



- мицинрезистентных энтерококков // КМАХ. Том 20, №1. 2018. С.55-61.
12. Хай-Хром Экспресс-диагностика. Дифференциация микроорганизмов в первичном посеве. Каталог компании HiMedia. С. 3 7.
13. Халдарбекова Г.З., Мухамедов И.М. Биологические свойства лактобацилл выделенных из разных биотопов тела человека //Журнал Стоматология. Ташкент. 2018, №3. С. 75-78.
14. Царев В.Н. Микробиология, вирусология и иммунология полости рта. // ГЭОТАР-Медиа, 2016. с. 572.

615.453.47-281:617.7 -[611.77-612.084

ДОКЛИНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА КОЖНО-РАЗДРАЖАЮЩЕГО И КОЖНО-РЕЗОРБТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ГЛАЗНОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ПЛЕНКИ «NOVACEL ZIYO»

¹Л.Н.Хегай, ²З.А.Ниязова, ³А.А. Сыдииков

¹Ташкентская Медицинская Академия,

Ташкентский педиатрический медицинский институт,

³Ташкентский государственный стоматологический институт.

РЕЗЮМЕ

В статье представлены результаты исследования кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия многофункциональной пленки для терапии травм органа зрения «Novacel ziyo». Опыты проведены на 24 половозрелых крысах-самцах массой тела 150-170 гр. Для изучения воздействия растворов пленки на кожные покровы 18 белых крыс применены 3 взаимодополняющие методики: двухкапельная и аппликационная пробы и опускание 2/3 хвоста в пробирку с раствором пленки. Контрольную группу составили 6 особей. Установлено, что отечественная пленка для лечения травм глаз «Novacel ziyo» не обладает токсическим действием на кожные покровы.

Ключевые слова: доклинические исследования, многофункциональная лекарственная пленка, кожно-раздражающее и кожно-резорбтивное свойство.

ABSTRACT

The article presents the results of a study of the skin-irritating and skin-resorptive action of the multifunctional film "Novacel ziyo" for the treatment of eye injuries. The experiments were carried out on 24 sexually mature male rats weighing 150-170 g. To study the effect of film solutions on the skin of 18 white rats 3 complementary methods were used: two-drop and application tests and lowering 2/3 of the tail into a test tube with a film solution. The control group consisted of 6 individuals. It has been established that the domestic film "Novacel ziyo" for the treatment of eye injuries does not possess a toxic effect on the skin.

Key words: preclinical studies, multifunctional drug film, skin irritant and skin resorptive properties.

Актуальность. Создание новых нетоксичных, биodeградируемых покрытий для терапии травм

органа зрения является приоритетной задачей ученых. Для оценки медико-биологической безопасности новых изделий медицинского назначения необходим доклинический токсикологический скрининг на экспериментальной модели патологии [1]. Тщательное изучение токсичности новых материалов на животных необходимо для профилактики нежелательных реакций при клинических испытаниях [2,3]. В дополнение к традиционным офтальмологическим препаратам в виде гелей, мазей, водных суспензий разработаны офтальмологические пленки, коллоидные системы, состоящие из нано- и микрочастиц, наноэмульсий, наносуспензий [4,5,6,7]. По сравнению с традиционной субконъюнктивной инъекцией, пленочные покрытия характеризуются более длительным воздействием, высокой биодоступностью для оболочек глаза [7].

Биоматериалы остаются одной из самых сложных и актуальных задач современной офтальмологии. Трудности заключаются в низкой биодоступности в виду особенностей анатомии и физиологии глаза, относительно низкой проницаемости эпителиальной мембраны роговицы, динамики слезной жидкости, назолакримального дренажа и др. [8]. В данном случае идеальным изделием могло служить пленочное покрытие, которое бы прикладывалось на поврежденную склеру для барьерной функции и дальнейшей адекватной терапии. Имплантат должен обладать адекватной площадью покрытия, адгезивными свойствами, быть биосовместимым, с низкой частотой осложнений, не должен вызывать системные и побочные действия, быть простым в применении, экономически доступным [7,9].

Цель. Изучение кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия отечественной полифункциональной лекарственной пленки «Novacel



ziyu» для терапии проникающих ранений глаз в эксперименте.

