

ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СМЕСИ ДЛЯ ПРИОСТАНОВЛЕНИЯ КАРИЕСА ВРЕМЕННЫХ ЗУБОВ В РАМКАХ ПЕРВИЧНОЙ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ ОЦЕНКИ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Целью исследования являлось изучение биологического действия смеси 38 %-го раствора фторида диамминсеребра и 10 %-го раствора повидон-йода в предложенном нами соотношении в остром токсикологическом эксперименте при различных путях поступления и анализ полученных данных. Объектом исследования послужила экспериментальная смесь (ЭС), состоящая из гидроксиапатита, препарата фторида диамминсеребра и 10 % раствор повидон-йода в предложенном нами соотношении; конвенциональные экспериментальные животные (белые крысы и мыши, кролики). Предмет исследования: острая пероральная токсичность, раздражающее действие на кожу и слизистые, сенсibiliзирующее действие, цитотоксического действия *in vitro*. Установлено, что по параметрам острой внутрижелудочной токсичности ЭС относится к малоопасным химическим соединениям (IV класс опасности по ГОСТ 12.1.007–76 ССБТ); не оказывает местно-раздражающего действия при однократном эпикутанном нанесении на неповрежденные кожные покровы белых крыс (0 класс выраженности кожно-раздражающих свойств); не обладает раздражающим действием при однократном воздействии на слизистые оболочки глаз кроликов (0 класс выраженности раздражающего действия); не обладает сенсibiliзирующим действием (отсутствие тенденции развития сенсibiliзирующего действия) и цитотоксическим действием в опытах *in vitro*.

Ключевые слова: первичная токсикологическая оценка, острая пероральная токсичность, раздражающее действие на кожу и слизистые, сенсibiliзирующее действие, цитотоксического действия *in vitro*; приостановление кариеса, фторид диамминсеребра.

T. N. Terekhova, A. V. Butvilovsky, E. S. Yurkevich, M. V. Anisovich

THE STUDY OF THE BIOLOGICAL EFFECT OF THE EXPERIMENTAL MIXTURE FOR ARRESTING CARIES TREATMENT OF DECIDUOUS TEETH THE FRAMEWORK OF THE PRIMARY TOXICOLOGICAL ASSESSMENT

The aim of the research was to study the biological effect of a mixture of 38 % solution of silver diamine fluoride and 10 % solution of povidone-iodine in the ratio we proposed in an acute toxicological experiment with various routes of entry and analysis of the data obtained. The object of the study was an experimental mixture (EM) consisting of hydroxyapatite, a 38 % solution of silver diamine fluoride and a 10 % solution of povidone iodine in the ratio we proposed; conventional experimental animals (white rats and mice, rabbits). Subject of study: acute oral toxicity, irritating effect on the skin and mucous membranes, sensitizing effect, *in vitro* cytotoxic effect. It was established that the EM according to the parameters of acute intragastric toxicity refers to low-dangerous chemical compounds

(IV danger class); does not have a local irritant effect with a single epicutaneous application to the intact skin of white rats (0 class of severity of skin-irritating properties); does not have an irritative effect with a single exposure to the mucous membranes of the eyes of rabbits (0 class of severity of irritative effect); does not have a sensitizing effect (lack of a tendency for a sensitizing effect) and cytotoxic effect in *in vitro* experiments.

Key words: primary toxicological assessment, acute oral toxicity, irritating effect on the skin and mucous membranes, sensitizing effect, *in vitro* cytotoxic effect; arresting caries treatment, silver diamine fluoride.

Приостановление кариеса – совокупность лечебно-диагностических мероприятий, направленных на стабилизацию имеющегося кариозного поражения. Наиболее актуальными данными мероприятия являются для временных зубов в дошкольном возрасте [9].

