

Светлакова Е.Н.¹, Мандра Ю.В.¹, Ларионов Л.П.²,
Макеев О.Г.³, Сичкар Д.А.³, Базарный В.В.³, Полушина Л.Г.³,
Жегалина Н.М.¹, Семенова Е.А.¹, Котикова А.Ю.¹, Дементьева К.Д.¹, Бурлак А.В.¹

Исследование возможной острой, субхронической токсичности композиции на основе клеточных продуктов и безопасности её применения в эксперименте на животных

1 - Кафедра пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний, 2 - кафедра фармакологии и клинической фармакологии, 3 - кафедра медицинской биологии и генетики ФГБОУ ВО УГМУ МЗ РФ

Svetlakova E.N., Mandra Yu.V., Larionov L.P., Makeev O.G., Sichkar DA, Bazarny V.V., Polushina LG, Zhegalina N.M., Sementsova E.A., Kotikova A.Yu., Dementieva K.D., Burlak A.V.

Investigation of possible acute, subchronic toxicity of composition based on cellular products and safety of its applications in experiment on animals

Резюме

Целью нашего исследования было выявление возможной острой и субхронической токсичности, установление безопасности применения композиции на основе клеточных продуктов в экспериментальных условиях на трёх видах лабораторных животных при различных путях её введения. Исследования проведены на белых беспородных мышах массой 19-21 г, белых крысах популяции линии Wistar массой 190-240, кроликах породы Шиншилла массой 2,8-3,6 кг обоего пола. Результаты проведенных исследований показали, что композиция на основе клеточных продуктов в нативном виде и в виде 10% суспензии не вызывает острой и субхронической токсичности. Различная степень выраженности показателей двигательной активности и исследуемого поведения, до и после введения 0.4 мл 10 % суспензии исследуемой композиции, стала основным критерием для разделения данной популяции самок и самцов на субпопуляции по уровню тревожности. Композиция на основе клеточных продуктов не вызывает местного раздражающего действия на слизистые и кожные покровы кроликов. Исследуемый состав при субхроническом применении не проявляет сенсibiliзирующих свойств.

Ключевые слова: композиция на основе клеточных продуктов, суспензия, мыши, крысы, кролики, пути введения

Summary

The aim of our study was to identify possible acute and subchronic toxicity, to establish the safety of the use of a composition based on cell products under experimental conditions in three types of laboratory animals, with different routes of administration. The studies were carried out on white mongrel mice weighing 19-21 g, white rats of the Wistar lineage weighing 190-240, rabbits of the Chinchilla breed with a mass of 2.8-3.6 kg of both sexes. The results of the conducted studies showed that the composition based on cell products in native form and as a 10% suspension does not cause acute and subchronic toxicity. The different degree of expression of motor activity and behavior, before and after administration of 0.4 ml of a 10% suspension of the test composition, became the main criterion for the separation of this population of females and males into subpopulations by the level of anxiety. The composition based on cell products does not cause a local irritant effect on mucous membranes and skin of rabbits. The test composition with subchronic application does not show sensitizing properties.

Key words: composition based on cell products, suspension, mice, rats, rabbits, administration routes

Введение

Отсутствие тенденции к снижению распространенности пародонтита диктует необходимость поиска новых способов эффективного лечения [1,2]. Большое значение

в комплексном лечении заболеваний пародонта имеет консервативная терапия. Предлагаемый арсенал медикаментозных и физических средств и методов позволяет добиться ликвидации очагов воспаления, длительной

Таблица 1. Показатели острой токсичности

Суспензия, объём, путь введения	Количество ♀ Жив.	Количество ♂ Жив.	Количество ♀ Погибло	Количество ♂ Погибло	ЛД ₅₀
Мыши					
В желудок один мл	10	10	0	0	Не определяется
В брюшину один мл	10	10	0	0	Не определяется
Крысы					
В желудок 4 мл	10	10	0	0	Не определяется
В брюшину 4 мл	10	10	0	0	Не определяется

стабилизации состояния пародонта, восстановления структурных и функциональных свойств элементов пародонтального комплекса, предупреждения перехода воспаления на глуболежащие ткани, повышения местных и общих факторов защиты, а также, в случае необходимости, обеспечить предоперационную подготовку. Однако стабилизация процесса во всех случаях происходит длительно, поэтому поиск новых методов ранней диагностики, лечения и профилактики заболеваний пародонта остается актуальным. Несомненно, одним из важнейших факторов, играющих роль в выборе средства для местного лечения является минимизация побочных эффектов, возникающих на фоне его применения [3,4]. В этом аспекте нас заинтересовало применение композиций на основе клеточных продуктов с целью повышения эффективности лечения хронического пародонтита [5,6].

