

DOI 10.52368/2078-0109-58-1-81-84
УДК 619:[615.33:615.375]:636.028

ИЗУЧЕНИЕ РАЗДРАЖАЮЩЕГО И АЛЛЕРГИЗИРУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ГЕНТАБИФЕРОНА-С ПРИ ОДНОКРАТНОМ И МНОГОКРАТНОМ ПРИМЕНЕНИИ

Григорьева Н.А. ORCID ID 0000-0002-7593-1198, Жуков М.С. ORCID ID 0000-0002-9317-7344,
Брюхова И.В. ORCID ID 0000-0003-2251-0581
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт патологии, фармакологии и терапии»,
г. Воронеж, Российская Федерация

*В проведенном исследовании изучено раздражающее и аллергизирующее действия препарата «Гентабиферон-С» при его однократном и многократном применении лабораторным животным. Установлено, что препарат не вызывает раздражения при инсталляции его на конъюнктиву и обладает слабо раздражающим действием при однократном нанесении на кожу кроликов. Также при его применении в единичных случаях возможно развитие аллергической реакции, проявляющейся в кратковременном покраснении конъюнктивы, а при увеличении дозировки возрастает риск развития гиперчувствительности III типа. **Ключевые слова:** гентамицин, интерферон, кролики, морские свинки, раздражающее действие, аллергизирующее действие.*

STUDY OF IRRITATING AND ALLERGENIC EFFECT OF GENTABIFERON-S WITH ITS A SINGLE DOSE AND REPEATED APPLICATION

Grigoryeva N.A., Zhukov M.S., Bryukhova I.V.
FSBSI "All-Russian Veterinary Research Institute of Pathology, Pharmacology and Therapy",
Voronezh, Russian Federation

*In this research, we studied the irritating and allergenic effect of the drug Gentabiferon-S with its single dose and repeated administration in laboratory animals. It has been found that the drug does not cause irritation when installed on the conjunctiva and has a weak irritating effect when applied to the skin of rabbits on one occasion. In rare cases when applied, an allergic reaction may develop manifested in a short-term redness of the conjunctiva. With the increased dosage, the risk of type III hypersensitivity development increases. **Keywords:** gentamicin, interferon, rabbits, guinea pigs, irritant effect, allergenic effect.*

Введение В процессе внедрения в ветеринарную практику вновь созданных лекарственных средств, а также в целях обеспечения безопасности их дальнейшего применения, необходимым условием является проведение доклинических и клинических исследований [10]. Доклинические испытания, проводимые *in vitro* и *in vivo*, включают в себя оценку безвредности, специфической биологической активности и эффективности изучаемого препарата [5, 9]. В дополнение к этому, они позволяют ускорить переход от открытия нового действующего вещества или композиции к их последующей разработке в рамках клинических исследований, а также сократить временные и материальные затраты на последние в результате предупреждения неблагоприятных последствий применения лекарственных средств [1]. На этапе доклинических исследований выделяют такие основные направления, как изучение фармакологической активности действующего вещества (ДВ), исследование фармакокинетических свойств ДВ и лекарственной формы (ЛФ), а в заключение, изучение токсикологических свойств ДВ [2]. При этом определяют безопасные и эффективные дозы, а также схемы применения препарата, устанавливают возможные органы-мишени его побочного действия, а также исследуют обратимость выявленных токсических эффектов [4, 6].

При изучении общетоксических свойств неотъемлемым этапом является сбор информации о местно-раздражающем действии лекарственного средства. Данный негативный эффект может проявляться при аппликации вещества на кожу или слизистые в виде эритемы различной интенсивности, эрозий, инфильтрации и отека, геморрагий, некроза и других изменений в месте нанесения [6, 8].

Анализ специфической токсичности в обязательном порядке включает в себя определение аллергизирующего действия. Данное свойство указывает на способность какого-либо вещества вызывать при введении его в организм состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсibilизация), в основе которых лежат иммунопатологические механизмы различного типа: анафилактический, цитотоксический; аллергические реакции, связанные с образованием иммунных комплексов и активацией комплемента; клеточный тип (реакция сенсibilизированных лимфоцитов) [3, 7].

