

Безопасность препарата «Рибафлоркс» при применении крысам в рекомендуемой, пятикратной и десятикратной дозе

Н.В. Данилевская (danylevskaya_n_v@mail.ru), А.А. Дельцов (deltsov-81@mail.ru),
А.А. Антипов (antipov-19.83@mail.ru)

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии имени К.И. Скрябина» (ФГБОУ ВПО МГАВМиБ) (Москва).

В статье описаны исследования по определению безопасности нового комбинированного лекарственного препарата «Рибафлоркс», в состав которого входит противовирусный компонент Рибавирин и компонент с широким противомикробным спектром Энрофлоксацин. Изучено влияние препарата на организм лабораторных животных при введении в терапевтической, пятикратной и десятикратной дозе.

Ключевые слова: безопасность, лекарственное средство, противомикробные средства, Рибафлоркс, токсичность

Сокращения: ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота, МТ — масса тела, РНК — рибонуклеиновая кислота, ГТФ — guanosine triphosphate (гуанозинтрифосфат), MRSP — methicillin-resistant *Staphylococcus pseudointermedius* (метициллин резистентные штаммы *Staphylococcus pseudointermedius*)

Введение

Ветеринарные врачи, работающие с домашними животными, хорошо знают, что заболевания, вызванные или осложненные инфекционными агентами, широко распространены. Их фармакокоррекция продолжает оставаться сложной проблемой в ветеринарной медицине, несмотря на обилие доступных противомикробных препаратов. Назначаемый препарат должен быть не только высоко активен в отношении возбудителей, но и безопасен для здоровья пациента.

Актуальность разработки способов фармакокоррекции заболеваний инфекционной этиологии обусловлена сложностью эпизоотической обстановки. Что касается мелких домашних животных, возникновению подобных заболеваний способствует обилие контактов, особенно в крупных мегаполисах, частые транспортировки, участие в выставках и т. д. С другой стороны, возросла токсическая нагрузка, действуют неблагоприятные факторы окружающей среды, стрессы. Это сочетается с дефектами физиологии в результате индивидуальных или породных генетических особенностей, в том числе последствий близкородственного скрещивания. Изменившийся к худшему физиологический статус привел к появлению большого количества низко резистентных особей с нарушенной активностью иммунной системы. При пассажах на таком поголовье возбудители заболеваний повышают вирулентность [2, 3].

В последнее время и в нашей стране, и за рубежом у мелких домашних и продуктивных домашних животных регистрируют рост патологий, вызванных ассоциациями микроорганизмов и вирусов. Известно, что вирус, поражая клетки эпителия в различных биотопах,

открывает ворота инфекции, способствует адгезии микроорганизмов и их размножению. Таким образом, бактериальная инфекция обычно осложняет и усугубляет тяжесть патофизиологических изменений, часто приводя к летальному исходу.

Так, вирусные инфекции респираторного тракта приводят к инвазии в результате нарушения защитных свойств слизистой оболочки в дыхательные пути таких возбудителей, как *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, микоплазмы. При вирусных заболеваниях пищеварительного тракта в качестве бактериальных возбудителей, осложняющих течение заболеваний и во многом определяющих летальность, выделяют патогенные эшерихии, сальмонеллы, стафилококки [3]. Практикующие врачи знают, что при лечении мелких домашних животных большую проблему представляют парвовирусные энтериты и перитониты, осложненные протейной инфекцией.

Характерной особенностью течения ассоциированных вирусно-бактериальных инфекций является не только усиление основных симптомов и клинических признаков заболеваний в зависимости от локализации патологического процесса, породы, возраста, физиологического состояния животных. Среди прочих осложнений все большее значение приобретает развитие инфекционно-аллергического синдрома. Он опасен как внешними проявлениями, так и вовлечением внутренних органов с аллергическим поражением суставов, астматическим компонентом, почечными и кардиальными симптомами (миокардиты и перикардиты). Именно ассоциированные инфекции с участием стрептококков и других возбудителей часто приводят к последующим ревматоидным артритам, нефритам, аутоиммунным поражениям различных внутренних органов. Следует помнить, что больное животное, даже если клинические признаки проявляются в стертой форме или латентно, — это источник дальнейшего распространения инфекции [2, 3].