Цель исследования: Выявить возможную острую и субхроническую токсичность, установить безопасность применения клеточной композиции в экспериментальных условиях на трёх видах лабораторных животных при различных путях её введения.

Материалы и методы

Исследования проведены на белых беспородных мышах массой 19-21 г, белых крысах популяции линии Wistar массой 190-240, кроликах породы Шиншилла массой 2,8-3,6 кг обоего пола. Мышей было сформировано 4 группы по 10 особей в каждой обоего пола; крыс 8 групп (также по 10 особей); кроликов 2 группы по 6 особей обоего пола. Композицию на основе клеточных продуктов применяли в виде нативной формы, 10% концентрации суспензии, приготовленной экстенпорально на воде для инъекций, которую наносили местно, вводили в желудок через зонд и внутрибрюшинно через инъекционную иглу. В процессе исследований использованы различные методы оценки показателей эксперимента.

Острую токсичность выявляли на мышах и крысах при двух путях введения – введение суспензии в желудок и внутрибрюшинно. Результаты исследований представлены в таблице №1. Результаты таблицы свидетельствуют о том, что клеточная композиция в виде 10% концентрации при различных путях введения не проявила острой токсичности на мышей и крыс, то есть представляется возможность для дальнейших исследований.

Оценка влияния клеточной композиции в виде 10% суспензии на этологические показатели крыс в тесте «открытое поле».

Открытое поле представляет собой прямоугольную камеру размером 100×100 см со стенками высотой 40 см. Полом служит лист белого пластика, на который черной краской нанесена решетка, делящая поле на 25 равных квадратов. Освещение производилось лампой 50 Вт, расположенной на высоте 150 см над центром пола [3,4]. Пересечение квадратов называют поведенческим актом, при котором животное вступает на новый квадрат обеими передними лапами. Крысу помещают в центр камеры на круг, для адаптации особи к методике её накрывают затемненным колпаком на 15 сек, затем снимают колпак и наблюдают за её поведением в течение 3 минут, фиксируя поведенческие акты.

При исследовании фиксировали следующие параметры: время ухода особи с центрального круга (сек), количество пересечённых квадратов, количество вертикальных стоек, количество обследованных «норок» (отверстий), груминг (количество приёмов чистки). После 3 минутного исследования крысу извлекали из «открытого поля». Подобные исследования осуществляли до и после внутрижелудочного введения суспензии клеточной композиции в дозе 0,4 мл на особь (при перерасчёте на кг будет соответствовать 2 мл).

Результаты и обсуждение

Из пяти критериев, выбранных для определения уровня напряженности, 2 критерия имели наибольшие расхождения: 1) время ухода особи с центрального круга и 2) количество пересечённых квадратов. Так, на рис. 1 представлен один из показателей двигательной активности крыс до и после введения суспензии. Исходя из данных, представленных на графике, можно говорить о том, что время за которое крысы покидают центральный круг до введения исследуемого образца изменяется в небольших пределах, но преимущественно в сторону увеличения времени. После его введения временные границы значительно расширяются, тенденция к увеличению времени сохраняется. Однако при тестировании через 120 минут, что в первой экспериментальной группе, что во второй время ухода с центрального круга практически одинаковое.

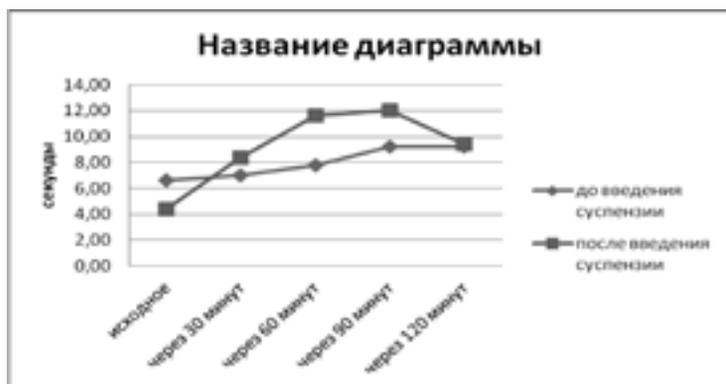


Рисунок 1. Динамика времени ухода крыс (результаты самцов и самок суммированы) с центрального круга