В связи с вышеизложенным **цель** нашего исследования заключалась в изучении раздражающего и аллергизирующего действия препарата «Гентабиферон-С» при однократном и многократном применении лабораторным животным.

Материалы и методы исследований. В соответствии с поставленными целями исследования были проведены три серии опытов, в которых задействовали 11 кроликов породы советская шиншилла с живой массой тела 2,7-3,0 кг и 24 половозрелых морских свинок массой 300-500 г разведения вивария ФГБНУ «ВНИВИПФиТ». Организация экспериментальной работы соответствовала биоэтическим нормам, отраженным в российских и международных нормативно-правовых документах, регламентирующих эксперименты на лабораторных животных (ГОСТ 33044-2014, European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123), Strasbourg, 1986 и Директива 2010/63/EU (2010 г.). Все животные прошли карантин в условиях вивария в течение 21 дня и являлись клинически здоровыми.

С целью исследования местно-раздражающего действия препарата «Гентабиферон-С» были отобраны 8 кроликов, которым за сутки до начала опыта освободили кожу спины (с двух сторон) от шерсти, площадь одного участка составляла 35 см². Далее животные были разделены на 2 группы. Первой группе кроликов наносили терапевтическую дозу (1 мл/10 кг) препарата, а второй - наносили дозу, в десять раз превышающую терапевтическую дозу (10 мл/10 кг). Плотность нанесения, в зависимости от веса животного, составила: в 1 группе - 0,008-0,009 мл на см², во 2 группе - 0,08-0,09 мл на см². Препарат наносили на правый бок, левый служил контролем (использовали 0,9%-ный раствор NaCl). Экспозиция препарата составляла 4 часа, после чего его убирали ватным тампоном, смоченным дистиллированной водой. Через 60 мин. и 16 ч визуально оценивали степень раздражения и толщину кожной складки общепринятыми методами.

Для изучения раздражающего действия исследуемого препарата на конъюнктиву были отобраны 3 кролика. Всем задействованным животным однократно капали по 2 капли препарат «Гентабиферон» на слизистую левого глаза, а в правый глаз капали по 2 капли стерильного физиологического раствора (контроль). После чего через 15, 30 мин., 1, 3, 6, 12, 24 ч оценивали степень раздражающего действия в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [8].

Третья серия опытов была посвящена изучению аллергизирующего действия исследуемого препарата. Для постановки эксперимента были сформированы 3 группы морских свинок по 8 животных в каждой. С целью оценки аллергизирующего действия гентабиферона-С был выбран метод конъюнктивальной пробы, который также подтверждали гематологическими исследованиями. В соответствии с методикой исследования, животных сенсibilизировали. Для этого морским свинкам из группы 1 (контроль) внутримышечно вводили физиологический раствор в течение 5 дней, а животным из группы 2 и 3 вводили препарат «Гентабиферон-С» в терапевтической (ТД) и десятикратной терапевтической (10ТД) дозе, соответственно. Через 20 дней после последней инъекции каждому животному капали по 1 капле исследуемого препарата в левый глаз и по 1 капле физиологического раствора в правый глаз (контроль). Через 15 мин. (быстрая реакция) и 24-48 ч (гиперчувствительность замедленного типа) проводили оценку степени проявления аллергизирующего эффекта. Также через 48 ч у всех животных производился забор крови для определения относительного количества эозинофилов и циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК).