Материал и методы исследования. Биоактивное покрытие для лечения травм глаз синтезировано группой ученых Узбекистана на основе Na-КМЦ, красителя метиленового синего, обладающего фотосенсибилизирующей и противомикробной активностью и пластификатора глицерина [10].

Данное исследование выполнено в соответствии с планом научно-исследовательских работ Ташкентской медицинской академии в рамках Государственной научно-технической программы по гранту ПЗ-2017092910 «Разработка полупроницаемых и биodeградируемых раневых покрытий для лечения повреждений кожных покровов и мягких тканей различного генеза».

Лекарственная форма представляет собой поликомпозиционную биodeградируемую полимерную пленку, активными компонентами являются водорастворимый натрий карбоксиметилцеллюлоза, sodium carboxymethyl cellulose (пищевая добавка E466), глицерин и метиленовый синий. Параметры токсичности Na-КМЦ - ЛД₅₀ в/ж крысы 27000 мг/кг. ПДК в воздухе рабочей зоны 10 мг/м³, класс опасности 3. Кожно-резорбтивным действием не обладает. Метиленовый синий по паспорту безопасности в соответствии с Регламентом (ЕС) № 1907/2006 (REACH), с поправками, внесенными 453/2010/EC [ОЭСР Test № 404 «Acute Dermal Irritation/Corrosion»] является нетоксичным соединением. Глицерин (Glycerol) согласно Регламенту (ЕС) № 1272/2008 является безопасным веществом. Согласно статье 2 регламента REACH (ЕС) № 1907/2006 вещество освобождено от регистрации.

С целью подтверждения результатов изучения кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия отечественной пленки для лечения ранений глаз проведены гистологические исследования кожных покровов спинки и хвостов белых крыс. Микропрепараты окрашивали гематоксилин-эозином.

Статистические исследования проведены на основании стандартных клинических рекомендаций. Количественные данные представлены как среднее арифметическое (M) $\pm$ стандартное отклонение (SD) в случае нормального распределения и как медиана (Md) и квартили (Q) или (SD) при других распределениях. За статистически значимые изменения принимался уровень достоверности $P < 0,05$. Обработка результатов клинического обследования производилась на персональном компьютере Pentium-IV с использованием прикладных офисных программ Statplus 9.0 с расчетом среднеарифметической изучаемого показателя (M), ее стандартной ошибки (t), показателей достоверности (P) и критерия Стьюдента. При этом учитывались методики, существующие указания по статистической обработке данных в клинических и лабораторных исследованиях [11].

Результаты и обсуждение. Оценка медико-биологической безопасности лекарственной пленки для терапии проникающих ранений глаз в эксперименте включала скрининг кожно-раздражающих и кожно-резорбтивных свойств вещества.

Токсикологические исследования проведены на 24 половозрелых крысах-самцах массой тела 150-170 гр. Животные содержались в стандартных условиях вивария Межвузовской научно-исследовательской лаборатории (МНИЛ) ТМА с естественным режимом освещения, при температуре 22-24 °C; относительной влажности воздуха 40-50%, с использованием стандартной диеты (сбалансированной по содержанию белков, жиров и углеводов рацион). Перед началом экспериментов лабораторные животные осмотрены, учтена масса тела, возраст, пол, двигательная активность и состояние шерстного покрова.

Эксперименты проводились с учетом требований Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных исследований или в иных научных целях [12,13,14,15,16], требований Национального руководства по содержанию и использованию лабораторных животных (получено разрешение Комитета по вопросам этики Минздрава РУз. (протокол № 5 от 05 июля 2018 года).

Согласно ГОСТ ISO 10993-5-2011 по продолжительности контакта биопленка относится к категории В - изделие длительного однократного применения, контакт которого превышает 24 час, но не более 30 сут. С учетом этого продолжительность наших исследований составила 30 суток [1].

За сутки до экспериментов с использованием двухкапельного и аппликационного методов шерсть тщательно выстригалась на симметричных участках боков размером 2x2 см, левая боковая сторона была контрольной и обрабатывалась дистиллированной водой, правая была опытной.

