



Апробация метода оценки фототоксических эффектов лекарственных препаратов в условиях *in vivo*

* В. А. Вавилова¹, Е. В. Шекунова¹, В. А. Кашкин¹, М. Н. Макарова¹, В. Г. Макаров¹, А. Я. Хайменов²

¹ Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,
Российская Федерация, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский район,
г.п. Кузьмолловский, Заводская ул., д. 3, к. 245

² Представительство фирмы «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.» в России,
Российская Федерация, 115035, Москва, Овчинниковская наб., д. 20, стр. 1

Резюме. Фототоксическое действие должно быть оценено для всех лекарственных и косметических средств, которые поглощают средний (UVB), длинноволновой (UVA) или видимый свет в диапазоне от 290 до 700 нм. Для оценки фототоксичности применяют как *in vitro*, так и *in vivo* методы. Для исследований *in vitro* разработаны рекомендации, но для исследований *in vivo* на сегодняшний день каких-либо общепринятых протоколов не существует. Цель работы состояла в апробации экономически целесообразного и информативного метода для оценки фототоксичности препаратов тетрациклина, кеторолака в условиях *in vivo* с использованием аутбредных крыс. При разработке протокола использовали лекарственные препараты, потенциально способные вызывать фототоксические реакции при клиническом применении: тетрациклин (таблетки, 200 и 300 мг/кг) и кеторолак (гель, 13,4, 26,8 и 40,3 мг/кг). Препараты применяли как однократно, так и многократно. Для УФ-экспозиции использовали облучатель ультрафиолетовый ОУФК-03 (ООО «Солнышко», Россия). Облучение (5 и 15 Дж/см²) проводили однократно через 1 ч после введения/нанесения препарата. Кожную реакцию оценивали через 30 мин, 24 ч после облучения и далее ежедневно на протяжении двух недель. Установлены оптимальные параметры, позволяющие оценивать фототоксические реакции лекарственных препаратов *in vivo*: интенсивность излучения при однократном системном введении составляет 15 Дж/см², при однократном местном применении (накожном) — 5 Дж/см²; продолжительность наблюдения для оценки кожной реакции на аутбредных крысах не менее семи суток.

Ключевые слова: фототоксичность; фототоксические реакции; УФ-излучение; тетрациклин; кеторолак; аутбредные крысы

Для цитирования: Вавилова ВА, Шекунова ЕВ, Кашкин ВА, Макарова МН, Макаров ВГ, Хайменов АЯ. Апробация метода оценки фототоксических эффектов лекарственных препаратов в условиях *in vivo*. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2018;8(2):115–122. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-2-115-122>

* **Контактное лицо:** Вавилова Валерия Александровна; vavilova.va@doclinika.ru

Experimental Testing of an *in vivo* Method of Phototoxicity Evaluation

* V. A. Vavilova¹, E. V. Shekunova¹, V. A. Kashkin¹, M. N. Makarova¹, V. G. Makarov¹, A. Ya. Khaymenov²

¹ JSC Scientific-Production Association «HOME OF PHARMACY»,
3/245 Zavodskaya Street, Kuzmolovsky settlement, Vsevolzhsky district,
Leningrad region 188663, Russian Federation

² Russian office of Dr. Reddy's Laboratories Ltd.,
20/1 Ovchinnikovskaya Embankment, Moscow 115035, Russian Federation

Abstract. At present all new medicinal products and cosmetics that absorb medium-wavelength UVB, long-wavelength UVA, or visible light in the range 290–700 nm need to be tested for potential phototoxicity. Phototoxicity is evaluated by both *in vitro* and *in vivo* methods. There are guidelines for *in vitro* phototoxicity evaluation, however, there are no formally validated protocols for *in vivo* phototoxicity evaluation. The purpose of this study was to test an economically viable and informative method for *in vivo* evaluation of tetracycline and ketorolac phototoxicity using outbred rats. Two medicinal products potentially capable of causing clinically established phototoxic reactions were used in this study: tetracycline (tablets, 200 mg/kg and 300 mg/kg) and ketorolac (gel, 13.4 mg/kg, 26.8 mg/kg and 40.3 mg/kg). The medicines were administered in both single and multiple doses. Ultraviolet irradiator OUFK-03 (OOO «Solnyshko», Russia) was used as a light source. The UV exposure (5 J/cm² and 15 J/cm²) was performed once 1 h after medicine administration. The skin reaction was evaluated 30 minutes and 24 hours after irradiation and then daily for 2 weeks. As a result, the following optimal parameters were determined for *in vivo* evaluation of phototoxic reactions caused by the medicines: radiation intensity — 15 J/cm² for single systemic administration and 5 J/cm² for single topical (dermal) administration; recommended period of skin reaction evaluation for outbred rats is not less than 7 days.

