

УДК 615.322:582.572.225:616.61-092.9

## ВЛИЯНИЕ ФИТОНЦИДИНА (ПРЕПАРАТА ИЗ ЧЕСНОКА) НА КЛЕТКИ ТКАНИ ПОЧЕК МЫШЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

© 2013 г. В. П. Пащенко, Л. Е. Громова, Е. Е. Чернышова

Северный государственный медицинский университет, г. Архангельск

Повышение эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта является одной из актуальных проблем современной стоматологии [3, 5, 15]. Известно, что данные заболевания протекают с хроническим воспалительным компонентом, при этом важное место в комплексном патогенетическом лечении гингивита занимают антисептические, противовоспалительные и иммунокорректирующие средства [6, 7]. Однако в ходе использования этих препаратов возможно снижение иммунобиологической реактивности организма, возникновение аллергических реакций и других побочных эффектов [2, 16]. Поэтому заслуживают внимания лекарственные средства растительного происхождения, способствующие усилению общей неспецифической иммунорезистентности организма, не дающие выраженных побочных эффектов [1, 8].

Следует отметить, что среди лекарств растительного происхождения особое место занимают препараты из чеснока, в частности фитонцидин. Он имеет ряд преимуществ: не токсичен, не вызывает аллергии, не вступает во взаимодействие с другими препаратами и может с ними сочетаться [14]. Особый интерес представляют его антисептические свойства, модулирующее влияние на систему иммуноструктурного гомеостаза и повышение общей неспецифической резистентности организма [4].

Производится фитонцидин Северным государственным медицинским университетом (г. Архангельск) в качестве биологически активной добавки, автор способа изготовления фитонцидина — М. Я. Спивак (патент РФ на изобретение № 2053787). Фитонцидин представляет собой водорастворимую фракцию чеснока, не содержит примесей и консервантов. В нем сохранены антимикробные, противовоспалительные, противоатеросклеротические и другие целебные свойства чеснока. Механизм действия фитонцидина изучен недостаточно, в частности, отсутствует углубленное исследование его воздействия на клетки организма.

В связи с предполагаемым использованием фитонцидина для лечения тканей пародонта мы провели оценку его токсичности. Объектом исследования была культура тканей почек мышей как наиболее изученная и широко используемая для оценки токсических препаратов, поступающих в организм.

Цель работы — изучить особенности влияния различных концентраций фитонцидина на клетки ткани почек при культивировании *in vitro*, чтобы установить дозы его непосредственного действия на жизнеспособность клеток организма.

### Методы

Брали стандартный раствор фитонцидина со сроком годности 6 месяцев и рН 6,6–7,0. Для оценки биологического действия препарата использовали ткани почек белых беспородных мышей весом 12–15 г.

Проведено изучение особенностей влияния различных доз фитонцидина на клетки тканей почек мышей при культивировании *in vitro*. Было установлено, что препарат выражено воздействует при содержании в питательной среде в количестве 1–8 %. Статистически значимое уменьшение числа выросших культур наблюдалось при концентрации фитонцидина 2,5 %, полное подавление способности тканей к образованию клеточных колоний — при 8 %. В бессывороточной среде диапазон доз фитонцидина, оказывающих влияние на клетки, находился в пределах 0,5–3,0 %. Проведенные опыты показывают, что данный фитопрепарат в установленных нами концентрациях может использоваться для непосредственного воздействия на клетки тканей в течение длительного времени.

**Ключевые слова:** фитонцидин, чеснок, токсичность, фитопрепарат, культура тканей и клеток, клетки почек, рост культур *in vitro*

Из эксперимента животных выводили в соответствии с предусмотренными правилами экспериментальных исследований путем эвтаназии под глубоким эфирным наркозом. Почки грызунов извлекали и после удаления капсулы и фрагментов мозгового вещества измельчали ножницами в растворе Хенкса, содержащем по 200 ЕД пенициллина и стрептомицина. После этого фрагменты ткани переносили на перфорированные миллиметровые фильтры (Millipore, pore size: 0,22 ультрамикрона) диаметром 12 мм. Всего было размещено 63 микрофрагмента ткани диаметром 0,10–0,05 мм [9–13].

