

ОЦЕНКА МЕСТНО-РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ОРАЛЬНО-ДИСПЕРГИРУЕМЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ВЕТЕРИНАРНОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ВВЕДЕНИИ В ЗАЩЕЧНЫЕ МЕШКИ СИРИЙСКИХ ХОМЯКОВ

*Калатанова А.В., **Авдеева О.И., **Мужикян А.А., **Шедько В.В.,
***Кудинов А.А., **Макарова М.Н.
*ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», г. Санкт-Петербург, Россия
**ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», г. Санкт-Петербург, Россия
***ФГБНУ Всероссийский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных, г. Санкт-Петербург, Россия

Введение. Здоровье животных является ключевым фактором прибыльности в продуктивном скотоводстве. В условиях интенсивных промышленных технологий скотоводства возникают трудности с поддержанием нормального физиологического состояния животных, так как даже незначительные воздействия стресс-факторов способны вызывать такие негативные последствия, как нарушение обмена веществ и снижение резистентности организма. Маститы, кетозы, родильные парезы, тимпани, артриты и другие заболевания сокращают продуктивность и требуют дорогостоящей ветеринарной помощи. Стандартные схемы лечения крупного рогатого скота не всегда применимы в случае высокопродуктивных животных в связи с тем, что воздействие стресс-факторов, связанных с лечебными процедурами, также может на длительное время снизить удои/приросты массы, что в конечном итоге может привести к финансовым потерям. Для сохранения прибыльности на молочных и мясных фермах необходимо обеспечивать профилактику, раннее выявление и лечение заболеваний, поэтому в высокопродуктивном скотоводстве важны не только профессиональная квалификация ветеринарных врачей и зоотехников, но и грамотный выбор и внедрение современных фармакологических технологий для лечения и профилактики болезней животных с учетом возможных рисков для здоровья и продуктивности.

Ветеринарная фармакология – развивающаяся научная отрасль, направленная на изучение воздействия лекарственных препаратов непосредственно на организм животных. Развитие ветеринарной фармакологии и технологии производства лекарств позволило существенно расширить количество лекарственных форм, применяющихся в ветеринарии, и обеспечить необходимые условия для фармакодинамики лекарственного средства в соответствии с особенностями физиологии того или иного вида животных, создавать лекарственные формы с различной скоростью всасывания, высвобождения действующего вещества и биодоступностью.

В ветеринарии используется ряд общепринятых путей введения, от применения которых зависит скорость развития терапевтического эффекта, его выраженность и продолжительность: энтеральные (перорально, сублингвально, ректально, в рубец и т.д.) и парентеральные (подкожно, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, внутрикостно, внутрибрюшинно и др.). Энтеральные пути введения лекарственных средств на фоне неоспоримых преимуществ, таких как отсутствие болезненности и стресса при введении, минимальные трудозатраты, возможность введения различных лекарственных форм, не требующих стерильности, обладают рядом недостатков: ограничение перорального введения порошков в связи с невозможностью регуляции дыхательных движений животного и, как следствие – риск вдыхания лекарственного средства; вероятность нарушения целостности лекарственной формы, что влечет за собой несвоевременное высвобождение действующего вещества; трудности в обеспечении запивания таблеток; большие потери лекарственных средств и их трансформация при пищеварении в преджелудках жвачных.

Парентеральные пути введения обеспечивают точность дозирования, быстрое всасывание лекарственных веществ и развитие терапевтического эффекта, однако их введение отличается болезненностью, что может негативно повлиять на

продуктивность животных, а также повлечь за собой изменение качества конечного продукта животноводства.

Прочие пути введения лекарственных средств – например аэрозольный – успешно применяются в скотоводстве, но их использование ограничено в связи с особенностью содержания животных.

Сегодня внимание фармакологов всего мира привлекают лекарственные формы, растворимые или диспергируемые в полости рта [8]. Применение данных лекарственных форм обеспечивает быстрое – не более трех минут [3] – всасывание лекарственного средства в системный кровоток, минуя желудочно-кишечный тракт, не влечет за собой попадания лекарственного средства в дыхательные пути при неконтролируемом вдохе, а также не требует проглатывания и глубокого проникновения в ротовую полость животного, что предотвращает стресс у животных и травмирование обслуживающего персонала.