Key words: phototoxicity; phototoxic reactions; UV radiation; tetracycline; ketorolac; outbred rats

For citation: Vavilova VA, Shekunova EV, Kashkin VA, Makarova MN, Makarov VG, Khaymenov AY. Experimental Testing of an *in vivo* Method of Phototoxicity Evaluation. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2018;8(2):115–122. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2018-8-2-115-122>

* **Contact person:** Valeria A. Vavilova; vavilova.va@doclinika.ru

При воздействии солнечного или искусственно-го света в слоях кожи активируются биохимические реакции, которые с точки зрения фармакологии, с одной стороны, могут быть полезным инструментом для биотрансформации некоторых пролекарств в активные лекарственные агенты, а с другой — причиной развития побочных эффектов при применении как топических, так и системных лекарственных препаратов (ЛП).

Впервые фотосенсибилизирующее действие лекарственных средств было описано в 1900 году Германом фон Таппайнером (Hermann von Tarpeiner) и его студентом Оскаром Раабом (Oscar Raab) [1]. В 1969 году дерматологи F. Ive, I. Magnus и др. впервые описали клинический случай фотосенсибилизации [2]. Результаты этих наблюдений явились предпосылками для дальнейшего активного изучения фотосенсибилизации под действием ЛП.

Фотосенсибилизирующее (гр. *phos*, *photos* свет + лат. *sensibilis* чувствительный) действие веществ на клетки организма — это способность вещества (фотосенсибилизирующее вещество — ФВ) при резорбтивном или местном действии снижать устойчивость клеток к воздействию солнечных или искусственных ультрафиолетовых лучей. В качестве ФВ могут выступать как различные лекарственные и косметические средства, так и пищевые продукты. Реакции кожи на сочетанное воздействие света и ФВ можно разделить на две группы: фотоаллергические и фототоксические.

Фотоаллергические реакции — это иммунологически опосредованные реакции по типу антиген (аллерген) — антитело, в которых аллергеном выступает активированное светом ФВ. Фотоаллергические реакции возникают как ответ иммунной системы на свет в присутствии даже ничтожных количеств ФВ. Фотоаллерген может проявлять свое действие лишь после активации под действием света с последующим связыванием с белками кожи. Эти реакции запускаются так же, как и реакции клеточного иммунного ответа.

Фототоксические реакции в большинстве случаев возникают в результате прямого повреждения тканей, вызванного ФВ. Большинство ФВ содержат в структуре молекул хотя бы одну двойную связь или ароматическое кольцо, которые могут поглощать энергию световых волн. Большинство соединений активируются электромагнитными волнами в длинноволновом и в среднем диапазоне, хотя некоторые соединения имеют пик поглощения в видимом диапазоне.

Понимание механизма токсического воздействия света на кожу требует знания как природы солнечного света, так и оптических свойств кожи.

Солнечный свет состоит из непрерывного спектра электромагнитного излучения, которое делится по длине волны на три главные области: ультрафиолетовую (UV) — от 10 до 400 нм, видимую (от 380 до 780 нм) и инфракрасную (от 700 нм до 1 мм). Электромагнитный спектр УФ-излучения дополнительно делят на несколько областей, каждая из которых обладает особыми биологическими эффектами,

основные из которых: длинноволновой диапазон (UVA) — 315–400 нм, средний диапазон (UVB) — 280–315 нм и коротковолновой (UVC) — 100–280 нм. Наиболее активным с биологической точки зрения является электромагнитное излучение с длиной волны от 290 до 700 нм.

Кожу человека можно рассматривать как оптически гетерогенную среду, состоящую из трех слоев, которые имеют различные показатели преломления, распределения хромофора и светорассеивающие свойства. Световые волны, входящие в роговой слой дермы, частично (до 10 %) отражаются, остальные поглощаются и подвергаются интенсивному рассеиванию (до 50 %) содержащейся в роговом слое урокановой кислотой, меланином и белками, содержащими ароматические аминокислоты триптофан и тирозин. Около 40 % электромагнитных ультрафиолетовых волн и до 60 % видимого диапазона передаются через роговой слой к эпидермису и нижележащим слоям кожи, где происходит их постепенное рассеяние и поглощение.