Аппликация растворов пленки в дозах 10, 100 и 200 мг/кг проводилась на выбритой коже спинки ежедневно открытым способом. При нанесении аппликации в течение 4-часовой экспозиции животные находились в фиксированном состоянии. Кусочек марли размером 1 см, смоченный раствором пленки, накладывали на кожу и фиксировали лейкопластырем. На месте аппликации в течение 24-48 часов реакцию кожи учитывали ежедневно по шкале оценки кожных проб. Реакцию наблюдали на наружной поверхности кожи и оценивали в баллах по шкале: видимая реакция; бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии; ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии; красная эритема по всему участку; инфильтрация и отек кожи.

При изучении кожно-раздражающего действия реакцию кожи учитывали ежедневно по шкале оценки кожных проб. Реакцию наблюдали на наружной по-

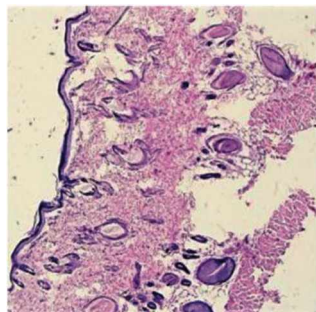


Рис 1. Кожа спинки белых крыс опытной группы. Эпидермис, дерма, придатки не нарушены. Окраска ГЭ. Об. 5x5.

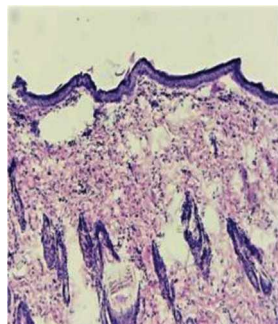


Рис 2. Кожа спинки крыс опытной группы. Очагов отёка, некроза, инфильтрации нет. Окраска ГЭ. Об. 5x20

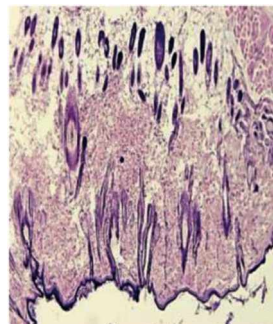


Рис.3. Кожа спинки белых крыс опытной группы. Эпидермис, дерма, придатки не нарушены. Окраска ГЭ. Об. 5x5.

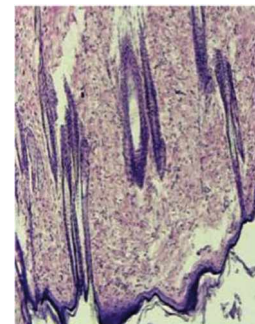


Рис.4.Кожа спинки белых крыс контрольной группы. Очагов отёка, некроза, инфильтрации нет. Окраска ГЭ. Об. 5x20.

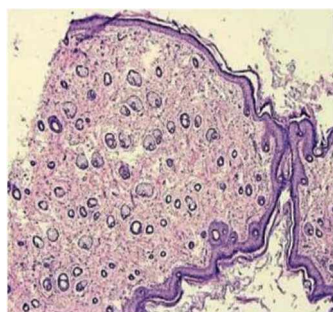


Рис. 5. Кожа спинки белых крыс опытной группы. Эпидермис, дерма, придатки не нарушены. Окраска ГЭ. Об. 5x5.

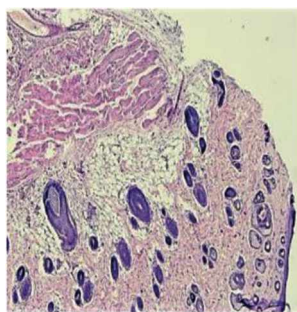


Рис. 6. Кожа спинки белых крыс опытной группы. Очагов отёка, некроза, инфильтрации нет. Окраска ГЭ. Об. 5x20.

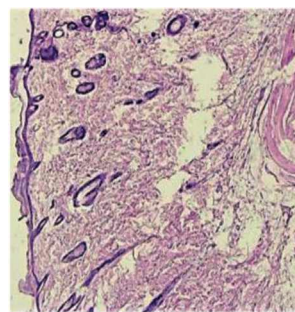


Рис. 7. Кожа спинки белых крыс опытной группы. Эпидермис, дерма, придатки не нарушены. Окраска ГЭ. Об. 5x5.

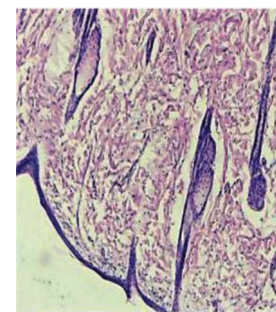


Рис. 8. Кожа спинки белых крыс контрольной группы. Очагов отёка, некроза, инфильтрации нет. Окраска ГЭ. Об. 5x20.