Регистрация новых лекарственных препаратов для ветеринарного применения контролируется федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору на основании ст. 12 и ст. 17 Федерального закона № 61ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и приказа Минсельхоза РФ от 01.04.2005 (ред. от 19.03.2010) № 48 «Об утверждении Правил государственной регистрации лекарственных средств для животных и кормовых добавок» и требует оформления документов, включающих отчет о результатах доклинического исследования лекарственного средства для ветеринарного применения.

Оценка местно-раздражающего действия лекарственных препаратов, предназначенных для применения в ветеринарии, важна не менее, чем определение фармакологической активности и токсичности, в связи с высокой вероятностью пагубного влияния данного побочного действия на продуктивность сельскохозяйственных животных.

Целью данного исследования являлось определение целесообразности использования защечных мешков хомяков для оценки токсических свойств и местно-раздражающего действия на примере оральнодиспергируемых таблеток и таблеток для рассасывания (модельные таблетки, не содержащие действующих веществ).

В связи с особенностью фармакокинетики оральнодиспергируемых лекарственных форм для проведения доклинических исследований необходимо использовать биологическую модель, подходящую для введения лекарственного средства способом, предусмотренным инструкцией по применению, в случае оральнодиспергируемых форм – трансбуккально или суббуккально. Оптимальной биологической системой для данных путей введения являются хомяки [7], которые во всем мире успешно применяются в доклинических исследованиях [4, 5]. Хомяки имеют большие защечные пространства (вместимость до 18 г) [6], что является необходимым условием для введения исследуемого препарата в неизменном виде и в количестве, достаточном для регистрации токсических эффектов и местно-раздражающего действия. Защечные мешки открываются на внутренней поверхности щек, что обеспечивает легко осуществимое, безболезненное и гуманное введение большого количества лекарственных средств без нарушения целостности. Кроме того, введение препаратов в защечный мешок не вызывает беспокойства животного.

Целесообразность введения лекарственных препаратов в защечный мешок хомякам основана также на с гистологическом строении органа. Стенка мешка образована слизистой, соединительнотканной и мышечной оболочками; латеральная поверхность органа покрыта кожей, имеющей типичное строение; слизистая оболочка покрыта многослойным слабоороговевающим эпителием, схожим по строению с эпителием щек и неба. В области медиальной стенки слизистой защечного мешка тесно прилегает к поднижнечелюстной слюнной железе, а каудальная часть органа граничит с околоушной слюнной железой.

Материалы и методы исследований. Исследование было проведено с использованием 24 самцов сирийских хомяков (питомник лабораторных животных ЗАО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ») в возрасте 10-12 недель. Животных содержали в стандартных условиях вивария [1].

В качестве исследуемых объектов использовали модельные таблетки, изготовленные в ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации»: оральнодиспергируемые таблетки (далее ОДТ) (микрочисталлическая целлюлоза, натрия крахмала гликолят, стеарилфумарат натрия) и таблетки для рассасывания (далее – ТДР) (изомальт, аэросил, лимонная кислота, магния стеарат, аспартам), которые вводили животным без нарушения целостности. Исследуемые объекты вводили хомякам трансбуккально по 1 таблетке на животное (группами по 12 хомяков на каждый исследуемый объект) однократно в первой половине дня. Объекты были помещены в защечные мешки хомяков на 0,5, 3, 6 и 24 часа. Введение всех исследуемых объектов производили в правый защечный мешок, при этом левый защечный мешок служил контролем. Эвтаназию с забором биологического материала через 0,5, 3, 6 и 24 часа после введения проводили в соответствии с Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes помещением в CO₂-камеру.

Для оценки местно-раздражающего действия была проведена патологоанатомическая оценка гиперемии слизистой оболочки защечного мешка и языка и гистологическая оценка тканей, непосредственно контактировавших с объектами по следующим критериям: гиперемия слизистой, гипертрофия слизистой, отек подслизистого слоя, вазодилатационный отек, потеря эпителия, клеточная инфильтрация. Кроме того, производилось гистологическое исследование правой доли поднижнечелюстной железы и околоушной слюнной железы.

Для гистологического исследования ткани фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина в течение 24 часов, после чего по общепринятой методике заливали в парафин [2]. Затем изготавливали срезы толщиной 5-7 мкм. Для микроскопического исследования срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологическое исследование гистологических препаратов проводилось с помощью светооптического микроскопа Carl Zeiss Axio Scope A1 (Германия) при увеличении 25, 50, 100, 200 и 400. Микрофотографирование проводили с помощью цифровой фотокамеры AxioCam ICc 1 (Германия).