Культивирование эксплантатов на подложки микрофрагментов ткани осуществляли в одном миллилитре питательной среды 199 и 100 ЕД пенициллина и стрептомицина в стеклянных закрытых резиновыми пробками пробирках (объемом 20 мл), которые затем размещали в стационарном штативе под углом 3,5° относительно горизонта, находящемся в термостате при температуре 37,5 °С.

Биологическое действие фитонцидина оценивали в двух сериях опытов. В первой серии при использовании эмбриональной сыворотки время культивирования составляло 6 дней, а во второй – без добавления сыворотки – 8 дней. Раствор вносили в среду 199 с помощью микродозатора (Hamilton Bonaduz AG) на весь срок культивирования. В первой серии опытов использовали концентрации фитонцидина 0,025, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0 и 8,0 %. В опытах без сыворотки – 0,06, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0 и 3,0 %. В контрольные и опытные пробы вносили по 0,03 мл раствора.

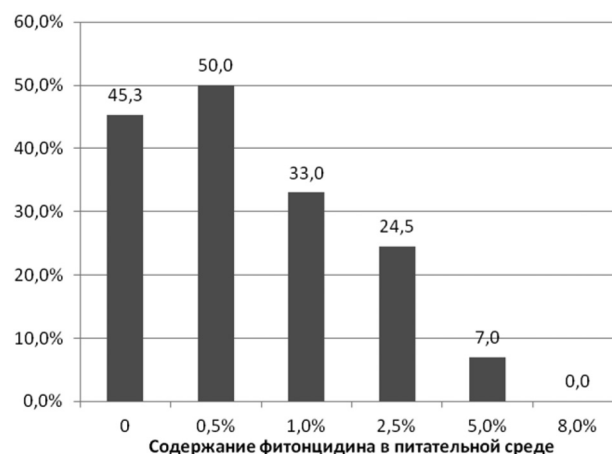
После завершения культивирования миллиметровые фильтры с культурами промывали в физрастворе и фиксировали в смеси Буэна в течение минуты, промывали в двух 90° спиртах и окрашивали гематоксилином Караца (1 час) и эозином (30 сек.) Далее их промывали в этиловом спирте, обезвоживали, просветляли в ксилоле и на предметном стекле погружали в канадский бальзам, покрывая покровным стеклом (Canada Balsam, Schuchardt Munchen).

Влияние препарата на клетки оценивали по двум количественным параметрам роста культур: а) соотношению выросших клеточных колоний и исходного числа эксплантатов (в процентах); б) среднему размеру площадей зон роста культур, образовавшихся около первичных эксплантатов ткани за 5 дней культивирования. Эти зоны роста возникают в процессе культивирования как за счет миграции клеток из центрального эксплантата,

так и за счет их деления в самой зоне. Полученные результаты сравнивали с контрольной пробой, куда фитонцидин не вносился. Площадь клеточной колонии определяли микрофотосъемкой культур (100×) и с помощью компьютерной программы [11]. Статистическую и графическую обработку результатов проводили с использованием пакетов прикладных программ Microsoft Excel 2000 и Statistica 7. Для сопоставления значимости различия полученных результатов применяли непараметрический критерий Wilcoxon. Различия между сравниваемыми параметрами считали значимыми при уровне  $p < 0,05$ .

**Результаты**

В серии исследований было установлено выраженное влияние фитонцидина на культивируемые клетки ткани почек мышей при содержании его в питательной среде 1–8 % (рисунок). При концентрации препарата 0,5 % отмечается слабая тенденция к увеличению числа растущих культур. Выраженная (на 27 %) тенденция к уменьшению числа клеточных колоний наблюдалась при содержании фитонцидина в среде 1 %. Статистически значимое уменьшение (на 46 %,  $p = 0,051$ ) числа выросших культур отмечалось при концентрации 2,5 %. Полное подавление способности клеток к образованию колоний, но с сохранением их миграции из микрофрагментов тканей почек в культуре было выявлено при 8 % содержания фитонцидина. Оценка влияния препарата на суммарную площадь зоны роста культур на фильтре при использовании сыворотки и культивирования микрофрагментов ткани почек в течение шести дней представлена в табл. 1.



