



Определение степени безопасности крема Бетакарбокломет при эпидермальном поступлении в организм животных

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика, г. Киев

Ключевые слова: мази, лекарств оценка доклиническая, токсичности тесты.

Цель работы – определение безопасности разрабатываемого лекарственного средства, что является одним из важных этапов проведения его доклинической оценки при организации промышленного производства.

Установлено, что при эпидермальном поступлении в организм ЛД₅₀ лечебного средства Бетакарбокломет больше 2000 мг/кг значительных изменений величины массы тела у животных, которым наносили крем, и у контрольных животных не выявлено. В результате патоморфологических исследований внутренних органов и в тканях животных после накожной аппликации лечебного средства Бетакарбокломет в дозе 2000 мг/кг не обнаружены какие-либо признаки патологических изменений, гемодинамических нарушений и воспалительных реакции. Таким образом, результат эксперимента даёт возможность отнести лечебного средства Бетакарбокломет к V классу токсичности (практически нетоксические вещества).

Визначення ступеня безпеки крему Бетакарбокломет при епідермальному надходженні в організм тварин.

Г. М. Войтенко, Арам Дуллах, І. О. Власенко, Л. Л. Давтян

Мета роботи – визначення безпечності лікарського засобу, що є одним із важливих етапів його доклінічного оцінювання при організації промислового виробництва.

Встановили, що при епідермальному надходженні в організм ЛД₅₀ лікувального засобу Бетакарбокломет більше ніж 2000 мг/кг суттєвих змін величини маси тіла у тварин, яким наносили крем, та в контрольних тварин не виявили. За результатом патоморфологічних досліджень внутрішніх органів і у тканинах тварин після нашкірної аплікації лікувального засобу Бетакарбокломет в дозі 2000 мг/кг не виявлені будь-які ознаки патологічних змін, гемодинамічних порушень і запальних реакцій. Отже, результат експерименту дає можливість віднести лікувальний засіб Бетакарбокломет до V класу токсичності (практично нетоксичні речовини).

Ключові слова: мазі, токсичності тести.

Актуальні питання фармацевтичної і медичної науки та практики. – 2015. – № 2 (18). – С. 79–83

Determining safety of betacarboclomet CREAM in epidermal delivery to the body of animals

G. M. Voytenko, Aram Dullah, I. O. Vlasenko, L. L. Davtyan

Aim. The article is devoted to safety determining of newly developed drug as one of the important stages of preclinical evaluation in the organization of industrial manufacturing.

Methods and results. The study of safety of newly developed Betacarboclomet cream in epidermal delivery to the body showed that the LD₅₀ of Betacarboclomet exceeds to 2000 mg/kg. Significant changes in body mass the animals after dermal application of cream and in control group animals have not been determined. A post-mortem examination of internal organs and tissues of animals after dermal application of Betacarboclomet at a dose of 2000 mg/kg revealed no signs of pathological changes, hemocirculatory disorders or inflammatory reactions.

Conclusion. The results of the study allow referring Betacarboclomet to toxicity Class V (virtually non-toxic substance).

Key words: Ointments, Toxicity Tests, Drug Evaluation, Predinical.

Current issues in pharmacy and medicine: science and practice 2015; № 2 (18): 79–83

Определение безопасности разрабатываемых лекарственных средств (ЛС) является одним из важных этапов проведения их доклинической оценки при организации промышленного производства.

Программа доклинических исследований ЛС включает разные этапы, среди которых определение его безопасности для состояния целостного организма – одно из наиважнейших. Оценку безопасности потенциального ЛС осуществляют путем изучения ряда интегральных, функциональных, метаболических, гематологических показателей, морфоструктуры органов и систем подопытных животных [1].

Методы, использованные с целью изучения острой токсичности ЛС, позволяют в условиях эксперимента на животных с достаточной точностью определить класс токсичности химических веществ.

Цель работы

Изучение степени безопасности разработанного крема Бетакарбокломет при эпидермальном поступлении в организм.

Материалы и методы исследования

Объект исследования – разработанный крем под условным названием Бетакарбокломет на основе бетаметазона дипропионата, клотримазола, метронидазола и мочевины.

Исследование степени безопасности ЛС при однократном и многократном эпидермальном поступлении в организм животных проводили в соответствии с требованиями OECD GUIDELINE 402 «Acute Dermal Toxicity» (Limit Test) [2].

