**УДК: 615.272.6.099:577.112.384.2**
**DOI: 10.17238/issn2072-2419.2021.1.87**

# ИЗУЧЕНИЕ АНОМАЛЬНОЙ ТОКСИЧНОСТИ L-АСПАРАГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Коровина В.В. – к.в. н., асс. каф. микробиологии, вирусологии и иммунологии (orcid 0000-0001-8022-2399) (ФГБОУ ВО СПБГУВМ)

***Ключевые слова***: аномальная т оксичност ь, L-аспарагиновая кислота, лабораторные животные, тест-доза. ***Key words***: abnormal toxicity, L-aspartic acid , laboratory animals, test dose.

***РЕФЕРАТ***

Более 60 лет тест на аномальную токсичность используется для контроля качества медицинских и ветеринарных препаратов и основной его целью является выявление токсичности препаратов, получаемых из субстанций биологического происхождения, превышающей установленный ранее допустимый уровень, контролируемый по повышению летальности или по неожидаемым (нерегламентированным) явлениям интоксикации животных. Этот тест позволяет определить аномальную или повышенную токсичность лекарственных препаратов, которая возникает за счет появления нежелательных примесей или продуктов разложения при изменении процесса производства, не предусмотренных регламентом производства, транспортирования или хранения.

Целью настоящих исследований являлась разработка методики контроля качества субстанции L-аспарагиновой кислоты. Исследования по показателю «Аномальная токсичность» проводили в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи РФ XIV, раздел «Аномальная токсичность» (ОФС.1.2.0004.15), согласно которому препарат считается выдержавшим испытание на аномальную токсичность, если суммарная гибель животных в проведенном испытании на 10 мышах не превышает 10 % [1]. Для достижения поставленной цели изучили условия растворения L-аспарагиновой кислоты для получения ее растворов с максимальной концентрацией. Определили максимально переносимую дозу L-аспарагиновой кислоты. По показателю «Аномальная токсичность» разработали тест-дозу на изучаемый препарат. В качестве тест-дозы считали целесообразным рекомендовать максимально переносимую дозу, т.е. ту дозу, при введении которой не отмечается летальности, выраженных клинических явлений интоксикации или наблюдаемые явления интоксикации проявляются кратковременно и очень слабо.

## *ВВЕДЕНИЕ*

Субстанция L-аспарагиновой кислоты (acidum asparticum) применяется для производства инъекционных препаратов и описана в ведущих зарубежных фармакопеях - Ph. Eur. 6.2 (Aspartic Acid), USP 31 (Aspartic Acid) [11].

Аспарагиновую кислоту получают конденсацией ацетамино-малонового эфира с эфиром хлоруксусной кислоты с последующим гидролизом и декарбоксилированием продуктов конденсации или кислотным гидролизом аспарагина. Методы выделения и анализа аспарагиновой кислоты основаны на нерастворимости ее кальциевых и бариевых солей. Биосинтез осуществляется в результате изомеризации треонина в гомосерин с последующим его окислением или в результате гидролиза аспарагина.

Аспарагиновая кислота одна из дикарбоновых аминокислот, имеет слабокис-

лые свойства (изоэлектрическая точка при pH 2,77). Кристаллизуется в виде ромбических призм, плохо растворимых в холодной воде. Встречается во всех организмах в свободном виде и в составе белков. Аспарагиновая кислота в значительных количествах входит в состав белков животных и растений, играет важную роль в обмене азотистых веществ. Участвует в образовании пиримидиновых оснований, синтезе мочевины. Наряду с глутаминовой кислотой играет важнейшую роль в реакциях переаминирования, является предшественником в биосинтезе незаменимых аминокислот метионина, треонина и лизина у растений и микроорганизмов. Аспарагиновая кислота может быть синтезирована в животном организме. Продуктом амидирования аспарагиновой кислоты является аспарагин [2,10].

Аспарагиновая кислота и аспарагин являются критически важными для роста и размножения лейкозных клеток при некоторых видах лимфолейкоза. Фермент микробного происхождения L-аспарагиназа, нарушающий превращение аспарагиновой кислоты в аспарагин и наоборот, оказывает сильное специфическое цитостатическое действие при этих видах лейкозов. Аспарагиновая кислота и её соли используются, как компоненты лекарственных средств.

***МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ***

Был проведен предварительный поиск условий растворения L-аспарагиновой кислоты для получения ее растворов с максимальной концентрацией. В качестве растворителей использовали воду для инъекций, слабые растворы гидроксида натрия и калия, физиологический раствор натрия хлорида 0,9%. Для каждой серии растворов проводили испытание на 10 мышах, учитывая переносимость по клиническим проявлениям интоксикации и летальность.

Исследования проведены на нелинейных белых мышах обоего пола массой тела - 19-21 г, полученных из питомника лабораторных животных. В период карантина (2 недели) и во время эксперимента животные находились в виварии при 22-24оС, влажности 50-60%, естественном световом режиме “день-ночь”, в стандартных пластиковых клетках, на стандартном пищевом рационе [6,7,9].

С животными обращались в соответствии с правилами “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей” [3,5,8].

***РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ***

Проведен предварительный поиск условий растворения L-аспарагиновой кислоты для получения ее растворов с максимальной концентрации. В качестве растворителей использовали воду для инъекций, слабые растворы гидроксида натрия и калия, физиологический раствор натрия хлорида 0,9%. Для каждой серии растворов проводили испытание на 10 мышах, учитывая переносимость по клиническим проявлениям интоксикации и летальность.

Установлено, что наибольшее количество аспарагиновой кислоты (до получения 10% раствора) растворяется при использовании 1М растворов натрия и калия гидроксида, при этом в растворе находятся диссоциированные соли - аспарагинаты, то есть иное вещество, что является некорректным для испытания на аномальную токсичность. При этом, pH этих растворов становится выраженно щелочным, что плохо переносится при внутривенном введении мышам.

Таким образом, в качестве растворителя в предварительных исследованиях с апробацией на животных, был выбран физиологический раствор натрия хлорида и дальнейшие исследования по отработке тест-дозы проводились с его использованием.

Подготовку субстанции L-аспарагиновой кислоты к внутривенному введению мышам проводили, учитывая, что, во-первых, L-аспарагиновая кислота мало растворима в воде, и, во-вторых, что ее водные суспензии или растворы имеют сильнокислую реакцию [11]. В качестве растворителя выбран раствор натрия хлорида 0,9% для инъекций, который изотоничен плазме крови, наиболее часто при-

меняется для разведения инфузионных лекарственных средств и его pH находится в диапазон 5,0-7,0 [4], что способствует уменьшению кислотности раствора аспарагиновой кислоты.

На первом этапе исследования опытным путем определяли максимально возможное количество субстанции L-аспарагиновой кислоты, которое растворяется в достаточном для измерения pH объеме стерильного раствора натрия хлорида 0,9% для инъекций. Для этого к точной навеске субстанции добавляли учитываемые объемы раствора натрия хлорида 0,9%, нагревая на водяной бане при температуре 60ºС при постоянном перемешивании в течение не менее 20 мин.

Установлено, что максимальным количеством субстанции L-аспарагиновой кислоты, которое почти полностью растворяется в указанных условиях в 20 мл раствора натрия хлорида 0,9%, является 100 мг, при этом pH полученного раствора составляет 2,6-2,8. Доведение pH полученного раствора субстанции 0,1 М раствором натрия гидроксида до 4,5-6 (диапазон pH большинства применяемых в инфузионной терапии препаратов [4]) способствует как полному растворению субстанции, так и получению более оптимального раствора для внутривенного введения экспериментальным животным.

На втором этапе исследования оценивали переносимость подготовленного раствора субстанции L-аспарагиновой кислоты при внутривенном введении мышам.

В соответствие с требованиями ГФ XIV опыты проведены на здоровых белых нелинейных мышах обоего пола массой тела 19-21 г. Каждой из 10 мышей вводили максимально допустимый для внутривенного введения объем полученного раствора субстанции – 0,5 мл со скоростью 0,1 мл/с, что соответствовало дозе L -аспарагиновой кислоты – 125 мг/кг.

Наблюдение за мышами проводили в течение 7 суток, учитывая общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, динамику массы тела и другие показатели, которые могут быть использованы для выявления токсического эффекта.

