

УДК 615.32:616-03.9

DOI: 10.14427/jipai.2016.2.61

## Изучение аллергизирующего и местно-раздражающего действия препарата «Эферол, спрей»

М.А. Романова<sup>1</sup>, А.К. Даиров<sup>1</sup>, Р.Б. Сейдахметова<sup>1</sup>, В.С. Шнаушшта<sup>2</sup>, С.М. Адекенов<sup>1</sup><sup>1</sup> АО «Международный научно – производственный холдинг «Фитохимия», г. Караганда, Республика Казахстан<sup>2</sup> Испытательный Центр РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗСР РК, г. Алматы, Республика Казахстан

## Study of allergenic and locally irritant action of preparation “Eferol, spray”

M.A. Romanova<sup>1</sup>, A.K. Dairov<sup>1</sup>, R.B. Seidakhmetova<sup>1</sup>, V.S. Shnaukshta<sup>2</sup>, S.M. Adekenov<sup>1</sup><sup>1</sup> Joint-stock company “International research and production holding “Phytochemistry”, Karaganda, Republic of Kazakhstan<sup>2</sup> Test Center “National center of examination of medicines, medical devices and medical equipment”, Almaty, Republic of Kazakhstan

### Аннотация

*Целью* настоящего исследования явилось изучение аллергизирующего и местно-раздражающего действия препарата «Эферол, спрей».

*Методы.* Возможное аллергизирующее и местно-раздражающее действие изучали, используя метод накожных аппликаций, на модели «реакция общей анафилаксии (анафилактический шок)», на модели «конъюнктивальная проба», а также используя тест непрямого дегрануляции тучных клеток.

*Результаты.* Отмечено наличие у изучаемого препарата «Эферол, спрей» определенного аллергенного потенциала, выявленного при изучении аллергизирующего действия на модели «реакция общей анафилаксии». Обнаружена способность изучаемого препарата индуцировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа при многократном энтеральном введении. Препарат «Эферол, спрей» не обладает кожно-сенсibiliзирующей активностью при исследовании методом накожных аппликаций и конъюнктивальной пробы.

### Ключевые слова

Доклинические исследования, аллергизирующее действие, «Эферол, спрей», местно-раздражающее действие

### Summary

*The aim* of this study was a research of the allergenic and locally irritating effect of the drug "Eferol spray".

*Methods.* Possible allergenic and locally irritating effect was studied using the method of skin application, on the model of "general anaphylaxis reaction (anaphylactic shock)", on the model of "conjunctival sample", as well as using indirect test degranulation of mast cells.

*Results.* It was noted the presence of study drug "Eferol, spray" certain allergenic potential, identified in the study of allergenic effect on the model of "general anaphylaxis reaction". It was found the ability of the researched drug to induce delayed hypersensitivity reaction with repeated enteral introduction. The drug "Eferol spray" does not have skin sensibility activity in the study by cutaneous applications and conjunctival samples.

### Keywords

Preclinical studies, allergenic action, “Eferol, spray”, locally irritant action

### Введение

Одним из направлений фармацевтической науки в условиях возрастающих требований к качеству и безопасности лекарств является создание лекарственных форм с хорошим терапев-

тическим и низким токсическим, аллергенным и раздражающим эффектом [1].

К возможным побочным эффектам, возникающим при применении лекарственных средств, относится формирование состояния гиперчув-

ствительности к какому-либо веществу, входящему в состав препарата [2]. В связи с этим, актуальной задачей является изучение местно-раздражающего и аллергизирующего действия препарата «Эферол, спрей».

В общую программу изучения безвредности новых лекарственных препаратов входит выявление у них аллергизирующего действия [3].

Целью настоящего исследования явилось изучение аллергизирующего и местно-раздражающего действия препарата «Эферол, спрей».

Спрей представляет собой часто употребляемую форму выпуска фармацевтического продукта. Данная лекарственная форма, раствор на основе эфирного масла полыни гладкой, предназначена для обеспечения местного и системного эффекта [4].

Основным компонентом препарата «Эферол, спрей» является эфирное масло полыни гладкой (*Artemisia glabella* Kar. et Kir.). В ходе скрининговых исследований выявлено, что эфирное масло полыни гладкой обладает противовоспалительной активностью, слабыми раздражающими свойствами и является малотоксичным [5]. Наличие антибактериального, противогрибкового и противовирусного действия эфирного масла полыни гладкой позволяет использовать его в качестве потенциального средства для лечения патологии дыхательных путей [6]. Ранее проведенными токсикологическими исследованиями было установлено, что препарат «Эферол, спрей» малотоксичен [7].