Изучение включало и проведение гематологических, биохимических анализов крови и патоморфологические исследования внутренних органов животных [3].

Исследования осуществили согласно национальным «Общим этическим принципам экспериментов на животных», которые согласуются с положениями Европейской конвенции о защите млекопитающих животных, используемых для экспериментальных и других научных целей [4].

Определение острой токсичности ЛС Бетакарбокломет при эпидермальном поступлении в организм животных проведено на самках белых крыс, которые более чувствительны к токсическому действию, чем самцы. Для эксперимента отобрали 10 животных, которые были разделены на 2 группы по 5 животных в каждой: первая группа – интактные животные (контроль); крысам второй группы наносили на кожу ЛС Бетакарбокломет в дозе 2000 мг/кг массы тела. Идентификацию проводили с использованием системы индивидуальных цветных меток.

В комнатах для содержания животных поддерживались условия: температура – 20–24°C, влажность – 30–70%, цикл освещения – 12 ч свет/12 ч темнота.

Примерно за 24 часа до проведения исследования и нанесения тестируемого образца шерсть была удалена на участке спины опытных животных. Крем наносили равномерно на выстриженный участок правого бока в дозе 2000 мг/кг. Индивидуальные дозы рассчитывали с учетом массы каждого животного в день аппликации. Дозу исследуемого крема наносили в 3 приема с интервалом в 2 часа. Клинические наблюдения за животными и регистрацию гибели вели в течение первого часа после нанесения тестируемого крема, а потом через 2, 3, 5 и 8 часов. В течение последующих 14 дней наблюдения проводили 2 раза в день (10⁰⁰ и 17⁰⁰), отмечая внешний вид, поведение и фиксируя число павших животных. Индивидуальную массу тела животных регистрировали перед нанесением тестируемых образцов (0 день), потом на 3, 7 и 14 день после аппликации.

На втором этапе опыта (после завершения изучения острой токсичности) под легким эфирным наркозом провели эвтаназию животных методом цервикальной дислокации. В дальнейшем проведено гематологическое и биохимическое исследование крови крыс, а также патоморфологическое изучение внутренних органов.

Данные статистически обработали с использованием t-критерия Стьюдента [5]. Разницу между исследуемыми показателями считали статистически достоверной при значении $p < 0,05$. Расчеты проводили на персональном компьютере с помощью программы Excel.

Результаты и их обсуждение

После нанесения крема Бетакарбокломет 5 животным в дозе 2000 мг/кг массы тела гибели животных не зарегистрировано в течение всего периода наблюдения, то есть летальность составила 0%.

Таким образом, ЛД₅₀ ЛС Бетакарбокломет больше чем 2000 мг/кг, что согласно руководству по согласованной на глобальном уровне системы классификации и маркировки химических веществ, позволяет отнести к V классу токсичности (практически нетоксические вещества) [6].

Наблюдение за животными с целью выявления клинических признаков токсичности тестируемого крема начали с первого дня введения. В течение всего периода наблюдения животные всех групп имели опрятный вид, были активны, имели ровную блестящую шерсть, кожу без следов расчесывания, язвообразования и облысения, окраска слизистых – без патологических изменений.

Участки кожи после нанесения крема имели бледно-розовый цвет, отёков и утолщений не наблюдалось, в последующем остриженные участки кожи заросли хорошей ровной шерстью. Визуальные симптомы патологических изменений в виде нарушения интенсивности и характера двигательной активности, координации движений, тонуса скелетной мускулатуры не отмечено. Поведенческие реакции не отклонялись от нормы. Реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители – без изменений.

Измерения массы животных при изучении острой токсичности ЛС Бетакарбокломет, который наносили в дозе 2000 мг/кг массы тела, показали, что масса животных контрольной группы равномерно увеличивалась в течение всего периода наблюдения. При использовании ЛС Бетакарбокломет животные добавляли в весе в меньшей степени, а на сроке 7 дней после нанесения средняя масса тела животных данной группы достоверно отличалась от массы животных контрольной группы. Но уменьшение массы тела в данной группе носило характер тенденции, к концу наблюдения этот показатель уже достоверно не отличался от контрольной группы.

Следовательно, каких-либо значимых изменений величины массы тела у животных, которым наносили крем и контрольных животных, не происходило, и данный показатель находился в пределах физиологической нормы для данного вида животных соответственно их возрасту.

Результаты исследования гематологических показателей периферической крови белых крыс-самок, которым наносили тестируемый крем в дозе 2000 мг/кг массы тела, приведены в *таблице 1*.

