



УДК 615.076.9: 615.065 + 615.454.2: 615.331
DOI <https://doi.org/10.11603/2312-0967.2022.2.13329>

ДОСЛІДЖЕННЯ ГОСТРОЇ ТОКСИЧНОСТІ ПЕСАРІЇВ «ЛАКТОВАГІН»

С. Л. Алейник, Ж. М. Полова

Національний медичний університет імені О. О. Богомольця
aleinyk_svitlana@ukr.net, zpolova@ukr.net

ІНФОРМАЦІЯ

Надійшла до редакції / Received:
06.05.2022
Після доопрацювання / Revised:
09.05.2022
Прийнято до друку / Accepted:
10.05.2022

Ключові слова:

доклінічні дослідження;
гостра токсичність;
песарії;
пробіотична активність;
інтравагінальне введення;
внутрішньошлункове введення.

АНОТАЦІЯ

Мета роботи. Дослідити гостру токсичність песаріїв під умовною назвою «Лактовагін» на лабораторних тваринах.

Матеріали і методи. Об'єкт дослідження: песарії «Лактовагін», що містять субстанцію *Lactobacillus IMB B-7280* з пробіотичною активністю та можуть використовуватись для лікування та профілактики дисбіотичних порушень у жінок. Дослідження гострої токсичності проводили на мишах-самцях лінії BALB/c при однократному застосуванні розробленого лікарського засобу при двох шляхах введення: інтравагінальному та внутрішньошлунковому. Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою ліцензійного програмного забезпечення MedStat v.5.2. Відмінності показників вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати й обговорення. Основними критеріями визначення токсичної дії препарату були загибель тварин, прояви інтоксикації, зниження індивідуальної та групової маси тварин порівняно з вихідною масою, що не спостерігали під час проведення даного експерименту. Під час щоденних оглядів тварин після однократного введення песаріїв «Лактовагін» не виявлено жодних патологічних поведінкових та фізіологічних проявів. Приріст індивідуальної та групової маси мишей був фізіологічним на рівні 3,5–4,1 % для дослідних груп, 2,8 % – для інтактного контролю. Наприкінці експерименту тварини підлягали евтаназії з метою проведення патоморфологічних досліджень, при проведенні яких не спостерігали патологічні зміни внутрішніх органів та головного мозку. Статистично значущих відмінностей між коефіцієнтами маси внутрішніх органів мишей-самців для різних груп не виявлено.

Висновки. З огляду на отримані дані після проведення експерименту, а саме: летальність мишей на рівні 0 %, позитивну динаміку приросту індивідуальної та групової маси тіла лабораторних тварин, відсутність ознак патології при проведенні патоморфологічних досліджень, можна припустити, що песарії «Лактовагін», які містять субстанцію *Lactobacillus casei IMB B-7280* з пробіотичною активністю, є відносно безпечними та нешкідливими.

Вступ. Збереження репродуктивного потенціалу жінок є одним з нагальних завдань сучасної медичної науки, адже зниження народжуваності, ускладнення перебігу вагітності і пологів пов'язані з різноманітними факторами, включно стрімке прогресування вагінальних патологій [1].

Фактори як ендогенного, так і екзогенного характеру є тригерами порушення нормального біоценозу піхви, що супроводжується зміною якісного та кількісного складу мікробіому, та, відповідно, розвитку дисбіотичних порушень [1, 2].

Найрозповсюдженішим проявом дисбіозу вагіни є бактеріальний вагіноз, що характеризується стрімким зростанням кількості патогенних та/або умовно-патогенних бактерій на фоні повної відсутності або різкого зменшення кількості лактобактерій у піхві [2, 3].

Сучасним ефективним лікуванням бактеріального вагіозу є проведення двохетапної терапії. Перша фаза включає застосування антибактеріальних препаратів переважно у вигляді лікарських форм для місцевого (вагінального) застосування з метою зниження росту чутливих патогенних мікроорганізмів. На другому етапі використовують препарати для відновлення нормального біоценозу піхви, тобто лікарські засоби (ЛЗ) з пробіотичною активністю, зокрема, лактобактерієвмісні, адже саме *Lactobacillus spp.* є основою пулу здорового мікроценозу жіночого організму [3].