Большую опасность представляет зооантропонозный потенциал многих возбудителей. К примеру, многочисленные исследования, проведенные в разных странах, показали, что среди владельцев собак с атопическим

дерматитом, инфицированными хирургическими ранами и другой патологией, а также у сотрудников ветеринарных клиник, постоянно контактирующих с такими пациентами, выявляется как постоянное, так и временное носительство *Staphylococcus pseudintermedius* [6...9]. Наблюдения свидетельствуют о возможности передачи данного возбудителя от людей к собакам и наоборот. Чаще это приводит к временному носительству (возможно, на слизистой оболочке носа, в слюне, зубном налете), но в некоторых случаях были отмечены процессы развития инфекции, сложно поддающейся лечению. Однако основная опасность в том, что это является существенным фактором распространения антибиотикорезистентности. Например, MRSP в настоящее время рассматривают как потенциальный источник мобильных детерминант устойчивости стафилококков, обитающих на коже и слизистых, к антибиотикам. Так, клон MRSP, преобладающий в Европе, по данным литературы, чувствителен в настоящее время только к нескольким новейшим препаратам, ни один из которых не имеет Государственной регистрации и не применялся для системного лечения мелких домашних животных [5].

Таким образом, наряду со специфической профилактикой и ветеринарно-санитарными мероприятиями по-прежнему одно из ведущих мест должно отводиться поиску эффективных средств, причем обладающих как антибактериальной, так и противовирусной активностью. В этом случае при своевременном начале лечения эффект синергизма может обеспечить комплексность воздействий и лучший результат при доминирующих в последнее время ассоциированных инфекциях.

Одним из новых комбинированных препаратов с подобными фармакологическими свойствами является «Рибафлор», включающий противовирусный компонент **Рибавирин** и компонент с широким противомикробным спектром **Энрофлоксацин** (подавляет рост и развитие грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов в том числе *E. coli*, *Haemophilus* spp., *Klebsiella* spp., *Bordetella* spp., *Clostridium* spp., *Erysipelotrix* spp., *Pasterella* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., *Campylobacter* spp., *Bacteroides* spp., а также *Mycoplasma* spp.).

Рибавирин обладает противовирусной активностью в отношении многих ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Механизм действия связан с тем, что он по структуре сходен с молекулой сахара Д-рибозы, производным которой является. Рибавирин включается в РНК вместо аденина или гуанина и образует комплементарные пары с урацилом и цитозином. Это вызывает мутации в РНК-зависимой репликации вирусов. 5' моно-, ди- и трифосфаты рибавирина ингибируют РНК-зависимые РНК-полимеразы вирусов. То есть являясь антиметаболитом нуклеозидов, рибавирин препятствует репликации геномов РНК-содержащих вирусов. 5'-монофосфат рибавирина ингибирует также клеточную дегидрогеназу монофосфата инозина и снижает внутриклеточную GTP, что может объяснять ингибирование репликации ДНК вируса, но обуславливает и возможную общую цитотоксичность рибавирина.

Фармакокинетическая особенность рибавирина заключается в том, что до 45 % введенной в желудочно-

кишечный тракт дозы легко абсорбируется, а в сочетании с жирной пищей всасывание увеличивается до 75 %. Существуют и инъекционные формы препарата. Рибавирин быстро проникает внутрь инфицированных вирусом клеток. Там он легко фосфорилируется аденозинкиназой до моно-, ди- и трифосфатного метаболитов и реализует проовирусный механизм действия, селективно ингибируя синтез вирусной РНК или ДНК с последующим нарушением транскрипции вируса, не подавляя синтез нуклеиновых кислот в нормально функционирующих клетках. Это проявляется торможением процесса репликации новых вирионов и снижением вирусной нагрузки.