Согласно данным (*табл. 1*), установлено повышение количества моноцитов на 19,5% и эритроцитов на 10,5%. Выявлено снижение количества лейкоцитов на 6,7% и тенденция к снижению количества нейтрофилов на 3,3%. Установленные изменения недостоверны, что свидетельствует о незначительном влиянии на систему крови. Данные свидетельствуют: у крыс-самок, которым наносили на кожу тестируемый крем, гематологические

показатели крови не менялись. Показатели белой крови (в том числе лейкоцитарная формула) и красной крови были на уровне показателей животных контрольной группы. Не отмечено достоверных изменений в количестве тромбоцитов. Таким образом, ЛС Бетакарбокломет при кожной аппликации крысам в дозе 2000 мг/кг не вызывало отклонений гематологических показателей крови от физиологической нормы для этого вида животных.

Таблица 1

Гематологические показатели периферической крови крыс-самок после кожной аппликации крема в дозе 2000 мг/кг массы тела, (M±m, n=5)

Показатели	Экспериментальные группы	
	Контроль	Крем ЛС Бетакарбокломет
Лейкоциты, 10 ³ мкл	5,9±0,78	5,5±0,87
Лимфоциты, %	77,3±4,1	77,2±3,8
Моноциты, %	4,1±0,23	4,9±0,47
Нейтрофилы, %	18,1±1,1	17,5±0,87
Эозинофилы, %	0,49±0,3	0,4±0,2
Базофилы, %	0	0
Эритроциты, 10 ⁶ мкл	8,14±0,44	9,0±0,48
Гемоглобин, г/дл	45,2±1,5	42,29±2,1
Гематокрит, %	15,34±1,1	15,7±1,7
Тромбоциты 10 ³ мкл	710,2±28,7	674,3±18,0

В таблице 2 приведены данные исследования биохимических показателей сыворотки крови крыс при применении ЛС Бетакарбокломет в дозе 2000 мг/кг массы тела.

Таблица 2

Биохимические показатели сыворотки крови крыс-самок после кожной аппликации крема в дозе 2000 мг/кг массы тела, (M±m, n=5)

Показатели	Экспериментальные группы	
	Контроль	ЛС Бетакарбокломет
Альбумин (г/л)	39,4±0,5	41,5±1,1
Общий белок (г/л)	63,1±1,2	60,5±1,5
Билирубин (мкмоль/л)	0,31±0,02	0,25±0,01
Холестерин (ммоль/л)	1,14±0,09	1,21±0,08
Глюкоза (ммоль/л)	6,6±0,21	5,85±0,38
Креатинин (ммоль/л)	29,2±0,80	33,8±3,22
Мочевина (ммоль/л)	6,28±0,24	8,1±0,72
Триглицериды (ммоль/л)	0,72±0,03	0,61±0,025
АЛТ (МЕ/л)	44,0±2,66	48,0±3,58
АСТ (МЕ/л)	99,5±4,9	104,3±5,8
ГГТ (МЕ/л)	0,12±0,01	0,18±0,01

Данные биохимического исследования сыворотки крови опытных животных достоверно не менялись по сравнению с контрольной группой и оставались в пределах физиологической нормы для этого вида животных соответственно их возраста. Показатели состояния печени и почек свидетельствуют об отсутствии структурно-функциональных нарушений со стороны этих органов при нанесении на кожу ЛС Бетакарбокломет

и практически не отличаются от соответствующих показателей для животных контрольной группы.

Изучался относительный вес органов животных. Не было существенных различий в величинах относительной массы органов крыс-самок, которым наносили на кожу ЛС Бетакарбокломет в дозе 2000 мг/кг массы тела по сравнению с животными контрольной группы (табл. 3).