В настоящее время для этой цели распространены становится применение фторида диамминсеребра (ФДС), вызывающего выраженную стагнацию кариеса эмали и дентина [14–16]. К механизмам действия данного соединения относят запечатывание дентинных канальцев серебром, кариесстатическое действие продуктов реакции ФДС с неорганическими компонентами зуба (Ag_3PO_4 , CaF_2) и антиферментное действие продуктов реакции ФДС с органическими компонентами зуба [12]. Единственным значимым недостатком применения ФДС для приостановления кариеса является возникающее после его применения окрашивание тканей зуба [8]. Таким образом, актуальным является разработка новых способов применения ФДС для снижения вероятности и интенсивности окрашивания обработанных зубов.

Ранее нами была предложена методика приостановления кариеса временных зубов путем последовательного нанесения на пораженные кариесом твердые ткани зуба 38 %-го раствора ФДС и 10 %-го раствора повидон-йода [10] в рассчитанном соотношении [11]. Данная методика апробирована на удаленных зубах с положительным результатом [1]. Каждое из применяемых веществ прошло токсикологическую оценку, и содержащие их препараты зарегистрированы и успешно применяются в Республике Беларусь. Однако первичная токсикологическая оценка продуктов реакции данных веществ (согласно разработанному способу) не проводилась, что определяет актуальность настоящего исследования.

Цель исследования: изучение биологического действия смеси 38 %-го раствора фторида диамминсеребра и 10 %-го раствора повидон-йода в предложенном нами соотношении в остром токсикологическом эксперименте при различных путях поступления и анализ полученных данных.

Задачи исследования:

1. Изучить клиническую картину острого отравления смеси ФДС и 10 %-го раствора повидон-йода (в предложенном нами соотношении) при однократном внутривнутреннем введении белым крысам и установить параметры острой токсичности.

2. Исследовать местно-раздражающее действие на кожные покровы белых крыс смеси ФДС и 10 %-го раствора повидон-йода.

3. Оценить ирритативное действие смеси ФДС и 10 %-го раствора повидон-йода при однократном воздействии на слизистые оболочки глаз кроликов.

4. Выявить вероятность сенсибилизирующего действия у смеси ФДС и 10 %-го раствора повидон-йода.

5. Изучить цитотоксическое действие смеси ФДС и 10 %-го раствора повидон-йода (в предложенном соотношении) в эксперименте *in vitro*.

Материалы и методы. Объектом исследования служила экспериментальная смесь (ЭС), состоящая из гидроксиапатита (AC371260010, «Acros Organics»), препарата ФДС («Аргенат однокомпонентный», «ВладМиВа») и 10 % раствор повидон-йода («Бетадин», «EGIS») в предложенном нами соотношении растворов ФДС и йода 1:110.

Предмет исследования: острая пероральная токсичность, раздражающее действие на кожу и слизистые, сенсибилизирующее действие, цитотоксического действия *in vitro*.

Все эксперименты с животными осуществлялись согласно правилам биоэтики.

Острая токсичность при однократном внутривнутреннем введении изучена согласно Инструкции 1.1.10–12–41–2006 (п.16, п.33) [5]. Вводимую дозу в острых опытах испытывали на 6 животных при интрагастральном введении при помощи иглы-зонда с последующим наблюдением за клинической картиной интоксикации и поведением животных в течение 14 суток.

Учитывая специфику применения препарата в эксперименте использовали крысят-отъемышей, массой 120–140 г, которым однократно внутривнутренне вводили ЭС в дозе 15000 мг/кг.

Местно-раздражающее действие на кожные покровы изучено согласно Инструкции 1.1.10-12-41-2006 (п.54-55) [5]. ЭС наносили на лишнюю шерстного покрова неповрежденную кожу спины 6 белых крыс, площадью 2×2 см, в дозе 0,02 мл на 1 см² кожного «окошка», при трехкратных 4-х часовых аппликациях.

Оценка ирритативного действия проведена применительно Инструкции 1.1.10-12-41-2006 (п.60) [5]. ЭС инстиллировали в нижний конъюнктивный свод правого глаза 3 кроликов в количестве 0,05 см³, левый глаз при этом служил в качестве контрольного, в который закапывали в аналогичном объеме дистиллированную воду.