До трети абсорбированного рибавирина экскретируется с мочой в неизменном виде, остальная часть выделяется с мочой в виде метаболитов в деривозилированной форме 1,2,4-триазол 3-карбоксамид и продукта его гидролиза 1,2,4-триазол 3-карбоксылльной кислоты.

Однако рекомендации по применению химиотерапевтических препаратов должны быть обоснованы соответствующими лабораторными исследованиями. Важным с точки зрения доказательной медицины являются экспериментальные исследования по изучению безвредности фармакологического препарата. Поэтому в доклинических токсикологических исследованиях изучают характер выраженности возможного повреждающего действия на организм экспериментальных животных, препаратов, вводимых в практику ветеринарии, с целью оценки их безопасности.

Цель исследования

Изучить безопасность применения препарата «Рибафлор» в рекомендуемой, пятикратной и десятикратной дозе на крысах.

Материалы и методы

Исследования проведены в ФГБОУ ВПО МГАВМиБ согласно «Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [4] и ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» [1]. Работа с животными проходила в соответствии с общими этическими принципами проведения экспериментов на животных и положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (Страсбург, 2003). Объектом исследования служили белые крысы с МТ 180...195 г, обоего пола, разделенные по принципу пар-аналогов на 4 группы (n=10), первые 3 группы были опытными, 4-я группа служила контролем. Животные содержались в одинаковых условиях вивария. Корм получали в соответствии с рационом для данного вида лабораторных животных. Доступ к воде был свободный. В течение 10 дней до начала исследований животных содержали в карантине.

В экспериментах использовали препарат «Рибафлор». Это комплексный раствор для инъекций, в 1 мл которого содержится 55 мг энрофлоксацина и 25 мг рибавирина. Испытуемый препарат вводили подкожно в рекомендуемой, пятикратной и десятикратной дозе (исчисляли в мг вещества на кг МТ животных):

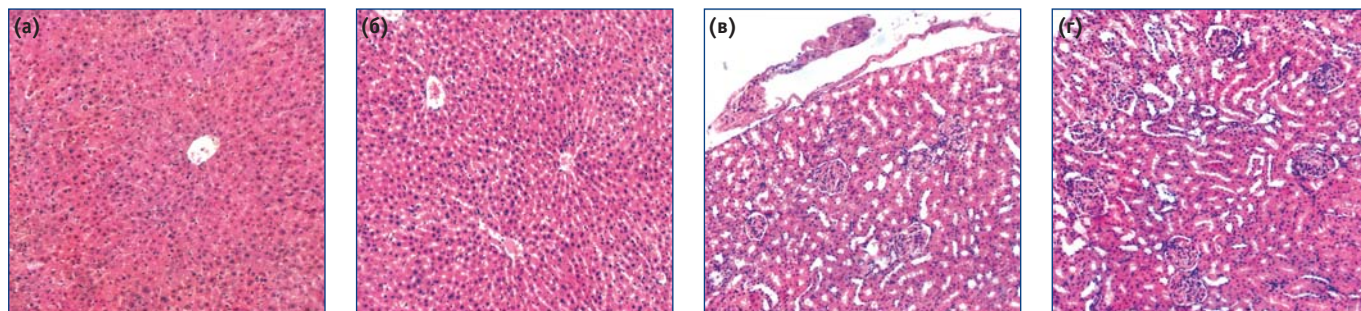


Рис. 1. Гистоархитектоника печени (а, б) и почек (в, г) крыс: контрольной (б, г) и опытной (а, в) группы, получавшей терапевтическую дозу «Рифафлокса». Гематоксилин и эозин, ок. 10, об. 10

- 1-я группа (терапевтическая доза) — 5,5 мг/кг МТ по энрофлоксацину, 2,5 мг/кг МТ по рибавирину;
- 2-я группа — 27,5 мг/кг МТ по энрофлоксацину, 12,5 мг/кг МТ по рибавирину;
- 3-я группа — 55,0 мг/кг МТ по энрофлоксацину, 25,0 мг/кг МТ по рибавирину;
- 4-я группа (контроль) — изотонический раствор натрия хлорида.

