В.Н., Бойков П.Я., Селянин М.А. Гиалуроновая кислота: получение, свойства, применение в биологии и медицине // Практическая медицина. М., 2012. – 224 с.
3. Хабаров В.Н., Селянин М.А., Михайлова Н.П., Зеленецкий А.Н.

Биоактивные композиции на основе модифицированной гиалуроновой кислоты // Вестник эстетической медицины. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 49–54.

4. Хабаров В.Н., Волков В.П., Зеленецкий А.Н. и др. Способ

получения модифицированной аскорбиновой кислотой сшитой соли гиалуроновой кислоты и биоактивная композиция на её основе // Патент 2382050 РФ. 2010 г.

REFERENCES:

1. Carole E. Schante, Guy Zuber, Corinne Herlinb, Thierry F. Vandamme Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications // Carbohydrate Polymers. – 2011. – V. 85.

– P. 469–489.
2. Khabarov V.N., Boykov P.Y., Selyanin M.A. Hyaluronan: preparation, the properties, applications in biology and medicine // practical medicine. M., 2012. – 224s. (in Russian).

3. Khabarov V.N., Selyanin M.A., Mikhailova N.P., Zelenetsky A.N. Bioactive composition based on modified hyaluronic acid // Journal of Aesthetic Medicine. – 2009. – Т. 8, № 1. – С. 49–54 (in Russian).

4. Volkov. V.P et al. Patent RU 2382050 C1. Method for preparing modified ascorbic acid of cross-linked hyaluronic acid salt and based bioactive composition. 2010 (in Russian).

A.V. Karamysheva¹, G.V. Son¹, N.M. Perova¹, M.V. Mnikhovich¹, S.A. Uspenskii², P.L. Ivanov², V.N. Khabarov², M.A. Selyanin²

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOSITIONS BASED ON HYALURONIC ACID MODIFIED WITH VITAMINS AND AMINO ACIDS

¹Federal State Budgetary Institution «All-Russian Scientific Research and Testing Institute of Medical Engineering», Federal Service for Surveillance in Healthcare, 115478, Moscow, Russian Federation

² Autonomous Noncommercial Organization «International Research Center for Innovative Technologies MARTINEX», 111123, Moscow, Russian Federation

Experimental studies of the biological action of the domestic preparation (Hyalrepair-02) containing as essential part hyaluronic acid modified with ascorbic acid and amino acids or its salts were carried out in white rats. It was established that the drug does not produce any adverse effects on hematological, biochemical, or others indicators characterizing the state of systems and organs of animals exposed to test compounds. The test compound has no statistically significant differences from similar control indicators. Based on the first stage of the studies, it could be said that this non-toxic compound may be used in cosmetics to treat minor facial defects to be aesthetically corrected (wrinkles, scars, etc.), in mesotherapy, biorevitalisation, bioreparation, contouring plastics and reconstructive surgery, in traumatology to replace soft tissue in joint fluid replacement.

Key words: hyaluronic acid, ascorbic acid, amino acids, hyalrepair, toxicity.

Материал поступил в редакцию 21 апреля 2014 г.