Таблица 3

Относительная масса (г/1000 г массы тела) внутренних органов крыс-самок после кожной аппликации крема в дозе 2000 мг/кг массы тела, (M±m, n=5)

Органы	Экспериментальные группы	
	Контроль	ЛС Бетакарбокломет
Печень	26,1±1,31	24,8±1,61
Почки	6,4±0,25	6,3±0,18
Надпочечники	0,22±0,01	0,23±0,02
Яичники	0,29±0,02	0,30±0,029
Сердце	3,3±0,25	3,4±0,21
Мозг	7,3±0,39	7,25±0,22
Селезёнка	2,1±0,16	2,0±0,14
Лёгкое	4,1±0,33	4,2±0,22
Тимус	0,9±0,07	1,0±0,08
Матка	2,2±0,14	2,1±0,15

Проведены патоморфологические исследования. При внешнем осмотре животных, которым наносили ЛС Бетакарбокломет, признаков повреждений, воспалительных и гиперпластических процессов не наблюдали. На слизистых оболочках патологических изменений не выявлено. Шерстный и кожный покровы крыс были чистые, признаков повреждений на поверхности кожи не было. На участках кожи животных, куда наносили образцы крема, патологических изменений не выявлено. Подкожный слой жировой ткани выражен умеренно.

При вскрытии крыс, которым наносили ЛС Бетакарбокломет, не выявлено каких-либо аномалий. Серозные оболочки были гладкими и блестящими, свободная жидкость в плевральной или абдоминальной полостях отсутствовала. Перикард полости – свободен от жидкости, слои как перикарда, так и эпикарда – гладкие, блестящие. Головной мозг, органы грудной и брюшной полости, а также малого таза расположены нормально. Печень представлена долями обычного размера. Ткань органа эластичная, однородная. Почки обычной формы и размеров, ткань органов эластичной консистенции без признаков патологических изменений. Состояние эндокринных органов – щитовидной железы, надпочечников – без изменений. Селезёнка нормальных размеров и эластичной консистенции. Регионарные лимфатические узлы не увеличены.

При микроскопическом исследовании препаратов кожи животных, которым наносили образцы крема, не обнаружено патологических изменений в эпидермисе и дерме. Эпидермис представлен многослойным плоским эпителием, в базальном слое – цилиндрические эпителиоциты с базофильной цитоплазмой и овальными

ядрами, богатыми хроматином. Очагов инфильтрации или атипичного митотического деления клеток не наблюдалось. В сетчатом слое кожи были корни волосяного покрова, сальные железы.

Во всех экспериментальных группах не выявлено существенных различий гистопатологических результатов в сердце, лёгких, печени, почках, тонком и толстом кишечнике. Кроме того, не зарегистрировано гистопатологического поражения в мозге, желудке, селезёнке, поджелудочной железе, трахее, пищеводе, мочевом пузыре, половых органах (яичниках, молочных железах, матке), лимфатических узлах, щитовидной железе, слезных и слюнных железах у животных всех групп.

Цитоархитектоника печени крыс при применении ЛС Бетакарбоклет в целом не нарушена. Гепатоциты – без признаков патологии полигональной формы с четкими контурами. Размер ядер в разных гепатоцитах мало отличался, изредка встречались двуядерные клетки.

Миокард животных после аппликации ЛС не отличался от такого у контрольных животных и был представлен равномерно окрашенным синцитием мышечных клеток с элементами эндомизия. В органе не отмечалось дистрофических изменений, воспалительных реакций и застойных явлений. Кардиомиоциты – без признаков патологии.

Ткань лёгких была воздушная. Респираторный отдел сохранил рисунок альвеолярных ходов и полостей.

Лимфоидные органы (тимус и селезёнка) покрыты плотной соединительнотканной капсулой. Паренхима органов – заполнена неизменёнными лимфоидными элементами. В селезёнке количество и размеры фолликулов белой пульпы – обычные. В тимусе – чёткая граница между мозговым и корковым веществом. Количество и размеры телец Гассала – обычные.

Фундаментальная часть желудка, тонкий и толстый кишечник имели характерную структуру, на всем протяжении устланы неповреждённым секреторным эпителием. Каких-либо воспалительных и дистрофических изменений не выявлено.

Почки всех животных имели характерное строение, паренхима органа была представлена неизменёнными извитыми и прямыми канальцами. Цитоплазма большинства риноцитов – мелкозернистая, розового цвета. Ядра в них – круглой формы, хроматин – мелко диспергированный и равномерно размещён в карิโอплазме.

Головной мозг и мозжечок имеют обычное строение. Мягкая мозговая оболочка не изменена, без признаков воспаления. В ткани мозга отсутствуют явления гиперемии и отёка. Нервные клетки – без признаков патологии.

Надпочечники имели обычное строение. Хорошо выражены три зоны коркового вещества. Эпителий – без признаков патологии.

Следовательно, по результатам патоморфологических исследований во внутренних органах и тканях крыс после накожной аппликации ЛС Бетакарбоклет в дозе 2000 мг/кг массы тела не обнаружено каких-либо признаков патологических изменений, гемодинамических нарушений и воспалительных реакций.

