

УДК 615.1/4

**ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИННОВАЦИОННОГО ПРЕПАРАТА,
ПРЕДНАЗНАЧЕННОГО ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ТЕРАПИИ
ХИМИЧЕСКИХ ОЖОГОВ ГЛАЗ ВЕЩЕСТВАМИ
РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ**

Колосов Р.В., Беловолов А.Ю., Назаров В.Б., Gladkikh В.Д.

ФГУП «Научно-производственный центр «Фармзащита» Федерального медико-биологического агентства», Химки, e-mail: info@atompharm.ru

Обсуждаются результаты доклинической оценки безопасности и специфической активности лекарственной формы препарата Педифен (0,25% раствор в виде спрея). В опытах на грызунах показано, что тестируемый препарат по параметрам острой токсичности относится к классу практически нетоксичных веществ, не обладает аллергенными и иммунотоксичными свойствами. При интраконъюнктивальном введении в максимально возможной дозе модельный образец препарата не оказывает раздражающего действия на слизистые оболочки глаз лабораторных животных. По критериям параметров острой и подострой токсичности лекарственная форма тестируемого препарата не имеет противопоказаний для клинических испытаний и медицинского применения. Результаты экспериментальной оценки специфической активности свидетельствуют, что применение педифена в ранние сроки после поражения глаз ирритантами способствует более быстрому восстановлению поврежденных слизистых и роговицы лабораторных животных, а также предупреждает развитие отдаленных последствий.

Ключевые слова: ирританты, педифен, раздражающее действие

**PRE-CLINICAL EVALUATION OF INNOVATIVE PREPARATION
FOR THE PREVENTION AND THERAPY
OF CHEMICAL EYE BURNS IRRITABILITY**

Kolosov R.V., Belovolov A.J., Nazarov V.B., Gladkikh V.D.

*«Pharmaceutical Protection», Federal Medical-Biological Agency of Russia,
Khimki, e-mail: info@atompharm.ru*

Under discussion are the results of preclinical safety assessment and the specific activity of the dosage form of the preparation Pedifen (0,25% solution in the form of a spray). The experiments on rodents show that by the acute toxicity parameters the tested preparation is classified as substance practically nontoxic with no allergenic and immunotoxic properties. After intracconjunctival injection in maximum dose the model sample of the preparation does not have irritating effect on the mucous membranes of the eyes of laboratory animals. According to the criteria of the acute and subacute toxicity the dosage form of the tested preparation has no contraindications for clinical research and medical application. The results of the experimental evaluation of the specific activity show that the use of the preparation Pedifen shortly after irritant eye-lesion stimulates faster recovery of the damaged mucous membranes and cornea of laboratory animals and prevents the development of negative effects in the long term.

Keywords: irritants, pedifen, irritating

Острые поражения веществами раздражающего действия нередко сопровождаются химическими ожогами глаз, которые характеризуются длительностью течения патологического процесса и развитием осложнений (посттравматический кератит, травматическая катаракта и пр.), в ряде случаев приводящих к снижению остроты зрения и инвалидизации потерпевших [1, 4–6]. В этой связи проблема профилактики и лечения осложнений острых поражений слизистых оболочек глаз раздражающими веществами сохраняет свою актуальность, что обуславливает необходимость разработки эффективных и безопасных средств профилактики и терапии.

Важной составляющей комплексной терапии при поражении ирритантами является купирование болевого синдрома, так как поток болевых импульсов является три-

герным механизмом для инициации других патологических эффектов (механическое повреждение пораженных участков, психомоторное возбуждение, вазомоторные реакции и др.). Выбор анестетика в качестве препарата для подавления болевого и раздражающего действия ирритантов обусловлен способностью местных анестетиков понижать (или полностью подавлять) возбудимость чувствительных нервных окончаний слизистых при непосредственном контакте.

