ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ТВЕРДОЙ ДИСПЕРСИИ ИВЕРМЕКТИНА

Защепкина В. В.¹,

аспирант лаб. экспериментальной терапии,
zashepkinavv@gmail.com

Мусаев М. Б.¹,

д.в.н., г.н.с. лаб. экспериментальной терапии,
musaev.mauldi@gmail.com

Халиков С. С.²,

д.т.н., в.н.с. лаборатории фторорганических
физиологически активных соединений,
salavatkhaliakov@mail.ru

Аннотация

Для дегельминтизации лошадей табунного содержания и диких животных в заповедниках вольным вскармливанием, нами разработан инновационный препарат на основе ивермектина с использованием технологии механохимической модификации субстанции ивермектина смесью полимеров (поливинилпирролидон /ПВП/ и арабиногалактан /АГ/ из лиственницы сибирской *Larix sibirica*). При этой обработке была получена твердая дисперсия ивермектина (ТДИ) в виде легко сыпучего порошка бежевого цвета. Исследована фармацевтическая безопасность ТДИ, изучены параметры общетоксического действия, острой кожной токсичности, раздражающих действий, влияния препарата на слизистую оболочку глаза. Исследования проведены на белых беспородных крысах. Установлено, что LD₅₀ исследуемого препарата превышает тестируемую дозу. Согласно ГОСТ 12.1.007-76, препарат относится к 4 классу опасности (малоопасные вещества).

При исследовании местного раздражающего действия препарата на кожу было отмечено, что целостность здоровой кожи с другой стороны, где нанесенные царапины не нарушались, эластичность сохранялась, покраснение

¹ Всероссийский научно-исследовательский институт фундаментальной и прикладной паразитологии животных и растений – филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (Москва, ул. Б. Черемушкинская 28, Россия)

² Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН (119991, Москва, ул. Вавилова, 28)

отсутствовало, через месяц стриженный слой был здоровым. Установлено отсутствие раздражающих свойств ТДИ при однократном нанесении на кожу.

В результате изучения раздражающего воздействия препарата на слизистую оболочку глаза установлено, что ТДИ оказывает умеренное местное раздражающее действие на глаза животных, оцениваемое в 1 балл.

Ключевые слова: ивермектин, полимеры, механообработка, антигельминтная активность.

PRE-CLINICAL STUDIES OF IVERMECTIN SOLID DISPERSION

Zashchepkina V. V.¹,
Postgraduate

Musaev M. B.¹,
Doctor of Veterinary Science

Khalikov S. S.²,
Doctor of Technical Science

Abstract

For deworming of horses of drove breeding and wild animals in preserves of free feeding, we have developed an innovative drug based on ivermectin using the technology of mechanochemical modification of ivermectin substance with a mixture of polymers (polyvinylpyrrolidone /PVP/ and arabinogalactan /AG/ Siberian larch *Larix sibirica*). With this treatment, a solid dispersion of ivermectin (SDI) was obtained in the form of a beige powder, which is easily flowable. The pharmaceutical safety of SDI was studied, the parameters of general toxicity, acute cutaneous toxicity, irritant effects, and the effect of the drug on the eye mucosa were studied. Studies conducted on white mongrel rats. The LD₅₀ of the study drug was found to exceed the test dose. According to GOST 12.1.007-76, the drug belongs to the 4th class of hazard (low hazardous substances). In the study of local irritation of the drug on the skin, it was noted that the integrity of healthy skin on the other hand, where the scratches were not injured, elasticity remained, there was no redness, after a month the sheared layer was healthy. Established the absence of irritating

¹ All-Russian Scientific Research Institute of Fundamental and Applied Parasitology of Animals and Plants – a Branch of the Federal State Budget Scientific Institution “Federal Scientific Center – All-Russian Scientific Research Institute of Experimental Veterinary Medicine named after K.I. Skryabin and Y.R. Kovalenko of the Russian Academy of Sciences” (28, Bolshaya Cheremushkinskaya st., Moscow, 117218, Russia), zashepkinaav@gmail.com

² Nesmeyanov Institute of Organoelement compounds RAS (119991, Moscow, Vavilova str., 28), salavatkhalikov@mail.ru

properties of SDI with a single application to the skin. As a result of studying the irritant effect of the drug on the mucous membrane of the eye, it was established that SDI has a moderate local irritant effect on the eyes of animals, estimated at 1 point.

Keywords: ivermectin, polymers, mechanical treatment, anthelmintic activity.

Введение. Разработка инновационных технологий противопаразитарных препаратов широкого спектра действия является важной проблемой в связи с высоким уровнем опасности распространения паразитарных болезней в России и других странах мира, поэтому создание новых противопаразитарных средств остается одной из приоритетных направлений развития науки и техники.

Для дегельминтизации лошадей табунного содержания и диких животных в заповедниках вольным вскармливанием, нами разработан препарат на основе субстанции ивермектина с применением механохимической технологии с использованием двух водорастворимых полимеров. Препарат представляет собой легко сыпучую твердую дисперсию, растворимую в воде без вкуса с легко уловимым хвойным запахом.