В тканях электромагнитное излучение приводит к возбуждению электронов молекул ФВ из стабильного в возбужденное состояние. Возбужденные электроны стремятся вернуться в стабильное состояние и передают свою энергию другим молекулам, например молекулам кислорода, что приводит к образованию ионов кислорода. Активные формы кислорода повреждают клеточные мембраны и ДНК. Также происходит активация синтеза цитокинов и арахидоновой кислоты. В результате развивается местная воспалительная реакция, клинически проявляющаяся как солнечный ожог.

Кроме того, учитывая интенсивный кровоток в микрокапиллярах кожи (в течение 20 мин весь объем крови взрослого человека может быть облучен через кожу), происходит активное облучение крови и прямое взаимодействие световых волн с содержащимися в системном кровотоке молекулами лекарственных средств. Степень кожной реакции зависит от их химической природы, концентрации (терапевтической дозы), длительности экспозиции, интенсивности и длины световых волн, продолжительности облучения, уровня абсорбции кожей ФВ, зависящей от толщины рогового слоя, количества меланина, секретируемых кожных желез. Как правило, фототоксические реакции проявляются как более интенсивная, чем загар, реакция кожи в виде интенсивных «сливных» красных пятен — эритем.

Для соединений, которые потенциально могут обладать фототоксическими свойствами, критическими являются следующие характеристики:

- способность поглощать естественный свет в диапазоне 290–700 нм;
- способность продуцировать свободные радикалы под воздействием ультрафиолета или видимого света;
- присутствие в остаточном количестве в органах и тканях, подвергающихся воздействию солнечного света (кожа, глаза).

Если одно или более из этих условий нехарактерно для изучаемого соединения, то нет необхо-

димости изучать его возможные фототоксические свойства.

В настоящее время при исследовании безопасности лекарственных и косметических средств, которые поглощают в длинноволновом и в среднем или видимом диапазоне, должно быть оценено их возможное фототоксическое действие. Такие требования отражены в руководствах Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA), Управления по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA), а также в документах Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для применения у человека (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) [3–5].

Для оценки фототоксичности применяют как *in vitro*, так и *in vivo* методы. Эксперименты в условиях *in vitro* в последние годы получили широкое распространение, так как они обладают высокой степенью информативности и позволяют не использовать экспериментальных животных. Наиболее часто для изучения возможных фототоксических эффектов используется 3Т3 NRU PT тест (3Т3 Neutral Red Uptake Phototoxicity Test), описанный в руководстве No. 432 [6] Организации экономического сотрудничества и развития (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) и соответствующем ему ГОСТ 32372–2013 [7].

Для изучения фототоксичности в условиях *in vivo* на сегодняшний день каких-либо общепринятых протоколов не существует. Руководством FDA, опубликованным в 2003 году [4], рекомендовано проведение как краткосрочного, так и продолжительного тестирования на животных. Хотя фототоксическая реакция развивается уже после однократного применения лекарственных препаратов, продолжительность исследования должна быть обоснована, поскольку существует опасность их накопления в тканях кожи и глазного яблока. Длительное изучение фототоксичности проводят в том случае, если это исследование заведомо даст клинически значимую информацию. Обычно используется дизайн, при котором введение препарата осуществляется в течение нескольких дней, однако особенности фармакокинетики и продолжительность его клинического применения должны учитываться при планировании эксперимента. Если уже накоплено достаточно информации о фототоксических свойствах исследуемого препарата или веществ данной фармакологической группы, то исследования подобного типа можно не проводить.

Периодичность облучения может быть как однократной, так и многократной. Облучение должно соответствовать периоду достижения максимальной концентрации нанесенного или введенного препарата в кожных покровах или в плазме крови. Принцип выбора доз соответствует аналогичному методу выбора при проведении токсикологических экспе-

риментов. Если негативный результат получен при введении максимальной тестируемой дозы, изучение фототоксичности при введении более низких доз не требуется. Если же есть основания полагать, что субстанция обладает фототоксическими свойствами, то целесообразно ее протестировать и при введении дозы, близкой или равной дозе, не вызывающей побочного действия (NOAEL) [3, 5].