Ми розробили песарії під умовною назвою «Лакто-вагін», що містять в якості субстанції з пробіотичною активністю штаму *Lactobacillus IMB B-7280*, самостійно синтезований Інститутом мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного Національної академії наук України, та визначено даний препарат як потенційний ЛЗ для профілактики та лікування дисбіотичних порушень піхви на основі ряду попередніх експериментальних досліджень [4, 5].

Відомо, що доклінічне випробування – важливий етап розробки ЛЗ, що включає комплекс заходів із доведення нешкідливості та специфічної активності новоствореного препарату і одержання дозволу на клінічні дослідження, а, отже, є однією з ланок, що гарантує якість та безпечність нового ЛЗ до потрапляння до кінцевого споживача [6].

Необхідною ланкою комплексу доклінічних досліджень є вивчення токсичності ЛЗ. Гостра токсичність визначається як небажаний ефект чи ефекти, що виникають відразу або через короткий проміжок часу після однократного введення речовини впродовж 24 годин. Неприятливим вважається будь-який вплив, що викликає біохімічні ураження та/або функціональні порушення органів, що спричинює зміни у функціонуванні як окремих органів і систем, так і організму в цілому [7].

Мета роботи: дослідити нешкідливість песаріїв під умовною назвою «Лактовагін» на підставі проведення експерименту з визначення гострої токсичності даного препарату.

Матеріали і методи. Дослідження було проведено в Інституті мікробіології і вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, відділі проблем інтерферону та імуномодуляторів під керівництвом академіка НАН України Співака Миколи Яковича.

Експеримент проводили відповідно до вимог Закону України № 3447-IV від 21.02.2006 р. «Про захист тварин від жорстокого поводження», наказів МОЗ України № 944 від 14.12.2009 р. «Про затвердження

Порядку проведення доклінічного вивчення лікарських засобів та експертизи матеріалів доклінічного вивчення лікарських засобів» та № 249 від 01.03.2012 року «Про затвердження Порядку проведення науковими установами дослідів, експериментів на тваринах», Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей».

Дотримання принципів біоетики підтверджено експертним висновком Комісії з питань біоетичної експертизи та етики наукових досліджень Національного медичного університету імені О. О. Богомольця (протокол № 138 від 10.11.2020 р.).

Дослідження гострої токсичності песаріїв під умовною назвою «Лактовагін» проводили відповідно до методичних рекомендацій «Доклінічні дослідження лікарських засобів» [8].

Експеримент проводили на 40 мишах-самичках лінії BALB/c віком 6–8 тижнів, масою 19–21 г, віргільних та невагітних.

Для визначення гострої токсичності випробування проводили при двох шляхах введення: рекомендованому до клінічного застосування (у випадку песаріїв – інтравагінальному) та внутрішньошлунковому, який є доцільним враховуючи можливість випадкових чи навмисних отруєнь при неправильному прийманні ЛЗ. Для забезпечення контролю впливу допоміжних речовин окремо випробовували основу без діючої речовини [8].

Тварин утримували в пластикових стандартних клітках, що комплектувалися пляшками для води. У кімнатах для утримання тварин дотримувалися таких умов: температура – 20–24 °С, вологість повітря – 30–70 %, режим освітлення – 12 год світло/12 год темрява. Усіх мишей утримували на стандартному раціоні для даного виду лабораторних тварин («Phoenix», Україна), питний режим *ad libitum*. Як підстилку використовували тирсу вільхи, попередньо оброблену автоклавуванням. Усіх мишей попередньо зважили, пронумерували, нанесли позначки 1 % спиртовим розчином діамантового зеленого і помістили в клітки для акліматизації впродовж 7 діб у лабораторному приміщенні.