### Материалы и методы

Объектом исследования явился препарат «Эферол, спрей», разработанный в Международном научно-производственном холдинге «Фитохимия», г. Караганда. В состав препарата «Эферол, спрей» входит активное вещество эфирное масло полыни гладкой (2 г), а также вспомогательные вещества: кремафор RH-40 (4 г), пропиленгликоль – 1,2 (4 г), вода очищенная (30 г). Препарат выпускается в виде лекарственной формы – спрей.

Возможное аллергизирующее и местно-раздражающее действие изучали, используя метод накожных аппликаций [8], на модели «реакция общей анафилаксии (анафилактический шок)», на модели «конъюнктивальная проба», а также используя тест непрямой дегрануляции тучных клеток [9].

### Метод накожных аппликаций

В исследовании использованы беспородные лабораторные морские свинки массой 600-700 г,

полученные из вивария лабораторных животных АО «МНПХ «Фитохимия». Животные были разделены на 2 группы, по 10 особей в каждой. Животным первой группы наносился препарат «Эферол, спрей», животным второй группы наносили такой же объём дистиллированной воды. Животным была проведена сенсibilизация путем 10 повторных накожных аппликаций на участок боковой поверхности туловища размером 2x2 см. Исследуемый препарат «Эферол, спрей» наносили равномерным слоем в количестве 3 капель на весь участок аппликации с помощью глазной пипетки. Реакцию кожи оценивали ежедневно, через 5 и 10 аппликаций по шкале оценки кожных проб.

Критерием сенсibilизации служили кожные проявления, оценка которых проводилась в баллах по шкале: 0 баллов – видимой реакции нет; 1 балл – очаговая эритема по всему участку и по его периферии; 2 балла – сплошное бледно-розовое пятно или сливающаяся очаговая эритема (красные пятна на розовом фоне); 3 балла – красная эритема по всему участку; 4 балла – инфильтрация и отек кожи; 5 баллов – эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления.

### Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок)

В исследовании использованы беспородные лабораторные морские свинки массой 500-800 г, полученные из вивария лабораторных животных АО «МНПХ «Фитохимия». Животные были разделены на 2 группы, по 10 особей в каждой.

Морским свинкам вводили исследуемый препарат в эффективной терапевтической дозе. Схема сенсibilизации следующая: первая инъекция подкожно, две последующие внутримышечно через день в область бедра, из расчёта 1 мл/кг массы.

Разрешающая инъекция – внутрисердечно на 14-21 дни после сенсibilизирующей инъекции. Разрешающая доза должна быть равна суммарной сенсibilизирующей дозе. Разрешающая инъекция на 14-21 дни вводится также и контрольной группе животных, которым вводили только растворитель.

Учет интенсивности анафилактического шока (в индексах по Weigle):

++++ – шок со смертельным исходом;

+++ – шок тяжелой степени (общие судороги, асфиксия, животное теряет способность удерживаться на лапах, падает на бок, не погибает);

++ – шок умеренный (небольшие судороги, выраженные явления бронхоспазма);

+ – шок слабый (некоторое беспокойство, учащенное дыхание, почесывание мордочки, непроизвольное мочеиспускание, дефекация, шерсть взъерошена);

0 – шок не развился, признаки его отсутствуют.

Вычисление анафилактического индекса по Weigle проводится по формуле:

$$(N_4 \times 4) + (N_1 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 1) + (N_4 \times 0) / N + N_1 + N_2 + N_3 + N_4,$$

где: N – число морских свинок, у которых наступила смерть; N<sub>1</sub> – число морских свинок, у которых развился тяжелый шок; N<sub>2</sub> – число морских свинок, у которых развился умеренный шок; N<sub>3</sub> – число морских свинок, у которых развился слабый шок; N<sub>4</sub> – морские свинки, у которых шок не наступил.

При гибели всех животных в группе индекс Weigle составлял 4 (++++). При тяжелом шоке – 3 (+++), при умеренном шоке – 2 (++) , при слабом шоке – 1 (+), при отсутствии анафилактических реакций у морских свинок – индекс будет равен 0.