Рисунок 2. Динамика пересечения квадратов

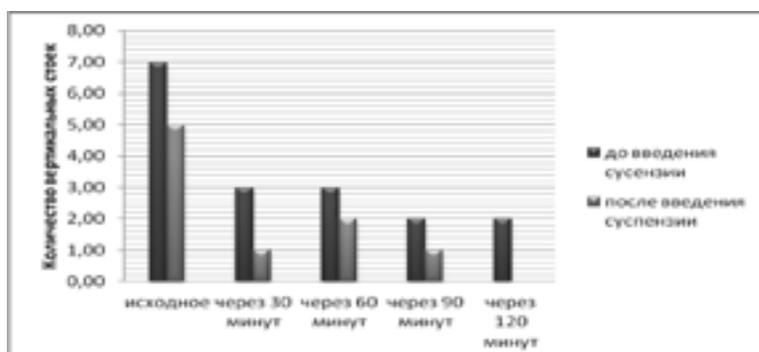
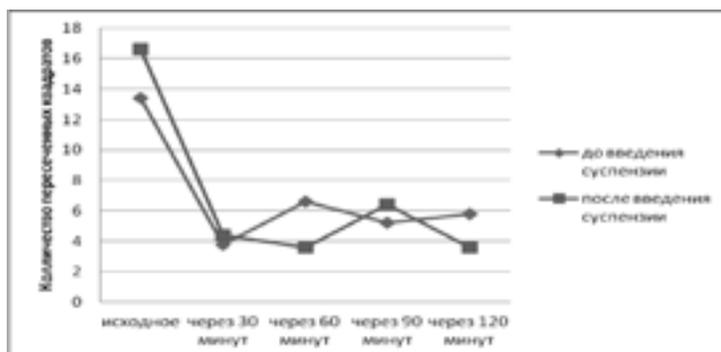
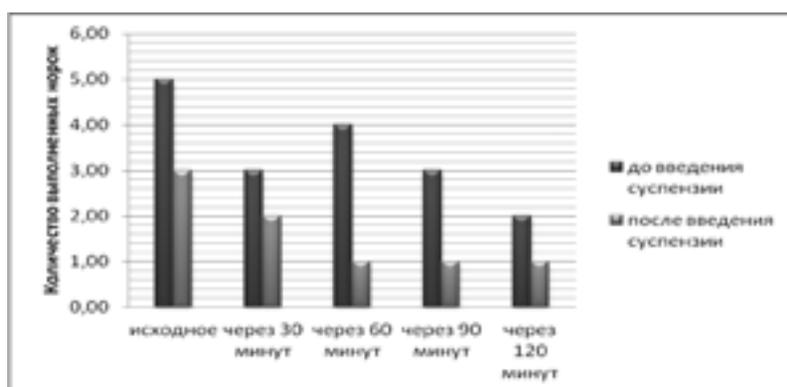


Рисунок 3. Динамика количества вертикальных стоек у крыс.

Рис.4- Динамика количества обследованных «норок»



На рис.2 представлены данные о количестве пересеченных квадратов. Тревожными считаются те особи, которые меньше передвигаются и у которых наблюдается большая дефекация. Тогда как менее тревожные особи отличаются большей двигательной активностью и меньшим количеством актов дефекаций. Можно заметить, что до введения исследуемого образца, с течением времени количество пересеченных квадратов в общем уменьша-

ется, а после его введения эта тенденция усугубляется.

Еще одним критерием, позволяющим оценить возбудимость лабораторных животных, является вертикальная двигательная активность, представленная на рис.3. Очевидно, что по сравнению с исходными показателями вертикальная двигательная активность угнеталась во всей популяции. Динамика такого рода может свидетельствовать о наличии анксиоседативного эффекта исследу-

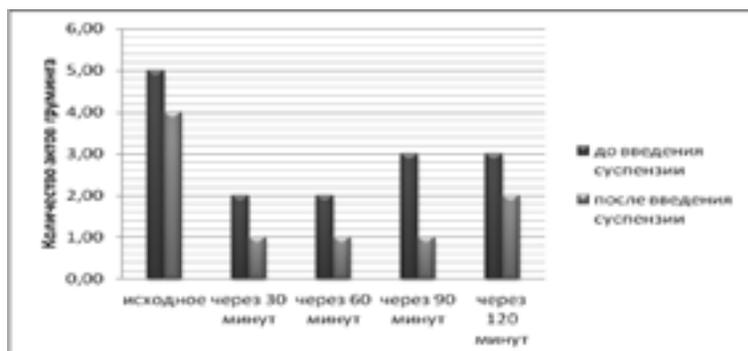


Рисунок 5. Количество актов груминга у крыс.