Исследования *in vivo* необходимы для более полной оценки безопасности новых лекарственных препаратов. Если наличие фототоксических свойств активной фармацевтической субстанции установлено в тесте 3Т3 NRU PT *in vitro*, то необходимо проведение эксперимента и на животных. Если в исследовании *in vivo* ожидаются положительные результаты, необходимо подтвердить, что доза, не вызывающая побочного действия (NOAEL), установленная по результатам токсикологических экспериментов, не индуцирует фототоксические реакции. Если при системном введении субстанции на уровне доз, соответствующих NOAEL, наблюдаются фототоксические реакции, разработчику необходимо оценить целесообразность проведения клинических исследований и дальнейшей разработки лекарственного средства [8]. Если же целесообразность разработки лекарственного средства обоснована, то на этапе подготовки инструкции по медицинскому применению необходимо подробно описать способы предотвращения развития фототоксичности и меры, которые необходимо предпринять в случае, если фототоксичность проявилась при применении препарата. В число этих мер может входить ограничение (вплоть до полного исключения) времени пребывания на открытом пространстве, особенно во время пика солнечной активности [9].

Таким образом, проведение исследований фототоксичности ЛП на животных является важным этапом разработки.

Цель работы — апробация метода изучения фототоксичности лекарственных препаратов на примере тетрациклина и кеторолака в условиях *in vivo* с использованием аутбредных крыс с непигментированной кожей.

В экспериментальном исследовании использовали антибиотик тетрациклин (препарат с установленными фототоксическими свойствами [10–13]) в форме для системного применения, и кеторолак — нестероидный противовоспалительный препарат (НПВП) в форме для местного применения. Известно, что НПВП могут вызывать фототоксические реакции, особенно при кожном применении [14–16]. Риск развития фототоксических реакций для ЛП кеторолака был установлен ранее в условиях *in vitro* [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные. Исследования проводили на аутбредных самцах крыс, массой в диапазоне 250–300 г, полученных из питомника АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (Россия).

Условия содержания. Крыс содержали группами в стандартных прозрачных пластиковых клетках, на

кукурузном подстиле, в контролируемых условиях окружающей среды (температура воздуха 19–25 °С, относительная влажность 30–70 %). Световой режим составил 12 ч света и 12 ч темноты. Стандартный корм для лабораторных животных «ЛБК-120» (ЗАО «Тосненский комбикормовый завод») и воду животные получали *ad libitum*.

Данная научно-исследовательская работа была рассмотрена на биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» и одобрена для проведения (№ БЭК 3.60/16 от 2 декабря 2016 г.). Количество животных было минимальным с точки зрения этических принципов. Для каждой схемы облучения использовали пять особей, что было достаточным для оценки характера и частоты проявления фототоксического эффекта препарата.

Лекарственные препараты. В исследовании использовали ЛП, потенциально способные вызывать фототоксические реакции при клиническом применении [11, 12, 14, 15, 17].

Тетрациклин в лекарственной форме таблетки, покрытые оболочкой. Для приготовления доз для введения препарат суспензировали в 1 % растворе крахмала.

Кеторолак в лекарственной форме гель для наружного применения с концентрацией 2 %.

Дозы и способ введения. Тетрациклин внутривенно (в/в) вводили в дозах 200 мг/кг (2 высшие терапевтические дозы, далее — ВТД) и 300 мг/кг (3 ВТД), при перерасчете на крысу с учетом площади поверхности тела. Препарат в дозе 200 мг/кг вводили двукратно (за 24 и 1 ч до УФ-экспозиции) и однократно (за 1 ч до УФ-экспозиции), в дозе 300 мг/кг — однократно за 1 ч до УФ-экспозиции. Время экспозиции составляло 120 или 360 мин.

УФ-экспозицию осуществляли через 1 ч после введения препарата, поскольку время достижения максимальной концентрации тетрациклина в плазме крови составляет 2–4 ч [18].

Кеторолак (гель) наносили на кожу, равномерно распределив до полного впитывания на заранее подготовленный участок кожи животного, в дозах 13,4 (2 ВТД), 26,8 (4 ВТД) и 40,3 мг/кг (6 ВТД) в течение 1 месяца или однократно за 1 ч до облучения. Облучение проводили во всех случаях однократно. Время экспозиции — 120 или 360 мин.

В качестве контроля в эксперимент были включены группы животных, которым или наносили «плацебо» (вспомогательные вещества геля кеторолак) или вводили 1 % раствор крахмала, внутривенно, для групп, получавших тетрациклин, с последующим облучением в течение 120 и 360 мин. Для исключения местнораздражающего действия препарата была сформирована группа животных, получавшая кеторолак (гель) на кожу в течение месяца в дозе 40,3 мг/кг, не подвергающаяся облучению.

