

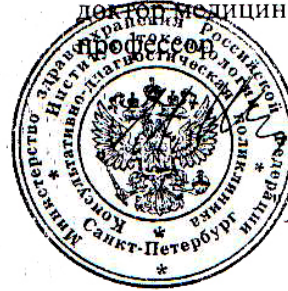
**ФЕДЕРАЛЬНОЕ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОЕ АГЕНТСТВО
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ТОКСИКОЛОГИИ**

192019, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1
Телефон/факс: (812) 567-91-65

e-mail: pharmtest@sp.ru
www.toxicology.ru

" У Т В Е Р Ж Д А Ю "

/ Директор Института токсикологии
доктор медицинских наук,



С.П. Нечипоренко

3 " 12 2008 г.

ОТЧЕТ

**об экспериментальном изучении безопасности сырья для
производства БАД «Угля высокой сорбционной
способности (УВСС) USVR»
производства ООО НПФ «БИОС», г. Санкт-Петербург**

Научный руководитель
доктор медицинских наук,
ведущий научный сотрудник

В.К. Суханкин



г. Санкт-Петербург, 2008 г.

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Ведущий научный сотрудник,
канд. мед. наук
(ответственный исполнитель)



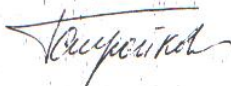
Колбасов С.Е.

Научный сотрудник



Алексеева Ю.А.

Старший научный сотрудник,
канд. мед. наук



Стройкова Г.С.

Старший научный сотрудник



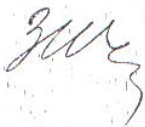
Трефилов В.В.

Старший научный сотрудник,
канд. мед. наук



Мелихова М.В.

Старший научный сотрудник,
канд. мед. наук



Хоботова З.И.

Работу обеспечивали:

Лаборанты-исследователи:

Алпатова Л.Н., Башкирева И.М., Гусева В.М.,
Дроздова Н.С., Патракова Е.В., Пименова Л.М.,
Орлова М.А.

Врачи-ветеринары:

Потапенко Е.Г., Храброва А.В.

СПИСОК ТЕРМИНОВ И СОКРАЩЕНИЙ

F – female (женский пол) самка

Lim_{ac genet} – порог острого однократного ингаляционного воздействия, установленного по специфическим эффектам, на генеративную функцию

Lim_{kc/i} – порог раздражающего действия для подопытных животных при ингаляторном воздействии на протяжении 4 месяцев по 4 часа в день 5 раз в неделю

Lim_{ac} – порог однократного вредного действия вещества – минимальная концентрация (или доза), которая вызывает изменения в организме

Lim_{ch} – порог хронического действия – минимальная концентрация (доза), вызывающая биологический эффект при хроническом воздействии

Lim_{im} – пороговая концентрация, установленная по влиянию вещества на систему иммунитета

M – male (мужской пол) самец

Z_{ch} – зона хронического действия, отношение Lim_{ac} к Lim_{ch}

Z_{ir} – зона раздражающего действия, отношение Lim_{ac} к Lim_{ir}

АЛТ – аланинаминотрансфераза (печеночная)

АСТ – аспаратаминотрансфераза (сердечная)

в/ж – внутривенно

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

K_к – коэффициент кумуляции – отношение дозы или концентрации, вызывающей определенный эффект при однократном воздействии, к суммарной дозе или концентрации вещества, вызывающей тот же эффект при многократном воздействии

КВИО – коэффициент возможности ингаляционного отравления

ЛД_{50 в/ж} – среднесмертельная доза для крыс при внутривенном введении

ЛД₅₀ – среднесмертельная доза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

ЛК₅₀ – среднесмертельная (летальная) концентрация при вдыхании

ЛК_{50 дерм} – среднесмертельная (летальная) доза при нанесении на кожу

МК – массовый коэффициент

МНК (МНД) – максимально недействующая концентрация (доза) - подпороговая концентрация химического вещества, определяемая по санитарно-токсикологическому признаку (поступление с водой)

МТД – минимально токсическая доза, испытание которой в эксперименте на животных сопровождается патологическими явлениями

ПДК – предельно-допустимая концентрация

ПДК_{врз} – предельно допустимая концентрация в воздухе рабочей зоны – эта концентрация при ежедневной (кроме выходных дней) работе в пределах 8 часов или другой продолжительности, но не более 41 часа в неделю, в течение всего рабочего стажа не должна вызывать заболевания или отклонения в состоянии здоровья, обнаруживаемых современными методами исследования в процессе работы или в отдаленные сроки настоящего и последующего поколений

ПДК_{мр} – предельно допустимая концентрация максимально разовая – концентрация, не вызывающая при вдыхании в течение 30 минут рефлекторных реакций в организме человека

ПДК_{сс} – предельно допустимая концентрация среднесуточная – не должна оказывать на человека прямого или косвенного вредного воздействия при неопределенно долгом (годы) вдыхании

ПОХиБВ – потенциально опасные химические и биологические вещества

РСЛЛ – реакция специфического лизиса лейкоцитов

СЛ₅₀; СL₅₀ – средняя смертельная концентрация – концентрация вещества, вызывающая гибель 50% животных: при 2 и 4-часовом воздействии и 14-дневном сроке наблюдения

СПП – суммационно-подпороговый показатель

ЩФ – щелочная фосфатаза

РЕФЕРАТ

Отчет изложен на 28 страницах машинописного текста и содержит 19 таблиц.

В нем представлены материалы по экспериментальному изучению безопасности сырья для производства БАД – «Угля высокой сорбционной способности (УВСС) USVR», разработанного ООО НПФ «БИОС», г. Санкт-Петербург.

Показано, что исследуемый УВСС нетоксичен и безопасен в плане развития отдаленных последствий.

Ключевые слова: Уголь высокой сорбционной способности (УВСС);
безопасность; токсичность; ПДК; ОБУВ

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ.....	9
1. Экспериментальное изучение безопасности УВСС	9
1.1. Санитарно-химический и радиологический анализ	9
1.2. Материалы и методы биологических исследований	10
1.3. Исследование острой токсичности.....	11
1.4. Хроническая токсичность и способность к кумуляции	20
1.5. Местное действие на кожу	22
1.6. Действие на глаза	23
1.7. Ингаляционное воздействие пылью УВСС	23
1.8. Изучение возможного сенсibiliзирующего действия.....	23
1.9. Изучение возможных отдаленных последствий	24
1.10. Изучение возможного местно-раздражающего действия УВСС	25
1.10.1. Материалы и методы.....	25
1.10.2. Результаты исследования	25
1.11. Литература	25
2. Расчет и обоснование гигиенических нормативов (ОБУВ, ПДК).....	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	28

ВВЕДЕНИЕ

«Уголь высокой сорбционной способности (УВСС) USVR» разработан (ТУ 9318-001-96144318-08) и производится ООО НПФ «БИОС» (г. Санкт-Петербург) в качестве сырья для производства БАД.

Основу УВСС составляют углеродные волокна высокой сорбционной емкости. Поэтому целью настоящего исследования являлось экспериментально обоснованное определение биологической активности УВСС для целей использования в качестве энтеросорбента.

Настоящая работа по изучению безопасности и биологической активности УВСС была выполнена во ФГУН «Институт токсикологии» ФМБА России в испытательной токсикологической лаборатории лекарственных препаратов, продуктов питания и объектов окружающей среды «АНАЛЭКТ» (Аттестат аккредитации № ГСЭН.RU.ЦОА.312 ФС по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека действителен до 02.08.2011 г.; аттестат аккредитации аналитической лаборатории «Аналэкт» № РОСС RU.0001.514726 действителен до 09.02.2009 г.).

Объем исследований включал санитарно-химический анализ и оценку следующих токсикологических характеристик:

1. Острая токсичность при внутрижелудочном введении.
2. Способность к кумуляции.
3. Возможное раздражающее действие.
4. Возможное сенсibiliзирующее действие.
5. Возможные отдаленные последствия.

Исследования были выполнены в соответствии со следующими нормативными документами:

1. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. МУК 2.3.2.721-98. МЗ РФ. М., 1999, 87 с.
2. Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны. № 2163-80. М., 1980, 19 с.
3. Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны. Методические рекомендации. № 2121-80, М., 1980, 16 с.
4. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности продовольственного сырья и пищевых продуктов. М., 2002, 270 с.
5. НРБ-99;

6. «Методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ» (в книге «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», М., Медицина, 2005, с. 41-53).

При изучении безопасности УВСС исходили из того, что он является парафармацевтиком.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ УВСС

1.1. Санитарно-химический и радиологический анализ

Исследования были выполнены в соответствии со следующими нормативными документами:

1. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. МУК 2.3.2.721-98. МЗ РФ. М., 1999, 87 с.;
2. СанПиН 2.3.2.1078-01. Гигиенические требования безопасности и пищевой ценности продовольственного сырья и пищевых продуктов. М., 2002, 270 с.
3. НРБ-99.

Подготовка проб проводилась по ГОСТ 26929–86 «Сырье и продукты пищевые. Подготовка проб. Минерализация для определения токсичных элементов». Токсичные элементы и вещества определялись по методическим указаниям № 01-19/47-11, ГОСТ 26930, 30171-96, 26927 и МУ 3208-85 с использованием газожидкостного хроматографа «Карло Эрба» (модель HRGC 5700, заводской номер 205485) и атомно-адсорбционного спектрометра «Перкин-Элмер» (модель 303, заводской номер 50463).

Суммарная удельная радиоактивность образцов УВСС измерялась на гамма-спектрометре «УСК-Гамма-плюс» (Россия).

Результаты исследования представлены в таблицах 1.1.1 и 1.1.2.

Таблица 1.1.1

Содержание токсичных элементов и токсикантов в УВСС

Показатели	Норма по СанПиН 2.3.2.1078-01	Содержание в УВСС
Элементы		
Свинец, мг/кг	6,0	0.01
Кадмий, мг/кг	1,0	0.02
Ртуть, мг/кг	0.1	0.005
Мышьяк, мг/кг	0.5	0.03

Хлорорганические пестициды		
ГХЦГ, мг/кг	0.1	<0.01
ДДТ и метаболиты, мг/кг	0.1	<0.01
Гептахлор	<0.002	<0.001
Алдрин	<0.002	<0.001

Таблица 1.1.2

Удельная радиоактивность образцов

Радионуклид	Норма по СанПиН 2.3.2.560-96, прил. 3 и 8, НРБ-99, Бк/кг	Активность, Бк/кг
⁹⁰ Sr	100	12
¹³⁷ Cs	200	19

Таким образом, по результатам проведенных измерений содержание вредных и опасных для здоровья веществ в УВСС не превышает допустимых уровней.