Лабораторних тварин випадковим чином розподілили на п'ять груп (по 8 тварин у групі):

- 1 група – тварини, яким інтравагінально вводили супозиторну основу;
- 2 група – тварини, яким інтравагінально вводили песарії;
- 3 група – тварини, яким внутрішньошлунково вводили супозиторну основу;
- 4 група – тварини, яким внутрішньошлунково вводили песарії;
- 5 група – інтактний контроль.

Готували дослідні зразки песаріїв із максимально допустимою дозою активного фармацевтичного ін-

гредієнта – 5000 мг/кг та окремо виливали супозиторну основу. До дослідних зразків та супозиторної основи додавали попередньо підігрітій до $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 0,9 % розчин натрію хлориду у кількості 0,5 мл на один тест-зразок, витримували на водяній бані при температурі до 37°C та перемішували до гомогенного стану.

За допомогою шприца із насадкою мишам дослідних груп інтравагінально або внутрішньошлунково вводили тест-зразки у кількості 50 мкл.

Основними критеріями визначення токсичної дії препарату були загибель тварин, прояви інтоксикації, зниження індивідуальної та групової маси тварин порівняно з вихідною масою, яку визначали о 10 годині в день введення ЛЗ. Наступне вимірювання індивідуальної та групової маси тіла тварин проводили на 3, 7 та 14 дні після однократного застосування препарату. Тварини кожного дня о 10 та 17 годинах впродовж 14 діб оглядали та фіксували дані про: загальний стан мишей, зміни положення тіла, стан шкіри та шерсті, колір слизових оболонок, температуру тіла, наявність/відсутність міозу/міддріазу, лакримації, салівації, ринореї, зміни кольору сечі та фекалій та їх частоти, сонливість, наявність тремору, судом, діяльність серцево-судинної, центральної нервової та дихальної систем.

Після проведення експерименту тварини підлягали евтаназії шляхом цервікальної дислокації з використанням ефірного наркозу та проведення патоморфологічних досліджень з метою оцінки стану внутрішніх органів. Зважували печінку, серце, селезінку, головний мозок, а також нирки та легені попарно.

Статистичну обробку результатів здійснювали за допомогою ліцензійного програмного забезпечення MedStat v.5.2. Нормальність розподілу показників визначали за критерієм W Шапіро – Уїлка. Дані представлено у вигляді середнього значення \pm середнє квадратичне відхилення ($M \pm SD$). Для проведення порівняння статистично значущої відмінності між показниками різних груп застосовували метод множинних порівнянь за критерієм Шеффе або критерієм Даннета при порівнянні з контрольною групою (нормальний закон розподілу). Відмінності показників

вважали статистично значущими при $p < 0,05$.

Результати й обговорення. В результаті проведеного експерименту впродовж 14 діб не зафіксовано випадків загибелі лабораторних мишей як при інтравагінальному, так і внутрішньошлунковому шляхах введення (табл. 1).

Протягом 14 діб експерименту спостерігали позитивну динаміку зміни середньої індивідуальної та групової маси мишей як дослідних, так і контрольної груп (табл. 2).

Збільшення середньої індивідуальної маси тварин фіксували на 14 день порівняння з вихідними даними на рівні 3,5 % ($p < 0,05$) для тварин, яким інтравагінально та внутрішньошлунково вводили супозиторну основу, 4,0–4,1 % ($p < 0,05$) для тварин, на яких випробували песарії при двох шляхах введення. Збільшення індивідуальної маси тварин контрольної групи становить 2,8 % ($p < 0,05$).

Показники вимірювання групової маси мишей на 3, 7 та 14 дні експерименту свідчать про статистично значущий приріст маси тварин на рівні 1,3 %, 2,6 % та 3,6 % ($p < 0,05$) для тварин групи № 1; 1,1 %, 2,3 % та 4,1 % ($p < 0,05$) для тварин групи № 2; 1,4 %, 2,3 %, 3,5 % ($p < 0,05$) для тварин групи № 3; 1,1 %, 2,6 % та 4,1 % ($p < 0,05$) для тварин групи № 4. Для тварин контрольної групи (№ 5) приріст маси становив 1,0 %, 2,1 % та 2,8 % на 3, 7 та 14 дні, відповідно. Отримані результати свідчать про нормальне функціонування дослідних тварин та адекватні умови утримання.