Наркотизация перед УФ-экспозицией. Перед размещением под источник УФ-излучения животных вводили в наркоз смесью раствора Золетил (20 мг/кг) и раствора Ксилазин (4 мг/кг) (1:1) в объеме 1 мл/кг массы тела.

УФ-экспозиция. Всем животным перед началом эксперимента выбривали участок кожи на спине, размером 2 × 3 см, который в дальнейшем подвергали облучению.

Предварительно наркотизированные животные были размещены под источником УФ-излучения на расстоянии 5 см (облучатель ультрафиолетовый ОУФК-03, производитель ООО «Солнышко», Россия) через 1 ч после введения/нанесения препаратов. Время экспозиции по разным схемам составляло 120 и 360 мин, что было достаточным для получения дозы 5 и 15 Дж/см² соответственно.

Оценка фототоксичности. Кожную реакцию оценивали через 30 мин, 24 ч после облучения и далее ежедневно на протяжении двух недель [19]. Кожная реакция оценивалась по наличию эритемы, отека и других повреждений кожного покрова по следующей шкале [20]:

«+» — наличие слабо выраженной эритемы и/или эдемы;

«++» — наличие эритемы и/или эдемы и/или трещин кожного покрова умеренной степени выраженности;

«+++» — наличие сильно выраженной эритемы и/или эдемы и/или трещин кожного покрова, изъязвлений.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований фототоксичности лекарственного препарата тетрациклин приведены в таблице 1. Из представленных данных следует, что при облучении животных в течение 120 мин реакция в виде незначительной эритемы наблюдалась только у животных, получавших тетрациклин однократно в дозе 300 мг/кг и двукратно в дозе 200 мг/кг. Схожие результаты были получены при однократном введении препарата в дозе 200 мг/кг при экспозиции 360 мин. У животных, облучавшихся в течение 120 мин после однократного введения тетрациклина в дозе 200 мг/кг, изменений не наблюдалось, так же как и у контрольной группы, которую облучали в течение 2 и 6 ч.

Наиболее выраженная фототоксическая реакция наблюдалась при облучении крыс в течение 360 мин после двукратного введения тетрациклина в дозе 200 мг/кг или однократного в дозе 300 мг/кг. Однако изменения кожного покрова (эритема, отек и трещины) начали проявляться только на третьи сутки после облучения. К седьмым суткам у некоторых крыс появлялось изъязвление кожного покрова. К одиннадцатым — наблюдалось заживление дефектов кожи. Следует отметить, что при клиническом применении, тетрациклин способен вызывать такие фототоксические реакции, как эритема, псевдопорфирия, крапивница и пигментация [11].

Таким образом, фототоксические реакции при в/в введении тетрациклина были наиболее выражены при экспозиции УФ-излучения интенсивностью 15 Дж/см².

Схемы применения кеторолака (гель) и результаты исследований фототоксичности препарата представлены в таблице 2.

Таблица 1

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП И РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФОТОТОКСИЧНОСТИ
ПРЕПАРАТА ТЕТРАЦИКЛИН, *n* = 5**

Препарат	Время экспозиции, мин (интенсивность, Дж/см ²)	Доза, мг/кг		Результаты
		за 24 ч до УФ	за 1 ч до УФ	
Плацебо	120 (5 Дж/см ²)	0	0	—
Тетрациклин, таблетки		—	200	—
		200	200	+
		—	300	+
Плацебо	360 (15 Дж/см ²)	0	0	—
Тетрациклин, таблетки		—	200	+
		200	200	+++
		—	300	+++

Примечание. «—» — отсутствие изменений (и/или вводимой дозы); «+» — незначительная эритема или отек; «++» — выраженные эритема и отек; «+++» — эритема, отек, трещины кожного покрова или язвы.

Таблица 2

**ХАРАКТЕРИСТИКА ГРУПП И РЕЗУЛЬТАТЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ФОТОТОКСИЧНОСТИ
ПРЕПАРАТА КЕТОРОЛАК ГЕЛЬ, *n* = 5**

Препарат	Время экспозиции, мин (интенсивность, Дж/см ²)	Период введения	Доза, мг/кг	Результаты
Плацебо	360 (15 Дж/см ²)	В течение месяца	0	—
Кеторолак, гель	120 (5 Дж/см ²)	В течение месяца	—	—
			13,4	+
		В течение месяца	26,8	++
			40,3	+++
		За 1 ч до УФ	13,4	+
			26,8	++
	360 (15 Дж/см ²)	За 1 ч до УФ	40,3	+++
			13,4	++
			26,8	+++
			40,3	+++

Примечание. «—» — отсутствие изменений (и/или облучения); «+» — незначительная эритема или отек; «++» — эритема и отек или язвы; «+++» — эритема, отек, трещины кожного покрова, язвы.