За подопытными животными наблюдали в течение 14 дней, причем первый день после введения животные находились под непрерывным наблюдением. Фиксировали общее состояние крыс, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, реакцию на болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, состояние волосяного и кожного покрова, количество и консистенцию фекальных масс, потребление корма и воды. В конце опыта животных подвергали эвтаназии для патолого-анатомического и патогистологического исследования печени и почек.

После извлечения органов в процессе патолого-анатомического вскрытия трупов животных, их фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина, при гистологических исследованиях соблюдали общепринятые методики. Микроскопию полученных гистологических срезов осуществляли при помощи микроскопа ScienOptBP-52 (окуляры 7, 10 и объективы 4, 10 и 40). Фотографировали цифровой камерой-окуляром для микроскопа DCM800 (8000 pixels, USB2.0).

Результаты и обсуждение

Установлено, что при подкожном введении лабораторным животным препарат «Рифафлокс» в рекомендуемой дозе (5,5 мг/кг МТ по энрофлоксацину и 2,5 мг/кг МТ по рибавирину) не вызывает видимых признаков отравления. Животные были подвижны, реагировали на внешние раздражители, шерстный покров гладкий. Нарушений акта дефекации не отмечено. За период наблюдения видимых признаков отклонения и гибели животных не было (табл.).

При введении животным препарата в 5-кратной рекомендуемой дозе (27,5 мг/кг МТ по энрофлоксацину и 12,5 мг/кг МТ по рибавирину) видимых изменений в поведении, приеме корма и воды, акте дефекации и реакции на внешние раздражители также не наблюдали.

У трех лабораторных животных из 10, которым вводили подкожно 10-кратную рекомендуемую дозу пре-

Токсичность «Рифафлокса» при однократном парентеральном введении в рекомендуемой, 5- и 10-кратной дозе (n=10)					
Группа	Доза препарата (мг/кг МТ)		Клинические признаки отравления, гол.	Пало, гол.	Выжило, гол.
	по энрофлоксацину	по рибавирину			
1-я	5,5	2,5	0	0	10
2-я	27,5	12,5	0	0	10
3-я	55,0	25,0	0	0	10
4-я	0	0	0	0	10

парата «Рифафлокс» (55,0 мг/кг МТ по энрофлоксацину и 25,0 мг/кг МТ по рибавирину), сразу после введения и далее на протяжении трех часов отмечали легкое угнетение, снижение подвижности, ослабление реакции на внешние раздражители. В последующем эти животные стали активно двигаться, адекватно реагировать на раздражители, принимать корм и воду, в течение срока наблюдения остались живы и не имели по результатам клинических наблюдений отличий от животных контрольной группы.

При патолого-анатомическом вскрытии на 15-е сутки после инъекции препарата, изменений внутренних органов на макрокартине по сравнению с контрольными особями не отмечено ни в одной из подопытных групп. В том числе не было отмечено анемичности слизистых или кожных покровов даже у крыс, получавших 10-кратную дозу препарата.

При микроскопии печени и почек животных из контрольной и опытной группы, получавшей препарат «Рифафлокс» в рекомендуемой (дозе 5,5 мг/кг МТ по энрофлоксацину и 2,5 мг/кг МТ по рибавирину), установлено, что гистоархитектоника органов не нарушена и характеризуется сходной картиной (рис. 1).