Целью настоящего исследования является проведение доклинических исследований твердой дисперсии ивермектина.

Материалы и методы. В работе использованы:

- субстанция ивермектина (ИВМ) серии 0315110205 (сод. 97,5%) производства Shandong Qilu King-Phar Pharmaceutical Co. Ltd. (КНР),
- полисахарид арабиногалактан (АГ) фармакопейный из лиственницы сибирской *Larix sibirica* / ТУ 9363-021-39094141-08, Иркутский Институт химии СО РАН, серия 02042013/,
- поливинилпирролидон (ПВП) (ФСП 42-0345-4368-03) с молекулярной массой $M_w \sim 12$ кДа.

Твердая дисперсия ивермектина (ТДИ) была получена путем его совместной механообработки в течение 3-х часов с полимерами (АГ и ПВП) в металлическом барабане (объем 800 мл) при загрузке компонентов в следующих количествах (3 г ИВМ, 73.5 г ПВП и 73.5 г АГ) с добавлением 2000 г металлических шаров (диаметр 15–22 мм) на шаровой мельнице LE-101.

Объектом исследования были лабораторные животные, которые содержались в виварии ВНИИП – филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986), стандартная диета для подопытных животных (ГОСТ

Р 50258-92) и согласно руководству («Лабораторные животные», 2003). Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики (GLP; Приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003 г.), карантин (акклиматизационный период) – в течение 14 суток.

С целью исследования фармацевтической безопасности ТДИ проведены исследования общетоксического действия, острой накожной токсичности, раздражающих действий, влияния препарата на слизистую оболочку глаза. Исследования проведены на белых беспородных крысах в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России от 26 августа 2010 г. № 750н и руководств по экспериментальному (доклиническому) изучению лекарственных средств и новых фармакологических веществ (Миронов А.Н. и совт., 2012) [1, 2].

Острая накожная токсичность. Изучение параметров накожной токсичности препарата (ТДИ) проводили на 12 крысах массой 220-250 гр. На каждую дозу использовали по 6 беспородных белых крыс—самцов массой 200—250 г. Препарат и субстанцию ИВМ наносили в максимально возможной дозе на выстриженную шерсть в области спины площадью 6х6 см. ТДИ наносили в виде суспензии в 22500 мг/кг по препарату и субстанции 450 мг/кг.

Первичную реакцию кожи оценивали сразу после нанесения, затем через 15 минут, 1, 3, 6, 24, 48 и 72 часа. Наблюдали за возможными признаками воспаления: покраснение, отек, эритема и т.д., руководствуясь «Методическими указаниями к постановке исследований по изучению раздражающих свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций избирательно действующих раздражающих веществ в воздухе и рабочей зоне», 1980.

Первой подопытной группе животных на выстриженную часть кожи, нанесли смоченную в воде ТДИ в максимальной дозе 22500 мг/кг по препарату, а контрольной группе воду без препарата.

Возможное проявление интоксикации оценивали в течение двух недель, учитывая при этом общее клиническое состояние и поведение животных, прием корма и воды.

В опыте по определению параметров острой токсичности препаратов при нанесении на кожу также оценивали их раздражающее действие. Первичную реакцию кожи оценивали сразу же после нанесения препаратов, далее через 1; 2; 24; 48 и 72 часа. О болезненности судили по поведению и реакции животных при пальпации места нанесения.

Оценку местно-раздражающего действия препарата при аппликации на кожу проводили, учитывая появление эритемы, отечность (увеличение

толщины кожной складки), образование корок и трещин, выпадение волос, пигментацию, образование язв и т.п., а функциональное состояние кожи проводили с помощью шкалы кожных проб по С.В. Суворову.

Местно-раздражающие действия ТДИ и субстанции ИВМ проводили на 12 крысах живой массой по 260 г. На выстриженную область спины, площадью 6х6 см, острым концом инъекционной иглы наносили продольные царапины и затем наносили препараты в тех же дозах, как и при острой накожной токсичности.

Первичную реакцию кожи оценивали сразу после нанесения препаратов и до 72 часов.

Раздражающее действие препарата на слизистую глаза проводили на 6 крысах массой 220–250 гр. Препарат обильно наносили однократно в конъюнктивный мешок глаза крысы, затем на 1 минуту прижимали слезно-носовой канал у внутреннего угла глаза. В течение месяца проводили наблюдение за прозрачностью роговицы и состоянием слизистой оболочки глаза с целью выявления возможной гиперемии и отека слизистой оболочки глаз, повреждение сосудов склеры и роговицы.