Накожное нанесение кеторолака геля в дозе 40,3 мг/кг в течение месяца животным, не подвергавшимся облучению, не вызывало изменений кожи, что исключает местнораздражающее действие самого препарата. Каких-либо фототоксических реакций не отмечалось и у животных, которых обучали в течение 360 мин на фоне нанесения «плацебо», что указывает на адекватно подобранные параметры излучения.

В результате облучения, экспозиция которого составила 120 мин, после нанесения кеторолака геля в течение месяца в дозе 13,4 мг/кг у крыс наблюдалась эритема, в дозе 26,8 мг/кг у всех животных наблюдались эритема и незначительный отек, которые к четвертым суткам переходили в изъязвления. На десятые сутки наблюдалось заживление кожных покровов. Фототоксические реакции проявлялись непосредственно по окончании экс-

позиции. В группе, получавшей препарат в дозе 40,3 мг/кг, наблюдалась 60 % смертность, причиной которой, возможно, является сочетание факторов эксперимента (наркоз и нанесение кеторолака). В месте облучения у них наблюдались эритема, отек и кровотокающие трещины кожного покрова (рис. 1). При однократном нанесении препарата за 1 ч до облучения погибла одна особь, получившая препарат в максимальной дозе (на вторые сутки), у выживших крыс наблюдались незначительный отек и трещины кожного покрова, проявившиеся на третьи—пятые сутки после экспозиции. К восьмым суткам наблюдалось образование язв.

При экспозиции 360 мин после однократного нанесения кеторолака в дозе 13,4 мг/кг у животных с третьих суток наблюдались незначительные изъязвления кожного покрова, которые к четырнадцатым суткам полностью заживали. После нанесения



Рис. 1. Эритема, отек, трещины кожного покрова у крысы, получавшей кеторолак в дозе 40,3 мг/кг в течение месяца, после УФ-экспозиции 120 мин (5 Дж/см²)

в дозе 26,8 мг/кг фототоксические реакции проявлялись раньше: на вторые сутки у крыс отмечались эритема и трещины кожного покрова, к восьмым суткам появились изъязвления, сохранявшиеся до четырнадцати суток (рис. 2). Аналогичные поражения кожных покровов наблюдались и при экспозиции 120 мин после однократного нанесения, но были менее выражены. При экспозиции 360 мин после нанесения препарата в дозе 40,3 мг/кг у двух крыс наблюдались незначительный отек и трещины кожного покрова сразу после облучения, к четвертым—шестым суткам отмечались эритема кожного покрова, образование язв, сохранявшиеся до четырнадцати суток, одна особь погибла.

Наблюдаемые у крыс фототоксические реакции в целом соответствовали реакциям, которые выяв-



Рис. 2. Изъязвление кожных покровов у крысы, получившей кеторолак в дозе 26,8 мг/кг однократно, после УФ-экспозиции 360 мин (15 Дж/см²)

лены при клиническом применении нестероидных противовоспалительных препаратов. Фототоксические реакции, особенно при накожном применении препаратов этой группы, клинически проявляются в виде развития эдемы, эритемы, везикул, дерматита [14–16].

Таким образом, для выявления фототоксических реакций кеторолака при накожном нанесении достаточно применения экспозиции УФ-излучения интенсивностью 5 Дж/см².

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данное исследование было направлено на апробацию экономически целесообразного и информативного метода для оценки фототоксичности препаратов *in vivo* с использованием аутбредных крыс. Для изучения фототоксических реакций наиболее часто эксперименты проводят на животных с непигментированной кожей. Как показали результаты проведенного исследования, аутбредные крысы с непигментированной кожей являются адекватной тест-системой для оценки фототоксических свойств препаратов в данных экспериментальных условиях как при системном (в/ж) введении, так и при местном (накожном) нанесении. Было показано, что как тетрациклин, так и кеторолак в отсутствие УФ-воздействия не оказывали влияния на состояние кожных покровов крыс. Включение в эксперимент контрольной группы, не подвергающейся УФ-облучению, особенно важно для лекарственных форм для наружного применения, поскольку существует вероятность развития местных реакций, вызванных самим препаратом (местнораздражающее действие). В этом случае для изучения возможных фототоксических свойств должна быть выбрана доза, не вызывающая местнораздражающего действия. Кеторолак гель в дозах, которые были применены в данном эксперименте, не оказывал местнораздражающего действия, как при однократном, так и многократном (в течение 30 суток) накожном нанесении. Наличие таких контрольных групп в эксперименте является необходимым условием, так как позволяет дифференцировать фототоксические реакции от возможного местнораздражающего действия или аллергических реакций.