#### Конъюнктивальная проба

Данный эксперимент проводили на морских свинках. Сенсibilизацию животных осуществляли в соответствии с клиническим способом введения тестируемого препарата в течение 30 дней. Введение препарата «Эферол, спрей» осуществляли внутрижелудочно в дозе 1/100 от ЛД<sub>100</sub>. Доза была выбрана на основании ранее проведенных доклинических исследований и составила 0,5 мл.

Через 24 часа после последнего введения испытуемого образца всем животным была проведена конъюнктивальная проба. Для этого под верхнее веко правого глаза животного вводили по одной капле препарата, смешанного с дистиллированной водой в соотношении 1:10. Левый глаз служил контролем (вводили аналогичное количество дистиллированной воды).

Реакцию учитывали через 15 мин (быстрая реакция), 24 ч и 48 ч (гиперчувствительность замедленного типа). Оценивали по следующей шкале (в баллах):

1 – легкое покраснение слезного протока;

2 – покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;

3 – покраснение всей конъюнктивы и склеры.

На протяжении эксперимента регистрировали изменения общего состояния, двигательной активности, массы тела животных, состояние шерстного и кожного покровов, а также их поведенческие реакции.

#### Тест непрямой дегрануляции тучных клеток

Эксперимент проводили на белых нелинейных сенсibilизированных крысах. Сенсibilизацию проводили в течение 30 дней путем внутрижелудочного введения испытуемого образца в дозе 0,3 мл. В тесте использовали тучные клетки перитонеальной жидкости, сыворотку сенсibilизируемого животного и исследуемый препарат. Для получения тучных клеток животное декапитировали, далее вводили внутрибрюшинно 5-8 мл подогретого до 37° С раствора Тироде без глюкозы. После легкого массажа в течение 15 мин брюшной стенки, делали разрез ножницами до средней линии, длиной 1,5-2 см и собирали экссудат в смоченную гепарином пробирку. Препараты готовили на обезжиренных предметных стеклах, окрашенных 0,3% спиртовым раствором нейтрального красного и высушенных при комнатной температуре.

К 0,03 мл взвеси тучных клеток добавляли 0,03 мл сыворотки сенсibilизированного животного и 0,03 мл испытуемого образца.

Далее препараты покрывали покровным стеклом, края которого смазывали вазелином и инкубировали 15 мин в термостате при 37°С. Оценку результатов проводили дифференциальным способом учета, подсчитывая показатель дегрануляции тучных клеток (ПДТК) по формуле:

$$\text{ПДТК} = \frac{1a + 2b + 3c + 3d}{100},$$

где: a, b, c, d – количество (среднее из трех повторений) дегранулированных клеток соответственно степени дегрануляции (слабо выраженной, умеренной, резкой и степени полностью дегранулированных клеток). В каждой камере подсчитывают 100 клеток. Реакцию считали положительной, если ПДТК превышал 0,2.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакета программ «Statistica 6.0». Использовали критерии Стьюдента и Вилкоксона-Манна-Уитни. Различия считались достоверными при p < 0,05.

#### Результаты и их обсуждение

Проведенные исследования показали, что при изучении алергизирующего действия препарата «Эферол, спрей» у всех подопытных животных во все сроки наблюдения общее состояние было стабильным – они умеренно подвижны, пищевая активность не нарушена. Температура тела значительно не изменялась по окончании опыта у животных во всех группах и соответствовала исходным данным.

### Метод накожных аппликаций

При накожном тестировании на 5-й и 10-й день опыта после нанесения препарата «Эферол, спрей» явлений раздражения, эритемы, инфильтрации, очаговых изъязвлений или шелушения кожи не отмечалось. Кожа сохраняла естественную окраску, состояние животных в опытной группе не отличалось от контрольной (интактные животные) (табл. 1).

При исследовании сенсibiliзирующего действия установлено, что многократное нанесение испытуемого препарата не вызывало патологических изменений кожных покровов в виде эритемы, отека и др.

Реакция оценена по шкале в баллах: 0 – видимой реакции нет, т.е. отрицательная кожная реакция.

Таким образом, опасность сенсibiliзации препаратом «Эферол, спрей» через неповрежденную кожу маловероятна.

### Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок)

После введения препарата «Эферол, спрей» внутрисердечно у животных наблюдалось: некоторое беспокойство, учащенное дыхание, почесывание мордочки, непроизвольное мочеиспускание, дефекация, судороги, асфиксия, животные теряли способность удерживаться на лапах, падали на бок.

У некоторых животных после введение препарата «Эферол, спрей» регистрировался шок со смертельным исходом (табл. 2).