Статистический анализ полученных данных выполняли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, USA).

Результаты и обсуждение. На всем протяжении исследования летальные эффекты и клинические признаки интоксикации в группах экспериментальных животных отсутствовали. Животные хорошо переносили трансбуккальное введение: введенные объекты не привлекали внимание животного, не вызывали дискомфорта, животные не пытались извлечь содержимое защечного мешка. За полчаса экспозиции у 30% животных не произошло полного растворения объектов, у остальных хомяков к моменту эвтаназии исследуемые объекты полностью растворились.

При анализе зафиксированных признаков местно-раздражающего действия было отмечено максимальное проявление гиперемии слизистой оболочки защечного мешка через 3 и 24 часа после введения в группах, получивших оральнодиспергируемые таблетки. Наименьшее местно-раздражающее действие оказали таблетки для рассасывания. Результаты оценки местно-раздражающего действия при макроскопическом исследовании языка и защечных мешков оценивались в баллах от 1 до 3 и представлены в таблице 1.

Данные не соответствовали закону нормального распределения. Статистический анализ данных показал наличие достоверных различий через 24 часа после введения орально диспергируемых таблеток и таблеток для рассасывания по сравнению с органами контрольной (левой) стороны (критерий Краскел-Уоллиса, $p < 0,05$).

При гистологическом исследовании (на этапе вырезки материала и при анализе микропрепаратов) защечные мешки были пусты либо содержали небольшое количество слизи или корма. Защечный мешок представлял собой мускульный орган (мышечная полость), выстланный изнутри слизистой оболочкой и открывающийся на внутренней поверхности щек. Стенка мешка исследованных животных была образована слизистой, соединительнотканной и мышечной оболочками. Латеральная поверхность органа была покрыта кожей, имеющей типичное строение.

Слизистая оболочка покрыта многослойным слабоороговевающим эпителием, схожим по строению с эпителием щек и неба. В области медиальной стенки слизистой защечного мешка тесно прилежала к поднижнечелюстной слюнной железе, а каудальная часть органа граничила с околоушной слюнной железой.

Таблица 1 - Макроскопическая оценка проявления местно-раздражающего действия в виде эритемы Me(Q1;Q3), n=3

Изменения	Оценка изменений в баллах							
	ОДТ				ТДР			
	Время после введения				Время после введения			
	0,5	3	6	24	0,5	3	6	24
Контроль (левый защечный мешок)	0(0;0)	1(1;1)	1(1;1)	1(1;1)	0(0;0)	1(1;1)	0(0;0)	0(0;0)
Общая оценка местно-раздражающего действия (правый защечный мешок +язык)	0(0;1)	1(1;2)	2(1;3)	4(4;4)*	0(0;1)	1(1;1)	0(0;1)	1(1;2)*

Примечание. * - различия статистически значимы в сравнении с органами контрольной (левой) стороны (критерий Краскел-Уоллиса, $p < 0,05$).

Язык покрыт многослойным плоским частично ороговевающим эпителием, формирующим на дорсальной поверхности сосочки языка. Собственный слой слизистой оболочки был образован рыхлой соединительной тканью. Мышечная оболочка образована пучками продольных, поперечных и дорсовентральных поперечно-исчерченных волокон. В межмышечной соединительной ткани встречались разрезы многочисленных сосудов и нервов.

Все выявленные при гистологическом исследовании микропрепаратов отличия от нормы были оценены в баллах от 1 до 3, результаты статистической обработки данных представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Гистологическая оценка местно-раздражающего действия Me (Q1;Q3), n = 3

Изменения	Оценка изменений в баллах							
	ОДТ				ТДР			
	Время после введения				Время после введения			
	0,5	3	6	24	0,5	3	6	24
Общая оценка МРД (прав.сторона+язык)	1(1;2)	5(4;6)*	3(2;4)	16(16;17)*	3(2;3)	1(1;2)	1(1;3)	3(2;5)
Контроль (левая сторона)	0(0;0)	2(1;2)	1(0;2)	3(2;4)	1(1;2)	1(0;2)	0(0;1)	0(0;1)

Примечание. * - различия статистически значимы в сравнении с органами контрольной (левой) стороны (критерий Краскел-Уоллиса, $p < 0,05$).