верхности кожи через 24 часа и оценивали в баллах по следующей шкале:

- видимой реакции - нет;
- бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии - отсутствует;
- ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии - отсутствует;
- красная эритема по всему участку - отсутствует;
- инфильтрация и отек кожи (утолщение кожных складок) при наличии или отсутствии эритемы.

Эритема - выраженная инфильтрацией очагов изъязвления (некроз), возможны геморагии, образование корочек. В течение периода наблюдения при воздействии растворов вещества в дозах 10, 100 и 200 мг/кг каких-либо признаков раздражения (гиперемия и др.) и отека со стороны кожных покровов не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии проявления раздражающего действия.

Таким образом, при накожной аппликации исследуемой субстанции не наблюдалось раздражающего действия на окружающую кожную ткань в зонах нанесения вещества.

Изучение кожно-резорбтивного действия проведено в подостром опыте в условиях погружения в пробирки с изучаемыми растворами пленки 2/3 длины хвостов крыс, что составляет 5% от поверхности тела. Ежедневная экспозиция изучаемых растворов в концентрациях 10, 100 и 200 мг/кг составила 4 часа при длительности опыта 30 дней. Ежедневно после 4-часовой экспозиции хвосты животных мыли теплой водой с мылом и высушивали. Растворы пленки в изученных дозах не оказывали местно-раздражающего действия на кожные покровы экспериментальных животных.

После декапитации животных скальпелем иссечены кожные лоскуты спинки и хвосты размером 2 см и толщиной не более 5-10 мм. Вырезанные кусочки фиксировали в 10% водном растворе формалина. В качестве растворителя использована водопроводная вода, т.к. дистиллированная вызывает набухание тканей. Срок фиксации тканей в формалине не превышал 48 час. После проводки кусочки заливали в парафин. Толщина парафиновых срезов колебалась от 2 до 3 мкм. Применена методика окраски гематоксилин-эозином [17,18,19]. Гистологические исследования ми-

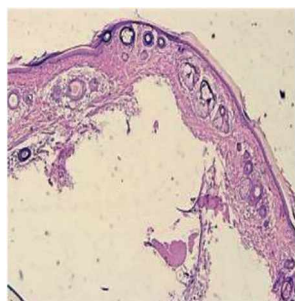


Рис. 9. Хвост белых крыс опытной группы. Дерма, эпидермис, придатки сохранены. Окраска ГЭ. Об. 5х5.

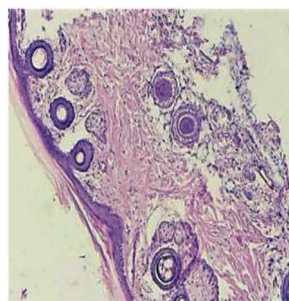


Рис. 10. Хвост белых крыс опытной группы. Очагов дистрофии, некроза, инфильтрации, отёка нет. Окраска ГЭ. Об. 5х10

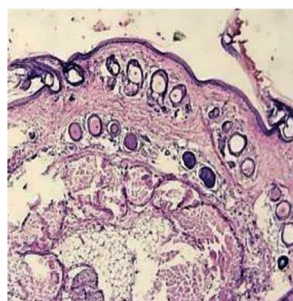


Рис. 11. Хвост белых крыс опытной группы. Эпидермис, дерма, придатки не нарушены. Окраска ГЭ. Об. 5х5.

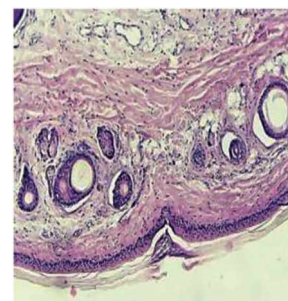


Рис. 12. Хвост белых крыс контрольной группы. Очагов отёка, некроза нет. Эпидермис, дерма, придатки сохранены. Окраска ГЭ. Об. 5х20.

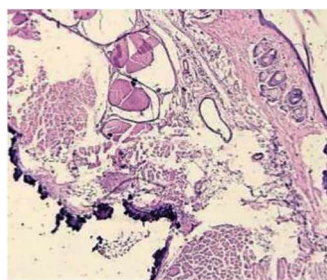


Рис. 13. Хвост белых крыс опытной группы. Эпидермис, дерма, придатки не нарушены. Окраска ГЭ. Об. 5х5.

