

Григорьев С.С.<sup>1</sup>, Жовтык П.Б.<sup>1</sup>, Ларионов Л.П.<sup>2</sup>, Бердников Р.Б.<sup>3</sup>

## Экспериментальное исследование свойств новой фармакологической композиции на лабораторных животных

1- ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Екатеринбург, кафедра терапевтической стоматологии; 2- ГБОУ ВПО Уральский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Екатеринбург, кафедра фармакологии и клинической фармакологии; 3- ФГБУ УНИИФ Минздрава России, г. Екатеринбург

Grigoriev S.S., Zhovtyak P.B., Larionov L.P., Berdnikov R.B.

### Experimental study of new pharmacological composition at laboratory animals

#### Резюме

Лечение красного плоского лишая рта является сложной и актуальной проблемой. В работе изучены свойства нового кремнийхитозансодержащего глицерогидрогеля. Экспериментально исследовали острую и хроническую токсичность, а также провели морфологическую оценку местного воздействия новой фармакологической композиции на лабораторных животных.

**Ключевые слова:** красный плоский лишай, кремнийхитозансодержащий глицерогидрогель, фармакологическая композиция

#### Summary

Treatment of oral lichen planus is a complex and important issue. We studied the properties of the new pharmacological composition on based silicon glycerolates with hitozan. Experimentally investigated the acute and chronic toxicity, as well as conducted a morphological assessment of the local impact of the new pharmaceutical compositions in laboratory animals.

**Key words:** oral lichen planus, silicon glycerolates with hitozan, pharmacological composition

#### Введение

Красный плоский лишай (КПЛ) — хроническое воспалительное, иммунозависимое заболевание с поражением кожи и слизистых оболочек, отличающееся полиморфизмом высыпаний, неуточненным этиопатогенезом, многообразием триггерных факторов и торпидностью к проводимой терапии [1, 2, 3]. Высокая распространенность патологии, отсутствие тенденции к снижению частоты и тяжести заболевания, а также риск злокачественной трансформации определяют красный плоский лишай как социально значимую стоматологическую и общемедицинскую проблему [1, 4]. Несмотря на отсутствие единого представления об этиопатогенезе плоского лишая, противоречивые сведения о распространенности данной патологии в структуре заболеваний слизистой оболочки рта, общепризнанным является высокая резистентность КПЛ к проводимой терапии, обусловленная тяжелым хроническим течением заболевания, общесоматической отягощенностью, трудностью выбора рациональных и эффективных схем комплексного лечения [2, 3, 5]. Широкий спектр существующих на сегодняшний

день медикаментозных средств и методов терапии позволяет купировать воспаление, достичь эпителизации патологических очагов, предупредить прогрессирование заболевания, а также, при необходимости, обеспечить предоперационную подготовку [4]. Однако стабилизация процесса всегда носит длительный характер, поэтому поиск новых методов ранней диагностики, лечения и профилактики красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта остается актуальной задачей.

Кроме того, в условиях непрерывного роста антигенной нагрузки наиболее остро встает проблема поиска новых безопасных методов лечения и способов минимизации концентрации лекарственных средств при сохранении их терапевтической эффективности. Решение данных вопросов позволяет снизить риск лекарственной непереносимости, развития аллергических и дисбиотических изменений, нарушений иммунного статуса, формирования резистентности к фармакотерапии. В этом аспекте перспективным является применение новой фармакологической композиции на основе кремнийхитозансодержащего глицерогидрогеля.

В Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского УрО РАН в течение последнего десятилетия активно ведутся работы по исследованию структуры и свойств кремнийсодержащих гидрогелей на основе полифункциональных полиолоатов, в том числе глицеролатов кремния [6]. Используя в качестве предшественников глицеролат биогенного элемента и природный биорполимер, золь-гель методом был получен кремнийхитозансодержащий глицерогидрогель [7].

Кремний является эссенциальным элементом нормального функционирования организма человека. Общеизвестна способность кремния концентрироваться в определенных органах, а также стимулировать рост соединительной и эпителиальной ткани. Данный элемент является структурным компонентом, входящим в состав гликозаминогликанов и, путем активации фибробластов, способствует синтезу коллагена. Гликозаминогликаны в составе протеогликанов входят в состав межклеточного вещества соединительной ткани. Вместе с волокнами коллагена и эластина, протеогликианы образуют соединительнотканый матрикс (основное вещество). Кремний в биологически активной и доступной форме – в форме глицеролатов кремния и их производных – оказывает выраженное репаративное и регенерирующее действие на все виды тканей и слизистые оболочки организма, легко в них проникает и способствует проникновению лекарственных добавок [8].