Установлено, что при внутривенном введении подготовленного раствора L-аспарагиновой кислоты в максимально возможной дозе 125 мг/кг (0,5 мл 0,5% раствора), как сразу после введения, так и в течение всего периода наблюдения у мышей не наблюдается каких-либо токсических явлений и нарушений динамики массы тела, не выявлено патологии в состоянии шерстного покрова, слизистых оболочек, потреблении пищи и воды. Поведение животных соответствовало норме. Гибели животных в течение периода наблюдения не регистрировалось.

Таким образом, указанная доза L-аспарагиновой кислоты хорошо переносится животными, что согласуется с данными литературы об ее уровне токсичности: L-аспарагиновая кислота и ее соли в соответствии с классификацией токсичности химических веществ относятся к малотоксичным веществам (ЛД50 при внутривенном введении >1000 мг/кг, точная величина для аспарагиновой кислоты не установлена из-за ее малой растворимости).

***ВЫВОДЫ***

Следовательно, проведенным экспериментальным исследованием установлено, что для испытания на аномальную токсичность в качестве тест -дозы можно рекомендовать следующую дозу L-аспарагиновой кислоты: 0,5 мл раствора, содержащего 2,5 мг субстанции в растворе натрия хлорида 0,9%, которая должна вводиться в течение 5 с. Рекомендуемый срок наблюдения при испытании препарата на аномальную токсичность должен составлять 24 часа.

Тест-доза: 0,5 мл раствора субстанции, содержащие 2,5 мг L-аспарагиновой кислоты, на 1 мышь. Вводить внутривенно в течение 5 с. Срок наблюдения 24 часа.

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, 2018 г, с. 1123.

**STUDY OF ABNORMAL TOXICITY L -ASPARTIC ACID. Korovina V. V. – phd, Assistant (St. Petersburg State University of Veterinary Medicine)**

***ABSTRACT***

For more than 60 years, the abnormal toxicity test has been used to control the quality of medical and veterinary drugs and its main purpose is to detect the toxicity of drugs obtained from substances of biological origin that exceeds the previously established permissible level, controlled by increased mortality or by unexpected (unregulated) phenomena of animal intoxication. This test allows you to determine the abnormal or increased toxicity of medicines, which occurs due to the appearance of undesirable impurities or decomposition products when changing the production process that is not provided for in the production, transportation or storage regulations.

The purpose of this research was to develop a method for quality control of the substance L-aspartic acid. Studies on the indicator "Abnormal toxicity" were conducted in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation XIV, section " Abnormal toxicity»

***ЛИТЕРАТУРА***

1.Аномальная токсичность (ОФС.1.2.4.004.15) / Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV.,т.1.– 2018. М.: «Издательство

2.«Научный центр экспертизы средств медицинского применения». – 1123с.

3.Биологический энциклопедический словарь. Гл. ред. М. С. Гиляров; Редкол.: А. А. Бабаев, Г. Г. Винберг, Г. А. Заварзин и др. — 2-е изд., исправл. — М.: Сов. Энциклопедия, 1986. – 135с.

4.Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Пер. с англ. - М. : Высшая школа, 1991. - С. 119 - 122.

5.Инфузионная терапия и клиническое питание. Под. ред. Хлябича Г.Н. – Фрезениус АГ-ФРГ. – 1992. – 795 с.

6.Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник /Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Г.П. и др. Под ред. Меньшикова В.В.-М.:Медицина,1987.-386 с.

7.Лапач С.Н., Чубенко А.В., Бабич П.Н. Статистические методы в биологических исследованиях с использованием Excel. – К.: Морион. – 2000. – 320 с.

8.Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ /Арзамасцев Е.В., Гуськова Т.А., Березовская Т.А. и др. // Руководство по экспериментальному (доклиническому ) изучению новых фармакологических веществ/под общей ред. чл.-корр. РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – С. 41 – 54.

9.Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними /Ю.М. Кожем'якин, О.С.Хромов, М.А.Філоненко, Г.А.Сайфетдінова – К.:Авіцена, 2002. - 156 с.

10. Проблема нормы в токсикологии. (Современные представления и методические подходы, основные параметры и констан-ты)./Трахтенберг И. М., Сова Р. Е., Шефтель В. О. и др. Под ред. проф. И. М. Трахтенберга.-М.: Медицина, 1991. - 204 с.

11. 10. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск XI. – М.: «Эхо». – 2010. – 944 с.

12. Martindale. The Complete Drug Referece. Thirty-sixth edition. – London-