Данные не подчинялись закону нормального распределения. Статистический анализ данных показал наличие достоверных различий по сравнению с контрольной (левой) стороной через 3 и 24 часа после введения ОДТ (критерий Краскел-Уоллиса, $p < 0,05$). Таблетки для рассасывания так же вызывали проявление признаков местно-раздражающего действия, однако статистических отличий от контроля отмечено не было.

Патологоанатомическое и гистологическое исследование защечных мешков и языка хомяков показало развитие у животных гиперемии слизистой оболочки, отека подслизистого слоя, незначительную потерю эпителия, клеточную инфильтрацию, наиболее выраженную у животных, эвтаназированных спустя 24 часа после введения исследуемых объектов. Данное обстоятельство также могло быть связано с реакцией тканей на шовный материал. Клеточная инфильтрация в защечных мешках в некоторых случаях сопровождалась формированием очаговых лимфоцитарных инфильтратов, а также микроабсцессов в месте введения. Анализ гистоло-

гических препаратов слюнных желез показал наличие незначительных дистрофических повреждений в виде вакуолизации цитоплазмы клеток концевых отделов желез, а также незначительную и умеренную лимфоцитарную инфильтрацию междольковой соединительной ткани, которые встречались в единичных случаях на всех сроках регистрации местно-раздражающего действия.

По результатам проведенного исследования было выявлено, что модельные таблетки, не содержащие активных веществ, в ряде случаев оказывали местно-раздражающее действие (от слабого до умеренного).

Результаты проведенного исследования позволили сделать следующие выводы:

1. Щечные мешки хомяков являются адекватной биологической моделью для оценки местно-раздражающего действия лекарственных средств, подвергающихся разрушению в ротовой полости.

2. Оценка местно-раздражающего действия лекарственных препаратов с использованием трансбуккального выведения хомякам целесообразна только в сравнении с плацебо, которое также способно оказать повреждающее действие на слизистые оболочки ротовой полости.

3. Регистрацию показателей местно-раздражающего действия после однократного введения следует проводить макроскопически через 3-6 часов после введения, после многократного введения – путем гистологического исследования тканей, подвергавшихся многократному воздействию исследуемых объектов.

В целом, в ходе данного исследования возможность введения лекарственных средств, диспергируемых в ротовой полости, в щечные мешки хомяков для оценки токсического и местно-раздражающего действия препаратов была доказана. Был сделан вывод о том, что хомяки являются адекватной биологической моделью для оценки безопасности лекарственных средств, диспергируемых в ротовой полости. Анатомическая близость расположения слизистой щечного мешка и слюнных желез, а также наличие общей соединительнотканной прослойки позволяют изучить опосредованно влияние исследуемых объектов, диспергируемых в полости щечного мешка, не только на ткани щечного мешка и языка, но и на микроструктуру экстрамуральных слюнных желез.

Выводы. По результатам проведенного доклинического исследования было показано, что оценка местно-раздражающего действия орально-диспергируемых лекарственных препаратов с использованием трансбуккального введения хомякам позволяет в полной мере оценить влияние исследуемых объектов на ткани щечного мешка, языка и экстрамуральных слюнных желез. Совокупность полученных данных позволяет интерпретировать результаты доклинических исследований лекарственных препаратов для ветеринарного применения для оценки возможных рисков и целесообразности применения лекарственного средства у продуктивных животных.

Литература. 1. ДИРЕКТИВА 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях. - СПб. 2012 2. Мужикян А.А., Макарова М.Н., Гуцин Я.А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных. *Международный вестник ветеринарии*. 2014 Т. 2 С. 103-109. 3. 5th ed. I.O. Strasbourg, France: 2005. *European Pharmacopoeia* 5.0. - 628 p. 4. Harsanyi B. B. et al. Hamster cheek-pouch testing of dental soft polymers. *Journal of dental research*. 1991V. 70 (1) P. 991-996. 5. Hochman B. et al. Keloid heterograft in the hamster (*Mesocricetus auratus*) cheek pouch. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2005. V. 20 (3) P. 200-212. 6. Katayama S. et al. Effect of polaprezinc on healing of acetic acid-induced stomatitis in hamsters. *J Pharm Pharm Sci*. 2000. V. 3 (1) P. 114-117. 7. Outbred hamsters. <http://www.spf-animals.ru/animals/hamsters/outbred> 8. Parkash V., Maan S., Yadav SK., Jogpal V. Fast disintegrating tablets: Opportunity in drug delivery system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 2011. V. 2(4) P. 223-235.