1.2. Материалы и методы биологических исследований

Работу проводили в соответствии с «Методическими указаниями к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны»[1] и методическими указаниями «Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище»[2].

В экспериментах использовали белых мышей, крыс, морских свинок и кроликов стандартной массы. Для в/ж введения из УВСС ex tempore готовили разведения на растительном масле.

Динамику веса крыс и относительной массы внутренних органов к весу тела определяли на весах ВЛР-500.

Суточную мочу собирали с помощью обменных клеток для крыс итальянской фирмы «Technoplast».

Кровь для биохимических исследований получали пункцией хвостовой вены крыс или из орбитального синуса морских свинок.

Активность АлАТ, АсАТ, ЩФ, тимоловую пробу, содержание общего белка и липидного фосфора сыворотки крови, белка мочи определяли с помощью наборов Био-Лат-Тест Чешской фирмы «Лахема».

СПП определяли по С.В.Сперанскому [3], а остальные показатели общепринятыми методами.

В условиях свободного поведения методом «открытого поля» изучали поведение животных [4].

Забитые декапитацией животные подвергались патологоанатомическому вскрытию. Для гистологического исследования брали легкие, сердце, печень, почки, желудок и кожу. Материал фиксировали в 15% формалине и заливали в парафин. Срезы окрашивали гематоксилин-эозином и суданом IV на жир.

Изучение гонадотоксического эффекта проводилось в соответствии с методическими рекомендациями [5] по показателям, обязательным при первичной оценке химических веществ [6]. Изучение мутагенной активности проводили по частоте образования микроядер в полихроматофильных эритроцитах костного мозга (из бедренной кости) белых мышей в соответствии с методическими рекомендациями [7, 8].

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили по Стьюденту-Фишеру.

1.3. Исследование острой токсичности

Для определения показателей острой токсичности УВСС вводили белым мышам и крысам обоего пола внутрижелудочно (в/ж) через атравматичный металлический зонд в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксону. Расчеты средних летальных доз проводили по В.Б. Прозоровскому (Фармакология и токсикология, 1978, №4, с. 497–502). Для достижения больших доз введение осуществляли повторно с интервалом 20–30 минут в течение 4 часов. Контрольные животные получали аналогичные по объемам количества растворителя — растительного масла.

Период наблюдения составлял 14 дней. Регистрируемые показатели: летальность, время гибели, симптоматика отравления, ежедневное наблюдение общего состояния и поведения, взвешивание до введения, на 7 и 14 дни наблюдения, объемы потребления корма и воды (для этого животные помещались в обменные клетки итальянской фирмы «Техноplast»), вскрытие и макроскопическое исследование всех погибавших и выживших животных в конце исследования (эвтаназия у грызунов осуществлялась передозировкой эфира), определение массовых коэффициентов внутренних органов.

Зависимые от дозы УВСС летальные эффекты представлены в таблицах 1.3.1–1.3.4

Таблица 1.3.1

Токсичность УВСС при в/ж введении мышам-самцам

Доза, мг/кг	10000	12640	15920	20000	24520	31760	40000
Эффект, пало/всего	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5

$$ЛД_{50} = 21280 \pm 2000 \text{ мг/кг}$$

$$ЛД_{16} = 13120 \pm 1160 \text{ мг/кг}$$

$$ЛД_{84} = 28800 \pm 2200 \text{ мг/кг}$$

Таблица 1.3.2

Токсичность УВСС при в/ж введении мышам-самкам

Доза, мг/кг	4000	6320	10000	12640	20000	24520	31760	40000
Эффект, пало/всего	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	3/5	4/5	5/5

$$ЛД_{50} = 23800 \pm 900 \text{ мг/кг}$$

$$ЛД_{16} = 18000 \pm 880 \text{ мг/кг}$$

$$ЛД_{84} = 31400 \pm 2000 \text{ мг/кг}$$

Таблица 1.3.3

Токсичность УВСС при в/ж введении крысам-самцам

Доза мг/кг	10000	12640	15920	20000	24520	31760	40000
Эффект, пало/всего	0/5	1/5	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5

$$ЛД_{50} = 20800 \pm 1400 \text{ мг/кг}$$

$$ЛД_{16} = 15200 \pm 1000 \text{ мг/кг}$$

$$ЛД_{84} = 28400 \pm 1600 \text{ мг/кг}$$

Токсичность УВСС при в/ж введении крысам-самкам

Доза мг/кг	10000	12640	15920	20000	24520	31760	40000
Эффект, пало/всего	0/5	1/5	2/5	2/5	3/5	4/5	5/5

$$LD_{50} = 20000 \pm 1200 \text{ мг/кг}$$

$$LD_{16} = 14000 \pm 800 \text{ мг/кг}$$

$$LD_{84} = 28000 \pm 1400 \text{ мг/кг}$$

Гибель животных при в/ж введении смертельных доз УВСС (более 15000 мг/кг) наблюдалась в течение 1–2 дней от момента введения при явлениях гиперсаливации, одышки, гиперкинезов, заторможенности, вялости, оглушения, кратковременных судорог в агональной стадии и паралича. Шерсть была взъерошенной, наблюдался акроцианоз.

Вскрытие погибших при в/ж введении мышей и крыс выявило, помимо венозного полнокровия внутренних органов и перерастяжения желудка и тонкого кишечника, субплевральные и субдуральные кровоизлияния, а также мелкие кровоизлияния в продолговатом мозге и полушариях коры.

Можно предположить, что в танатогенезе основную роль играют не токсические свойства УВСС, а патологические рефлексы с перерастянутых органов ЖКТ из за слишком больших объемов введенного материала.

У остальных экспериментальных животных на дозах менее 15000 мг/кг в первые сутки отмечались заторможенность, вялость, снижение потребления корма и воды, диарея. В остальные дни общее состояние и поведение экспериментальных животных не отличались от контрольной группы. На вскрытии — без особенностей. Половых различий в течении интоксикации не отмечалось.

Изложенное выше демонстрируется таблицами 1.3.5–1.3.11.

*Динамика массы тела самцов крыс (г) после в/ж введения УВСС
в дозах менее 15000 мг/кг ($M \pm m$)*

Время наблюдения	Контроль	УВСС
Фон	164 ± 10	160 ± 3
2 день	160 ± 15	153 ± 10
7 день	173 ± 10	163 ± 14
14 день	180 ± 15	176 ± 10

Таблица 1.3.6

*Динамика массы тела самок крыс (г) после в/ж введения УВСС
в дозах менее 15000 мг/кг ($M \pm m$)*

Время наблюдения	Контроль	УВСС
Фон	164 ± 14	175 ± 9
2 день	157 ± 10	166 ± 15
7 день	169 ± 9	174 ± 15
14 день	175 ± 9	185 ± 10

Динамика потребления воды (мл/день) крысами после в/ж введения УВСС в дозах менее 15000 мг/кг ($M \pm m$)

Время наблюдения	Контроль		УВСС	
	М	Ф	М	Ф
Фон	20.0±2.0	19.3±1.9	19.1±2.0	18.8±2.0
2 день	19.6±2.0	20.1±1.9	19.0±0.9	19.6±2.0
7 день	19.8±1.9	19.8±0.9	19.8±2.0	20.3±1.9
14 день	21.8±2.9	20.7±3.0	21.9±0.9	25.2±0.9*

*) — достоверные отличия от фона и контроля ($P < 0.05$)

Динамика потребления корма (г/день) крысами после в/ж введения УВСС в дозах 15000 мг/кг ($M \pm m$)

Время наблюдения	Контроль		УВСС	
	М	Ф	М	Ф
Фон	12.7±0.3	10.3±0.5	10.3±0.4	12.4±0.4
2 день	10.6±1.3	10.2±0.5	6.6±0.4*	8.4±0.3
7 день	12.3±0.4	10.0±0.9	10.2±1.0	11.8±0.3
14 день	10.8±1.0	10.4±0.3	11.3±0.3	10.4±0.3

*) — достоверные отличия от фона и контроля ($P < 0.05$)

*Влияние УВСС на массу тела (г)
выживших белых мышей*

Время наблюдения	Группы			
	Контроль		УВСС	
	М	Ф	М	Ф
Фон	18.0±3.9	17.8±1.8	19.9±3.8	19.3±3.8
7 день	20.1±3.0	19.6±3.9	21.4±3.0	20.0±2.9
14 день	20.4±3.9	21.6±4.0		21.1±3.0

Таблица 1.3.10

*Массовые коэффициенты (МК) органов у выживших белых мышей при
в/ж введении УВСС (г/кг веса тела)*

Орган	Исследуемые группы и пол			
	Контроль		УВСС	
	М	Ф	М	Ф
Сердце	3.4±0.3	3.7±0.09	3.8±0.4	3.3±0.1
Легкие с трахеей	6.7±0.1	6.4±0.3	6.3±0.1	6.1±0.1
Тимус	0.97±0.16	0.95±0.11	1.12±0.15	1.14±0.16
Печень	39.7±3.5	37.5±2.5	38.5±4.2	37.7±5.3
Селезенка	3.77±0.48	3.27±0.59	4.03±0.18	3.35±0.33
Почки	10.1±0.9	10.9±0.3	10.3±0.5	11.0±1.0
Надпочечники	0.14±0.06	0.15±0.07	0.16±0.06	0.15±0.04
Головной мозг	15.5±2.3	17.6±1.6	15.9±0.7	16.3±0.9
Яички или яичники	3.8±0.2	0.23±0.06	4.0±0.2	0.28±0.05

Таблица 1.3.11

Массовые коэффициенты (МК) органов у выживших белых крыс при в/ж введении препарата (г/кг веса тела)

Орган	Исследуемые группы и пол			
	Контроль		УВСС	
	М	Ф	М	Ф
Сердце	4.2±0.2	4.1±0.5	4.6±0.5	4.6±0.1
Легкие с трахеей	6.2±0.08	6.6±0.6	6.4±0.5	6.3±0.2
Тимус	1.2±0.3	1.2±0.2	1.6±0.2	1.8±0.2
Печень	29.8±1.6	27.3±2.3	28.3±2.2	28.7±1.7
Селезенка	5.0±0.1	5.1±0.3	6.1±0.3	6.1±0.1
Почка (левая)	7.6±0.3	7.0±0.4	7.6±0.09	7.3±0.3
Надпочечник (левый)	0.09±0.02	0.09±0.01	0.10±0.02	0.09±0.01
Головной мозг	8.4±0.6	8.4±0.5	7.9±0.5	7.9±0.3
Яички или яичники	7.12±0.28	0.32±0.02	7.54±0.22	0.31±0.03

По данным вскрытия и макроскопического исследования изучаемых органов мышей и крыс различий между группами животных не установлено.