Целью исследования являлась экспериментальная оценка безопасности и специфической активности лекарственной формы препарата Педифен (0,25%-й раствор N, M-диэтил-5,5-дифенил-2-пентиламина гидрохлорида в виде спрея; технология синтеза апробирована в заводских условиях ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России) в опытах на грызунах.

Материалы и методы исследования

Оценку параметров острой токсичности проводили в опытах на половозрелых лабораторных животных (ЛЖ): белых мышах, белых крысах при внутрижелудочном введении; в опытах на крысах и кроликах – при интраконъюнктивальном введении. Для определения показателей острой токсичности при внутрижелудочном введении модельный образец препарата *per os* вводили через атравматичный металлический зонд в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксоу [3]. Для достижения больших доз препарата введение осуществляли повторно с интервалом 20–30 минут в течение 4 часов. Расчеты величин медианно-летальных доз (LD_{50}) проводили по В.Б. Прозоровскому, 1978 [8]. При интраконъюнктивальном введении модельный образец препарата вводили капельно в конъюнктивальные мешки и на роговицу ЛЖ в максимальных дозах. Объем вводимого препарата при этом соответствовал максимально технически возможному для введения в течение дня. Соответственно для крыс и кроликов указанные объемы составляли 1,0 и 8,0 мл. Контрольные животные получали аналогичные по объемам введения растворы воды для инъекций. Наблюдение за животными осуществлялось в течение 14 дней.

Для оценки подострой токсичности модельного образца препарата при интраконъюнктивальном введении грызунам его вводили в максимальной терапевтической дозе, составляющей 0,1 мл/кг (дозировали каплями с помощью автоматической микропипетки). На мышах линии *CBA*, крысах и морских свинках обоего пола была оценена иммунотоксичность модельного образца препарата по показателям неспецифического, специфического гуморального и клеточного иммунитета при его введении в течение 14 дней в максимальной терапевтической дозе. При исследовании аллергенных свойств применяли реакции общей анафилаксии и иммунных комплексов, конъюнктивальной пробы и непрямой реакции дегрануляции тучных клеток после интраконъюнктивального введения препарата в той же дозе в течение 5 дней.

Исследование специфической активности препарата проводили на кроликах обоего пола породы Шиншилла: на фоне развивающейся клинической картины поражения ирритантами (слезотечение, гиперемия конъюнктивы, нарастание отека век и т.д.) производили двукратное (с интервалом в 10 с) и повторное (через 30 мин) закапывание 0,05 мл препарата в конъюнктивальный мешок правого глаза. Наблюдение за глазами животных начинали сразу же после воздействия ирританта и осуществляли в течение 14 суток. В ходе проведения эксперимента регистрировали следующие офтальмологические показатели: выраженность блефароспазма (по продолжительности сокращения круговой мышцы глаза, с), слезотечения (по интенсивности смачивания бумажной ленты, мм), гиперемии конъюнктивы век и склеры (по бальной шкале: 1 балл – сосуды инъецированы, 2 балла – отдельные сосуды трудно различимы, 3 балла – диффузное глубокое покраснение), отека век (по бальной шкале: слабый отек век – 1 балл, выраженный отек с частичным выворачиванием век – 2 балла, в результате отека глаз закрыт наполовину – 3 балла, в результате отека век глаз закрыт более чем наполовину – 4 балла). Определяли выраженность зрачковой и роговичного рефлексов (оценку зрачкового реф-

лекса проводили в помещении со слабым освещением, в качестве светового раздражителя использовали узкий пучок направленного света; диаметр зрачка определяли линейным пуриллометром). Наличие повреждений конъюнктивы и роговицы оценивали посредством флуоресцеиновой пробы (в конъюнктивальный мешок глаза вводили 1–2 капли 0,5% раствора флуоресцеина натрия: при появлении зеленого окрашивания эпителия роговицы проба оценивалась как положительная (+), что свидетельствовало о повреждении роговицы). В ряде случаев глаза животных подвергали гистоморфологическим исследованиям.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнялась с помощью простого сравнения средних по *t*-критерию Стьюдента [2].