Статистическая обработка полученных данных проводилась с помощью компьютерного пакета программ Statistica, версия 6.0. Рассчитывали среднюю арифметическую (M), стандартную ошибку (SEM) и стандартное отклонение (SD), а также коэффициент вариации. Достоверность результатов оценивали по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследований. Изучение местно-раздражающего действия препарата «Гентабиферон-С» показало отсутствие признаков негативных проявлений через 1 час после однократного нанесения препарата на кожу. Однако при осмотре животных через 16 ч после нанесения препарата было отмечено наличие эритемы от слабой до умеренно выраженной и утолщение кожной складки от 0,3 до 0,4 мм у 2 из 4 животных в первой опытной группе, во второй - у 2 из 4 животных от 0,5 до 0,6 мм (таблица 1). При этом отклонений в клинических показателях (изменения температуры тела, частоты сердечных сокращений и дыхательных движений) у всех подопытных кроликов на протяжении всего исследования не установлено, а полное исчезновение эритемы, отмеченной выше, наблюдалось через 3 дня после ее проявления.

В свою очередь визуальная оценка состояния конъюнктивы, роговицы, век и глаз животных после однократного нанесения исследуемого препарата «Гентабиферон-С» позволила установить, что препарат не вызывает раздражение конъюнктивы, как непосредственно после инстилляции, так и на протяжении всего периода наблюдения (таблица 2). При этом клиническое состояние кроликов в течение проведения опыта соответствовало норме: пульс - 140-145 уд/мин., частота дыхательных движений - 56-59 дд/мин., температура тела - 39,0-39,3 °С.

Таблица 1 – Раздражающее действие и проявление эритемы при однократном нанесении гентабиферона на кожу кроликов в баллах

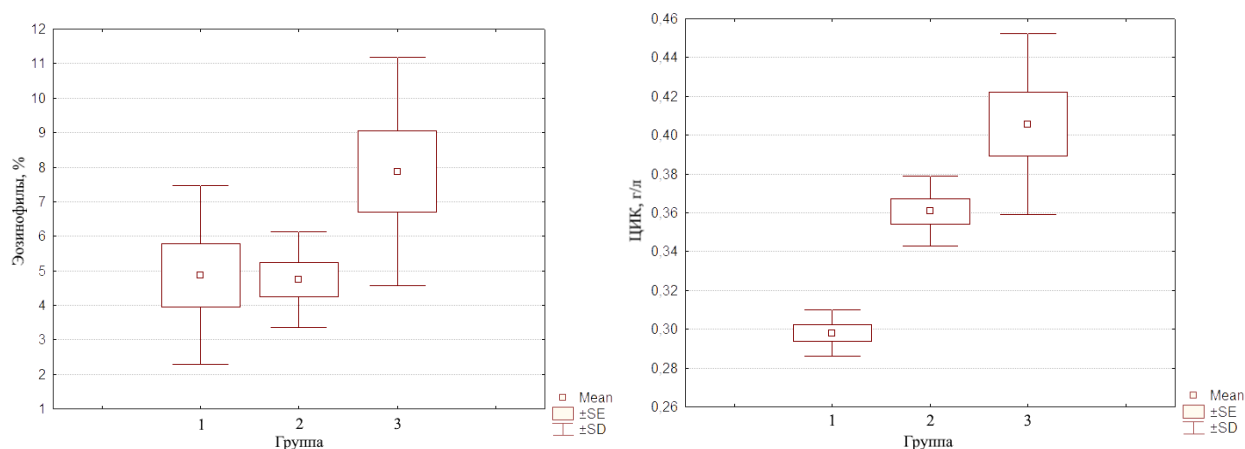
Время осмотра	ТД (n=4)	10 ТД (n=4)
Раздражающее действие		
1 ч	0±0	0±0
16 ч	0,5±0,30*	0,75±0,48*
Проявление эритемы		
1 ч	0±0	0±0
16 ч	0,75±0,48*	1,0±0,58*

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с результатом первого часа.