Впродовж дослідження тварини груп № 1–5 були активні, рухова активність, координація, підвищення або зниження тонуусу скелетної мускулатури не спостерігали.

Лабораторні тварини дослідних та контрольної груп щоразу при зовнішньому огляді не мали ознак патології, шерсть була охайна, шкірні покриви гладкі та чисті, шкіра та слизові оболонки без будь-яких ознак уражень. При огляді очей, носа, ротової порожнини, зовнішніх статевих органів, промежини та анального отвору встановлено, що всі органи нормальної будови у тварин груп № 1–5, виділень з органів не виявлено.

Таблиця 1

Показники летальності тварин при інтравагінальному та внутрішньошлунковому введенні песаріїв та супозиторної основи, $n=8$

Група тварин	Кількість загиблих тварин/ кількість тварин у групі	Летальність, %
№ 1 – інтравагінально супозиторна основа	0/8	0
№ 2 – інтравагінально песарії	0/8	0
№ 3 – внутрішньошлунково супозиторна основа	0/8	0
№ 4 – внутрішньошлунково песарії	0/8	0
№ 5 – інтактний контроль	0/8	0

Таблиця 2

Динаміка зміни маси тіла мишей при інтравагінальному та внутрішньошлунковому введенні песаріїв та супозиторної основи, n=8

Група	Вихідна		3 день		7 день		14 день	
	індивідуальна маса	групова маса	індивідуальна маса	групова маса	індивідуальна маса	групова маса	індивідуальна маса	групова маса
№ 1 – інтравагінально супозиторна основа	19,65±0,51	157,1±0,07	19,9±0,46	159,2±0,08**	20,15±0,47	161,2±0,07**	20,35±0,44*	162,8±0,08**
№ 2 – інтравагінально песарії	20,23±0,42	161,8±0,07	20,45±0,43	163,6±0,08**	20,7±0,44	165,5±0,08**	21,04±0,55*	168,4±0,08**
№ 3 – внутрішньошлунково супозиторна основа	20,23±0,4	161,8±0,07	20,5±0,44	164,0±0,08**	20,74±0,43	166,0±0,08**	20,94±0,43*	167,5±0,07**
№ 4 – внутрішньошлунково песарії	20,32±0,13	162,5±0,08	20,54±0,17	164,3±0,07**	20,85±0,13	166,8±0,07**	21,15±0,18*	169,2±0,07**
№ 5 – інтактний контроль	19,9±0,32	159,2±0,07	20,1±0,3	160,8±0,08**	20,32±0,3*	162,6±0,08**	20,46±0,28*	163,7±0,08**

Примітки. * – статистично значуща відмінність індивідуальної маси порівняно з вихідною масою;

** – статистично значуща відмінність групової маси порівняно з вихідною масою.

Після евтаназії дослідних тварин при проведенні автопсії не виявлено патологічних змін внутрішніх органів та головного мозку; досліджено, що всі органи анатомічно правильно розташовані, мають звичний колір, консистенцію, трофіку, без ознак набряку та запальних процесів.

Печінка, серце, селезінка, головний мозок, нирки та легені вилучали та зважували відповідно до мето-

дик [8]. Коефіцієнти маси внутрішніх органів мишей-самиць наведено в таблиці 3.

Статистично значущих відмінностей показників коефіцієнтів маси внутрішніх органів мишей після разового введення песаріїв та їх основи інтравагінально та внутрішньошлунково як при порівнянні різних груп між собою, так і при порівнянні з ІК не виявлено.