Оценку раздражающего действия по степени гиперемии и отека, а также количеству выделений проводили по балльной системе А. Majda и К. Chuscielska. Гиперемия конъюнктивы и роговицы оценивалась по следующим признакам: сосуды инъецированы — 1 балл; отдельные сосуды трудно различимы — 2 балла; диффузное глубокое покраснение — 3 балла. Степень отека век оценивалась по его выраженности: слабый отек — 1 балл; выраженный отек с частичным выворачиванием век — 2 балла; закрытие глаза наполовину — 3 балла; закрытие глаза больше, чем наполовину, — 4 балла. Количество выделений: минимальное количество в углу глаза — 1 балл, количество выделений увлажняет веки — 2 балла; количество выделений увлажняет веки и окружающую кожу — 3 балла.

Результаты исследований. В результате проведенного изучения параметров острой накожной токсичности клинического осмотра животных опытных групп признаков интоксикации не выявлено на протяжении 14 суток наблюдений. Общее состояние крыс было удовлетворительным, изменений в поведении не отмечено, аппетит и жажда не были изменены, судороги не наблюдались; координация движений не была нарушена; тонус скелетных мышц соответствовал норме; реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители была адекватной; окраска видимых слизистых оболочек соответствовала норме; частота и глубина дыхательных движений, а также ритм сердечных сокращений не были изменены.

Полученные нами результаты изучения острой накожной токсичности субстанции ИВМ и ТДИ представлены в табл. 1.

Таблица 1

Изучение параметров острой накожной токсичности

Препарат	Доза, мг/кг по препарату	Кол-во животных в группе	Число выживших/погибших животных в группе
Субстанция ИВМ	450	6	6/0
ТДИ	22500	6	6/0

В результате доза 22500 мг/кг оказалась максимально возможной для аппликации на кожу крысам. Таким образом, LD₅₀ исследуемого препарата превышает испытанную дозу. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

При изучении местно-раздражающие действия ТДИ было отмечено, что целостность здорового кожного покрова и с другой стороны, где наносили царапины не была нарушена, эластичность сохранена, гиперемия отсутствовала, через месяц выстриженный шерстный покров восстановился, что дало основание утверждать об отсутствии раздражающих свойств супрамолекулярного комплекса ивермектина при однократном нанесении на кожу.

Таблица 2

Раздражающее действие ТДИ на кожу

Критерии оценки раздражающего действия на кожу	Наличие или отсутствие (+/-)
эритема	-
увеличение кожной складки	-
нарушения целостности (трещины, изъязвления)	-
температура кожи	норма

В результате изучения раздражающего действия на слизистую оболочку глаза в течение 3 часов после интраконъюнктивального введения препарата у всех 6 крыс не наблюдали гиперемии конъюнктивы правого глаза, соответствующая 1 баллу по шкале A. Majda, K. Chrusaielska. Признаков раздражающего действия препарата не обнаружено — глаза животных сохраняли нормальный вид, отека век и выделения из глаз не наблюдали. Через сутки после введения какие-либо патологические изменения слизистой оболочки отсутствовали.

Наблюдения проводились в течение месяца. Таким образом, можно утверждать, что препарат оказывает умеренное местно-раздражающее действие на глаза животных, оцениваемое в 1 балл.

Заключение. Изучение параметров накожной токсичности на крысах, доза 22500 мг/кг оказалась максимально возможной для аппликации на кожу крысам. Таким образом, LD₅₀ исследуемого препарата превышает испытанную дозу. Согласно ГОСТ 12.1.007-76 препарат относится к 4 классу опасности (вещества малоопасные).

При изучении местно-раздражающего действия комплекса ивермектина на кожу было отмечено, что целостность здорового кожного покрова с другой стороны, где наносили царапины не была нарушена, эластичность сохранена, гиперемия отсутствовала, через месяц выстриженный шерстный покров восстановился, что дало основание утверждать об отсутствии раздражающих свойств супрамолекулярного комплекса ивермектина при однократном нанесении на кожу.

В результате изучения раздражающего действия на слизистую оболочку глаза после интраконъюнктивального введения препарата у всех подопытных крыс не наблюдали гиперемии конъюнктивы. Таким образом, можно утверждать, что препарат оказывает умеренное местно-раздражающее действие на глаза животных, оцениваемое в 1 балл.

Литература

1. Методические рекомендации по доклиническому изучению антигельминтной активности лекарственных средств / Б.А. Астафьев, М.Н. Лебедева, Ф.П. Коваленко и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. С. 603–623.
2. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В. Березовская, О.Л. Верстакова и др. // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012. Ч. 1. С. 13–50.

References

1. Methodical recommendations on preclinical study of anthelmintic activity of drugs / B.A. Astafiev, M.N. Lebedeva, F.P. Kovalenko et al. // Guide to preclinical studies of drugs / ed. Mironova A.N.: Grif and K, 2012. Part 1. P. 603–623. (In Russ.)
2. Guidelines for the study of general toxic effects of drugs / E.V. Arzamastsev, I.V. Berezovskaya, O.L. Verstakova et al. // Guidelines for pre-clinical trials of drugs / ed. Mironova A.N. M.: Grif and K, 2012. Part 1. P. 13–50. (In Russ.)