Таблица 2 – Результаты однократного нанесения на конъюнктиву глаза кроликов препарата «Гентабиферон» в баллах

Время после введения препарата	Кролик 1		Кролик 2		Кролик 3	
	Левый глаз	Правый глаз	Левый глаз	Правый глаз	Левый глаз	Правый глаз
0	0	0	0	0	0	0
15 мин.	0	0	0	0	0	0
30 мин.	0	0	0	0	0	0
1 ч	0	0	0	0	0	0
3 ч	0	0	0	0	0	0
6 ч	0	0	0	0	0	0
12 ч	0	0	0	0	0	0
24 ч	0	0	0	0	0	0
48 ч	0	0	0	0	0	0

Исследование аллергизирующего действия препарата «Гентабиферон-С» показало, что в результате проведения конъюнктивальной пробы выявлено отсутствие реакции гиперчувствительности замедленного типа. При этом следует отметить, что у 2 животных в каждой опытной группы наблюдалось легкое кратковременное покраснение слезного протока, что указывает на появление у них аллергической реакции на препарат, не зависящей от вводимой дозировки. В то же время анализ крови показал, что у животных из группы 2 относительное содержание эозинофилов достоверно не отличалось от такового у морских свинок контрольной группы, но при этом уровень циркулирующих иммунных комплексов был выше на 21,1% ($0,298 \pm 0,012$ против $0,361 \pm 0,018$, $p=0,00001$). В третьей группе количество ЦИК превышало значения контроля на 36,2% ($0,298 \pm 0,012$ против $0,406 \pm 0,047$, $p=0,000018$), а содержание эозинофилов при этом достоверно не отличалось ($p=0,063166$) (рис. 1).

**Рисунок 1 – Уровень эозинофилов и циркулирующих иммунных комплексов при применении гентабиферона в терапевтической дозе и десятикратно ее превышающей**

Следует отметить тот факт, что коэффициент вариации данного показателя был равен 42,1%, что указывает на неоднородность вариационного ряда. В связи с этим был проведен дополнительный анализ ряда данных, который показал, что у 37,5% морских свинок наблюдается увеличение относительного содержания эозинофилов в 2,2 раза. Таким образом, при исследовании аллергизирующего действия гентабиферона-С установлено, что при применении препарата в терапевтической дозе у 25% опытных животных выявлялась аллергическая реакция, что, по всей видимости, может быть связано с наличием в препарате интерферонов, не специфичных для данного вида животных. С увеличением дозы препарата отмечено возрастание риска развития гиперчувствительности III типа, на что указывает увеличение относительного содержания эозинофилов и уровня циркулирующих иммунных комплексов.

Заклучение. Опытным путем установлено, что препарат «Гентабиферон-С» не вызывает раздражения при инсталляции его на конъюнктиву и обладает слабо раздражающим действием при однократном нанесении на кожу кроликов. Однако при его применении в единичных случаях возможно развитие аллергической реакции, проявляющейся в кратковременном покраснении конъюнктивы, а при увеличении дозировки возрастает риск развития гиперчувствительности III типа.

Conclusion. It has been experimentally found that the drug Gentabiferon-S does not cause irritation when installed on the conjunctiva and has a weak irritating effect when applied to the skin of rabbits on one occasion. However, with its application, in rare cases an allergic reaction may develop, manifested in a short-term redness of the conjunctiva, and with an increase in dosage, the risk of developing hypersensitivity of type III increases.