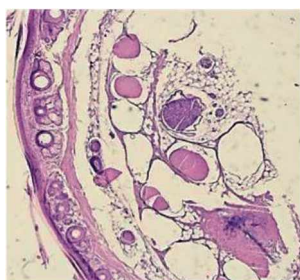


Рис. 14. Хвост белых крыс опытной группы. Очагов отёка, некроза нет. Эпидермис, дерма, придатки сохранены. Окраска ГЭ. Об. 5х1 С.



Рис. 15. Хвост белых крыс опытной группы. Эпидермис, дерма, придатки не нарушены. Окраска ГЭ. Об. 5х5.



Рис. 16. Хвост белых крыс контрольной группы. Очагов отёка, некроза нет. Эпидермис, дерма, придатки сохранены. Окраска ГЭ. Об. 5х10.

кропрепаратов проведены на световом микроскопе DN-200M (Китай) со встроенным фотоаппаратом.

При гистоморфологическом исследовании, проведенном через 30 дней после воздействия растворов пленки в концентрации 10, 100 и 200 мг/кг, у животных контрольной и опытных групп анатомическое расположение и структура внутренних органов соответствовали норме. Внешний вид, размеры и макроскопическая структура органов визуально не отличались от нормы. Структура кожных покровов спинок и хвостов белых крыс независимо от дозы воздействия без патологических изменений.

Кожа. Гистологическая картина кожи спины белых крыс после 30-дневного воздействия растворов пленки в дозе 10, 100 и 200 мг/кг представлена на рис. 1-8.

Установлено, что эпидермис, дерма и придатки не нарушены, отёк, некроз, и инфильтрация не выявлена. Таким образом, результаты гистоморфологических исследований кожи спины белых крыс после 30-дневного воздействия растворов пленки в дозах 10, 100 и 200 мг/кг позволили установить, что эпидермис, дерма, придатки не нарушены, не выявлены очаги отёка, некроза и инфильтрации.

Гистологическая картина кожных покровов хвостов белых крыс после 30-дневного воздействия рас-

творов пленки в дозах 10, 100 и 200 мг/кг также не выявила патологических изменений (рис.9-16).

Результаты гистоморфологических исследований кожных покровов хвостов белых крыс после 30-дневного воздействия растворов пленки в дозах 10, 100 и 200 мг/кг позволили установить, что эпидермис, дерма, придатки не нарушены, не выявлены очаги отёка, некроза и инфильтрации.

Таким образом, результаты гистоморфологических исследований кожных покровов хвостов белых крыс в опытных и контрольных группах не выявили каких-либо изменений в структуре клеток.

Закключение. Результаты сравнительного гистоморфологического исследования покровных тканей кожи контрольных и опытных животных позволяют констатировать, что 30-дневное накожное воздействие растворов пленки в дозах 10, 100 и 200 мг/кг не оказывает токсического влияния на кожные покровы экспериментальных животных. Доклиническая гистоморфологическая оценка медико-биологической безопасности глазной лекарственной пленки подтверждает отсутствие у отечественного покрытия «Novacel ziyu» для лечения проникающих ранений глаз кожно-раздражающего и кожно-резорбтивного действия.



ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- ГОСТ ISO 10993-1-2011. Межгосударственный стандарт изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка и исследования [ISO 10993-1-2011. Medical-devices. Biological evaluation of medical devices. Part 1. Evaluation and testing (In Russ.)], www.iso.org, www.russiangost.com
- Хабриев Р. У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Москва. 2005г. - 832 с. [Khabriev R. U. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances. Moscow. 2005. - 832p. (In Russ.)], www.booksmed.com.
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общей редакцией Миронова А.Н. Часть Т-М.-Гриф УК-М. 2012. 944 с. [Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Under the general editorship of A.N. Mironov. Part 1-M.-Grif and K.-M. 2012. 944p. (In Russ.)], www.twirpx.com.
- ГОСТ ISO/TS 80004-1-2017. Нанотехнологии. Часть 1. Основные термины и определения [(ISO/TS 80004-1:2015. Nanotechnologies. Vocabulary>. Part 1: Core terms, IDT) (In Russ.)], hll/k: Docs.cntd.ru.
- TVelpandian (editor) Pharmacology> of Ocular Therapeutics /New Delhi, India.- 2016,- 534p. [https://DOI 10.1007 / 978-3-319-25498-2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-25498-2). ISBN 978-3-319-25498-2.
- Baino E, Perero S, Ferraris S. et al. Biomaterials for orbital implants and ocular prostheses: overview and future prospects. Acta Biomater. 2014Mar;10(3):1064-87. [https://doi: 10.1016/j.actbio.2013.12.014](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.014).
- Baino, E, Perero, S, Ferraris, S, Miola, M, Balagna, C, Vem, E., Ferraris, M. (2014). Biomaterials for orbital implants and ocular prostheses: Overview and future prospects. Acta Biomaterialia. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.12.01.0>.
- Анурова М. Н, Бахрушина Е. О., Лапик И. В., Шитова А. С., Краснюк И. И. Изучение осмотической активности офтальмологических гелей. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2018; 3 (24):30-34 [Anurova MN, Bakhrushina EO, Lapik TV, Shitova AS, Krasnyuk II Study> of osmotic activity> of ophthalmic gels. Development and registration of medicines. 2018: 3 (24): 30-34. ISSN 2305-2066 (Print). ISSN 2658-5049 (Online) (In Russ.)].
- Sun, S, Li, J., Li, X, Lan, B., Zhou, S, Meng, Y., & Cheng, L. (2016). Episcleral drug film for better-targeted ocular drug delivery> and controlled release using multilayered polycaprolactone (PCL). Acta Biomaterialia, 37, 143-154. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.04.01>.
- Патент № FAP 01540 от 12.06.2019 г Глазная лекарственная пленка для лечения инфицированных ран в эксперименте. Авторы Ниязова З.А., Сарымсаков А.А., Хегай Л.И. и др. [Patent No. FAP 01540 from 12.06.2019, Ophthalmic medicinal film for the treatment of infected wounds in the experiment. Authors Niyazova Z.A., Sarymsakov A.A., Khagai LN, et al. (In Russ.)].
- Зайцев В.М., Лифляндский В.Г., Маринкин В.И. Прикладная медицинская статистика /Учебное пособие,- СПб,- ООО «Издательство Фолиант»,- 2003,- 432 с. [Zaitsev V.M., Lifyandsky V.G., Marinkin VI. Applied Medical Statistics / Textbook-SPb - ООО "Foliant Publishing House"-2003 - 432 p. (In Russ.)]. [Http://www.twirpx.com](http://www.twirpx.com). kingmed.infocnigi.book.
- Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных исследований или в иных научных целях (ETS № 123, Страсбург, 1986.-20 с. European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental research or other scientific purposes [(ETS № 123, Strasbourg, 1986.-20p] (In Russ.)], [http: coe.int](http://coe.int).
- ГОСТ 32373-2013 Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при накожном поступлении [Testing of chemicals of health hazard. Basic requirements for tests for acute dermal toxicity>. (In Russ.)], <http://docs.cntd.ru>.
- Руководящий документ ОЭСР Тест № 402: Острая кожная токсичность [Test № 402 «Acute Dermal Toxicity»> (In Russ.)], <http://oecd.org>.
- Руководящий документ ОЭСР. Тест № 404 «Acute Dermal Irritation (Corrosion OECD (2004) (In Russ.) <http://oecd.org>.
- Руководящий документ ОЭСР .Skin Absorption: In Vitro Method, Test Guideline №. 428, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, OECD, Paris. 2011 (In Russ.) <http://oecd.org>.
- Меркулов Г.А. Курс патолого-гистологической техники: Медицина.-М-1969 С.156-164 [Merkulov G.A. Course of pathological and histological techniques: Medicine.-M.- 1969 S. 156-164 (In Russ.)]. [www. labx. narod. ru](http://www.labx.narod.ru)
- Luna, Lee G., HT(ASCP) (editor)). Manual of Histologic Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology> (Third Edition). American Registry> of Pathology: (McGraw Hill Publishers, New York 1960 (Progressive Stain).
- Hematoxylin and Eosin (H&E) Staining Protocol Prepared by ROY ELLIS IMVS Division of Pathology: The Queen Elizabeth Hospital Woodville Road, Woodville, South Australia 5011. <http://www.ihcworld.com>.