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты оценки острой пероральной токсичности тестируемой лекарственной формы препарата Педифен в опытах на ЛЖ свидетельствуют о том, что видовая чувствительность и половые различия в токсичности отсутствуют. Гибели мышей (крыс) при введении доз модельного образца препарата до максимального значения (15 г/кг) не наблюдалось. На вскрытии ЛЖ в конце эксперимента (через 14 дней) анатомо-морфологических различий между животными опытной группы и контролем не установлено. Анализ величин массовых коэффициентов внутренних органов также не выявил каких-либо достоверных отличий между группами ЛЖ, получившими модельный образец препарата, по отношению к контрольной группе. При интраконъюнктивальном введении модельного образца препарата гибели ЛЖ, внешних патологических проявлений, которые можно было бы интерпретировать как признаки интоксикации, также не отмечалось.

Результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными в 14-дневном периоде после острого введения модельного образца препарата и результаты патоморфологических исследований позволяют отнести педифен к VI классу относительно безвредных лекарственных веществ [10].

Результаты оценки подострой токсичности (при ежедневном интраконъюнктивальном введении кроликам модельного образца препарата в максимальной терапевтической, 3-х и 10-кратной максимальной терапевтической дозах в течение 14 дней) не выявили местно-раздражающего действия на слизистую глаз, функциональных сдвигов со стороны сердечно-сосудистой системы; изменений гематологических и биохимических показателей крови; дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме органов.

Результаты вскрытия и макроскопического исследования в подостром эксперименте не выявили изменения массы центральных органов иммунной системы. Иммунотоксического влияния модельного образца препарата на естественную резистентность организма, оцениваемого посредством сравнения фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей линии *СВА* опытных и контрольных групп, также не выявлено.

При исследовании влияния модельного образца препарата на специфический гуморальный иммунный ответ определяли титр гемагглютининов в опытных и контрольных группах мышей линии *СВА*, иммунизированных эритроцитами барана. Выявлена тенденция увеличения как общего титра антител, так и IgG-антител, не носящая статистически достоверного характера.

Влияние модельного образца препарата на специфический клеточный иммунитет оценивали по выраженности реакции гиперчувствительности замедленного типа. Для индукции гиперчувствительности мышей линии *СВА* сенсибилизировали эритроцитами барана с дальнейшим (на 5 сутки эксперимента) введением разрешающей дозы антигена под апоневротическую пластинку. При этом не выявлено ни стимулирующего, ни ингибирующего действия.

Результаты исследования возможно-го аллергенного действия модельного образца препарата в опытах на морских свинках показали, что он не обладает аллергенными свойствами, судя по реакции общей анафилаксии при применении препарата даже в дозах, превышающих терапевтические на порядок. Кроме того, конъюнктивальные пробы, реакции дегрануляции тучных клеток крыс и иммунных комплексов у морских свинок были отрицательными.

После инстилляций ирританта – ортохлорбензилиденмалонитрила (вещество «CS») – в конъюнктивальную полость глаза крыс, наряду с резко выраженным корнеальным синдромом, отмечались гиперемия и отёк конъюнктивы, приводящие к появлению участков хемоза, поверхностного некроза. Через 15–30 минут отмечалось обильное слезотечение (40–60 мм), с последующим развитием блефароспазма, гиперемии конъюнктивы (интенсивностью 2–3 балла), отёка конъюнктивы (1–2 балла) и снижением чувствительности роговицы. При проведении флуоресцеиновой пробы отмечалось интенсивное окрашивание в нижних квадрантах глаз. Через сутки, по данным офтальмоскопии, выявлялись ло-

кальные и очаговые помутнения эпителия роговицы (1–2 балла), микро – и очаговые помутнения (в виде кристаллических бесцветных и коричневатых включений) в поверхностных и передних слоях стромы. В ряде случаев наблюдали обширный инфильтрат роговицы с васкуляризацией и рубцовыми изменениями. На гистологических препаратах фиксировались специфические проявления серозно-гнойного конъюнктивита, очаговые дистрофические изменения эпителия роговицы и отёк стромы.