**Таблица 1. Данные сенсibiliзации при воздействии препарата «Эферол, спрей» на модели кожных аппликаций**

| Группа        | Количество аппликаций | Количество животных с положительной реакцией | Баллы реакции |
|---------------|-----------------------|--|---------------|
| Эферол, спрей | 10                    | 0/0  | 0/0           |
| Контроль      | 10                    | 0/0  | 0/0           |

Примечание: в числителе указано наличие эритемы, в знаменателе – отек

**Таблица 2. Учет интенсивности анафилактического шока вызванного препаратом «Эферол, спрей» в индексах по Weigle**

| Регистрируемые показатели  | Контрольная группа |                        | Эферол, спрей   |                        |
|--|--------------------|------------------------|-----------------|------------------------|
|  | Номер животного    | Показатель регистрации | Номер животного | Показатель регистрации |
| ++++ - шок со смертельным исходом;   | 1.                 | ++++                   | 1.              | ++++                   |
|  | 2.                 | ++                     | 2.              | +                      |
| +++ - шок тяжелой степени (общие судороги, асфиксия, животное теряет способность удерживаться на лапах, падает на бок, не погибает);           | 3.                 | 0                      | 3.              | 0                      |
|  | 4.                 | 0                      | 4.              | ++                     |
|  | 5.                 | 0                      | 5.              | 0                      |
|  | 6.                 | +                      | 6.              | +                      |
| ++ - шок умеренный (небольшие судороги, выраженные явления бронхоспазма);  | 7.                 | ++++                   | 7.              | ++++                   |
|  | 8.                 | 0                      | 8.              | 0                      |
| + - шок слабый (некоторое беспокойство, учащенное дыхание, почесывание мордочки, непроизвольное мочеиспускание, дефекация, шерсть взъерошена); | 9.                 | 0                      | 9.              | +                      |
|  | 10.                | +++                    | 10.             | ++++                   |
| 0 – шок не развился, признаки отсутствуют  |                    |                        |                 |                        |

Симптомы продолжительные (10-20 минуты) после чего выжившие животные возвращались к естественному состоянию. Животные, оставшиеся в живых, не отказывались от приема пищи и потребления воды. У животных контрольной группы наблюдается прирост массы, в группе эффективная терапевтическая доза наблюдалось незначительное снижение массы тела.

Учет интенсивности анафилактического шока производился в индексах по Weigle (табл. 3).

По оценке общей анафилактической реакции животных выявлено развитие реакции анафилаксии различной степени тяжести у животных после введения препарата «Эферол, спрей». Индекс реакции по Weigle у контрольной группы животных составил 1,27 (у 2 свинок из 10 – гибель, у 1 – тяжелый шок, у 1 – умеренный шок, у 1 – слабый шок, у 5-х – шок не развился). При внутрисердечном введении препарата группе – «Эферол, спрей», индекс реакции по Weigle составил 1,89 (3 из 10 морские свинки погибли, у 1 – умеренный шок, у 1 – развился слабый шок, у 2-х – шок не развился).

#### Конъюнктивальная проба

При однократной инстилляцией испытуемого препарата «Эферол, спрей» показатели состояния роговицы и радужной оболочки сохранялись на

исходном физиологическом уровне, как у сенсibilизированных, так и у контрольных животных. Суммарная реакция в комплексе «роговица + радужка + конъюнктив» отсутствовала во всех экспериментальных группах (табл. 4).

Анализ результатов местной реакции показал, что не было отмечено каких-либо изменений слизистой оболочки и склеры глаз в обеих группах экспериментальных животных.

#### Тест непрямо́й дегрануляции тучных клеток

Результаты исследования теста непрямо́й дегрануляции тучных клеток экспериментальных крыс представлены в таблице 5. Тест был проведен на крысах после сенсibilизации в течение 30 дней. Полученные показатели дегрануляции тучных клеток крыс в присутствии опытных и контрольных сывороток препарата «Эферол, спрей» или физиологического раствора в контроле представлены в таблице (табл. 5).

Отмечено некоторое повышение показателя реакции дегрануляции тучных клеток крыс, свидетельствующее о накоплении реактивных антител, выявляемых в данной реакции.