Изменение количества выросших культур при различном содержании фитонцидина в питательной среде, содержащей эмбриональную сыворотку

**Таблица 1**  
Влияние фитонцидина на размер площади зоны роста ткани почек на фильтре при культивировании в течение 6 дней в среде с использованием сыворотки

Содержание фитонцидина в среде, %	1	2	3	4	5	6	7
	Контроль	0,025	0,5	1,0	2,5	5,0	8,0
Количество исследований, n	116	87	41	39	85	114	62
M, мм <sup>2</sup>	4,97	5,71	3,28	1,76	0,889	0,347	0,049
p	p <sub>1</sub>	p <sub>1-2</sub> = 0,004	p <sub>1-3</sub> = 0,882	p <sub>1-4</sub> = 0,001	p <sub>1-5</sub> = 0,001	p <sub>1-6</sub> = 0,001	p <sub>1-7</sub> = 0,001

Примечание для табл. 1, 2. M – средняя величина зоны роста клеточной колонии при данной концентрации фитонцидина.

Таблица 2

Влияние фитонцидина на средний размер площади зоны роста ткани почек на фильтре при культивировании в течение 8 дней в среде без использования сыворотки

Содержание фитонцидина в среде, %	1	2	3	4	5	6	7
	Контроль	0,06	0,25	0,5	1	2	3
Количество исследований, п	23	2	6	8	23	12	6
M, мм <sup>2</sup>	3,54	4,15	2,65	1,96	1,857	1,05	0,13
P	P <sub>1</sub>	P <sub>1-2</sub> = 0,915	P <sub>1-3</sub> = 1,000	P <sub>1-4</sub> = 0,013	P <sub>1-5</sub> = 0,009	P <sub>1-6</sub> = 0,046	P <sub>1-7</sub> = 0,043

Из данных таблицы можно сделать заключение, что диапазон доз фитонцидина, вызывающих подавление образования и задерживающих рост клеточных колоний, составляет 0,5–8,0 %. При более низких концентрациях, 0,025 %, возможно слабо выраженное увеличение роста культур, а при 8 % и более — значительное и почти полное угнетение способности к делению клеток и образованию упорядоченных клеточных зон роста.

Чтобы оценить влияние условий культивирования на способность препарата угнетать жизнеспособность клеток, культивируемых *in vitro*, мы провели аналогичные опыты, но без использования эмбриональной сыворотки. Результаты представлены в табл. 2

При культивировании ткани в питательной среде без использования сыворотки фитонцидин больше влияет на жизнеспособность клеток культивируемых тканей почки, вызывая значительное подавление роста уже при концентрации 3 %. Полученный результат, вероятно, связан с более неблагоприятными для клеток условиями культивирования (в бессывороточной среде) и более продолжительным его сроком (8 дней). Диапазон доз, оказывающих тормозящее влияние на способность клеток к репродуктивной активности, в этом случае составил 0,5–3,0 %.

### Обсуждение результатов

Исследования с использованием фитонцидина с разным сроком хранения нами проводились неоднократно. Результаты во всех случаях были идентичные, что свидетельствует о том, что активность препарата в течение рекомендуемых сроков хранения изменяется незначительно.

Фитонцидин *in vitro* обладает слабой токсичностью. Он оказывает выраженное непосредственное угнетающее действие на жизнеспособность культивируемых клеток при содержании 1–5 %. Более высокая чувствительность клеток к препарату при культивировании тканей без использования эмбриональной сыворотки связана с отсутствием стимулирующего влияния эмбриональной сыворотки на жизнеспособность клеток и более длительным сроком культивирования. Возможно, при более низкой концентрации 0,2–0,5 % отмечается некоторая стимуляция фитонцидином роста культур. Тканевые культуры могут применяться для количественного тестирования свойств этого препарата. Опыты подтверждают, что фитонцидин в указанных нами концентрациях может использоваться для непосредственного воздействия

на клетки и нанесения на слизистые ткани на длительное время.

Выводы:

1. Препарат из чеснока фитонцидин в опытах по культивированию *in vitro* при концентрациях от 0,5 до 8,0 % оказывает выраженное биологическое действие, вызывая угнетение роста культур.