Другим важным параметром является выбор характеристик облучения. Интенсивность солнечного излучения, которой может подвергаться человек, зависит от многих факторов, таких как широта местности, высота над уровнем моря, сезон, погода и время суток. К тому же чувствительность кожи к воздействию солнечного света индивидуальна и зависит от типа кожи. Для проведения экспериментов должна быть использована доза излучения, которую можно получить, находясь на открытом пространстве в солнечный день, в полдень, в умеренном поясе, на уровне моря, что соответствует интенсивности 5–20 Дж/см² [3–5].

Существует большое количество УФ-облучателей, которые рекомендуются производителями для изучения фототоксичности в условиях лабора-

тории. Однако данное оборудование является дорогостоящим. В проведенном эксперименте в качестве источника излучения был использован недорогой отечественный прибор ОУФК-03. По информации, заявленной производителем, данный облучатель позволяет генерировать УФ-излучение в диапазоне от 300 до 400 нм, таким образом, полностью воспроизводя длинноволновый УФ-диапазон. Результаты показали, что при использовании данного прибора для выявления фототоксических свойств целесообразно проводить тестирование с применением интенсивности излучения 5 Дж/см² в случае однократного кожного нанесения препаратов. При тестировании препаратов для системного применения необходимо увеличение интенсивности УФ-облучения до 15 Дж/см².

Наиболее информативным клиническим признаком вызванной веществом фототоксической реакции является образование эритемы и/или отека. В проведенном исследовании кроме эритемы и отека было отмечено развитие трещин и изъязвлений кожного покрова. Реакция кожи должна оцениваться через различные промежутки времени после облучения, наиболее часто используются периоды 0,5; 24; 48 и 72 ч [20–23]. Но для ряда веществ, особенно тех, которые медленно проникают в кожу, иногда необходим более длительный период наблюдения (до 5 суток) как описано в рекомендациях по оценке фототоксических свойств в руководстве под редакцией Н. Vogel [19]. Однако результаты данного исследования показали, что для полной оценки фототоксических реакций необходимо осуществлять наблюдение за животными как минимум в течение семи суток после облучения. Более длительное наблюдение с оценкой скорости регенерации полученных изменений также может дать дополнительную информацию в плане оценки тяжести вызванных повреждений, что может быть важно при сравнительной оценке фототоксических свойств препаратов, и их обратимости.

*Авторы не заявили о конфликте интересов
The authors did not declare a conflict of interest*

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Tappeiner H, Raab O. Ueber die Wirkung Fluorescierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab. *Munch Med Wochenschr.* 1900;47:5.
2. Ive FA, Magnus IA, Warin RP, Jones EW. «Actinic Reticuloid»; a Chronic Dermatitis Associated with Severe Photosensitivity and the Histological Resemblance to Lymphoma. *Br J Dermatol.* 1969;81(7):469–85.
3. Note for Guidance on Photosafety Testing. London, UK: The European Agency for the Evaluation of Medicinal Product; 2002. Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003353.pdf
4. Guidance for Industry Photosafety Testing. Rockville, MD: Center for Drug Evaluation and Research Food and Drug Administration; 2003.

Available from: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/fda/fda-3640fnl.pdf>