Выводы

По параметрам острой токсичности при накожной аппликации крысам ЛС Бетакарбоклет можно отнести к V классу токсичности (практически нетоксичные вещества) и к соответствующим гигиеническим требованиям ГОСТ 12.1.007-76 [7].

Перспектива дальнейших исследований. Изучение других показателей токсикологических свойств разрабатываемого лекарственного средства Бетакарбоклет.

Список литературы

1. Доклинические исследования лекарственных средств: метод. рекомендации / под ред. А.В. Стефанова. – К. : Авицена, 2002. – 568 с.
2. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. OECD GUIDELINE 402 «Acute Dermal Toxicity», adopted: 24 Feb 1987. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.oecd.org.
3. Волкова О.В. Основы гистологии с гистологической техникой / О.В. Волкова, Ю.К. Елецкий. – М. : Медицина, 1982. – 304 с.
4. Резников А.Г. Биоэтические аспекты экспериментов на животных / А.Г. Резников // *Клінічна хірургія*. – 2010. – №6. – С. 8–13.
5. Державна Фармакопея України / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». – 1-е вид. – Х. : PIPEГ, 2001. – 556 с.
6. A Guide to the Globally Harmonized Sys of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). [Электронный ресурс]. – Режим доступа: www.osha.gov/dsg/hazcom/ghs.html#3.2.
7. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007-76. – 2 с.

References

1. Stephanov, A. V. (Ed.) (2002) *Doklinicheskie issledovaniya lekarstvennykh sredstv [Preclinical studies of drugs]*. Kyiv: Avicena. [in Ukrainian].
2. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. OECD GUIDELINE 402 «Acute Dermal Toxicity», adopted: 24 Feb 1987. Retrieved from www.oecd.org.
3. Volkova, O. V., & Eleckij, Y. K. (1982). *Osnovy gistologii s gistologicheskoy tekhnikoj [Fundamentals of histology with histological technique]*. Moscow: Medicina. [in Russian].
4. Reznikov, A. G. (2010) Bioeticheskie aspekty eksperimentov na zhivotnykh [Bioethical aspects of animal experiments]. *Klinichna khirurgiia*, 6, 8–13. [in Ukrainian].
5. (2001) *Derzavna pharmacoepia Ukrainy*. Kharkiv: RIREH. [in Ukrainian].
6. A Guide to the Globally Harmonized Sys of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). Retrieved from www.osha.gov/dsg/hazcom/ghs.html#3.2.
7. (1976) *Vrednye veschestva. Klassifikaciya i obschie trebovaniya bezoposnosti [Hazardous substances. Classification and general safety requirements]*. [in Russian].

Сведения об авторах:

Войтенко Г. Н., д. мед. н., профессор каф. промышленной, клинической фармации и клинической фармакологи, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика.

Арам Дуллах, аспирант каф. фармацевтической технологии и биофармации, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П. Л. Шупика.

Власенко И. А., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтической технологии и биофармации, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика, E-mail: vlasenko_iryua@mail.ru.

Давтян Л. Л., д. фарм. н., профессор, зав. каф. фармацевтической технологии и биофармации, Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика.

Відомості про авторів:

Войтенко Г. М., д. мед. н., професор каф. промислової, клінічної фармації та клінічної фармакології, Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика.

Арам Дуллах, аспірант каф. фармацевтичної технології і біофармації, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика.

Власенко І. О., к. фарм. н., доцент каф. фармацевтичної технології і біофармації, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, м. Київ, E-mail: vlasenko_iryua@mail.ru.

Давтян Л. Л., д. фарм. н., професор, зав. каф. фармацевтичної технології і біофармації, Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика.

Information about authors:

Voytenko G. M., Dr.hab., Professor of the Department of Industrial, Clinical Pharmacy and Clinical Pharmacology, P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education.

Aram Dullah, Postgraduate student of Department of Pharmaceutical Drugs Technology and Biopharmacy, P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education.

Vlasenko I. O., Dr.hab., Associate Professor, Department of Pharmaceutical Drugs Technology and Biopharmacy, P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education, E-mail: vlasenko_iryua@mail.ru.

Davtyan L. L., Dr.hab., Chair of the Department of Pharmaceutical Drugs Technology and Biopharmacy, P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education.

Надійшла в редакцію 10.02.2015 р.