Изучение сенсibilизирующего действия проведено согласно Инструкции 1.1.11-12-35-2004 (глава 8) [4] на 10 белых мышах, сенсibilизированных ЭС в стандартной дозе по 100 мкг в полном адьюванте Фрейнда. Оценку внутрикожного теста опухания лапы (ВТОЛ) в баллах проводили в абсолютных (мм) и относительных (балл) единицах по следующей шкале: 0 баллов – ВТОЛ до 0,1 мм; 1 балл – 0,11-0,20 мм; 2 балла – 0,21-0,30 мм; 3 балла – 0,31-0,40 мм; 4 балла – 0,41-0,50 мм; 5 баллов – 0,51 мм и более [6].

Исследования цитотоксического действия *in vitro* проведены в соответствии с требованиями ГОСТ ISO 10993-5-2011 [3] и Инструкции 1.1.10-12-41-2006 [5] и выполнены на первичной культуре эмбриональных фибробластов мыши (1 пассаж). Посев клеток произведен в шестилуночные планшеты (по три лунки на каждую экспериментальную группу) с плотностью посева 5000 клеток на 1 см². Культивирование осуществлялось при 37°C, 5 % CO₂ в среде, содержащей 90 % DMEM (Dulbecco modified Eagle medium, модифицированная среда Дульбекко-Игла, производитель: Sigma, США), 10 % FBS (Fetal bovine serum, эмбриональная телячья сыворотка, производитель: HyClone, США), 0,1 % AAS (Antibiotic-antimycotic solution, раствор антибиотиков, производитель: Sigma, США). В основной группе в раствор Хэнкса добавлена 1 %-ная вытяжка из образца экспериментальной смеси, в контрольных группах использовался 1 %-ный раствор Хэнкса (отрицательный контроль) и 1 %-ный этанол (положительный контроль). В начале исследования, на 2-е, 5-е, 8-е и 11-е сутки подсчитывали общее количество клеток в 30 мм² на дне каждой лунки.

Полученные результаты обрабатывали методами описательной статистики, описание коли-

чественных переменных представлено в виде медианы, нижнего и верхнего квантиля Me [Q1; Q3]. Регрессионный анализ выполнен при помощи пакета Microsoft Excel 2007. Достоверность различий при множественном сравнении определена по критерию U (Манна-Уитни) (с критическим уровнем значимости при проверке статистических гипотез равном 0,05) [7, 13].

Результаты и обсуждение. На протяжении 14-суточного периода наблюдения гибели и клинических симптомов интоксикации не отмечено, поведение подопытных животных не отличалось от контрольных. Следовательно, по параметрам острой внутрижелудочной токсичности экспериментально разработанная смесь из комбинации препаратов (гидроксипатит, «Аргенат однокомпонентный», «Бетадин») в предложенном нами соотношении относится к малоопасным химическим соединениям (IV класс опасности, ГОСТ 12.1.007-76 ССТБ) [2].

При изучении раздражающего действия на кожные покровы у животных опытной группы на протяжении всего периода наблюдения отека и эритемы кожных покровов не отмечено. Следовательно, при однократном воздействии на неповрежденные кожные покровы белых крыс ЭС не обладает раздражающим действием и может быть отнесен к 0-му классу выраженности кожно-раздражающих свойств (Инструкция 1.1.11-12-35-2004, приложение 6 [4]).

При оценке ирритативного действия на протяжении всего периода наблюдений гиперемии конъюнктивы, отека век и выделений из глаза опытных животных не отмечено. Таким образом, исследуемый препарат не оказывает раздражающего действия на слизистые оболочки глаз кроликов и относится к 0 классу выраженности ирритативного действия (Инструкция 1.1.11-12-35-2004, приложение 4 [4]).

Результаты определения сенсibilизирующего действия представлены на рис. 1.

Внутрикожное введение в основание хвоста белых мышей ЭС в нативном виде не сопровождалось развитием отечно-пролиферативной реакции, которая по выраженности реакции по абсолютному (мм) показателю у животных опытной группы (0,045 [0,03; 0,0825]) не отличалась от контроля (0,005 [0; 0,125]; U = 4,5; p < 0,001).

