

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТРОЙ ТОКСИЧНОСТИ, РАЗДРАЖАЮЩЕГО И КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕЛЯ ХИТОЗАНА С ТАУРИНОМ И АЛЛАНТОИНОМ

П. А. Федосов, А. И. Сливкин, В. А. Николаевский, А. В. Бузлама

Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 30.04.2015 г.

Аннотация. В статье представлены результаты доклинического изучения острой токсичности геля разработанного на основе хитозана с таурином и аллантоином при местном применении для лечения ран. Показано что гель относится к IV классу токсичности, не оказывает раздражающего действия на конъюнктиву глаза крыс, и кожно-резорбтивного действия, отрицательного влияния на клиническое состояние животных.

Ключевые слова: хитозан, таурин, аллантоин, гель, острая токсичность, раздражающее действие.

Abstract. The article presents the results of pre-clinical study of acute toxicity developed gel based on chitosan with taurine and allantoin when applied topically to treat wounds. It is shown that the gel is a class IV toxicity, no irritation to the conjunctiva of rats and skin-resorptive action, in the absence of a negative impact on the clinical condition of the animals.

Keywords: chitosan, taurine, allantoin, gel, acute toxicity, irritant.

Большой интерес в мире привлекают к себе таурин и аллантоин, проявляющие ранозаживляющие свойства [1,2]. Хитозан довольно часто используется в качестве основы лекарственной формы [3]. На фармацевтическом рынке существует большое разнообразие ранозаживляющих средств, однако не все они отвечают требованиям для современных раневых покрытий [4].

Нами впервые разработан гель на основе хитозана с таурином и аллантоином (ХТА). В предварительных скрининговых исследованиях, в опытах на 49 животных, было обнаружено ранозаживляющее действие комбинации геля ХТА, превосходящее по своей активности мазь «Левомеколь» и гель «Солкосерил», в связи с этим исследование безопасности новой лекарственной формы для местного применения является весьма актуальным.

Целью данной работы явилось определение острой токсичности, оценка раздражающего дей-

ствия, кожно-резорбтивного действия геля на основе хитозана с таурином и аллантоином.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Острую токсичность геля ХТА определяли при аппликационном применении путем нанесения на кожу взрослым беспородным мышам (n=30) массой 18-25 г. Животные находились на кормлении полнорационным комбикормом с добавлением моркови, пшеницы и ржи. В соответствии с рекомендациями «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», максимально возможное для однократного нанесения количества геля не вызвало летальных исходов, в связи с чем процедуру нанесения выполняли восемь раз на протяжении суток с часовым перерывом [5]. В первой группе гель наносился на кожу животным в дозе 0,3 г за один раз – суммарная суточная доза 96 г/кг. Во второй группе 1,0 г при суммарной суточной дозе 320 г/кг, в третьей группе применяли 2,0 г геля за один раз – суммарная суточная доза 640 г/кг. Для нанесения необходимого количества геля

Таблица 1

Критерии оценки раздражающего действия на слизистые оболочки глаз

Степень интенсивности реакции	Оценка в баллах	Раздражающий эффект
Отсутствие реакции	0	отсутствует
Гиперемия - нет	0	отсутствует
Гиперемия слабой выраженности	1	слабый
Гиперемия средней выраженности	2	слабый
Выраженная гиперемия	4	слабо выраженный
Лакримация - нет	0	отсутствует
Лакримация слабо выражена	1	слабый
Лакримация средней выраженности	4	слабо выраженный
Лакримация выраженная	5	умеренный
Нагноение отсутствует	0	отсутствует
Гнойные выделения	6	выраженный
Нагноение выраженное, истечение гноя на кожные покровы	10	сильно выраженный
Повреждение роговицы отсутствует	0	отсутствует
Повреждение роговицы средней выраженности	6	выраженный
Повреждение роговицы разлитое, помутнение выраженное	10	сильно выраженный
Отек век отсутствует	0	отсутствует
Отек век выражен	10	сильно выраженный

мышам выбривали шерстный покров с помощью депиляционного крема Deep depil (ООО «Флоресан», Россия) на площади 70% поверхности тела. Температура в помещении вивария поддерживалась на уровне +27°C для предотвращения переохлаждения животных во время эксперимента. Наблюдение за животными вели в течение 14 суток, в 1 сутки после применения геля наблюдение за состоянием животных осуществляли непрерывно. Оценивали общее клиническое состояние, поведение, интенсивность и характер двигательной активности, изменения частоты дыхательных движений, сохранение рефлексов положения, выживаемость животных. Проводили патологоанатомические исследования погибших особей [5]. Класс токсичности и безопасности определяли методом накопления частот по Беренсу, в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 и классификацией И.В. Березовской (2003) [6,7].