Шерсть была блестящей, опрятного вида. Очагов облысения не наблюдалось. Выделения из естественных отверстий отсутствовали. Передние и задние конечности изменений не представляли. Деформации конечностей не наблюдалось. Зубы были сохранены. Видимые слизистые оболочки были бледными, блестящими, гладкими. Молочные железы самок без уплотнений на ощупь. Половые органы самцов правильно выражены.

При осмотре грудной и брюшной полостей нарушений в положении внутренних органов не отмечалось. Листки плевры, перикарда и брюшины были тонкими, блестящими, гладкими.

Подчелюстные лимфатические узлы и слюнные железы имели округлую или овальную форму, гладкую поверхность, слегка желтоватый или розоватый цвет.

Щитовидная железа плотно прилежала к гортани. Консистенция ее была умеренно плотной. Величина и форма отклонений от нормы не представляли. Поверхность разреза была однородной розоватой окраски.

Тимус имел треугольную форму, беловатый цвет и умеренно плотную консистенцию.

Диаметр аорты был равномерным на всем протяжении. Интима аорты была гладкой, блестящей, беловатой окраски.

Величина и форма сердца изменений не представляли. Мышца сердца была умеренно плотной, равномерно коричневатой окраски. Клапаны сердца были тонкими, гладкими, блестящими. В полостях сердца содержалось небольшое количество жидкой крови.

Легкие спадались при вскрытии грудной клетки. Величина и форма их изменений не представляли. Поверхность легких имела однородную бледно-розовую окраску. Ткань легких была пушистой на ощупь. Просвет трахеи и крупных бронхов был широким. Слизистая оболочка — блестящей, бледно-розовой, гладкой.

Слизистая пищевода была блестящей, гладкой, бледного цвета. Величина и форма желудка изменений не представляли. Его просвет был заполнен пищевым содержимым. Гиперемии, эрозий, кровоизлияний, свидетельствующих о раздражающем действии введенного препарата, не наблюдалось.

Просвет двенадцатиперстной кишки изменений не представлял, слизистая кишки была блестящей, гладкой, бледно-розовой. Слизистая оболочка тонкой кишки была также бледно-розовой, блестящей, гладкой. Слизистая оболочка толстой кишки имела слегка сероватый оттенок, была гладкой, блестящей.

Форма и величина печени изменений не представляли. Поверхность печени была гладкой, однородной темно-красной окраски. Ткань печени на разрезе была темно-красной. Капсула печени была тонкой, прозрачной. Консистенция печени имела обычную плотность.

Форма поджелудочной железы изменений не представляла. Железа имела дольчатое строение, бледно-розовую окраску и умеренно плотную консистенцию.

Размеры и форма селезенки изменений не представляли. Поверхность селезенки имела однородную темно-вишневую окраску, была гладкой. Консистенция селезенки была умеренно плотной. На разрезе органа выделялись сероватые мелкоклеточные фолликулы.

Величина и форма почек так же не представляли изменений. Капсула почек легко снималась. Поверхность была гладкой, однородно коричневато-сероватого цвета. На разрезе органа хорошо различимы корковое и мозговое вещество. Консистенция почек была умеренно плотной.

Надпочечники имели округлую форму, беловато-желтую окраску и умеренно плотную консистенцию. На разрезе отчетливо выделялось темно-коричневое мозговое вещество.

Мочевой пузырь был заполнен прозрачной, светлой мочой. Слизистая оболочка мочевого пузыря была гладкой, блестящей, бледной окраски.

Яичники имели неровную зернистую поверхность, темно-красный цвет и округлую форму. Тело матки было умеренно плотным, имело обычные размеры, темно-красный цвет. Яички самцов были умеренно плотными, беловатого цвета, обычных размеров.

Оболочки головного мозга были тонкими, прозрачными. Вещество мозга было чуть плотноватым на ощупь, поверхность мозга была гладкой. На фронтальных размерах расширения желудочков не наблюдалось.

Следовательно, по данным некропсии острое внутрижелудочное введение УВСС в исследуемых дозах не вызывает макроскопических изменений внутренних, эндокринных органов и головного мозга подопытных белых крыс, а также не сопровождается изменениями слизистой оболочки желудка и кишечника.

Величины ЛД₅₀ при в/ж введении у мышей и крыс разного пола колеблются от 20000 до 23000 мг/кг.

Следовательно, результаты токсикометрии, данные некропсии и наблюдений за экспериментальными животными в постинтоксикационном периоде острого отравления позволяют условно отнести УВСС к VI классу относительно безвредных лекарственных веществ (Н. Hodge et al. *Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimor, 1975, 427 p.; К.К. Сидоров, 1973*) (таблица 2.3.1). Состояние переживших острую интоксикацию животных свидетельствует о хорошей переносимости и безвредности УВСС в дозах, превышающих рекомендуемые для человека (до 1-2 г в сутки) в сотни раз.

Таблица 1.3.12

Степени токсичности (по Hodge и Sterner)

Степень токсичности	Термин	ЛД ₅₀ , однократно per os, крысы (мг/кг)	ЛД ₅₀ , однократно i/v*(в/б), крысы (мг/кг)
1	Чрезвычайно токсично	<1	<0,1
2	Высокотоксично	1-50	0.1-50
3	Умеренно токсично	50-500	5-50
4	Малотоксично	500-5000	50-500
5	Практически нетоксично	5000-15000	500-1500
6	Относительно безвредно	>15000	>1500

*Градация степеней токсичности при внутривенном пути введения определяется посредством умножения значений стандартных доз для оценки токсичности препарата при пероральном пути введения на коэффициент 0,1

Таким образом, результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после острого введения, а также данные некропсии позволяют отнести УВСС к нетоксичным (относительно безвредным по С.Д. Заугольникову) и малоопасным (IV класс опасности по ГОСТ 12.1.007-76) веществам.

Как химическое вещество (в том числе, БАД) по показателю острой летальной токсичности ($LD_{50} > 5000$ мг/кг) и данным морфологического исследования (внутренние органы не изменены) УВСС можно отнести к IV классу малотоксичных и малоопасных веществ (ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности»).

1.4. Хроническая токсичность и способность к кумуляции

При хроническом ежедневном (на протяжении 30 дней) в/ж введении крысам и мышам УВСС в дозе 2 г/кг (0.1 от LD_{50}) летальных эффектов не наблюдалось.

При этом средняя поглощенная доза (LD_{50n}) УВСС составила 60000 мг/кг. По формуле Л.И.Медведа коэффициент кумуляции (К), равный отношению LD_{50n} к LD_{50} , составляет 3.0, т.е. **УВСС не обладает способностью к кумуляции.**

Результаты изучения интегральных показателей общей токсичности представлены в таблицах 1.4.1 и 1.4.2. Данные таблиц свидетельствуют, что ни по одному из использованных показателей не было выявлено статистически значимых различий с контролем ($p > 0,05$ при 95% уровне вероятности) или патологических отклонений за пределы варьирования физиологической нормы.

Таблица 1.4.1

Показатели поведенческих реакций белых мышей после хронического введения УВСС по методу «открытого поля» (регистрация в течение 5 минут), $M \pm m$

Экспериментальная группа	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Норковый рефлекс	Болюсы	Интегральная активность
Контроль	33 ± 3	13 ± 2	12 ± 0	3 ± 0	65 ± 3
УВСС	34 ± 5	16 ± 1	12 ± 0	4 ± 0	71 ± 4

*Влияние хронического введения УВСС
на показатели общей нелетальной токсичности белых крыс, $M \pm m$*

Показатели и единицы измерения	Контроль	УВСС
Вес тела, г	202±9	205±4
Масса органов, г/кг массы тела	легкие 6.1±0.0	3.4±0.0
	печень 27.6±0.0	26.0±0.5
	почки 7.9±0.0	6.0±0.4
	селезенка 3.6±0.1	3.1±0.1
	сердце 1.5±0.2	1.2±0.1
СПП, В	11.1±0.6	14.0±0.4
Белок мочи, мг%	2.3±0.5	1.2±0.3
Удельный вес мочи, г/мм ³	0.14±0.35	0.12±0.24
Сахар крови, мг%	91±3	81±7
Белок сыворотки, г%	7.11±0.11	6.18±0.13
Липидный фосфор, ммоль/л	31.11±0.51	31.12±0.38
АлАТ, мккат/л	0.84±0.7	0.86±0.9
АсАТ, мккат/л	0.67±0.11	0.77±0.13
ЩФ, мккат/л	0.100±0.7	0.85±0.18
Тимоловая проба, ед. помутн.	0.84±0.14	0.86±0.8
Содержание лейкоцитов, тыс./мм ³	8.2±0.9	7.61±0.48
Содержание эритроцитов, млн./мм ³	6.43±0.5	7.23±0.9
Содержание гемоглобина, г%	13.3±0.2	14.4±0.3
Продолжительность гексеналового сна, мин.	21.4±0.5	16.5±0.2

При вскрытии крыс, забитых на следующий день после последнего введения, размеры, форма и окраска внутренних органов макроскопических изменений, по сравнению с контролем, не имели. *Слизистая оболочка желудка и тонкого кишечника были блестящими, бледно-розовыми, без признаков раздражения или воспаления.*

При гистологическом исследовании препаратов легких, миокарда, печени, почек и слизистой желудка подопытных животных дистрофических, воспалительных или некробиотических изменений указанных выше органов не наблюдалось.

Эпителий альвеол и внутрилегочных бронхов изменений не представлял, альвеолы были воздушными. Ателектазов либо отека легочной ткани не наблюдалось. Поперечная исчерченность миофибрилл миокарда была отчетливой. Строение печени нарушений не представляло. Границы гепатоцитов были отчетливые, цитоплазма

зернистая, слабобазофильная, ядра светлые с тонкой мембраной и отчетливыми ядрышками. Нефроэпителий с оксифильной зернистой цитоплазмой и светлыми четкими ядрами. Эпителий слизистой желудка сохранен, главные и обкладочные клетки желез желудка не изменены.