Хитозан является дезацетилированным производным хитина и как полисахарид органического происхождения характеризуется мукоадгезивностью, биосовместимостью, биодеструкцией, отсутствием токсичности, способностью к селективному связыванию труднорастворимых органических соединений. Протонированная высокоактивная аминогруппа молекулы хитозана обеспечивает растворимость полимера в гидрофильной основе. В таком виде хитозан обладает наибольшей сорбционной, хелатообразующей и комплексообразующей способностью. Кроме того, приобретая избыточный положительный заряд, хитозан может взаимодействовать с анионными компонентами гликопротеидов на поверхности эпителиальных клеток, способствуя изменению структуры цитоскелета эпителия, увеличению межклеточных пространств и околкеклеточной проницаемости [7, 9].

Кроме того, хитозан активизирует синтезирующую функцию фибробластов, что приводит к росту коллагеновых волокон и обеспечивает ускорение процессов регенерации эпителия [9].

В качестве активных лекарственных добавок в исследуемой фармакологической композиции использовали фурагин и анестезин.

Руководствуясь вышесказанным, проведено экспериментальное исследование острой и хронической токсичности предложенной фармакологической композиции, а также морфологическое исследование слизистой оболочки рта лабораторных животных.

**Цель исследования** – экспериментальное исследование эффективности действия новой фармакологической

композиции на основе кремнийхитозансодержащего глицерогидрогеля при лечении воспалительных заболеваний слизистой оболочки рта.

## Материалы и методы

Необходимость экспериментального исследования обусловлена тестированием нового фармакологического средства. В эксперименте исследовали влияние новой фармакологической композиции на животных. В качестве гидрофильной мукоадгезивной основы изучаемого средства использован кремнийхитозансодержащий глицерогидрогель, синтезированный методом биомиметической минерализации из раствора глицеролатов кремния и слабо-кислого водного раствора хитозана. (патент РФ 2255939, МПК А61К 47/30, 2005 год) [10]. В качестве активных лекарственных добавок в состав композиции введены фурагин и анестезин.

На основе данного геля был предложен состав при следующем соотношении компонентов, масс. %: фурагин – 0,8-1,2; анестезин – 0,8-1,2; кремнийхитозансодержащий глицерогидрогель – остальное до 100. Композиция изготовлены в Институте органического синтеза им. И.Я. Постовского (проф., д.м.н. Хонина Т.Г.) в соответствии с договором о содружестве с Уральской Государственной Медицинской Академией от 17 марта 2006 года и переданы для исследования.

Экспериментальная работа проведена на кафедре фармакологии и клинической фармакологии Уральского государственного медицинского университета Минздрава России, г. Екатеринбург под руководством проф. д.м.н. Л.П. Ларионова. В исследование включены лабораторные животные: 30 белых крыс-самцов популяции Вистар стадного разведения массой 180-220 г в возрасте 4-6 месяцев и 6 кролики-самцы породы шиншилла массой 2550-3400г. Животных содержали в стандартных условиях вивария, предусмотренных «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных Приказом МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г. и Приказом МЗ СССР №1179 от 10.10.1983 «Об утверждении нормативов затрат кормов для лабораторных животных в учреждениях здравоохранения» с соблюдением общепринятых правил обращения с животными [11].

Исследование острой токсичности фармакологической композиции проводили на крысах путем однократного введения в желудок 10%-ной водной суспензии через зонд по 2,5 мл на 100г особи. Объем вводимой суспензии соответствовал максимальной вместимости желудка опытных животных. После введения композиции ежедневно наблюдали за поведением животных в течение первых суток, а в последующие 13 суток – ежедневно. При этом оценивали общую двигательную активность животных, нервно-мышечную возбудимость, рефлексы, вегетативные реакции (саливация, диурез, дефекация) в сравнении с контрольной интактной группой животных.

Экспериментальное исследование возможного проявления хронической токсичности фармакологической композиции проводилось на крысах и кроликах и включало оценку кожно-резорбтивного, кожно-раздражающего,

местнораздражающего, сенсибилизирующего действия, а также морфоструктурные изменения висцеральных органов. Для оценки кожно-резорбтивного и кожно-раздражающего действия композицию ежедневно в течение 14 дней равномерно наносили тонким слоем в дозе 50 мг на см<sup>2</sup> с экспозицией 5 часов на хвосты опытных групп крыс. За сутки до исследования, а также после его завершения были изучены ориентировочно-исследовательские реакции животных опытной и контрольной групп. Применяя методику «открытое поле» регистрировали время ухода животных с центрального круга, а затем в течение 3 минут их горизонтальную (количество пересеченных квадратов) и вертикальную (количество вертикальных квадратов) двигательную активность, груминг и заглядывание в «норки».