дуемого образца.

Для оценки исследовательского поведения крыс, было зарегистрировано количество заглядываний в «норки» (рис. 4). По данным графика можно судить о том, что количество обследованных «норок» у экспериментальных животных проявляется тенденция к снижению на фоне введённой суспензии, но незначительно.

Груминг у животных – важный поведенческий акт, выполняющий ряд функций, включая уход за кожей и шерстью, терморегуляцию, распределение химических веществ по телу и т. д. Наряду с потягиваниями, зеванием и купанием, естественный груминг относят к так называемой категории комфортного поведения. Помимо прямой биологической функции, груминг часто используется как адаптивная реакция при боли, стрессе и т.д., у грызунов являясь специфической общепризнанной поведенческой реакцией на стресс. Интересно, что сильный стресс приводит к снижению двигательной активности животных в целом ряде тестов на фоне возросшего груминга. То же касается и реакции дефекации. На рис. 5 представлены данные этого показателя. Исходя из этих данных можно сказать о том, что после введения образца

количество актов груминга снижается, однако на 120-ой минуте эксперимента заметна положительная динамика.

Оценка местного раздражающего и сенсибилизирующего действия композиции на основе клеточных продуктов

Влияние исследуемой композиции оценивали по состоянию целостности (реакции) слизистой роговицы глаза кролика. Четырём кроликам (по 2 кролика самцов и самок) за веко правого глаза (левый глаз оставался контрольным без внесения композиции) вносили в нативном виде клеточную композицию в дозе 10 мг. Наблюдение осуществляли всего первого часа, через 12 и 24 часа. Отрицательных эффектов не проявилось (рис. 6, 7).

Оценку влияния клеточной композиции на кожные покровы и проявление сенсибилизации осуществляли также на кроликах. На подготовленные участки от шерсти кожи (правого и левого бока) кроликов площадью 4x4 см, на правый участок кожи наносили по 300 мг испытуемой композиции и наблюдали за возможным проявлением реакции ткани. На 4-е сутки на площадь левого бока кожи кролика наносили подобную дозу композиции для выявления алергизирующего эффекта. При этом каких

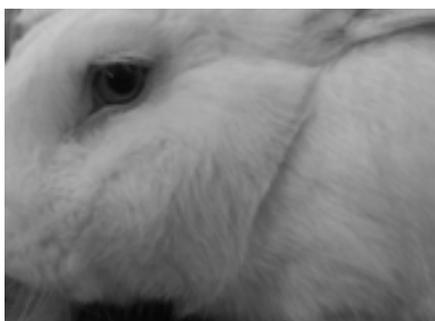


Рисунок 6. Контрольный глаз кролика.

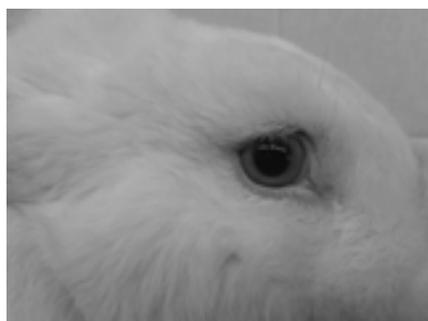


Рисунок 7. Опытный глаз кролика после внесения за веко композиции).

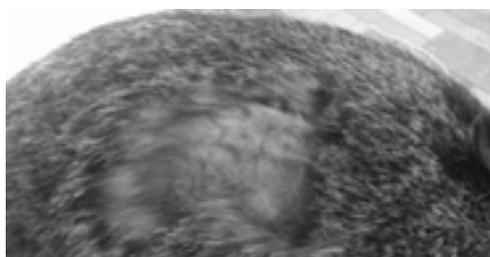


Рисунок 8. Опытная площадь кролика на фоне клеточной композиции



Рисунок 9. Опытная площадь на фоне клеточной композиции



Рисунок 10. Контрольная площадь кролика



Рисунок 11. Контрольная площадь кролика

либо отрицательных проявлений не зарегистрировали. Поэтому данный эксперимент был продолжен до 7-ых, 14-ых 21-ых и 27-ых суток. За весь указанный период проявлений каких-либо сенсibiliзирующих свойств изучаемой композиции зарегистрировано не было (рис. 8, 9, 10, 11).