Строма печени в обеих группах представлена тонкими прослойками междольковой и портальной соединительной ткани с проходящими в них сосудами и нервными волокнами. Дольчатость органа выражена, балочное строение сохранено, печеночные балки располагаются на небольшом расстоянии друг от друга. Гепатоциты неправильной полигональной формы, с равномерно окрашенной цитоплазмой; границы между клетками хорошо выражены. Ядра гепатоцитов четко просматриваются, располагаются преимущественно в центре клеток, окрашены слабо базофильно, неравномерно: хроматин в них образует крупнолыбчатые диффузные скопления всей площади ядра. Диаметр центральных и портальных вен не увеличен, просвет их обычно пуст, иногда встречаются отдельные эритроциты, эндотелий плоской формы. Синусные капилляры узкие в контрольной группе и относительно равномерно расширены у животных первой опытной группы, слабо

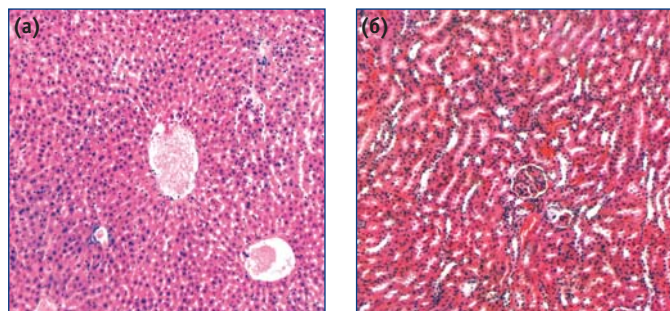


Рис. 2. Гистоархитектоника печени (а) и почек (б) крысы, получавшей пятикратную дозу «Рифафлокса». Гематоксилин и эозин, ок. 10, об. 10

кровенеполнены, как в центральных участках, так и на периферии долек.

Почки с поверхности покрыты относительно толстой хорошо развитой соединительнотканной капсулой. Строма органа слабо развита и хорошо выявляется только вокруг крупных кровеносных сосудов. Клеточных элементов в строме мало. Кортикальное и мозговое вещество ясно дифференцируются, граница между ними неровная. Почечные тельца нефронов округлой формы, приблизительно одинаковые по размеру; состоят из хорошо различимых сосудистых клубочков, просветы капилляров клубочков пусты и содержат лишь небольшое количество эритроцитов. Гломерулярные базальные мембраны не утолщены. Между петлями капилляров видны немногочисленные мезангиальные клетки. Наружная стенка капсулы Боумена–Шумлянского не утолщена, полость капсулы хорошо различима, представляет собой умеренно расширенную щель в форме полумесяца. Проксимальные канальцы, представленные однослойным кубическим каемчатым эпителием, более многочисленны в корковом веществе, имеют больший диаметр, толстую стенку и узкий просвет, что обусловлено высотой клеток и наличием на их апикальном полюсе хорошо развитой щеточной каемки. Границы между клетками хорошо различимы, цитоплазма их оксифильная, окрашена относительно равномерно. Дистальные канальцы, образованные однослойным кубическим и низким призматическим эпителием, меньшего диаметра, имеют тонкую стенку, их клетки — низкие призматические и не имеют щеточной каемки. Форма просвета канальцев — округлая. Границы между клетками хорошо различимы, цитоплазма их оксифильная, бледная, окрашена относительно равномерно. Петли нефрона образованы однослойным плоским эпителием, который имеет бледную оксифильную цитоплазму с очень слабой зернистостью. Собирающие почечные трубочки образованы однослойным кубическим (низкопризматическим) эпителием. Вокруг почечных канальцев располагаются перитубулярные капилляры, стенка их образована уплощенной формы эндотелиоцитами, имеющими темные плоские ядра, без признаков повреждения. Кровенаполнение сосудов слабое.