Местнораздражающее действие исследуемой композиции оценивали путем ее внесения за веко глаза кролика в дозе 10 мг однократно за сутки в течение 10 дней. Указанная доза свободно помещалась за веко, не мешая моргательному рефлексу. Для определения сенсибилизирующего действия кроликам опытной группы на предварительно выстриженную от шерсти кожу боковой области размером 6\*6 см наносили тонким слоем композицию в дозе 50 мг на см<sup>2</sup> при равномерном растирании однократно в сутки в течение 2 дней. На третьи сутки проводилась разрешающая проба: исследуемую композицию наносили на противоположный симметричный участок кожи бока кролика. Повторно композицию наносили на 7, 14, 21 и 28 сутки эксперимента. Результат оценивали в сравнении с контрольной группой. Оценка системного действия фармакологической композиции определялась по морфоструктурным изменениям висцеральных органов (сердца, печени, почек, надпочечников, селезенки) в те же сроки: на 7, 14, 21 и 28 сутки эксперимента. Ткани фиксировали 10% раствором формалина, проводили заливку парафином, срез тканей, окрашивали по Романовскому-Гимза и изучали под 160- и 320-кратным увеличением. Оценку проводили в сравнении с контрольной интактной группой животных.

Создание модели воспалительного процесса на слизистой оболочке щеки животных производилась путем нанесения термической травмы (t=98-100°C) и формирования патологического элемента. В соответствии с целью исследования животные были подразделены на 2 группы по 10 особей в каждой. Животным опытной и контрольной групп в условиях контролируемого рауш-наркоза наносили термический ожог с помощью нагретого шпателя при 15-секундном контакте со слизистой оболочкой щеки. Крысам опытной группы ежедневно наносили на раневую поверхность тонким слоем фармакологическую композицию на основе кремнийхитозансодержащего глицерогидрогеля, контрольная группа находилась под наблюдением и лечения не получала. Забор материала для морфологического исследования осуществляли до воздействия, через 1, 5, 7, 10, 14 суток. Ткани фиксировали 10% раствором формалина, проводили восковую заливку, срез тканей, окраску по Романовскому-Гимза и изучали под 160-320-кратным увеличением.

Морфологическое исследование проводилось в Уральском научно-исследовательском институте фтизиопульмонологии Минздрава России (к.м.н., заведующий патологоанатомическим отделением Бердников Р.Б.).

## Результаты и обсуждение

При изучении острой токсичности достоверно значимых различий в поведенческих реакциях лабораторных животных опытной и контрольной групп не выявлено, летальных исходов также не наблюдалось. Все контролируемые показатели не отличались от аналогичных показателей интактных животных.

При исследовании хронической токсичности (кожно-резорбтивного, кожно-раздражающего, сенсибилизирующего действия) фармакологической композиции у всех лабораторных животных видимых изменений на коже в области воздействия не наблюдалось. В исследовании «открытое поле» отличий опытной и контрольной групп животных по изучаемым показателям не выявлено. Изменений со стороны склеры, конъюнктивы, слезного протока глаз кроликов при оценке местнораздражающего действия композиции также не наблюдалось. При сравнительной оценке гистологических препаратов висцеральных органов лабораторных животных опытной и контрольной групп структурных изменений не выявлено. Таким образом, исследуемая фармакологическая композиция на основе кремнийхитозансодержащего глицерогидрогеля относится к IV типу класса опасности (малоопасные вещества) согласно ГОСТу 12.1.007-76.

Местное действие фармакологической композиции оценивали по срокам полной эпителизации патологического элемента слизистой оболочки щеки крыс и морфологическим показателям состояния тканей в области пораженного участка. Гистологическое исследование тканей слизистой оболочки щеки у животных исследуемой группы (рис. 1), получивших травму и находящихся под наблюдением, подтверждает формирование эпителиального слоя в сроке 8,60±1,30 дней с сохраненной дифференцировкой слоев, но в области патологического очага толщина его увеличена. Роговой слой нарастает неравномерно, клетки шиповатого слоя находятся на разных стадиях деления. Клетки базального слоя располагаются в несколько рядов, беспорядочно. Соединительно-тканые сосочки хорошо выражены. В эндотелии сосудов подэпителиального слоя обнаруживаются процессы пролиферации и образование тромбов. Выявляются тучные клетки в незначительном количестве.