Таблиця 3

Коефіцієнти маси внутрішніх органів мишей-самиць на 14 день після разового інтравагінального та внутрішньошлункового введення песаріїв та супозиторної основи, n=8

Група	Печінка	Нирки	Легені	Серце	Селезінка	Головний мозок
№ 1 – інтравагінально супозиторна основа	7,06±0,08	1,6±0,04	1,13±0,1	0,87±0,06	0,8±0,07	2,19±0,07
№ 2 – інтравагінально песарії	7,07±0,06	1,72±0,1	1,22±0,08	0,93±0,04	0,86±0,04	2,25±0,04
№ 3 – внутрішньошлунково супозиторна основа	7,05±0,1	1,6±0,08	1,21±0,07	0,86±0,06	0,83±0,05	2,21±0,05
№ 4 – внутрішньошлунково песарії	7,05±0,05	1,67±0,03	1,25±0,05	0,89±0,03	0,84±0,03	2,21±0,04
№ 5 – інтактний контроль	7,02±0,07	1,66±0,1	1,21±0,08	0,86±0,05	0,83±0,04	2,2±0,04

Висновки. 1. Проведено дослідження гострої токсичності песаріїв під умовною назвою «Лактовавіг», що містять субстанцію *Lactobacillus IMB B-7280* з пробіотичною активністю на мишах-самицях лінії

BALB/c при двох шляхах введення. Встановлено, що вони є відносно безпечними та нешкідливими.

2. Після однократного введення песаріїв «Лактовавіг» впродовж 14 діб спостерігали позитивний фізі-

ологічний приріст індивідуальної та групової маси тіла лабораторних тварин при двох шляхах введення (на 14 день 3,5–4,1 % для дослідних груп, 2,8 % – для інтактного контролю).

Конфлікт інтересів: відсутній.

Conflicts of interest: authors have no conflict of interest to declare.

ACUTE TOXICITY RESEARCH OF PESSARIES “LACTOVAGIN”

S. L. Aleinyk, Zh. M. Polova

O. O. Bohomolets National Medical University

aleinyk_svitlana@ukr.net, zpolova@ukr.net

The aim of the work. To research the acute toxicity of pessaries with the conditional name “Lactovagin” on the laboratory animals.

Materials and Methods. The object of the study: pessaries “Lactovagin” containing the substance *Lactobacillus IMB B-7280* with probiotic activity, and can be used for the treatment and prevention of dysbiotic disorders in women. The research of acute toxicity was conducted on female BALB/c line mice with a single administration of the developed drug by two routes of administration: intravaginal and intragastric. Statistical analysis of the results was performed with MedStat v.5.2 statistic software package. Differences in indicators were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Results and Discussion. The main criteria for determining the toxic effect of the drug were the death of animals, manifestations of intoxication, a decrease in the individual and group weight of animals compared to the initial weight. These indicators were not observed during this experiment. Pathological behavioral and physiological signs were not detected during daily examinations of animals after a single administration of pessaries “Lactovagin”. The increase in individual and group weight of mice was physiological at the level of 3.5–4.1 % for the experimental groups, 2.8 % for the intact control group. At the end of the experiment, the animals were euthanized for the pathomorphological studies, during which pathological changes in internal organs and brain were not observed. Statistically significant differences were not found between the weight coefficients of internal organs of female mice for different groups.

Conclusions. The data obtained after the experiment: the absence of the lethality of mice, the positive dynamics of the increase in individual and group body weight of laboratory animals, the absence of signs of pathology during pathomorphological studies can indicate that pessaries “Lactovagin” containing the substance *Lactobacillus casei IMB B-7280* with probiotic activity, are relatively safe and harmless.

Key words: preclinical studies; acute toxicity; pessaries; probiotic activity; intravaginal administration; intragastric administration.