Таким образом, можно убедительно говорить о безопасности применения композиции на основе клеточных продуктов для экспериментальных животных, и можно предполагать о перспективности композиции в создании новых фармакологически активных препаратов.

Выводы

1. Композиция на основе клеточных продуктов в нативном виде и в виде 10% суспензии не вызывает острой и субхронической токсичности.

2. Различная степень выраженности показателей двигательной активности и исследуемого поведения, до и после введения 0.4 мл 10% суспензии исследуемой композиции, стала основным критерием для разделения данной популяции самок и самцов на субпопуляции по уровню тревожности. Таким образом, количество особей с низким уровнем тревожности составило - 60%, со средним уровнем тревожности - 20%, с высоким уровнем тревожности - 20%. Исходя из этих данных, можно говорить о том, что представленный образец оказывает умеренное анксиоседативное действие с 60-ой минуты.

3. Уровень тревожности после введения образца композиции снижается, что является благоприятным фактором для будущего использования как перспективного препарата.

4. Поскольку экспериментальные животные с момента рождения содержались в одинаковых условиях и

получали одинаковую пищу, можно сделать вывод о генетически детерминированной предрасположенности крыс к поведенческой депрессии.

5. Композиция на основе клеточных продуктов не вызывает местного раздражающего действия на слизистые и кожные покровы кроликов.

6. Исследуемая композиция при субхроническом применении не проявляет сенсibiliзирующих свойств. ■

Светлакова Е.Н. доцент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний УГМУ, к.м.н. *Мандра Ю.В.* проректор по научной работе и инновациям УГМУ, заведующая кафедрой пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний, профессор, д.м.н. *Ларионов Л.П.* профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии УГМУ, профессор, д.м.н. *Макеев О.Г.* заведующий кафедрой медицинской биологии и генетики, профессор, д.м.н. *Сичкар Д.А.* старший лаборант кафедры медицинской биологии и генетики Базарный В.В. профессор кафедры клинической лабораторной диагностики и бактериологии УГМУ, д.м.н. *Полушина Л.Г.* научный сотрудник, отдел общей патологии ЦНИЛ УГМУ *Жегалина Н.М.* доцент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний УГМУ, к.м.н. *Семенцова Е.А.* ассистент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний УГМУ, к.м.н. *Котикова А.Ю.* ассистент кафедры пропедевтики и физиотерапии стоматологических заболеваний УГМУ *Дементьева К.Д.* студентка стоматологического факультета УГМУ *Бурлак А.В.* студентка стоматологического факультета УГМУ, Автор ответственный за переписку – Светлакова Е.Н., 620146 г. Екатеринбург, Бардина 38 а, электронный адрес: svet_anel11@mail.ru

Литература:

1. Тарасенко С.В. Лазерная пародонтальная хирургия. Учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования / Тарасенко С.В., Тарасенко И.В., Лазарихина Н.М. – М.: МГМСУ, 2009. – 60 с.
2. Brugnara A.J. Atlas of Laser Therapy Applied to Clinical Dentistry// A.J. Brugnara, Garrini A.M., E.D. Bologna, T.C. Pinheiro. – 2007. – 119 p.
3. Кастрикин Ю.В., Сабитова Е.Б. Изменение поведенческих реакций крыс в тесте «открытое поле» при введении НПВС./Ю.В. Кастрикин, Е.Б. Сабитова// Здоровье и образование в XXI веке.- 2012. - №2.- С. 37-41.
4. Фролова Г.А. Профиль тревожности популяции лабораторных крыс в нормальных (контрольных) условиях, оцененный в тесте "открытое поле"//

- Г.А. Фролова, П.Я. Субботина, Г.С. Лецинский// Донецкий медицинский вестник.- 2014.- №10.- С. 274-280.*
5. *Макеев О. Г. Аспекты применения аутологичных фибробластов в косметологии с позиции клинической практики / О. Г. Макеев, А.И. Улыбин, П.С. Зубанов, А.Е. Зверева, С.В. Костюкова, А.В. Коротков, Е.Г. Малишевская, Н.П. Шабашова //Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2014. -№ 5. -С. 86-92*
6. *Патент 2345781. Макеев О.Г., Зубанов П.С., Улыбин А.И. Способ получения культуры клеток кожи.*