2. При 1–3 % содержания препарата без сыворотки в питательной среде чувствительность клеток ткани почек к нему увеличивается более чем в два раза и наблюдается эффект угнетения образования и роста культур от значительной задержки образования до его полного подавления.

3. Тканевые культуры могут использоваться для количественного тестирования биологических свойств фитонцидина.

### Список литературы:

1. Айбазова М. С. Лечение воспалительных заболеваний пародонта препаратами шиповника : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Ставрополь, 2009. 23 с.
2. Буракиаев С. А. Хронический генерализованный пародонтит: метаболические и иммунологические характеристики : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Самара, 2010. 23 с.
3. Вольф Г. Ф., Ратейцхак Э. М., Ратейцхак К. Пародонтология : руководство / под ред. Г. М. Барер. М. : МЕДпресс-информ, 2008. 548 с.
4. Громова Л. Е., Спивак М. Я. Влияние фитонцидина на неспецифическую иммунорезистентность организма // Материалы I Российского фитотерапевтического съезда. М., 2008. С. 366.
5. Грудянов А. И., Фоменко Е. В. Этиология и патогенез воспалительных заболеваний пародонта. М. : Медицинское информационное агентство, 2010. 96 с.
6. Зорян Е. В. Современные направления фармакотерапии заболеваний слизистой оболочки полости рта // Клиническая стоматология. 2009. № 3. С. 22–25.
7. Кузьмина И. Н., Цомаева Л. А. Индивидуальный подбор средств противовоспалительного действия для ухода за полостью рта // Клиническая стоматология. 2008. № 3. С. 30–31.
8. Сарап Л. Р., Жиленко О. Г., Подзорова Е. А., Лесных И. В. Лечебно-профилактическая эффективность зубных паст на основе натуральных экстрактов у пациентов с воспалительными заболеваниями пародонта // Клиническая стоматология. 2009. № 3. С. 40–42.
9. Пащенко В. П. Количественная оценка свойств сыворотки крови и некоторых биологически активных веществ с помощью тканевых культур // Материалы по актуальным вопросам современной гистопатологии. М., 1978. С. 26–27.

10. Пащенко В. П. Устройство для посадки на подложку микрофрагментов биологических тканей : пат. SU 1785530, АЗ, С 12МЗ/00; заяв. 4898950/3; опублик. 30.12.1992.

11. Пащенко В. П., Пащенко А. В., Бегун Д. В. Разработка компьютерной программы по морфометрии // Сборник научных работ молодых ученых и студентов 56-й научной сессии АГМА. Архангельск, 1998. С. 94.

12. Пащенко В. П., Назаренко Н. А., Рехачева Э. В., Пащенко А. В. Воздействие асептического стимулятора Дорогова (АСД-2Ф) на количественные параметры роста тканевых культур почек мышей // Экология человека. 2010. № 9. С. 22–26.

13. Пащенко В. П., Балашов В. К., Сивков А. Н., Пащенко А. В. Использование метода тканевых культур для оценки качества питьевой воды // Экология человека. 2003. № 3. С. 27–29.

14. Спивак М. Я. Чеснок как лечебное средство научной медицины. Архангельск : Изд-во АГМА, 1996. 86 с.

15. Ценов Л. М., Голева Н. А. Роль микрофлоры в возникновении воспалительных заболеваний пародонта // Пародонтология. 2009. № 1. С. 7–11.

16. Юсупова Л. Г. Обоснование протоколов диагностики и лечения гингивита : автореф. дис. ... канд. мед. наук. Казань, 2007. 17 с.

#### References

1. Aibazova M. S. *Lechenie vospalitel'nykh zabolovaniy parodonta preparatami shipovnika (avto-ref. kand. dis.)* [Treatment of parodontium inflammatory diseases with briar preparations (Author's Abstract of Candidate Thesis)]. Stavropol, 2009, 23 p. [in Russian]

2. Burakshaev S. A. *Khronicheskii generalizovannyi parodontit: metabolicheskie i immunologicheskie kharakteristiki (avto-ref. kand. dis.)* [Chronic generalized periodontitis: metabolic and immunological characteristics (Author's Abstract of Candidate Thesis)]. Samara, 2010, 23 p. [in Russian]