Следовательно, хроническое поступление УВСС в организм мышей и крыс через желудок не вызывает дистрофических или деструктивных изменений паренхиматозных органов и не сопровождается раздражением слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта. Таким образом, по интегральному показателю кумуляции и показателям общей нелетальной токсичности УВСС не обладает способностью к кумуляции и нетоксична.

1.5. Местное действие на кожу

Действие на кожу и кожно-резорбтивное действие изучалось на белых крысах в соответствии с методическими указаниями [9]. Для этого после помещения животных в специальные домики их хвосты на 2/3 помещали в кашлицу, которую получали, смешивая порошок из растертого УВСС с холодной водой в соотношении 90% — порошок, 10% — вода, на 4 часа. Через 1 и 16 часов после окончания однократной аппликации не отмечалось эритемы или отека кожи хвостов (величина отека измерялась путем измерения толщины хвостов в средней части при помощи толщинометра типа ТР-1-10). 20-кратная аппликация не вызывала гибели подопытных животных и не выявляла раздражающего действия на кожу в течение 5-дневного срока последующего наблюдения.

Морфологически кожа хвостов на месте нанесения порошка изменений не представляла. Эпидермис и придатки кожи без изменений. Слои эпидермиса отчетливо выражены, базальная мембрана сохранена. Эпителиальные клетки наружных и внутренних корневых влагалищ волосяных фолликулов и соединительно-тканная сумка хорошо выражены.

Макроскопические и микроскопические изменения внутренних органов у животных отсутствовали.

Изучение морфологических, биохимических, гематологических и физиологических показателей экспериментальных белых крыс не выявило достоверных отличий от контрольной группы (хвосты животных помещали в воду).

Следовательно, УВСС не обладает раздражающим действием на кожу и кожно-резорбтивным действием, т.е. нетоксичен при попадании на кожу или при контакте с ней.

Поэтому среднесмертельную (летальную) дозу при нанесении на кожу (ЛК₅₀ дерм) достичь невозможно (>2500 мг/кг), также как невозможно определить период времени, в течение которого вызывается видимый некроз кожной ткани животного.

1.6. Действие на глаза

При однократном внесении 50 мг порошка УВСС в конъюнктивальный мешок глаза кролика через 1 минуту появились умеренная гиперемия и слезотечение, сопровождавшиеся непродолжительным блефароспазмом, что можно расценить как реакцию на индифферентное механическое инородное тело. Полнокровие сосудов сохранялось не более 20 минут и все явления раздражения прошли в течение 40–45 минут.

Следовательно, УВСС обладает слабым раздражающим действием на слизистую оболочку глаза кролика, как любая механическая пыль.

1.7. Ингаляционное воздействие пылью УВСС

Однократное 2-х часовое динамическое ингаляционное воздействие порошком на белых мышах производили в стандартных камерах Б.А. Курляндского объёмом 200 литров. Подача воздуха составляла 60 л/мин при температуре 20°C. С помощью пылевых распылителей РПВ достигали максимально возможных концентраций пыли, которые в ходе эксперимента определяли гравиметрическим методом [10]. Пробы воздуха отбирали через каждые 30 мин; при этом средняя концентрация пылей в ходе заправки составили 50.5 ± 2.5 г/м³.

В ходе заливок и после них у животных не наблюдалось летальных исходов, а лишь признаки пылевого (механического) раздражения верхних дыхательных путей (чихание, груминг), глаз (лакримация) и беспокойство.

Вскрытие забитых животных не выявило изменений, кроме умеренного полнокровия внутренних органов. В дыхательных путях определялись частички порошка.

Следовательно, пыль УВСС не опасен при остром ингаляционном поступлении (не вызывает признаков отравления), но способна раздражать верхние дыхательные пути и глаза механическим образом, как любая пыль.

Таким образом, достичь среднесмертельную (летальную) концентрацию при вдыхании (ЛК₅₀) пыли УВСС невозможно (ЛК₅₀ > 50000 мг/м³) Поэтому коэффициент возможности ингаляционного отравления (КВИО) — один из показателей опасности химических веществ, представляющий собой отношение максимально возможной концентрации паров вещества к его среднесмертельной концентрации, является очень малой величиной (КВИО менее 3) – IV класс (малоопасное вещество).

1.8. Изучение возможного сенсibiliзирующего действия

Изучение сенсibiliзирующего действия проводили в соответствии с методическими рекомендациями [11] на морских свинках. Для этого в кожу наружной

поверхности уха морской свинки туберкулиновым шприцем вводили однократно 0.02 мл водной взвеси УВСС в дозе 10 мг/кг, а через 10 дней на предварительно выстриженные участки кожи боковой поверхности спины (2x2 см) наносили порошок из расчета 20 мг/см². Кровь у животных брали через 3 часа после постановки кожных проб. При этом на коже спины не отмечалось признаков раздражения, а в периферической крови признаков сенсibilизации (эозинофилии или увеличения уровня лизиса в РСЛЛ по сравнению с контролем) (таблица 1.8.1).

Таблица 1.8.1

Показатели сенсibilизации периферической крови морских свинок после внутрикожного введения УВСС, М±т

Показатель и единицы измерения	Контроль	УВСС
Лейкоциты, тыс./мм ³	9.5±0.7	10.0±0.2
Эозинофилы, %	8±0	4±0
Лимфоциты, %	32±4	36±3
Моноциты, %	5±1	5±0
Нейтрофилы, %	50±2	50±5
РСЛЛ, % лизиса	10±1	8±0

Следовательно, УВСС при эпикутанном контакте не обладает сенсibilизирующим действием, т.е. не провоцирует развитие аллергии.

1.9. Изучение возможных отдаленных последствий

Результаты изучения возможных гонадотоксического и мутагенного эффектов УВСС в дозе 1 г/кг (вводилась 10 дней) через 15 дней после окончания введения представлены в таблице 1.9.1.

Таблица 1.9.1

Показатели гонадотоксичности и мутагенного действия УВСС, М± т

Показатель и единицы его измерения	Контроль	УВСС
Весовой коэффициент гонад крыс-самцов, г/кг веса тела	9.10±0.34	10.0±0.45
Количество спермиев, 10 ⁶ /мл	154±24	180±36
Продолжительность движения спермиев, мин.	97±10	101±3
Осмотическая резистентность МNaCl	1.46±0.08	1.45±0.10
Число проанализированных клеток костного мозга мышей	4135±98	4177±118
Частота клеток с микроядрами, %	0.34±0.04	0.34±0.11

Они свидетельствуют об отсутствии достоверно значимых сдвигов показателей гонадотоксичности и мутагенности при введении животным УВСС.

Не наблюдалось угнетения сперматогенеза или увеличения частоты мутаций.

Следовательно, УВСС не обладает токсическим влиянием на репродуктивную функцию и не оказывает мутагенного эффекта. Это свидетельствует о его безопасности в плане развития отдаленных негативных последствий у человека.

1.10. Изучение возможного местно-раздражающего действия УВСС

Местное действие порошка УВСС оценивали на модели мерцательного эпителия пищевода лягушки.

1.10.1. Материалы и методы

Цитотоксический эффект изучали на болотных лягушках *Rana temporaria* массой 25 г. После обездвиживания (разрушение спинного мозга) и фиксации животных на пробковом столе вскрывали грудную клетку, выделяли пищевод и рассекали в каудальном направлении. Над глоточной частью пищевода устанавливали две штанги. В опытах регистрировали время прохождения пробковой крошкой участка пищевода (10 мм), ограниченного штангами, до и после нанесения УВСС. Продолжительность воздействия — 1 минута.

1.10.2. Результаты исследования

В опытах на лягушках было установлено, что нанесение на слизистую оболочку пищевода порошка УВСС не отражалось на функции мерцательного эпителия (таблица 1.10.2.1).

Таблица 1.10.2.1

Влияние УВСС на двигательную функцию мерцательного эпителия пищевода лягушки

Группа	Количество опытов	Время прохождения меткой участка пищевода длиной 10 мм (сек)		
		Исходное	После нанесения	
			1-3 мин	7-10 мин
Вода	10	22.6±1.2	27.4±2.6	24.9±1.5
УВСС	10	20.7±1.2	19.9±1.0	22.6±0.8

Таким образом, можно заключить, что УВСС не оказывает местно-раздражающего действия.

1.11. Литература

1. Методические указания к постановке исследований для обоснования санитарных стандартов вредных веществ в воздухе рабочей зоны. №2163— М., 1980, 19 с.

2. Определение безопасности и эффективности биологически активных добавок к пище. МУК 2.3.2.721—98. МЗ РФ. М., 1999, 87 с.
3. Буреш Я., Бурешова О., Дж.П.Хьюстон. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. М., Высшая школа, 1991, 450 с.
4. Методы экспериментального исследования по установлению порога действия промышленных ядов на генеративную функцию. МЗ СССР. М., 1969, 25 с.
5. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования. Методические рекомендации. МЗ СССР. №1744—, М., 1978, 35 с.
6. Оценка мутагенной активности химических веществ микроядерным методом. Методические рекомендации. МЗ СССР №28—/10. М., 1984, 21 с.
7. Критерии оценки и методы прогнозирования отдаленных последствий действия на организм вредных веществ в воздухе рабочей зоны. Информационное письмо. НИИ гиг.тр.и проф. забол. М., 1985, 15 с.
8. Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно допустимых уровней загрязнения кожи (методические указания), №2162—79, М., 1980, 23 с.
9. Измерение концентраций аэрозолей преимущественно фиброгенного действия. Методич. указания. МЗ СССР, №4436—87. М., 1988, 28 с.
10. Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны. Методические рекомендации. №2121— 80. М., 1980, 16 с.

2. РАСЧЕТ И ОБОСНОВАНИЕ ГИГИЕНИЧЕСКИХ НОРМАТИВОВ (ОБУВ, ПДК)

Все расчеты были проведены по программам, разработанным совместно с Региональным токсико-гигиеническим информационным центром «Токси» (г. Санкт-Петербург) «Гигиеническое нормирование вредных веществ в различных средах», «Определение параметров токсичности и классов опасности вредных веществ», «Система информационного мониторинга за обращением ПОХиБВ, отходов и перевозкой опасных грузов» (разрешения на использование №№ 18, 20, 21 от 27.04.2001 г. выданы Советом по экспертизе программных продуктов департамента Госсанэпиднадзора МЗ РФ).

Данные программные продукты предназначены для Центров Госсанэпиднадзора любого уровня с целью организации работ по количественному и качественному учету и контролю за обращением потенциально опасных химических, биологических веществ и отходов, а также за перевозками опасных грузов.

ЛД_{50 в/ж} УВСС составляет приблизительно 20000 мг/кг для крыс.