5. Guidance on Photosafety Evaluation of Pharmaceuticals. Geneva, Switzerland: ICH Harmonised Tripartite Guideline; 2013. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S10/S10_Step_4.pdf
6. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Test No. 432: *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. OECD. Organization for Economic Cooperation and Development; 2004. Available from: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecdtg432-508.pdf>
7. Межгосударственный стандарт ГОСТ 32372–2013. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. *In vitro* 3T3 NRU тест на фототоксичность. М.: Стандартинформ; 2014. [Interstate Standard GOST 32372–2013. Testing of Chemical of Health Hazard. *In Vitro* 3T3 NRU Phototoxicity Test. Moscow: Standartinform; 2014 (In Russ.)]
8. ГОСТ Р 56701–2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств. М.: Стандартинформ; 2016. [GOST R 56701–2015. Medicines for Medical Applications. Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals. Moscow: Standartinform; 2016 (In Russ.)]
9. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2014. [Guidance on Evaluation of Medicines. V. 1. Moscow: Grif i K; 2014 (In Russ.)]
10. Wlodek C, Narayan S. A Reminder about Photo-onycholysis Induced by Tetracycline, and the First Report of a Case Induced by Lymecycline. *Clin Exp Dermatol.* 2014;39(6):746–7.
11. Vassileva SG, Mateev G, Parish LC. Antimicrobial Photosensitive Reactions. *Arch Intern Med.* 1998;158(18):1993–2000.
12. Smith EL, al Raddadi A, al Ghamdi F, Kutbi S. Tetracycline Phototoxicity. *Br J Dermatol.* 1995;132(2):316–7.
13. Hasan T, Khan AU. Phototoxicity of the Tetracyclines: Photosensitized Emission of Singlet Delta Dioxygen. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1986;83(13):4604–6.
14. Monteiro AF, Rato M, Martins C. Drug-induced Photosensitivity: Photoallergic and Phototoxic Reactions. *Clin Dermatol.* 2016;34(5):571–81.
15. Kaidbey KH, Mitchell FN. Photosensitizing Potential of Certain Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents. *Arch Dermatol.* 1989;125(6):783–6.
16. Bagheri H, Lhiaubet V, Montastruc JL, Chouini-Lalanne N. Photosensitivity to Ketoprofen: Mechanisms and Pharmacoepidemiological Data. *Drug Saf.* 2000;22(5):339–49.
17. Sahu RK, Singh B, Saraf SA, Kaithwas G, Kishor K. Photochemical Toxicity of Drugs Intended for Ocular Use. *Arh Hig Rada Toksikol.* 2014;65(2):157–67.
18. Agwuh KN, MacGowan A. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of the Tetracyclines Including Glycylcyclines. *J Antimicrob Chemother.* 2006;58(2):256–65.
19. Vogel HG. *Drug Discovery and Evaluation: Pharmacological Assays.* Springer Science & Business Media; 2002.
20. Adachi T, Satou Y, Satou H, Shibata H, Miwa S, Iwase Y, et al. Assessment of 8-Methoxypsoralen, Lomefloxacin, Sparfloxacin, and Pirfenidone Phototoxicity in Long-Evans Rats. *Int J Toxicol.* 2015;34(1):16–23.
21. Matsumoto N, Akimoto A, Kawashima H, Kim S. Comparative Study of Skin Phototoxicity with Three Drugs by an *in vivo* Mouse Model. *J Toxicol Sci.* 2010;35(1):97–100
22. Owen K. Comparative Grepafloxacin Phototoxicity in Mouse Skin. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(2):261–4.
23. Wagai N, Yamaguchi F, Tawara K, Onodera T. Studies on Experimental Conditions for Detecting Phototoxic Potentials of Drugs in Balb/c Mice. *J Toxicol Sci.* 1989;14(3):197–204.

ОБ АВТОРАХ

Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ». Российская Федерация, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245
Вавилова Валерия Александровна. Фармаколог

Шекунова Елена Васильевна. Руководитель группы экспериментальной фармакологии, канд. биол. наук

Кашкин Владимир Александрович. Руководитель исследований, канд. мед. наук

Макарова Марина Николаевна. Директор, д-р мед. наук

Макаров Валерий Геннадьевич. Заместитель директора по науке, д-р мед. наук

Представительство фирмы «Д-р Редди'с Лабораторис Лтд.» в России. Российская Федерация, 115035, Москва, Овчинниковская наб., д. 20, стр. 1

Хайменов Александр Яковлевич. Руководитель отдела клинических исследований Медицинского отдела, канд. мед. наук

Статья поступила 01.12.2017

Принята к печати 14.05.2018

AUTHORS

Joint Stock Company Scientific-Production Association «HOME OF PHARMACY», 3/245 Zavodskaya Street, Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation
Valeria A. Vavilova. Pharmacologist

Elena V. Shekunova. Head of the Experimental Pharmacology Group. Candidate of Biological Sciences

Vladimir A. Kashkin. Research Director. Candidate of Medical Sciences

Marina N. Makarova. Director. Doctor of Medical Sciences

Valery G. Makarov. Deputy Director for Science. Doctor of Medical Sciences, Professor

Russian office of Dr. Reddy's Laboratories Ltd., 20/1 Ovchinnikovskaya Embankement, Moscow 115035, Russian Federation

Alexandr Ya. Khaymenov. Head of the Clinical Research Section of the Medical Department. Candidate of Medical Sciences

Article was received 1 December 2017

Accepted for publication 14 May 2018