3. Vol'f G. F., Rateitskhak E. M., Rateitskhak K. *Parodontologiya* [Periodontology] Moscow, 2008, 548 p. [in Russian]

4. Gromova L. E., Spivak M. Ya. *Materialy I Rossiiskogo fitoterapevticheskogo s"ezda* [Proceedings of I Russian Phytotherapeutic Conference]. Moscow, 2008, p. 366. [in Russian]

5. Grudyanov A. I., Fomenko E. V. *Etiologiya i patogenez vospalitel'nykh zabolovaniy parodonta* [Etiology and pathogenesis of parodontium inflammatory diseases]. Moscow, 2010, 96 p. [in Russian]

6. Zoryan E. V. *Klinicheskaya stomatologiya* [Clinical Dentistry]. 2009, no. 3, pp. 22-25. [in Russian]

7. Kuzmina I. N., Tsomaeva L. A. *Klinicheskaya stomatologiya* [Clinical Dentistry]. 2008, no. 3, pp. 30-31. [in Russian]

8. Sarap L. R., Zhilenko O. G., Podzorova E. A., Lesnykh I. V. *Klinicheskaya stomatologiya* [Clinical Dentistry]. 2009, no. 3, pp. 40-42. [in Russian]

9. Pashchenko V. P. *Materialy po aktual'nyim voprosam sovremennoi gistopatologii* [Materials on urgent issues

of modern histopathology]. Moscow, 1978, pp. 26-27. [in Russian]

10. Pashchenko V. P. *Ustroistvo dlya posadki na podlozhku mikrofragmentov biologicheskikh tkanei: pat. SU 1785530, АЗ, S 12МЗ/00*. [Device for surface-supported setting of biological tissues' microfragments: pat. SU 1785530, АЗ, С 12МЗ/00] applic. 4898950/3; published 30.12.1992. [in Russian]

11. Pashchenko V. P., Pashchenko A. V., Begun D. V. *Sbornik nauchnykh rabot molodykh uchenykh i studentov 56-i nauchnoi sessii АГМА* [Collection of Scientific Papers of Young Researchers and Students of 56-th Scientific Session of Arkhangelsk State Medial Academy]. Arkhangelsk, 1998, p. 94. [in Russian]

12. Pashchenko V. P., Nazarenko N. A., Rekhacheva E. V., Pashchenko A. V. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2010, no. 9, pp. 22-26. [in Russian]

13. Pashchenko V. P., Balashov V. K., Sivkov A. N., Pashchenko A. V. *Ekologiya cheloveka* [Human Ecology]. 2003, no. 3, pp. 27-29. [in Russian]

14. Spivak M. Ya. *Chesnok kak lechebnoe sredstvo nauchnoi meditsiny* [Garlic as therapeutic agent of scientific medicine]. Arkhangelsk, 1996, 86 p. [in Russian]

15. Tsepov L. M., Goleva N. A. *Parodontologiya* [Periodontology]. 2009, no. 1, pp. 7-11. [in Russian]

16. Yusupova L. G. *Obosnovanie protokolov diagnostiki i lecheniya gingivita (avto-ref. kand. dis.)* [Defense of protocols for gingivitis diagnostics and treatment (Author's Abstract of Candidate Thesis)]. Kazan, 2007, 17 p. [in Russian]

#### EFFECT OF PHYTONCIDIN (GARLIC PREPARATION) ON CELLS OF MICE KIDNEY TISSUE IN CULTIVATION IN VITRO

V. P. Pashchenko, L. E. Gromova, E. E. Chernyshova

Northern State Medical University, Arkhangelsk, Russia

With the goal to establish a direct effect on resiliency of organisms' cells, there was studied the effect of garlic preparation Phytoncidin on growth of mice' kidney tissue cells in their cultivation in growth medium 199 with fetal serum and without it. It has been established that in the set span of concentrations, Phytoncidin delayed formation of cell colonies and their growth all the way to a complete stop of their formation.

**Keywords:** Phytoncidin, cell culture, kidney cells, positive cultures

#### Контактная информация:

Пащенко Владимир Петрович — доктор медицинских наук, профессор кафедры нормальной физиологии и восстановительной медицины ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Адрес: 163000, г. Архангельск, пр. Троицкий, д. 51

E-mail: paschenkow@mail.ru