По параметрам острой токсичности УВСС относится к IV классу опасности.

Расчетные нормативы для обеспечения безопасности человека и окружающей среды с учетом коэффициента запаса:

-ПДК в воздухе рабочей зоны (ПДКврз)= 10 мг/м³;

-ПДК атмосферного воздуха среднесуточное (ПДКав)= 1 мг/м³;

-ПДК для воды водоемов санитарно-бытового назначения максимально не действующее (ПДКвв) = 3 мг/л;

-ПДК для воды водоемов рыбного хозяйства (ПДКвврх)= 1 мг/л.

Таким образом, УВСС по параметрам воздействия на организм человека и окружающую среду относится к IV классу малоопасных веществ (ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности»). В воздухе она может находиться в виде пыли и оказывать раздражающее действие на глаза и органы дыхания.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных экспериментов с помощью объективных токсикологических, физиологических, биохимических и морфологических методов было показано, что УВСС не оказывает хронического и специфического токсического действия на организм теплокровных лабораторных животных. УВСС не вызывает летальных эффектов, не нарушает деятельность основных адаптационных систем организма, не обладает сенсibiliзирующим действием, безопасен при попадании на кожу, слизистые оболочки.

Показано, что исследуемая УВСС нетоксичен и безопасен в плане развития возможных неблагоприятных отдаленных последствий.

Полученные результаты позволяют рекомендовать «Уголь высокой сорбционной способности (УВСС) USVR» в МЗСР РФ для процедуры регистрации в качестве безопасного сырья для производства добавки к пище (парафармацевтика, энтеросорбента).

Federal Medical-Biological Agency
Federal State Science Institution
THE INSTITUTE OF TOXICOLOGY

192019, St.Petersburg, 1 Bechterew St.
Telephone/fax: (812) 567-91-65

e-mail: pharmtest@sp.ru
www.toxicology.ru

“I APPROVE”

/Director of the Institute of Toxicology
Doct. Med. Sci.
(Signed) S.P.Nechiporenko
“3” December 2008

SEAL: Ministry of Health of the Russian Federation
The Institute of Toxicology * St.Petersburg
Consulting-Diagnostic Outpatient Clinic

REPORT
of experimental investigation into biological activity
of raw material for manufacture of the biologically active additive
(BAA)
“High absorption capacity charcoal (HACC) USVR”
produced by the OOO NPF “BIOS”
St.Petersburg

Head of the research
Ph.D. in medicine
Leading researcher

(Signed)

V.K.Sukhankin

This copy is correct
(Signed)

SEAL: Limited Liability Company
Research-Industrial Company
BIOS * St.Petersburg

St.Petersburg, 2008

LIST OF RESEARCHERS

Leading researcher
Ph.D. in medicine
(the responsible researcher) (Signed) Kolbassov, S.E.

Researcher (Signed) Agapova V.F.

Senior researcher
Ph.D. in chemistry (Signed) Kulbitsky, G.N.

Senior researcher
Ph.D. in medicine (Signed) Melikhova, M.V.

Senior researcher
Ph.D. in medicine (Signed) Stroikova, G.S.

Senior researcher (Signed) Trefilov, V.V.

Collaborators in the research:

Laboratory assistants- Allatova L.I., Bashkireva I.M., Gusseva V.M.,
Researchers: Drozdova N.S., Kopylova N.Yu.,
Orlova M.A., Patrakova E.V., Pimenova L.M.
Veterinarians: Potapenko E.G., Khrabrova A.V.

LIST OF TERMS AND ABBREVIATIONS

F – female (female sex)

Lim_{ac genet} – threshold of acute single inhalation exposure as established by specific

effects upon generative function

Lim_{ke/l} – threshold of irritating effect upon experimental animals in inhalation exposure during 4 months, 4 times a day, 5 times a week

Lim_{ac} - threshold of a single harmful exposure to substance: the minimum concentration (or a dose) that induces changes in the organism

Lim_{ch} - threshold of chronic exposure – the minimum concentration (a dose) inducing biological effect in chronic exposure

Lim_{im} - threshold concentration as established by the substance effect upon the immunity system

M -male (male sex)

Z_{ch} - Zone of chronic exposure, the Lim_{ac}/Lim_{ch} ration

Z_{ir} - Zone of irritating effect, the Lim_{ac}/Lim_{ir} ration

ALT - alaninaminotransferase (of the liver)

AST - aspartataminotransferase (of the heart)

i.g. - oral

GIT - gastrointestinal tract

K_k - cumulation coefficient: a dose or concentration inducing a certain effect in a single exposure/total dose or substance concentration inducing the same effect in repeated exposures

PCIP - Potential coefficient of inhalation poisoning

LD_{50 o} - mean lethal oral dose, rats

LD₅₀ - mean lethal dose

LDG - lactatdehydrogenase

LC₅₀ - mean lethal concentration in inhalation

LC_{50 derm} - mean lethal in application to skin

MC - mass coefficient

MIC - maximum ineffective concentration (dose): subthreshold concentration of chemical substance as determined by a sanitary-toxicological sign (administration with water)

MTD - minimum toxic dose whose testing in laboratory animals is accompanied by pathological phenomena

MPC - maximum permissible concentration

MPC_{waa} - **maximum permissible concentration in work area air**: this concentration in daily (excepting days off) work within the 8-hour working day or other duration but not more than 41 hours a week during the whole length of service must not induce diseases or deviations in health conditions as detected with modern means of studies in the work process, or at a delayed term in present or future generations.

MPC_{mr} - **maximum permissible concentration for a single exposure**: the concentration inducing no reflex response in the human organism in inhalation lasting 30 min.

MPC_{cc} - **maximum permissible average daily concentration** must not affect humans in either direct or indirect way in a long-lasting (*years*) inhalation.

PDCBS - potentially dangerous chemical and biological substances

SLLR - specific leukocyte lysis response

CL₅₀ - average lethal concentration: the substance concentration inducing death of 50% animals in 2- and 4-hour exposure and a 14-day term of observation

SSP - summed up subthreshold parameter

AP - alkaline phosphatase

SUMMARY

The report is written on 28 pages of typed text and contains 19 tables.

The report presents materials of experimental study of the raw material safety in the process of manufacture of the BAA "High absorption capacity charcoal (HACC) USVR" developed by the OOO NPF "BIOS", St.Petersburg.

The HACC under study was shown to be non-toxic and safe in respect to delayed consequence development.

Key words: High absorption capacity charcoal (HACC); safety, toxicity; MPC; OBUV

CONTENTS

INTRODUCTION.....	7
THE MAIN PART.....	9
1. Experimental study of the HACC safety.....	9
1.1. Sanitary-chemical and radiological analysis	9
1.2. Materials and method of biological studies	10
1.3. Study of acute toxicity.....	11
1.4. Chronic toxicity and cumulation capacity	20
1.5. Local effect on the skin	22
1.6. Effect on the eyes.....	23
1.7. Inhalation effect of the HACC dust exposure.....	23
1.8. Study of possible sensitising effect.....	23
1.9. Study of possible delayed effects	24
1.10. Study of possible local-irritating effect of the HACC	25
1.10.1. Materials and methods	25
1.10.2. Results of the study	25
1.11. References	25
2. Calculation and substantiation of hygienic standards (OBUV, MPC)	27
CONCLUSION	28

INTRODUCTION

The “High absorption capacity charcoal (HACC) USVR” has been developed (Technical Condition 9318-001-96144318-08) and is manufactured by the OOO NPF “BIOS” (St.Petersburg) as raw material for production of BAAs.

The HACC is based on carbon fibres with high absorption capacity. Therefore the study was aimed at experimentally substantiated identification of the HACC biological activity for using it as an enterosorbent.

This study of safety and biological activity of the HACC was performed at the Federal State Science Institution “The Institute of Toxicology” of the Federal Medical-Biological Agency of Russia’s Testing Toxicological Laboratory of Drugs, Food and Environmental Objects (“ANALECT”) (Accreditation Certificate # ГСЭН.RU.ЦОА.312 ФС in the field of Inspection of consumers rights and human well-being protection, time of expiry: 02 August 2011; the Accreditation Certificate of the Analytical Laboratory “Analect” # ПООС.RU.0001.514726, valid until 09 February 2009).

The study involved sanitary-chemical analysis and assessment of the toxicological parameters as follows:

1. Acute toxicity in oral administration
2. Cumulation capacity
3. Possible irritating effect
4. Possible sensitising effect
5. Possible delayed effects

The study was performed in compliance with the standard documents as follows:

1. Identification of safety and efficacy of biologically active additives to food products. MUK 2.3.2.721-98. Ministry of Health of the RF. Moscow, 1999, pp.87.
2. Methodological guidelines for scheme of studies for substantiation of sanitary standards of hazardous substances in the work area air. # 2163-80. Moscow, 1980, pp.19.
3. Scheme of studies in the field of hygienic standardization of industrial allergens in work area air. Methodological guidelines. # 2121-80. Moscow, 1980, pp.16.
4. Sanitary rules and standards (SanPiN) 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements for safety and food value of food raw material and food. Moscow, 2002, pp.270.
5. Standards of radiation safety-99 (NRB-99).

6. "Methodological guidelines for study of general toxic effect of pharmacological substances" (in: Guidelines of Experimental (Preclinical) Study of New Pharmacological Substances, M., Meditsina, 2005, p.41-53).

When studying the HACCC safety we proceeded from the fact that it is a parapharmaceutic agent.

THE MAIN PART

1. EXPERIMENTAL STUDY OF THE HACCC SAFETY

1.1. Sanitary-chemical and radiological analysis

The study was performed in compliance with the standard documents as follows:

1. Identification of safety and efficacy of biologically active additives to food products. MUK 2.3.2.721-98. Ministry of Health of the RF. Moscow, 1999, pp.87.
2. Sanitary rules and standards 2.3.2.1078-01. Hygienic requirements for safety and food value of food raw material and food. Moscow, 2002, pp.270.
3. Standards of radiation safety-99.

Preparing of samples was performed by the GOST 26929-86 "Raw materials and food. Preparing of samples. Mineralisation for identification of toxic elements". Toxic elements and substances were identified in compliance with methodological guidelines # 01-19/47-11, GOST 26930, 30171-96, 26927, and MU 3208-95 using gas-liquid chromatograph "Karlo Erba" (model HRGC 5700, manufacture number 205485) and atomic absorptive spectrometer "Perkin-Elmer" (model 303, manufacture number 50463).