#### Заключение

Таким образом, следует отметить наличие у изучаемого препарата «Эферол, спрей» опре-

**Таблица 3. Влияние препарата «Эферол, спрей» на интенсивность анафилактического шока у морских свинок**

| Группы        | Число животных в группе | Индекс реакции по Weigle |
|---------------|-------------------------|--------------------------|
| Контроль      | 10                      | 1,27 ± 0,7               |
| Эферол, спрей | 10                      | 1,89 ± 0,1               |

**Таблица 4. Конъюнктивальная реакция при введении препарата «Эферол, спрей»**

| Сроки после однократной инстилляцией препарата «Эферол, спрей» | Баллы по системе классификации повреждения глаза |                          |                       |                          |
|--|--|--------------------------|-----------------------|--------------------------|
|  | Контрольная группа                               |                          | Эферол, спрей         |                          |
|  | Опытный глаз (правый)                            | Контрольный глаз (левый) | Опытный глаз (правый) | Контрольный глаз (левый) |
| 0 часов  | 0  | 0                        | 0                     | 0                        |
| 1 час  | 0  | 0                        | 0                     | 0                        |
| 24 часа  | 0  | 0                        | 0                     | 0                        |
| 48 часов   | 0  | 0                        | 0                     | 0                        |
| 72 часа  | 0  | 0                        | 0                     | 0                        |

**Таблица 5. Средние показатели дегрануляции тучных клеток в присутствии сывороток крыс, получавших препарат «Эферол, спрей»**

| Группы животных | Показатель дегрануляции тучных клеток |
|-----------------|---------------------------------------|
| Контрольная     | 0,14 ± 0,02 (P>0,05)                  |
| Эферол, спрей   | 0,20 ± 0,06 (P>0,05)                  |

деленного аллергенного потенциала, выявленного при реакции общей анафилаксии. Также обнаружена способность изучаемого препарата индуцировать реакцию гиперчувствительности замедленного типа при многократном

энтеральном введении. Вместе с тем препарат «Эферол, спрей» не обладает кожно-сенсibiliзирующей активностью при исследовании методом накожных аппликаций и конъюнктивальной пробы.

## Литература

1. Захматова Е.Ю., Насыбуллина Н.М., Залялютдинова Л.Н., и соавт. Изучение раздражающего и сенсibiliзирующего действия лекарственной формы для наружного применения. Успехи современного естествознания. 2005; 10: 56.
2. Денисов А.А. Изучение алергизирующего действия субстанции и лекарственных форм препарата «Киллевир». М.: научно-исследовательский центр токсикологии и гигиенической регламентации. 2005; 21.
3. Стрилец О.П. Изучение безвредности нового комбинированного гипотензивного препарата. Украинский биофармацевтический журнал. 2009; 5: 47.
4. Сейдахметова Р., Пак Р.Н., Сулейменов Е.М. Химический состав и биологическая активность полыни гладкой. Химио-фармацевтический журнал. 2002; 3: 27-30.
5. Саранчин А.В., Арыстан Л.И., Ли Е.А. Отчет о научно – исследовательской работе по проекту: «Фармакологические исследования новых лекарственных форм оригинальных фитопрепаратов». К. 2014: 13-23.
6. Терешкина О.И. Спрей: определение понятия. Фармация. 2006; 5: 41–43.
7. Сейдахметова Р.Б., Пак Р.Н., Рахимов К.Д. Эферол – средство для лечения патологии дыхательных путей. М.: Фундаментальные проблемы фармакологии. 2003: 148.
8. Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. и соавт. Методические рекомендации по оценке алергенных свойств фармакологических средств. М.: 1988: 19.
9. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: методические рекомендации. М.: Медицина, 2005: 56-65.

## Сведения об авторах:

Романова Мария Андреевна – младший научный сотрудник экспериментальной и клинической фармакологии, АО «МНПХ «Фитохимия».

Даиров Айдар Куанышбекович – младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии, АО «МНПХ «Фитохимия».

Сейдахметова Роза Батталовна – кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии, АО «МНПХ «Фитохимия».

Шнаушта Валентина Станиславовна – кандидат биологических наук, заведующий лабораторией фармакологических испытаний, Испытательный Центр РГП на ПХВ «Национальный центр экспертизы лекарственных средств, изделий медицинского назначения и медицинской техники» МЗСР РК.

Адекенов Сергазы Мынжасарович – академик НАН РК, доктор химических наук, профессор, АО «МНПХ «Фитохимия».

АО «МНПХ «Фитохимия», г. Караганда, 100009, ул. Газалиева 4, e-mail: phyto\_pio@mail.ru , 8 (7212) 43-31-27.