Наблюдаемые у животных клинко-гистологические изменения соответствовали химическому ожогу глаз 2 степени [9].

Стихание воспалительных и деструктивных изменений, подтверждённое во всех экспериментах морфологическим контролем, наступало на 7–9 сутки после инстилляций раствора ирританта (к 6–8 суткам исчезала гиперемия конъюнктивы, к 7–9 суткам стихал отёк конъюнктивы, флуоресцеиновая проба становилась отрицательной).

На фоне лечения педифеном проявления химического ожога глаз купировались в 2–3 раза быстрее, чем без лечения: гиперемия и отёк конъюнктивы исчезали на 3–5 сутки; на 4–5 сутки флуоресцеиновая проба становится отрицательной.

Лечебно-профилактический эффект педифена обусловлен тем обстоятельством, что, наряду с местным анестезирующим действием, он обладает антиоксидантной, противовоспалительной и иммуностимулирующей активностью, антимикробными свойствами в отношении грамположительной и грамотрицательной микрофлоры, улучшает отток жидкости из передней камеры глаза [7], что обуславливает сокращение сроков течения воспалительного процесса и способствует регенераторным процессам.

С целью оценки возможности профилактики (посредством педифена) развития отдалённых последствий поражений глаз, инициируемых ирритантами, ЛЖ подвергались биомикроскопии роговицы и конъюнктивы через 3 месяца после инстилляций вещества «CS» в конъюнктивальную полость. Результаты исследования свидетельствуют, что в ряде случаев фиксировались как поверхностные, так и глубокие очаги помутнения стромы различной формы, прорастание через лимб поверхностных и глубоких сосудов. Данные, характеризующие эффективность педифена по предупреждению развития отдалённых последствий, вызываемых веществом «CS», представлены в таблице.

Влияние лекарственных препаратов
на предупреждение отдалённых
последствий (по наблюдениям через
3 месяца) после поражения
глаз веществом «С»

Оцениваемый интегральный показатель	Наличие патологических изменений (%) у животных		
	1 группа	2 группа	3 группа
Патология конъюнктивы	0%	0%	25%
Патология роговицы	25%	62%	75%

Выводы

1. В опытах на грызунах (мыши, крысы) показано, что лекарственная форма препарата Педифен 0,25% по параметрам острой токсичности относится к классу практически нетоксичных веществ.

2. При интраконъюнктивальном введении в максимально возможной дозе (более 5 г/кг) модельный образец препарата не оказывал выраженного раздражающего действия на слизистые оболочки глаз лабораторных животных.

3. Лекарственная форма препарата Педифен 0,25% не обладает аллергенными и иммунотоксичными свойствами.

4. По критериям параметров острой и подострой токсичности лекарственная форма препарата Педифен 0,25% не имеет противопоказаний для клинических испытаний и медицинского применения.

5. Экспериментальная оценка эффективности лекарственной формы препарата Педифен 0,25% в виде спрея показала, что применение указанного препарата в ранние сроки после поражения глаз ирритантами значительно сокращает сроки проявления раздражающего действия, способствует более быстрому восстановлению поврежденных слизистых и роговицы, а также предупреждает развитие отдаленных последствий.

Список литературы

1. Комбинированная травма глаз при выстреле из газового ствольного оружия самообороны / Ю.С. Астахов, Р.В. Бабаханян, Г.И. Даль и др. // Вестник офтальмологии. – 1995. – Т. 3, № 4. – С. 9–11.
2. Бейли Н. Статистические методы в биологии. – М.: Мир, 1963. – 271 с.
3. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. – М.: Медицина, 1974. – 143 с.
4. Лебедев В.Н. Судебно-медицинская характеристика повреждений, причинённых из 7,62 мм газового пистолета модели 6П42 (экспериментальное исследование): автореф. дис. ... канд. – СПб., 1999. – 9 с.