Summed up relative radioactivity of the HACCC samples was measured with the gamma-spectrometer "USK-Gamma-plus" (Russia).

Results of the study are presented in tables 1.1.1 and 1.1.2.

Table 1.1.1

Toxic elements and toxic agent content in the HACCC

Parameters	The SanPiN 2.3.2.1078-01 standard	Content in the HACCC
Elements		
Lead, mg/kg	6.0	0.01
Cadmium, mg/kg	1.0	0.02
Mercury, mg/kg	0.1	0.005
Arsenic, mg/kg	0.5	0.03

Table 1.1.1 continuation

Chlorine-organic pesticides		
Hexachlorocyclohexane, mg/kg	0.1	<0.01
Dichlordiphenyltrichloroethane and metabolites, mg/kg	0.1	<0.01
Heptachlor	<0.002	<0.001
Aldrine	<0.002	<0.001

Table 1.1.2

<i>Relative radioactivity of samples</i>		
Radionuclide	SanPiN 2.3.2.560-96, appendix 3 and 8, NRB-99, Bq/kg	Activity, Bq/kg
⁹⁰ Sr	100	12
¹³⁷ Cs	200	19

Hence, according to results of accomplished measurements, the content of hazardous and dangerous substances in the HACCC does not exceed permissible levels.

1.2. Materials and methods of biological studies

The work was performed in compliance with “Methodological guidelines for scheme of studies for substantiation of sanitary standards of hazardous substances in the work area air” [1] and methodological guidelines “Identification of safety and efficacy of biologically active additives to food products” [2].

White mice, rats, guinea pigs and rabbits of standard mass were used in the experiments. For oral administration, vegetable oil dilutions with the HACCC were prepared ex tempore.

Rats’ weight dynamics as well as dynamics of internal organs mass relative to body weight were determined with the scales VLR-500.

Daily urine was collected with the aid of exchange cages for rats, the cages produced by Italian company “Texnoplast”.

The blood for biological studies was obtained with a puncture of the rat-tail vein or the guinea pig orbital sinus.

The activity of ALT, AST, and AP, the thymol test, the content of the blood serum total protein and lipid phosphorus, the urine protein were determined with the aid of the Bio-Lat-Test sets produced by the Czech company “Lahema”.

The SSP was determined with the S.V.Speransky technique [3], and other parameters were studied with commonly accepted methods.

Under conditions of free behaviour, with the aid of the "open field" technique, animals' behaviour was studied [4].

Slaughtered with decapitation, the animals were subjected to pathological-anatomical autopsy. The lungs, heart, liver, kidneys, stomach and skin were taken for histological study. The material was fixed in 15% formalin and poured over with paraffin. The slices were then stained with haematoxylin-eosin and sudan IV on fat.

Study of gonadotoxic effect was performed according to methodological guidelines [5] by the parameters mandatory in primary assessment of chemical substances [6]. Mutagenic activity was studied by the rate of micronuclei formation in polychromatophilic erythrocytes of the white mouse bone marrow (from the femur) in compliance with methodological guidelines [7,8].

Statistical processing of the results was performed by Student-Fischer method.

1.3. Study of acute toxicity

To determine the parameters of acute toxicity, white mice and rats of both sexes were administered per os (orally) increasing doses of the HACCC through non-traumatic metal pump according to the Litchfield-Wilkocson technique. Calculations of average lethal doses were performed by V.B.Prozorovsky (Farmakologiya I toxikologiya, 1978, #4, p.497-502). In order to achieve large doses, the administration was repeatedly performed during 4 hours with time intervals of 20-30 minutes. The control animals were administered analogous in volume amounts of the solvent: vegetable oil.

The observation period was 14 days. The registered parameters were as follows: lethality, time of death, signs of poisoning, daily observations of general condition and behaviour, weighing prior to administration, on the 7th and 14th days of observation, amounts of fodder and water consumption (the animals were placed for this into exchange cages produced by Italian company "Texnoplast"), autopsy and macroscopic study of all perishing and surviving animals in the end of the study (the euthanasia in the rodents was performed with overdoses of ether), determination of mass coefficients of internal organs.

Lethal effects depending on the HACCC dose are presented in tables 1.3.1-1.3.4.

Table 1.3.1

Toxicity of the HACC in oral administration to male mice

Dose, mg/kg	10000	12640	15920	20000	24520	31760	40000
Effect, died/total	0/5	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5

$LD_{50} = 21280 \pm 2000$ mg/kg

$LD_{16} = 13120 \pm 1160$ mg/kg

$LD_{84} = 28800 \pm 2200$ mg/kg

Table 1.3.2

Toxicity of the HACC in oral administration to female mice

Dose, mg/kg	4000	6320	10000	12640	20000	24520	31760	40000
Effect, died/total	0/5	0/5	0/5	0/5	1/5	3/5	4/5	5/5

$LD_{50} = 23800 \pm 900$ mg/kg

$LD_{16} = 18000 \pm 880$ mg/kg

$LD_{84} = 31400 \pm 2000$ mg/kg

Table 1.3.3

Toxicity of the HACC in oral administration to male rats

Dose, mg/kg	10000	12640	15920	20000	24520	31760	40000
Effect, died/total	0/5	1/5	1/5	2/5	3/5	4/5	5/5

$LD_{50} = 20800 \pm 1400$ mg/kg

$LD_{16} = 15200 \pm 1000$ mg/kg

$LD_{84} = 28400 \pm 1600$ mg/kg

Table 1.3.4

Toxicity of the HACC in oral administration to female rats

Dose, mg/kg	10000	12640	15920	20000	24520	31760	40000
Effect, died/total	0/5	1/5	2/5	2/5	3/5	4/5	5/5

LD₅₀ = 20000±1200 mg/kg

LD₁₆ = 14000±800 mg/kg

LD₈₄ = 28000±1400 mg/kg

Death of the animals following oral administration of lethal doses of the HACC (over 15000 mg/kg) was observed during 1 or 2 days as of the moment of administration noting phenomena of hypersalivation, dyspnoea, hyperkinesis, lethargy, floppiness, torpor, brief seizures in the agonal phase, and paralysis. The coat was tangled, acrocyanosis occurred.

Autopsy of the mice and rats who died after the oral administration revealed, apart from venous plethora of internal organs and overstretching of the stomach and small intestine, the subpleural and subdural haemorrhages as well as small haemorrhages in the medulla oblongata and cortical hemispheres.

One can assume that the tanatogenesis involves pathological reflexes with overstretching of the gastrointestinal tract because of large volumes of administered material rather than toxic properties of the HACC.

In the rest of the experimental animals, with lesser doses than 15000 mg/kg, during first 24 hours, lethargy, floppiness, decrease in consumption of fodder and water as well as diarrhoea were noted. In other days, the general condition and behaviour of experimental animals did not differ from those of the control ones. In their autopsy, no particular changes were found. No differences between sexes were found during the intoxication.

The above findings are demonstrated in tables 1.3.5-1.3.11.

Table 1.3.5

Dynamics of male rats body mass (g) following administration of the HACC in doses lesser than 15000 mg/kg ($M \pm m$)

Time of observation	Control	HACC
Initial level	164±10	160±3
Day 2	160±15	153±10
Day 7	173±10	163±14
Day 14	180±15	176±10

Table 1.3.6

Dynamics of female rats body mass (g) following administration of the HACC in doses lesser than 15000 mg/kg ($M \pm m$)

Time of observation	Control	HACC
Initial level	164±14	175±9
Day 2	157±10	166±15
Day 7	169±9	174±13
Day 14	175±9	185±10

Table 1.3.7

Dynamics of water consumption (ml/day) by rats following oral administration of the HACC in doses lesser than 15000 mg/kg (M±m)

Time of observation	Control		HACC	
	M	F	M	F
Initial level	20.0±2.0	19.3±1.9	19.1±2.0	18.8±2.0
Day 2	19.6±2.0	20.1±1.9	19.0±0.9	19.6±2.0
Day 7	19.8±1.9	19.8±0.9	19.8±2.0	20.3±1.9
Day 14	21.8±2.9	20.7±3.0	21.9±0.9	25.2±0.9*

*) – significant differences from the initial level and control (P < 0.05)

Table 1.3.8

Dynamics of fodder consumption (g/day) by rats following oral administration of the HACC in doses 15000 mg/kg (M±m)

Time of observation	Control		HACC	
	M	F	M	F
Initial level	12.7±0.3	10.3±0.5	10.3±0.4	12.4±0.4
Day 2	10.6±1.3	10.2±0.5	6.6±0.4*	8.4±0.3
Day 7	12.3±0.4	10.0±0.9	10.2±1.0	11.8±0.3
Day 14	10.8±1.0	10.4±0.3	11.3±0.3	10.4±0.3

*) – significant differences from the initial level and control (P < 0.05)

Table 1.3.9

The effect of HACC upon body mass (g) of survived white mice

Time of observation	Groups			
	Control		HACC	
	M	F	M	F
Initial level	18.0±3.9	17.8±1.8	19.9±3.8	19.3±3.8
Day 7	20.1±3.0	19.6±3.9	21.4±3.0	20.0±2.9
Day 14	20.4±3.9	21.6±4.0	21.1±3.0	20.3±2.8

Table 1.3.10

Mass coefficients (MC) of the survived white mice organs in oral administration of HACC (g/kg body weight)

Organ	Groups and sex under study			
	Control		HACC	
	M	F	M	F
Heart	3.4±0.3	3.7±0.09	3.8±0.4	3.3±0.1
Lungs with trachea	6.7±0.1	6.4±0.3	6.3±0.1	6.1±0.1
Thymus	0.97±0.16	0.95±0.11	1.12±0.15	1.14±0.16
Liver	39.7±3.5	37.5±2.5	38.5±4.2	37.7±5.3
Spleen	3.77±0.48	3.27±0.59	4.03±0.18	3.35±0.33
Kidneys	10.1±0.9	10.9±0.3	10.3±0.5	11.0±1.0
Adrenals	0.14±0.06	0.15±0.07	0.16±0.06	0.15±0.04
Brain	15.5±2.3	17.6±1.6	15.9±0.7	16.3±0.9
Testicles of ovaries	3.8±0.2	0.23±0.06	4.0±0.2	0.28±0.05

*Mass coefficients (MC) of the survived white rats organs
in oral administration of HACCC (g/kg body weight)*

Organ	Groups and sex under study			
	Control		HACC	
	M	F	M	F
Heart	4.2±0.2	4.1±0.5	4.6±0.5	4.6±0.1
Lungs with trachea	6.2±0.08	6.6±0.6	6.4±0.5	6.3±0.2
Thymus	1.2±0.3	1.2±0.2	1.6±0.2	1.8±0.2
Liver	29.8±1.6	27.3±2.3	28.3±2.2	28.7±1.7
Spleen	5.0±0.1	5.1±0.3	6.1±0.3	6.1±0.1
Kidney (left)	7.6±0.3	7.0±0.4	7.6±0.09	7.3±0.3
Adrenal (left)	0.09±0.02	0.09±0.01	0.10±0.02	0.09±0.01
Brain	8.4±0.6	8.4±0.5	7.9±0.5	7.9±0.3
Testicles of ovaries	7.12±0.28	0.32±0.02	7.54±0.22	0.31±0.03

According to the autopsy and macroscopic study data re the organs under study in mice and rats, no difference was found among the animal groups.