При введении крысам препарата в 5-кратной дозе (27,5 мг/кг МТ по энрофлоксацину и 12,5 мг/кг МТ по рибавирину), установлено, что гистоархитектоника печени животных незначительно нарушена при сохранении общего гистологического строения органа. Гепатоциты набухшие, с неравномерно окрашенной зер-

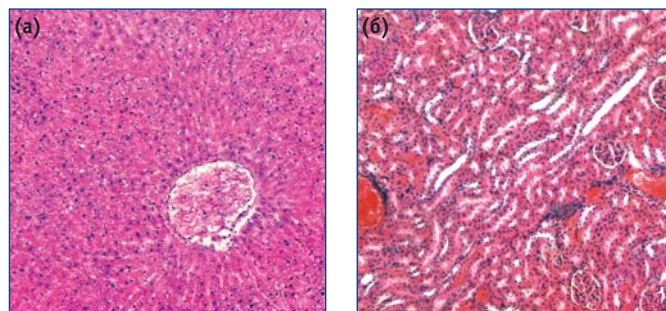


Рис. 3. Гистоархитектоника печени (а) и почек (б) крысы, получавшей десятикратную дозу «Рифафлокса». Гематоксилин и эозин, ок. 10, об. 10

нистой цитоплазмой, границы между клетками плохо выражены. Диаметр центральных и портальных вен незначительно увеличен, просвет их заполнен редко расположенными эритроцитами и однородной белковой массой, окрашенной эозинофильно, а эндотелий имеет плоскую форму. Синусные капилляры неравномерно расширены, наиболее сильное кровенаполнение наблюдается на периферии долек. Найденные микроскопические изменения в печени характерны для слабо выраженной зернистой дистрофии гепатоцитов и гемодинамических расстройств в виде венозной гиперемии (рис. 2а).

Гистоархитектоника почек животных на фоне 5-кратной дозы (27,5 мг/кг МТ по энрофлоксацину и 12,5 мг/кг МТ по рибавирину) также была изменена незначительно (рис. 2б). Границы между нефроцитами проксимальных и дистальных канальцев плохо различимы, цитоплазма их оксифильная, окрашена относительно равномерно, мутная. Кровенаполнение сосудов сильное. Найденные микроскопические изменения в почках характерны для незначительной зернистой дистрофии нефроцитов и гемодинамических расстройств в виде венозной гиперемии (рис. 3б).

При введении животным препарата в 10-кратной дозе (55,0 мг/кг МТ по энрофлоксацину и 25,0 мг/кг МТ по рибавирину) гистоархитектоника печени животных была изменена в большей степени. Гепатоциты резко набухшие, неправильной полигональной формы, с неравномерно окрашенной пенистой или зернистой цитоплазмой, границы между клетками плохо выражены. Отдельные гепатоциты в состоянии некробиоза и некроза. В таких клетках наблюдается кариопикноз и кариорексис. Было отмечено, что диаметр центральных и портальных вен существенно увеличен, просвет их заполнен эритроцитами часто в состоянии агрегации, и однородной белковой массой, окрашенной эозинофильно. Эндотелий сосудов плоской формы. Найденные микроскопические изменения в печени характерны для выраженной зернистой и гидрической дистрофии гепатоцитов, а также венозной гиперемии (рис. 3а).

Гистоархитектоника почек животных также была нарушена. Границы между нефроцитами проксимальных и дистальных канальцев плохо различимы, цитоплазма их оксифильная, окрашена неравномерно, мутная, часто зернистая или пенистая. Петли нефрона образованы однослойным плоским эпителием, который имеет бледную оксифильную цитоплазму с очень слабой зернистостью. Кровенаполнение сосудов очень сильное.

Найденные микроскопические изменения в почках характерны для зернистой и гидропической дистрофии нефроцитов и ярко выраженных гемодинамических расстройств в виде венозной гиперемии (рис. 3б).