Медианные значения относительных показателей ВТОЛ у белых мышей в опыте и контроле были равны и составили 0 [0; 0]. Таким образом,

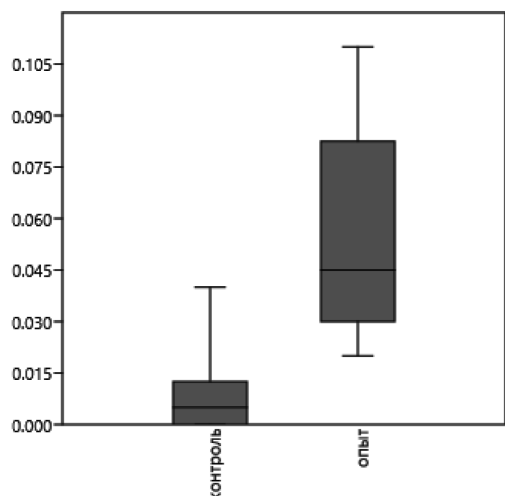


Рис. 1. Абсолютные показатели ВТОЛ у белых мышей в опыте и контроле (мм)

в результате эксперимента у изучаемой ЭС не отмечено проявлений сенсibilизирующей активности.

Результаты оценки цитотоксического действия вытяжки из образца экспериментальной смеси (1 %-й раствор) представлены в таблице.

Таблица. Воздействие водной вытяжки на среднее число клеток в ростовой среде

Исследуемый образец	Среднее число клеток в разные сроки, сутки				
	0	2	5	8	11
Опыт	979	1979	3080	3991	4305
Раствор Хэнкса (отрицательный контроль)	707	1371	2210	3030	3520
Этанол (положительный контроль)	809	1308	1238	759	425

Согласно результатам исследований (таблица), в группе отрицательного контроля наблюдался близкий к линейному характер клеточной прогрессии ($R = 0,995$; $F = 27,97$; $p = 0,013$) с уменьшением темпа прироста с 93,9 % на 2-е сутки до 16,2 % на 11-е сутки. В опытной серии динамика прогрессии ($R = 0,91$; $F = 15,0$; $p = 0,03$) статистически не отличалась от контрольной серии с раствором Хэнкса, темп прироста в аналогичные сроки наблюдения снизился с 102,1 % до 7,9 %. В случае позитивного контроля с этанолом ($R = 0,70$; $F = 2,83$; $p = 0,19$) лаг-фаза роста культуры клеток прекращалась на 2-5 сутки (темп прироста 61,7 % и темп убыли – 5,4 %, соответственно) после внесения этанола в среду (рис. 2), достигая минимальных значений к концу наблюдения (425).

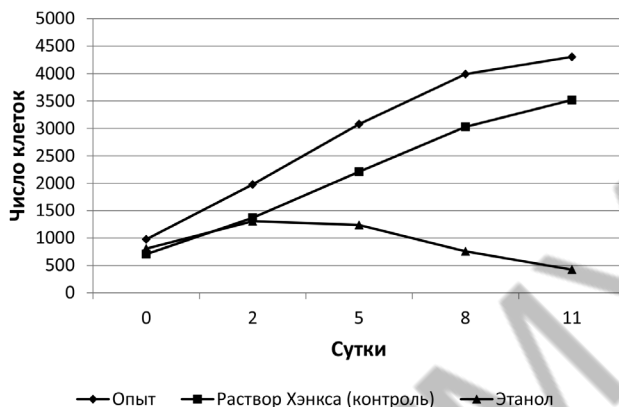


Рис. 2. Профили клеточной прогрессии в опытной и контрольных группах

Выводы

1. По параметрам острой внутрижелудочной токсичности экспериментальная смесь в предложенном нами соотношении относится к малоопасным химическим соединениям (IV класс опасности, ГОСТ 12.1.007-76 ССТБ).

2. Однократное эпикутанное воздействие исследуемого образца экспериментальной смеси на неповрежденные кожные покровы спины белых крыс не оказывает местно-раздражающего действия (0 класс выраженности кожно-раздражающих свойств (Инструкция 1.1.11-12-35-2004, приложение 6)).