5. Литвин Ф.И. Судебно-медицинская характеристика поражений органов зрения человека, причинённых выстрелами из газового оружия: автореф. дис. ... канд. – СПб., 2002. – 11 с.

6. Муковский Л.А., Шумакова К.М., Куглеев А.А. и др. Отдалённые последствия поражения глаз газовым оружием в аэрозольной упаковке // Актуальные вопросы теоретической и прикладной токсикологии: сб. тезисов докладов 1 Всероссийской конференции токсикологов. – СПб., 1995. – Т. 2. – С. 60.

7. Онуфриенко М. Э. Фармако-токсикологическая оценка педифена: дис. ... канд. ветер. наук. – СПб., 1995. – 151 с.

8. Прозоровский В.Б., Прозоровская М., Демченко В.М. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки // Фармакол. и токсикол. – 1978. – № 4. – С. 497–502.

9. Пучковская Н.А., Шульгина Н.С., Непомнящая В.М. Патогенез и лечение ожогов глаз и их последствий. – М.: Медицина. – 1973. – 192 с.

10. H. Hodge et al. Clinical Toxicology of Commercial Products // Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimore, 1975. – 427 p.

References

1. Astahov Ju.S., Babahanjan R.V., Dal' G.I. i dr. Kombinirovannaja travma glaz pri vystrele iz gazovogo stvol'nogo oruzhija samooborony. // Vestnik oftal'mologii. 1995. T.3, no. 4. pp. 9–11.
2. Bejli N. Statisticheskie metody v biologii. M.: «Mir», 1963. 271 p.
3. Gacura V.V. Metody pervichnogo farmakologicheskogo issledovanija biologicheski aktivnyh veshhestv. M., «Medicina», 1974. 143 p.
4. Lebedev V.N. Sudebno-medicinskaja harakteristika povrezhdenij, prichinjonnyh iz 7,62 mm gazovogo pistoletamodeli 6P42 (jeksperimental'noe issledovanie): Avtoreferat kand. dis. SPb. 1999. 9 p.
5. Litvin F.I. Sudebno-medicinskaja harakteristika porazhenij organov zrenija cheloveka, prichinjonnyh vystrelami iz gazovogo oruzhija: Avtoreferat kand. dis. SPb. 2002. 11 p.
6. Mukovskij L.A., Shumakova K.M., Kugleev A.A. i dr. Otdaljonnye posledstvija porazhenija glaz gazovym oruzhjem v ajerozol'noj upakovke. //V kn. «Aktual'nye voprosy teoreticheskoi i prikladnoj toksikologii. Sb. tezisov dokladov 1 Vserossijskoj konferencii toksikologov». SPb.: 1995. T. 2. pp. 60.
7. Onufrienko M. Je. Farmako-toksikologicheskaja ocenka pedifena. Dissertacija kand. veterinarn. nauk. SPb.: 1995. 151 p.
8. Prozorovskij V.B., Prozorovskaja M., Demchenko V.M. Jekspress-metod opredelenija srednej jeffektivnoj dozy i ee oshibki Farmakol. i toksikol. 1978, no. 4. pp. 497–502.
9. Puchkovskaja N.A., Shul'gina N.S., Nepomnjashhaja V.M. Patogenez i lechenie ozhogov glaz i ih posledstvij. M.: Medicina. 1973. 192 p.
10. H. Hodge et al. Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning. Ed. IV, Baltimore, 1975. 427 p.

Рецензенты:

Образцов Н.В., д.м.н., с.н.с., профессор кафедры «Токсикология и клиническая фармакология», ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации ФМБА России», г. Москва;

Сарманаев С.Х., д.м.н., профессор, зав. кафедры «Токсикология и клиническая фармакология» ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации ФМБА России», г. Москва.
Работа поступила в редакцию 16.08.2013.