Выводы

При подкожном введении лабораторным животным препарата «Рибафлор» в терапевтической дозе не установлено видимых признаков отравления, гибели животных и патолого-анатомических и микроморфологических изменений. При введении в пятикратной и десятикратной дозе, препарат также не вызывает видимых признаков отравления, гибели животных или изменения поведения. Однако, в связи с тем, что при введении в десятикратной дозе установлены микроморфологические изменения во внутренних органах, что также подтверждается и данными литературы, необходимо дальнейшее более глубокое и всестороннее изучение токсичности и эффективности, как на клиническом, так и на доклиническом этапе.

Библиография

1. ГОСТ Р 53434-2009 — Принципы надлежащей лабораторной практики.
2. Данилевская, Н.В. Проблема антибиотикорезистентности на примере лечения сальмонеллеза у домашних голубей / Н.В. Данилевская, Н.В. Пименов //РВЖ.МДЖ. — 2005. — № 4. — С. 21–25.
3. Данилевская, Н.В. Антибактериальная терапия в ветеринарной практике / Н.В. Данилевская, В.В. // Эффективная фармакотерапия в ветеринарии. — 2011. — № 1. — С. 38–43.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина, 2005. — 832 с.
5. Bond, R. Что произошло со Staphylococcus intermedius? Пересмотр таксономической классификации и развитие лекарственной резистентности / R. Bond, A. Loeffler // Journal of Small Animal Practice. Российское издание — 2012. — Т. 3. — №3. — С. 3–5.
6. Guardabassi, L. Transmission of multiple antimicrobial-resistant Staphylococcus intermedius between dogs affected by deep pyoderma and their owners / L. Guardabassi, M.E. Loeber, A. Jackobson // Veterinary Microbiology. — 2004. — N. 8. — P. 23–27.
7. Loeffler, A. Prevalence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus among staff and pets in small animal referral hospital in the UK / A. Loeffler, A.K. Boag, J. Sung, J.A. Lindsay, L. Guardabassi, A. Dilsgaard, H. Smith, K.B. Stevens, D.H. Lloyd // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 2005. — N. 56. — P. 692–697.
8. Stegmann, R. Human infection associated with methicillin-resistant Staphylococcus pseudintermedius ST71 / R. Stegmann, A. Burners, C.A. Maranta, V. Perreten // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. — 2010. — N. 65. — P. 2047–2048.
9. Talan, D.A. Frequency of Staphylococcus intermedius as human nasopharyngeal flora / D.A. Talan, A. Staatz, G.D. Overturf // Journal of Clinical Microbiology. — 1989. — N. 27. — P. 2393.

SUMMARY

N.V. Danylevskaya, A.A. Deltsov, A.A. Antipov.

Moscow state academy of veterinary medicine and biotechnology named after K.I. Skryabin.

Safety of the Preparation «Ribaflox» at Application to Rats in the Recommended, Fivefold and Tenfold Dose.

In article researches on determination of safety of the new combined preparation «Ribaflox» which part the antiviral component Ribavirin and a component with a wide antimicrobic range Enrofloxacin are described. Influence of the preparation on an organism of laboratory animals at introduction in a therapeutic, fivefold and tenfold dose is studied.

Ваш питомец заболел?



Теперь есть верный помощник
ветеринарного врача...

Рибофлоркс – новый высокоэффективный комплексный препарат широкого спектра действия, обладает выраженным противовирусным и антибактериальным свойствами.

Уникальный состав и особенный
механизм действия препарата
помогут вылечить в самые
короткие сроки



Эффективен при:

- ✓ Вирусных инфекциях (ДНК-, РНК-содержащие)
- ✓ Бактериальных заболеваниях (Гр+, Гр-, микоплазмы)
- ✓ Смешанных инфекциях

Эксклюзивный дистрибьютор
ООО «АС-Маркет»
www.as-market.ru

Alp+Vet™

Информация о препарате:
+7-495-727-08-18
raciovet@bk.ru
www.alpovet.com