Эксперименты по определению раздражающего действия геля ХТА и его компонентов проводили методом конъюнктивной пробы, в опытах на 20 белых беспородных крысах-самцах массой 280-300 г. Были сформированы 4 группы по 5 особей в каждой. 1-я группа – на роговицу глаза подопытным крысам наносили 1 каплю геля на основе хитозана с таурином и аллантоином. 2-я группа – животным инстиллировали каплю геля хитозанового, 3-я группа – на роговицу глаза помещался порошок аллантоина, 4-я группа – порошок таурина наносили на роговицу глаза. Второй глаз являлся контрольным, в конъюнктивный мешок закапывали 1 каплю воды. Реакцию определяли через 15 мин и через 24 часа.

Оценивали общее клиническое состояние животных, осуществляли контроль роговичного рефлекса, изменения слизистой оболочки глаза регистрировали визуально, оценивали покраснение слезного протока, отек века [5].

Для исследования кожно-резорбтивного действия геля ХТА использовали пробирочный метод, были использованы взрослые белые беспородные крысы самцы (n=20) массой 200-225 грамм. За день до опыта хвосты крыс тщательно мыли теплой водой с мылом. В день опыта животное фиксировалось в камере Когана на 4 часа, хвост погружали на 2/3 в пробирку заполненную жидкостью. Первая группа была контрольной – хвосты опускались в пробирку с водой. Во второй группе хвосты крыс помещали с исследуемым гелем ХТА, в третьей группе с гелем «Солкосерил» 10% (Legacy Pharmaceuticals Switzerland GmbH, Швей-

цария), в четвертой группе с мазью «Левомеколь» (ОАО Нижфарм, Россия). Пробирки помещали на водяную баню температурой 28-30°. Через 4 часа кожу хвоста тщательно мыли до полного удаления остатков лекарственных средств в проточной воде и таким образом предотвращали возможность слизывания. В качестве критериев кожно-резорбтивного действия использовали общее клиническое состояние, степень выраженности признаков интоксикации, наличие аллергических реакций [8]. Результаты действия исследуемых веществ оценивали полуквантитативно в баллах, степень эритемы и отека суммировали для каждого подопытного животного и определяли выраженность раздражающего и кожно-резорбтивного эффекта для группы животных [9].

Все эксперименты проводились с соблюдением этических принципов «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» [10]. Данные были статистически обработаны с использованием пакета прикладных программ «Microsoft Excel» и «Statistica 5.0»

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследований определения острой токсичности установлено, что после восьмикратного нанесения на выбритую кожу мышей геля в суммарной суточной дозе 96 г/кг за 8 часов, все животные были подвижны, признаки интоксикации не наблюдались, ни одно животное в группе не погибло в течение 14 суток. После применения геля ХТА на кожу в дозе 320 г/кг в течение 8 часов, наблюдалось угнетенное состояние животных, снижение частоты дыхательных движений, мышцы были малоподвижны, изменение рефлексов положения сохранялась, летальность в группе составила 22,2%. При увеличении дозы восьмикратного нанесения геля до 640 г/кг, летальность в группе составила 42,9%. Общее клиническое состояние выживших животных характеризовалось значительным снижением двигательной активности и поведенческих реакций, саккадированным дыханием и симптомами легочно-сердечной недостаточности. Нанести на кожу дозу больше 640 г/кг не представляется технически возможным, и поэтому в исследовании ограничились нанесением трех доз.

Используя полученные данные, была построена кривая токсичности по методу Беренса, которая позволила установить (рис. 1.), что при нанесении геля ХТА на кожу $LD_{50} = 720$ г/кг, на основании чего его можно отнести к IV классу опасности – малотоксичные химические вещества.

При исследовании раздражающего действия геля ХТА и его компонентов методом конъюнктивной пробы показало, что при однократном воздействии на конъюнктиву глаза гелем ХТА и гелем содержащим только хитозан, проявлялось кратковременное легкое покраснение конъюнктивы глаза (1 балл – слабый эффект), так как гель ХТА и хитозановый гель были приготовлены на уксусной кислоте и pH гелей 4,2. Отсутствовало изменение двигательной активности, вокализация, признаки возбуждения, изменение аппетита и потребление воды.

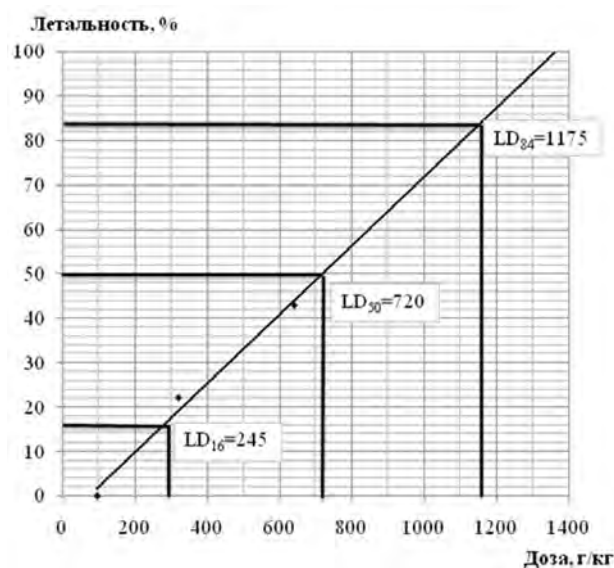


Рис. 1. Характеристическая кривая токсичности геля ХТА (метод Беренса) при накожном нанесении мышам