The coat was shining and neat. There were no foci of baldness. Discharges from the natural orifices were absent. There were no changes in the forelimbs or hind limbs. No osseous deformities were found. Teeth were kept. Visible mucous membranes were pale, shining, smooth. Mammary glands of females had no infiltrations to the touch. Sexual organs of males were unchanged.

Studies of the chest and abdominal cavities revealed no disorders in the internal organs position. Leafs of the pleura, pericardium and peritoneum were thin, shining, smooth.

Submaxillary lymphatic nodes and salivary glands had roundish or oval shape, smooth surface, were yellowish or pinkish in colour.

The thyroid gland was closely bordering to the larynx; its consistence was moderately dense; its size and shape did not differ from normal values; surface of the cut was evenly pinkish.

The thymus had triangle shape, whitish colour and moderately dense consistence.

The aorta diameter was regular along the whole length. Aorta intima was smooth, shining, whitish.

The heart size and form had no changes. The heart muscle was moderately dense and had steady brownish colour. The heart valves were thin, smooth, shining. In the heart chambers, some amount of liquid blood was contained.

The lungs dissipated when opening the chest. Their size and form presented no changes. Their surface was of evenly pale-pinkish colour. The lung tissue was fluffy to the touch. The lumen of trachea and large bronchi was large enough. The mucous membrane was shining, pale-pinkish, smooth.

The oesophagus mucous membrane was shining, smooth, pale. Size and shape of the stomach were ordinary. Its lumen was filled up with food content. No hyperaemia, erosion, haemorrhages indicating irritating effect of the administered preparation, were found.

The duodenum lumen was unchanged, the small intestine mucous membrane was shining, smooth, pale-pink. The colon mucous membrane had a slightly greyish colour, was smooth and shining.

The shape and size of the liver were unchanged. Surface of the liver was smooth, homogeneous, had regular dark-red colour. Tissue of the liver when cut was dark-red. Capsule of the liver was thin, transparent. Consistence of the liver had ordinary density.

The pancreas shape was unchanged. The gland had lobulose structure, pale-pink colour and moderately dense consistence.

The size and shape of the spleen were unchanged. Surface of the spleen was dark cherry-coloured and smooth. Consistence of the spleen had ordinary density. The cut of the organ revealed greyish small-celled follicles.

The size and shape of the kidneys were unchanged. Kidney capsule was easily detachable. Surface of the kidneys was smooth and had regular brownish-greyish colour. On the cut of the organ, cortical and medullary substances were well differentiated. Consistence of the kidneys had ordinary density.

The adrenals were roundish, of whitish-yellow colour and had ordinary density. On the cut, dark-brown medullary substance was well evident.

The bladder was filled up with clear light urine. The bladder mucous membrane was smooth, shining, and had a pale colour.

The ovaries had uneven grainy surface, dark-red colour and a roundish shape. The uterus body was moderately dense, had ordinary size and dark-red colour. Males' testicles were moderately dense, whitish, of ordinary size.

Brain membranes were thin, transparent. The brain substance was slightly dense to the touch, the surface was smooth. As to the frontal size, no distention of the ventricles was found.

Therefore, according to the necropsy data, oral administration of the HACC in the doses under study evoked no macroscopic changes in internal, endocrine organs and the brain of experimental white rats, and was not accompanied by any changes in the mucous membranes of the stomach and intestine.

The LD₅₀ values in oral administration in mice and rats of different sexes varied from 20000 to 23000 mg/kg.

Consequently, the results of toxicometry, necropsy data and observations of experimental animals in the postintoxication period of acute poisoning enable one to conditionally relate the HACC to class VI of relatively safe drug substances (H.Hodge et al. *Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute poisoning. Ed. IV, Baltimore, 1975, 427 p.*; K.K.Sidorov, 1973) (table 2.3.1). Condition of the animals who survived acute intoxication indicate good tolerance and safety of the HACC in the doses hundreds-fold exceeding those recommended for humans (up to 1-2 g per day).

Table 1.3.12

Grades of toxicity (by Hodge and Sterner)

Grade of toxicity	Term	LD ₅₀ , once, per os, rats (mg/kg)	LD ₅₀ , once, i.v.* (intraperitoneal), rats (mg/kg)
1	Extremely toxic	<1	<0.1
2	Highly toxic	1-50	0.1-50
3	Moderately toxic	50-500	5-50
4	Slightly toxic	500-5000	50-500
5	Practically non-toxic	5000-15000	500-1500
6	Relatively safe	>15000	>1500

* The gradations of the toxicity grades in intravenous administration are determined by means of multiplying the standard dose values for assessment of preparation toxicity in oral administration by the coefficient 0.1.

Thus the results of toxicometry, observations of experimental animals during 14 days following acute administration, as well as necropsy data enable one to relate the HACC to non-toxic (relatively safe, by S.D.Zaugolnikov) and low-hazard (class IV of hazard by the GOST 12.1.007-76) substances.

As a chemical substance (including the BAA), by the parameter of acute lethal toxicity ($LD_{50} > 5000$ mg/kg) and the data of morphological study (internal organs unchanged), the HACC can be related to class IV of slightly toxic and low-hazard substances (GOST 12.1.007-76 "Harmful substances. Classification and general safety requirements").

1.4. Chronic toxicity and cumulation capacity

In chronic daily (during 30 days) oral administration of the HACC to rats and mice in the dose 2 g/kg (0.1 of the LD_{50}), no lethal effects were found.

The average absorbed dose of the HACC (LD_{50n}), at that, amounted to 60000 mg/kg. By the L.I.Medvedev formula, the cumulation coefficient (K) equal to LD_{50n}/LD_{50} ratio is 3.0, i.e. **the HACC has no cumulation capacity.**

The results of study of the general toxicity parameters are presented in tables 1.4.1 and 1.4.2. The table data indicate that no statistically significant differences among the used parameters as compared to the control were revealed ($p > 0.05$ at 95% probability level), nor any pathological deviations were revealed beyond the limits of physiological normal value varying.

Table 1.4.1

Parameters of white mice behavioural responses following chronic administration of the HACC, by the "open field" method (5-minute recording), $M \pm m$

Experimental group	Horizontal motion activity	Vertical motion activity	Burrow reflex	Bolus	Integral activity
Control	33±3	13±2	12±0	3±0	65±3
HACC	34±5	16±1	12±0	4±0	71±4

*The effect of chronic administration of the HACC
upon the parameters of general non-lethal toxicity in white rats, M±m*

Parameters and units of measurements	Control	HACC
Body weight, g	202±9	205±4
Mass of the organs, g/kg of body weight	lungs	3.4±0.0
	liver	26.0±0.5
	kidneys	6.0±0.4
	spleen	3.1±0.1
	heart	1.2±0.1
SSP, B	11.1±0.6	14.0±0.4
Urine protein, mg%	2.3±0.5	1.2±0.3
Urine relative weight, g/mm ³	0.14±0.35	0.12±0.24
Blood sugar, g/mm ³	91±3	81±7
Serum protein, g%	7.11±0.11	6.18±0.13
Lipid phosphorus, mmol/L	31.11±0.51	31.12±0.38
ALAT, mcat/L	0.84±0.7	0.86±0.9
AST, mcat/L	0.67±0.11	0.77±0.13
AP, mcat/L	0.100±0.7	0.85±0.18
Thymol test, unit of turbidity	0.84±0.14	0.86±0.8
Leucocytes contents, thousand/mm ³	8.2±0.9	7.61±0.48
Erythrocyte contents, million/mm ³	6.43±0.5	7.23±0.9
Haemoglobin contents, g%	13.3±0.2	14.4±0.3
Duration of Hexenal sleep, min.	21.4±0.5	16.5±0.2

In section of the rats slaughtered on the next day following the last administration, the size, shape and colour of the internal organs had no macroscopic changes as compared with the control. ***The mucous membranes of the stomach and small intestine were shining, pale-pink, with no signs of irritation or inflammation.***

Histological study of the preparations of the lungs, myocardium, liver, kidneys and stomach mucous membrane of the experimental animals revealed no dystrophic, inflammatory or necrobiotic changes in the above organs.

The epithelium of alveoli and intrapulmonary bronchi was unchanged, the alveoli were aerial. No atelectases or pulmonary tissue oedema were found. The transversal banding of the myocardium fibrillae was quite distinct. The liver structure was unchanged. Hepatocyte borders were distinct, the cytoplasm was grainy, weakly basophilic, the nuclei were light and had thin membrane and light distinct nucleoli. Nephroepithelium had oxyphilic grainy cytoplasm and light distinct nuclei. The stomach mucous membrane epithelium was well preserved, the main and coating cells of the stomach glands were unchanged.

Consequently, chronic administration of the HACC to the mouse and rat organism via stomach induces no dystrophic or destructive changes of the parenchymatous organs and is not accompanied by irritation of the gastrointestinal tract mucous membranes. Therefore, according to the integral parameter of cumulation and parameters of general non-lethal toxicity, the HACC possesses no capacity for cumulation and is non-toxic.

1.5. Local effect on the skin

Local effect on the skin was studied in white rats in compliance with the methodological guidelines [9]. To do this, following placing of the animals in special lodges, their tails were by 2/3 inserted for 4 hours into a thin gruel obtained with mixing the powder of pulverized HACC with cold water in ratio as follows: 90% powder, 10% water. In 1 and 16 hours following cessation of the single application, no erythema or oedema of the tail skin were found (extent of the oedema was measured by means of measuring tail thickness in the middle part with the aid of thicknessmeter of the TP-1-10 type). 20 times repeated application induced no death of experimental animals or any irritating effect upon the skin during 5 days of subsequent observation.