Гистологическое исследование тканей слизистой оболочки щеки у животных исследуемой группы (рис. 2), получивших обработку патологического очага композицией, свидетельствует о формировании эпителия равномерной толщины на всем протяжении в сроке 4,20±1,40. Соединительно-тканые сосочки четкие, клетки базального слоя располагаются в один ряд. Клетки шиповатого слоя крупные, в состоянии активного деления. В подэпителиальном слое обнаруживаются тучные клетки.



Рисунок 1.



Рисунок 2.

## Выводы

1. Исследуемая фармакологическая композиция на основе кремнийхитозансодержащего глицерогидрогеля является малоотоксичной и относится к IV типу классу опасности (малоопасные вещества) согласно ГОСТУ 12.1.007-76.

2. В результате морфологического исследования выявлено, что применение новой фармакологической композиции приводит к снижению воспалительного процесса при экспериментальной травме. Положительная динамика гистологической картины, определяемая уже на третьи сутки наблюдений, позволяет говорить об эффективном и оптимальном соотношении отдельных компонентов фармакологических композиций.

3. Полученные данные указывают на возможность дальнейшего клинического исследования фармакологи-

ческой композиции на основе кремнийхитозансодержащего глицерогидрогеля у пациентов с воспалительными заболеваниями слизистой оболочки полости рта, в том числе с красным плоским лишаем. ■

*Григорьев С.С., д.м.н., профессор кафедры терапевтической стоматологии УГМУ, г. Екатеринбург; Жовтыак П.Б., аспирант кафедры терапевтической стоматологии УГМУ, г. Екатеринбург; Ларионов Л.П., д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии УГМУ, г. Екатеринбург; Бердников Р.Б., к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий патологоанатомическим отделением ФГБУ УНИИФ Минздрава России, доцент кафедры патологической анатомии ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России; Автор, ответственный за переписку - Жовтыак Полина Борисовна, E-mail: polina\_zhovtyak@mail.ru*

## Литература:

1. Леонтьева Е.С. Стоматологические проявления красного плоского лишая и прогностическая значимость факторов, влияющих на его течение: автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Казань, 2014. - 24 с.
2. Глазкова Ю. П. Иммуносупрессивная терапия в комплексном лечении красного плоского лишая слизистой оболочки полости рта и губ: автореферат дис. ... канд. мед. наук / РУДН. — М., 2013. — 22 с.
3. Srinivas K. Oral lichen planus - Review on etiopathogenesis/ K. Srinivas, K. Aravinda, P. Ratnakar, N. Nigam, S. Gupta// National Journal of Maxillofacial Surgery.- 2011.- Vol. 2.- P. 15-16.
4. Белева Н.С. Совершенствование диагностики и комплексного лечения в системе диспансеризации больных красным плоским лишаем слизистой оболочки полости рта: автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Пермь, 2010. - 24 с.
5. Segura S. Evaluation of MYC status in oral lichen planus in patients with progression to oral squamous cell carcinoma/ S. Segura, E. Rozas-Muñoz, A. Toll, G. Martín-Ezquerro, E. Masferrer, B. Espinet // Br. J. Dermatol.-2013, Vol.169(1), P. 106-114.
6. Khonina, T.G. Mechanism of structural networking in hydrogels based on silicon and titanium glycerolates / T.G. Khonina, A.P. Safronov, E.V. Shadrina, M.V. Ivanenko, A.I. Suvorova, O.N. Chupakhin // Journal of Colloid and Interface Science. – 2012. – Vol. 365. – P. 81–89.
7. Ларченко Е. Ю. Фармакологически активные гидрогели на основе глицеролатов кремния и хитозана/ Е. Ю. Ларченко, Т. Г. Хонина, Е. В. Шадрина, А. В. Пестов, О. Н. Чулахин, Н. В. Меньшуткина// Известия Академии наук. Серия химическая.-2014.-№5, с. 1225-1231.
8. Воронков М.Г., Зелчан Г.И., Лукевич Э.Я. Кремний и жизнь. Биохимия, фармакология и токсикология соединенный кремния. Рига: Зинатне, 1978, 587 с.
9. Хитозан, под ред. К.Г. Скрыбина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова, Центр «Биоинженерия» РАН, Москва, 2013, 591с.
10. Пат. 2255939 Российская Федерация, МПК7 С 07 F 7/04, А 61 К 47/30. Глицераты кремния, обладающие транскутанной проводимостью медикаментозных средств, и глицерогидрогели на их основе / Т.Г. Хонина, Л.П. Ларионов, Г.Л. Русинов, А.Л. Суворов, О.Н. Чулахин; заявитель и патентообладатель Ин-т орг. синтеза УрО РАН. – № 2003124688/04; заявл. 07.08.03; опубл. 10.07.05, Бюл. № 19.–12 с.
11. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общ. ред. Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. М., 2005. 832 с.