Список литературы. 1. Арисов, М. В. Изучение аллергизирующих свойств лекарственного препарата для ветеринарного применения "инспектор quadro" / М. В. Арисов, И. П. Белых, В. В. Артемов // *Ветеринарный врач*. – 2018. – № 4. – 32–35. 2. Васильев, А. Н. Качественные доклинические исследования – необходимый этап разработки и внедрения в клиническую практику новых лекарственных препаратов / А. Н. Власильев // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2012. – № 57 (1-2). – С. 42–49. 3. Оценка анафилактической активности препаратов на основе рекомбинантных интерферонов при активной кожной анафилаксии / В. А. Грицюк [и др.] // *Ветеринарный фармакологический вестник*. – 2021. – № 2 (15). – С. 8–19. Doi: 10.17238/issn2541-8203.2021.2.8. 4. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных : справочник / [Т. В. Абрашова [и др.] ; ред. В. Г. Макаров, М. Н. Макарова]. – СПб. : Лема, 2013. – 116 с. 5. Меньшикова, Л. А. Особенности доклинических исследований инновационных лекарственных препаратов (короткое сообщение) / Л. А. Меньшикова, И. Г. Печенкина, Н. С. Береза // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2013. – № 2 (2). – С. 62–65. 6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А. Н. Миронов [и др.] ; ред. А. Н. Миронов. – М. : Гриф и К, 2012. – Ч. 1. – 944 с. 7. Все об аллергии : полный справочник / ред. Н. В. Морозова. – М. : Эксмо, 2010. – 590 с. 8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / ред. Р. У. Хабриев. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Медицина ; Шико, 2005. – 826 с. 9. Изучение безвредности препарата триолакт в эксперименте на белых крысах / С. В. Шабунин [и др.] // *Российская сельскохозяйственная наука*. – 2019. – № 4. – С. 55–58. Doi: 10.31857/S2500-26272019455-58. 10. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies / E. L. Andrade [et al.] // *Braz J Med Biol Res*. – 2016. – № 49 (12). – e 5646. Doi: 10.1590/1414-431X20165646.

References. 1. Arisov, M. V. *Izuchenie allergiziruyushchih svojstv lekarstvennogo preparata dlya veterinarnogo primeneniya "inspektor quadro"* / M. V. Arisov, I. P. Belyh, V. V. Artemov // *Veterinarnyj vrach*. – 2018. – № 4. – 32–35. 2. Vasil'ev, A. N. *Kachestvennyye doklinicheskie issledovaniya – neobhodimyj etap razrabotki i vnedreniya v klinicheskuyu praktiku novyh lekarstvennyh preparatov* / A. N. Vpasil'ev // *Antibiotiki i himioterapiya*. – 2012. – № 57 (1-2). – S. 42–49. 3. *Ocenka anafilaktogennoj aktivnosti preparatov na osnove rekombinantnyh intreferonov pri aktivnoj kozhnoj anafilaksii* / V. A. Gricyuk [i dr.] // *Veterinarnyj farmakologicheskij vestnik*. – 2021. – № 2 (15). – S. 8–19. Doi: 10.17238/issn2541-8203.2021.2.8. 4. *Fiziologicheskie, biohimicheskie i biometricheskie pokazateli normy eksperimental'nyh zhivotnyh : spravochnik* / [T. V. Abrashova [i dr.] ; red. V. G. Makarov, M. N. Makarova]. – SPb. : Lema, 2013. – 116 s. 5. *Men'shikova, L. A. Osobennosti doklinicheskikh issledovanij innovacionnyh lekarstvennyh preparatov (korotkoe soobshchenie)* / L. A. Men'shikova, I. G. Pechenkina, N. S. Bereza // *Razrabotka i registraciya lekarstvennyh sredstv*. – 2013. – № 2 (2). – S. 62–65. 6. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv* / A. N. Mironov [i dr.] ; red. A. N. Mironov. – M. : Grif i K, 2012. – CH. 1. – 944 s. 7. *Vse ob allergii : polnyj spravochnik* / red. N. V. Morozova. – M. : Eksmo, 2010. – 590 s. 8. *Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv* / red. R. U. Habriev. – 2-e izd., pererab. i dop. – M. : Medicina ; SHiko, 2005. – 826 s. 9. *Izuchenie bezvrednosti preparata triolakt v eksperimente na belyh kryсах* / S. V. SHabunin [i dr.] // *Rossiyskaya sel'skohozyajstvennaya nauka*. – 2019. – № 4. – S. 55–58. Doi: 10.31857/S2500-26272019455-58. 10. *Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies* / E. L. Andrade [et al.] // *Braz J Med Biol Res*. – 2016. – № 49 (12). – e 5646. Doi: 10.1590/1414-431X20165646.

Поступила в редакцию 11.01.2022.