Morphologically, the tail skin at the place of the powder application showed no changes. The skin epidermis and skin appendages did not change. The epidermis layers were quite distinct, the basal membrane was well preserved. Epithelial cells of external and internal root sheaths of hair follicles as well as the connective tissue bursa were quite distinct.

Microscopic and macroscopic changes of the internal organs were absent in the animals.

Study of morphological, biochemical, haematological and physiological parameters in the experimental white rats revealed no significant differences from the control group (where the animals' tails were placed in water).

Consequently, the HACC exerts no irritating effect upon the skin and no skin-resorptive action either, i.e. it is non-toxic when applied to the skin or in contact with the skin.

Therefore it is impossible to reach an average-lethal (lethal) dose when applying the HACC to the skin (LC_{50} derm) (>2500 mg/kg), as well as it is impossible to determine the term during which visible necrosis of the animal skin tissue would be induced.

1.6. Effect on the eyes

A single administration of 50 mg HACC powder into the conjunctival sac of the rabbit eye induced in 1 minute a moderate hyperaemia and lacrimation accompanied by a short blepharospasm which can be estimated as a response to indifferent mechanical foreign body. Vascular plethora kept no longer than 20 minutes, and the manifestations of irritation disappeared within 40-45 minutes.

Consequently, the HACC exerts weak irritating effect upon the rabbit eye mucous membrane as any other mechanical dust.

1.7. Inhalation effect of the HACC dust exposure

A single 2-hour dynamic inhalation exposure to the powder in white mice was achieved in standard chambers of B.A.Kurliandsky, of up to 200 litres capacity. Air pumping was 60 L/min at the temperature 20°C. With the aid of dust pulverizers RPV, maximal possible dust concentrations were achieved that were measured with gravimetric method [10]. Air samples were taken every 30 min.; the dust average concentration, at that, amounted in the process of pumping up to $50.5 \pm 2.5 \text{ g/m}^3$.

During the pumping and after it, no lethal outcome was observed among the animals, but some signs of dust (mechanical) irritation of the upper respiratory ways (sneezing, grooming), eyes (lacrimation) and some anxiety appeared.

Section of the slaughtered animals revealed no changes excepting a moderate plethora of internal organs. Particles of the powder were found in the respiratory tract.

Consequently, the HACC dust is not dangerous in acute inhalation administration (induces no signs of poisoning), but it is capable of irritating the upper respiratory tract and eyes in a mechanical way like any other dust.

Therefore it is impossible to reach an average-lethal (lethal) concentration when inhaling (LC_{50}) the HACC dust ($\text{LC}_{50} > 50000 \text{ mg/m}^3$). Hence, the coefficient of possible inhalation poisoning (CPIP) that is one of the parameters of chemical substance danger expressed by the ratio of maximal possible concentration of substance vapours in respect to its average-lethal concentration, is a very small value (CPIP less than 3) – class IV (slightly dangerous substance).

1.8. Study of possible sensitising effect

Study of possible sensitising effect was performed in compliance with methodological guideline [11], in guinea pigs. To perform this, into the skin of external surface of the

guinea pig ear, 0.02 ml of the HACC water suspension in the dose 10 mg/kg was administered with the aid of tuberculin syringe, and in 10 days the powder calculated as 20 mg/cm² was applied to preliminarily sheared skin areas on the back lateral surface (2x2 cm). Blood then was taken from the animals in 3 hours after the skin testing. No signs of irritation were observed, at that, on the skin of the back and no signs of sensitising were found in the peripheral blood (eosinophils or an increase in the leukocyte specific lysis response (LSLR) as compared with the control) (table 1.8.1).

Table 1.8.1

Peripheral blood sensitisation parameters in guinea pigs following intracutaneous administration of the HACC. M±m

Parameters and measurement units	Control	HACC
Leucocytes, thousand/mm ³	9.5±0.7	10.0±0.2
Eosinophils, %	8±0	4±0
Lymphocytes, %	32±4	36±3
Monocytes, %	5±1	5±0
Neutrophils, %	50±2	50±5
LSLR, % of lysis	10±1	8±0

Consequently, the HACC being epicutaneously applied exerts no sensitising effect, i.e. it does not provoke development of allergy.

1.9. Study of possible delayed effects

Results of investigation into possible gonadotoxic and mutagenic effects of the HACC in the dose 1 g/kg (administration during 10 days) in 15 days following cessation of the administration are presented in table 1.9.1.

1.9.1

Parameters of gonadotoxic and mutagenic effects of the HACC, M±m

The parameter and its measurement units	Control	HACC
Weight coefficient of male rats' gonads, g/kg body weight	9.10±0.34	10.0±0.45
Number of sperm cells, 10 ⁶ /ml	154±24	180±36
Duration of sperm cell movements, min.	97±10	101±3
Osmotic resistance of MnaCl	1.46±0.08	1.45±0.10
Number of mice bone marrow cells under analysis	4135±98	4177±118
Rate of the cells with micronuclei, %	0.34±0.04	0.34±0.11

The data indicate absence of any significant shifts in parameters of gonadotoxicity or mutagenicity following administration of the HACC to the animals.

No suppression of spermatogenesis or increase in mutation rate were found.

Consequently, the HACC does not affect the reproductive function and exerts no mutagenic effect. This indicates its safety in respect to development of delayed negative sequences in human beings.

1.10. Study of possible local-irritating effect of the HACC

The HACC powder local effect was assessed in the model of the frog ciliated epithelium.

1.10.1. Materials and methods

Cytological effect was studied on the marsh frogs *Rana temporaria* of a 25-g mass. Following the immobilisation (destruction of the spinal cord) and fixation of the animals on a corkwood table, the chest was opened, oesophagus was isolated and dissected in caudal direction. Over the pharyngeal part of the oesophagus, two rods were established. In the experiments, time of passage of the corkwood crumbs through oesophagus segment limited with the rods (10 mm) was registered prior to and after application of the HACC, duration of the exposure being 1 minute.

1.10.2. Results of the study

In the experiments on frogs, it was found that application of the HACC powder onto the oesophagus mucous membrane did not affect functions of the ciliated epithelium (table 1.10.2.1).

Table 1.10.2.1

Effect of the HACC upon motor activity of the frog oesophagus ciliated epithelium

Group	Number of experiments	Time of passage of the mark through oesophagus segment of 10-mm length		
		initial	Following the application	
			1-3 min	7-10 min
Water	10	22.6±1.2	27.4±2.6	24.9±1.5
HACC	10	20.7±1.2	19.9±1.0	22.6±0.8

Therefore one may conclude that the HACC exerts no local irritating effect.

1.11. References

1. Methodological guidelines for performing studies for substantiation of the sanitary standards of hazardous substances in the work area air. #2163—M., 1980, pp.19

2. Determination of safety and efficacy of biologically active additives for food. MUK 2.3.2.721—98. MZ RF, M., 1999, pp.87
3. Buresh Ya., Bureshova O., J.P.Houston. Methods and the main experiments for investigation into the brain and behaviour. M., Vysshaya shkola, 1991, pp.450
4. Methods of experimental study for establishing the action thresholds of industrial poisons in generative function. MZ USSR, M., 1969, pp.25.
5. Methods of experimental study for establishing the action thresholds of industrial poisons in generative function necessary for hygienic standardization. Methodological guidelines. MZ USSR #1744--M., 1978, pp.35.
6. Assessment of mutagenic activity of chemical substances with the aid of micronuclear technique. Methodological guidelines. MZ USSR #28--/10. M., pp.21.
7. Assessment criteria and prognostication methods for delayed effects of hazardous substances upon the organism in the work area air. Informative letter. Research Institute of Labour Hygiene and Occupational Diseases. M., 1985, pp.15
8. Assessment of hazardous chemical compounds effects upon the skin and the substantiation of maximal permissible levels of skin contamination (methodological guidelines). #2162—79. M.,1980, pp.23.
9. Measurement of concentrations of aerosols exerting mainly fibrinogenic effect. Methodological guidelines. MZ USSR #4436—87. M., 1988, pp.28.
10. Performing the studies for hygienic standardization of industrial allergens in the work area air. Methodological guidelines. MZ USSR #2121—80. M., 1980, pp.16.

2. CALCULATIONS AND SUBSTANTIATION OF HYGIENIC STANDARDS (OBUV, MPC)

All calculations were performed by the programs developed in collaboration with the Regional Toxic-Hygienic Informational Centre "Toxi" (St.Petersburg) the "Hygienic standardization of hazardous substances in different media", "Determination of toxicity parameters and classes of danger of hazardous substances", "The system of informational monitoring of PDCBS (potentially dangerous chemical and biological substances), waste, and transportation of dangerous goods" (the permissions for use of ## 18, 20, 21 of 27 April 2001 were granted by the Council of Software Expertise of the State Sanitary Epidemiological Inspection Department of the RF Ministry of Health).

This software was designated for State Sanitary Epidemiological Inspection departments of any level for the purpose of organisational work in quantitative and qualitative registration and control of circulation of potentially dangerous chemical, biological substances and waste as well as transportation of dangerous goods.

The HACC LD_{50 oral} amounts up to approximately 20000 mg/kg for rats.

By the parameters of the HACC acute toxicity it is related to class IV of danger.

The calculated standards for safety of humans and environment with due consideration of margin coefficient:

- MPC in the work area air (MPC_{waa}) = 10 mg/m³;
- MPC of the atmosphere air for average 24 hrs (MPC_{aa}) = 1 mg/m³;
- MPC for water of sanitary-domestic reservoirs maximally non-acting (MPC_{wr}) = 3 mg/L;
- MPC for water of fishery reservoirs (MPC_{wfr}) = 3 mg/L.

Therefore, the HACC by its parameters of effect upon the human organism and environment, is related to class IV of slightly dangerous substances (GOST 12.1.007-76 "Hazardous substances. Classification and General safety requirements"). In the air, it can be present in the form of dust and exert irritating effect upon the eyes and respiratory tract.

CONCLUSION

During experimental studies with the aid of objective toxicological, physiological, biochemical and morphological methods, it has been shown that the HACC exerts no chronic or specific toxic effects upon the organism of warm-blooded laboratory animals. The HACC induces no lethal effects, does not disturb the activity of the organism main adaptation mechanisms, possesses no sensitising properties, and is safe in contacts with the skin and mucous membranes.

It has been shown that the HACC under study is non-toxic and safe in respect to development of unfavourable delayed consequences.

The results obtained enable one to recommend “High absorption capacity charcoal (HACC) USVR” for the procedure of registration in the Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation as a safe raw material for manufacture of food additive (parapharmaceutic agent, enterosorbent).