Лакримация отсутствовала, легкое покраснение слезного канала, и конъюнктивы века исчезало не позднее чем через 5 мин. После нанесения порошков аллантина и таурина признаки раздражающего действия полностью отсутствовали (0 баллов). Таким образом, гель на основе хитозана и гель ХТА, порошки таурина и аллантина при нанесении на слизистую оболочку глаза не обладают раздражающим действием и не оказывают неблагоприятного воздействия на организм.

В ходе исследования кожно-резорбтивного действия веществ, установлено отсутствие покраснения, отека, токсических и аллергических реакций после 4 часовой экспозиции на кожи хвоста геля ХТА, геля «Солкосерил» и мази «Левомеколь» (0 баллов – отсутствие раздражающего действия). Во всех опытных группах у животных отсутствовали изменения поведенческих реакций, двигательной активности, ритма дыхания.

Таким образом, гель ХТА является малотоксичным при местном применении даже в дозировке, которая превышает терапевтическую в 12 раз, что свидетельствует о высокой безопасности.

ВЫВОДЫ

Гель на основе хитозана с таурином и аллантином является малотоксичным веществом, которое может быть отнесено к IV классу опасности – малотоксичные химические вещества. При нанесении на слизистую оболочку глаза и при аппликации на кожу не оказывает раздражающего и кожно-резорбтивного действия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Effect of taurine on wound healing / S. Dinger [et al.] // *Amino Acids*. — 1996. — Vol. 10. — P. 59-71
2. Profile of wound healing process induced by allantoin / L.U. Araújo, A. Grabe-Guimarães, V. C. Mosqueira, C. M. Carneiro, N. M. Silva-Barcellos // *Acta Cirúrgica Brasileira*. — 2010. — Vol. 25, №5. — P. 460–466.
3. Федосов П.А. Хитозан как полимер будущего и перспективы его применения в медицине / П.А. Федосов // *APRIORI*. Серия: Естественные и технические науки : электрон. журнал. — 2014. — № 4. — URL: <http://www.apriori-journal.ru/seria2/4-2014/Fedosov.pdf> (дата обращения: 29.04.2015).
4. Антонов С.Ф. Материалы для лечения ран и ожогов на основе хитозана / С.Ф. Антонов // *Хитозан* / под ред. К.Г. Скрыбина, С.Н. Михайлова, В.П. Варламова. — М. : Центр «Биоинженерия» РАН, 2013. — С. 436-488.
5. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов. — М. : Гриф и К, 2012. — 944 с.
6. Сепетлиев, Д. Статистические методы в научных медицинских исследованиях / Д. Сепетлиев — М., 1968. — 419 с.
7. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И. В. Березовская // *Хим.-фарм. журнал*. — 2003. — Т. 37, №3. — С. 32–34.
8. Саноцкий, И.В. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / И.В. Саноцкий. — М.: Медицина, 1970. — 344 с.
9. Бузлама А.В. Экспериментальное изучение фармакологических свойств солей гуминовых кислот: дис. ... д-ра мед. наук. ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 2015.
10. European convention for the protection of vertebral animals used for experimental and other scientific purpose: Council of Europe 18.03.1986. — Strasbourg, 1986. — 52 p.

Воронежский государственный университет
Федосов П. А., аспирант кафедры фармакологии
E-mail: fedosov91@gmail.com

Сливкин А. И., д.фармацевт.н., профессор,
зав. кафедрой фармацевтической химии и фармацевтической технологии
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru
Тел.: (473) 2731-895

Николаевский В. А., д.мед.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии
E-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru
Тел.: (473) 2530380

Бузлама А. В., к.мед.н., доцент кафедры фармакологии
E-mail: buzlamaa@yandex.ru
Тел. (473) 2530380

Voronezh State University
Fedosov P. A., post-graduate student department of pharmacology
E-mail: fedosov91@gmail.com

Slivkin Alexey I. – doctor of pharm. sciences, professor, head of the Dept. of pharmaceutical chemistry and pharmaceutical technology
E-mail: slivkin@pharm.vsu.ru
Ph.: (473) 2731-895

Nikolaevsky V. A., Doctor of medicine, professor, head of the department of pharmacology
E-mail: nikolaevsky@pharm.vsu.ru
Ph.: (473) 2530380

Buzlama A. V., Doctor of medicine, associate professor, Dept. of pharmacology
E-mail: buzlamaa@yandex.ru
Ph.: (473) 2530380