3. При однократном воздействии на слизистые оболочки глаз кроликов исследуемый образец экспериментальной смеси не обладает раздражительным действием (0 класс выраженности раздражительного действия (Инструкция 1.1.11-12-35-2004, приложение 4)).

4. Исследуемый образец экспериментальной смеси не обладает сенсibilизирующим действием (отсутствие тенденции развития сенсibilизирующего действия (Инструкция 1.1.11-12-35-2004, приложение 9)).

5. Экспериментальная смесь в опытах *in vitro* не обладает цитотоксическим действием.

Заключение. В настоящем исследовании проанализирован ряд биологических показателей первичной токсикологической оценки (острая пероральная токсичность, раздражающее действие на кожу и слизистые, сенсibilизирующее действие, цитотоксического действия *in vitro*) разработанной нами экспериментальной смеси для приостановления кариеса временных зубов.

Литература

1. Бутвиловский, А. В. Изучение изменения химического состава твердых тканей пораженных кариесом временных зубов после аппликации 38 %-ного фторида диамминсеребра и препарата йода // Медицинский журнал. – 2015. № 4. – С. 55–57.
2. ГОСТ 12.1.007–76 ССБТ. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности; Введ. 01.01. 1977. – М.: Госстандарт СССР, 1977. – 22 с.
3. ГОСТ ISO 10993–5–2011. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М. 2014. – 10 с.
4. Инструкция 1.1.11–12–35–2004. Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ: утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 14.12.2004. – Минск, 2004. – 43 с.
5. Инструкция 1.1.10–12–41–2006. Гигиеническая оценка изделий медицинского назначения, медицинской техники и материалов, применяемых для их изготовления. : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 22.11.2006. – Минск, 2006. – 79 с.
6. Лепешко, П. Н. Токсиколого-гигиеническая оценка новых химических веществ, внедряемых в производство : учебно-методическое пособие / П. Н. Лепешко, Л. М. Бондаренко. – Минск : БГМУ, 2017. – 55 с.
7. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва // М. Медиасфера, 2002. – 312 с.
8. Терехова, Т. Н. Возможности применения препаратов фторида диамминсеребра в детской стоматологии / Т. Н. Терехова, А. В. Бутвиловский, Ж. М. Бурак // Современная стоматология. – 2009, № 1. – С. 57–59.
9. Терехова, Т. Н. Лечение кариеса временных зубов путем приостановления / Т. Н. Терехова, А. В. Бутвиловский, Ж. М. Бурак // Стоматологический журнал. – 2010. № 4. – С. 305–307.
10. Терехова, Т. Н. Способ приостановления кариеса зубов с помощью фторида диамминсеребра / Т. Н. Терехова, А. В. Бутвиловский, В. В. Хрусталева // Современная стоматология. – 2019, № 3.
11. Химическое моделирование взаимодействия препаратов серебра с твердыми тканями зуба и йодидами / А. В. Бутвиловский [и др.] // Медицинские новости. – 2019. № 3.
12. A review on applications of silver diamine fluoride in dentistry / Jain M. et al. // Int. J. of Oral Health Dentistry. – 2018. Vol. 4(2). – P. 58–62.
13. Hammer, O. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis / O. Hammer, D.A.T. Harper, P.D. Ryan // Palaeontologia Electronica. – 2001. Vol. 4(1). – P. 1–9.
14. Horst, J. A. UCSF Protocol for Caries Arrest Using Silver Diamine Fluoride: Rationale, Indications and Consent / J. A. Horst, H. Ellenikiotis, P. L. Milgrom // CDA J. – 2016. – Vol. 44 (1). – P. 17–28.
15. Pediatric Dentists' Silver Diamine Fluoride Education, Knowledge, Attitudes, and Professional Behavior: A National Survey / M. B. Antonioni et al. // Journal of Dental Education. – 2018. – Vol. 83 (2). – P. 173–182.
16. Silver diamine fluoride: A review and current applications / S. Shah et al. // JoAOR. – 2014. – Vol. 5(1). – P. 25–35.