Перелік бібліографічних посилань

1. Мехедко В. В. Практичні аспекти бактеріального вагінозу: актуальність, діагностика та комплексне лікування. *Здоров'я жінки*. 2020. 1(147). С. 61–68.
2. Вагініти та проблеми їх лікування / Довга І. М., Частій Т. В., Іваннік В. Ю., Казмірчук В. В. *Annals of Mechnikov Institute*. 2022. 2. С. 9–20.
3. Vodstrcil L. A., Muzny C. A., Plummer E. L., Sobel J. D., Bradshaw C. S. Bacterial vaginosis: drivers of recurrence and challenges and opportunities in partner treatment. *BMC Med*. 2021. Vol. 19 (1). P. 194. DOI: 10.1186/s12916-021-02077-3.
4. *Lactobacillus casei* IMB B-7280 - штам для створення пробіотичного препарату із антибактеріальною та імуномодулювальною дією: пат. 98881 Україна: МПК C12N1/00. № у 2014 12770; опубл. 12.05.2015. 8 с.
5. Супозиторії з пробіотичною активністю для вагінального застосування : пат. 141286 Україна : МПК А61К 9/02, А61К 35/74, А61К 35/66, А61Р 15/02. № у 2019 10960 ; опубл. 25.03.2020. 9 с.
6. Фармацевтична енциклопедія. URL: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/>.
7. Chinedu E., Arome D., Ameh F. S. A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicol Int*. 2013. Vol. 20 (3). P. 224–226. DOI: 10.4103/0971-6580.121674.
8. Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. реком. / за ред. О. В. Стефанова; Держ. фармакол. центр. Київ, 2001. 527 с.

References

1. Mekhedko VV. [Practical aspects of bacterial vaginosis: relevance, diagnosis and comprehensive treatment]. *Zdorovia zhinky*. 2020;1(147): 61-8. Ukrainian.
2. Dovha IM, Chastii TV, Ivannik Vlu, Kazmirchuk VV. [Vaginitis and the problems of their treatment]. *Annals of Mechnikov Institute*. 2022;(2): 9-20. Ukrainian.

Фармакологічні дослідження біологічно активних речовин

Pharmacological researches of biologically active substances

3. Vodstrcil LA, Muzny CA, Plummer EL, Sobel JD, Bradshaw CS. Bacterial vaginosis: drivers of recurrence and challenges and opportunities in partner treatment. *BMC Medicine*; 19(1). Available from: <https://doi.org/10.1186/s12916-021-02077-3>.
4. Spivak Mla, Lazarenko LM, Demchenko OA, Babenko LP, vynakhidnyky. Lactobacillus casei IMV B-7280 – strain to create a probiotic drug with antibacterial and immunomodulatory effects: US Pat. 98881 Ukraine: IPC C12N1/00. 2014 in 2014 12770. Ukrainian.
5. Spivak Mla, Polova ZhM, Aleinyk SL, Lazarenko LM, Hlushchenko OM, vynakhidnyky. Suppositories with probiotic activity for vaginal use. US Pat. 141286 Ukraine: IPC A61K 9/02, A61K 35/74, A61K 35/66, A61P 15/02. 2019 in 2020 10960. Ukrainian.
6. Pharmaceutical encyclopedia. Available from: <https://www.pharmencyclopedia.com.ua/about>. Ukrainian.
7. Chinedu E, Arome D, Ameh F. A new method for determining acute toxicity in animal models. *Toxicology International*. 2013;20(3):224. Available from: <https://doi.org/10.4103/0971-6580.121674>
8. Stefanov OV. Preclinical studies of drugs: guidelines. [Доклінічні дослідження лікарських засобів : метод. реком.] Kyiv: Avitsenna; 2001. Ukrainian.

Відомості про авторів

Алейник С. Л. – аспірантка кафедри аптечної та промислової технології ліків, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна. E-mail: aleinyk_svitlana@ukr.net, ORCID 0000-0003-2901-9189.

Полова Ж. М. – д. фармац. наук, професорка, завідувачка кафедри аптечної та промислової технології ліків, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна. E-mail: zpolova@ukr.net, ORCID 0000-0002-1874-2841.

Information about the authors

Aleinyk S. L. – PhD-student of the Pharmacy and Industrial Technology of Drugs Department, O. O. Bohomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine. E-mail: aleinyk_svitlana@ukr.net, ORCID 0000-0003-2901-9189.

Polova Zh. M. – DSc (Pharmacy), Professor, Head of the Pharmacy and Industrial Technology of Drugs Department, O. O. Bohomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine. E-mail: zpolova@ukr.net, ORCID 0000-0002-1874-2841.