

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЛАЗНЫХ КАПЕЛЬ ЦИТОХРОМА С ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОВРЕЖДЕНИИ ГЛАЗ

Д. Ю. Ивкин^{1*}, П. В. Буренков², А. С. Ивкина¹, В. Е. Карев³, Е. И. Елецкая¹, Е. Д. Семивеличенко¹, Г. А. Плиско¹

1 – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

2 – ООО «Самсон-Мед», 196158, Санкт-Петербург, Московское шоссе, д. 13

3 – ФГБУ «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д. 9

*Контактное лицо: Ивкин Дмитрий Юрьевич. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Статья получена: 05.10.2018. Статья принята к печати: 15.01.2019

Резюме

Введение. Цитохром С является метаболическим препаратом, который оказывает антигипоксическое, трофическое действие, стимулирует процессы регенерации и применяется в том числе при различных заболеваниях глаз.

Цель. Задачей работы являлось определение специфической активности глазных капель Цитохрома С в сравнении с эмоксипином.

Материалы и методы. В качестве тест-системы использованы кролики самцы породы советская шиншилла, проведено моделирование травматической эрозии и кислотного ожога с последующим применением испытуемых глазных капель. При формировании эрозии применяли метод С. Hanna, J. E. O'Brien (1960) с соскабливанием эпителия роговицы, кислотный ожог в эксперименте формировали под местной анестезией (0,4% инкаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 8 мм), смоченной 3% раствором уксусной кислоты с экспозицией 5 секунд на роговицу. Оценка эффективности проведена на основании предложенной авторами балльной шкалы, позволяющей гистологически учесть изменения роговицы при патологическом процессе. В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD). Распределение в каждой выборке данных анализировали при помощи критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении использовали дисперсионный анализ с последующим апостериорным анализом (критерий Тьюки). В случае, если данные имели ненормальное распределение, рассчитывали критерий Краскела-Уоллиса.

Результаты и обсуждение. Состоятельность моделей травматической эрозии и кислотного ожога подтверждена гистологически. Терапевтическая эффективность глазных капель эмоксипина в полной дозе была недостаточно выраженной и сопоставимой с таковой у цитохрома С в половинной терапевтической дозе. Цитохром С в терапевтической и двойной терапевтической дозе эффективно справлялся с последствиями кислотного ожога и травматической эрозии при применении в форме глазных капель в течение 28 дней.

Заключение. Глазные капли Цитохром С, применяемые в терапевтической дозе и дозе, превышающей терапевтическую в 2 раза оказывают выраженный регенераторный эффект при травматической эрозии и кислотном ожоге роговицы глаза кролика. Эффект при применении глазных капель Цитохрома С в половинной терапевтической дозе, равно как и препарата сравнения (эмоксипин) в терапевтической дозе, выражен незначительно.

Ключевые слова: травматическая эрозия, кислотный ожог, Цитохром С, эмоксипин.

Конфликт интересов: конфликта интересов нет.

Для цитирования: Ивкин Д. Ю., Буренков П. В., Ивкина А. С., Карев В. Е., Елецкая Е. И., Семивеличенко Е. Д., Плиско Г. А. Сравнительная эффективность глазных капель цитохрома С при экспериментальном повреждении глаз. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2019; 8(1): 78–84.

COMPARATIVE EFFICIENCY OF CYTOCHROME C EYE DROPS DURING EXPERIMENTAL EYE DAMAGE

D. Yu. Ivkin^{1*}, P. V. Burenkov², A. S. Ivkina¹, V. E. Karev³, E. I. Eletskaia¹, E. D. Semivelichenko¹, G. A. Plisko¹

1 – Saint-Petersburg State Chemical and Pharmaceutical University, 14A, Professor Popov str., Saint-Petersbourg, 197376, Russia

2 – LLC «Samson-Med», 13, Moskovskoe shosse, St. Petersburg, 196158, Russia

3 – Federal Medical and Biological Agency Federal State Institution Scientific and Research Institute of Childrens Infections, 9, Professor Popov, str., 197022, Russia

*Corresponding author: Dmitry Yu. Ivkin. E-mail: dmitry.ivkin@pharminnotech.com

Received: 05.10.2018. Accepted: 15.01.2019

Abstract

Introduction. Cytochrome C is a metabolic drug that has an antihypoxic, trophic effect, stimulates regeneration processes, and is also used in various eye diseases.

Aim. The task of the work was to determine the specific activity of cytochrome C eye drops in comparison with emoxipin.

Materials and methods. As a test system, Soviet chinchilla male rabbits were used, the simulation of traumatic erosion and acid burn was carried out, followed by the use of test eye drops. In forming erosion, the method of C. Hanna, J. E. O'Brien (1960) with scraping of the corneal epithelium, an acid burn in the experiment was formed under local anesthesia (0.4% inoain) application of filter paper (in the form of a circle with a diameter of 8 mm) moistened with 3% acetic acid solution with an exposure of 5 seconds on the cornea. The effectiveness evaluation was carried out on the basis of a scale proposed by the authors, which allows histologically to take into account corneal changes during the pathological process. Descriptive statistics methods were used for all quantitative data: the average sample values (M) and standard deviations (SD) were calculated. The distribution in each data sample was analyzed using the Shapiro – Wilk criterion. Under normal distribution, analysis of variance was used followed by a posteriori analysis (Tukey criterion). If the data had an abnormal distribution, the Kruskal-Wallis test was calculated.

Results and discussion. The integrity of the patterns of traumatic erosion and acid burn was histologically confirmed. The therapeutic efficacy of eye drops of emoxipin in the full dose was not sufficiently pronounced and comparable to that of cytochrome C in half the therapeutic dose. Cytochrome C in therapeutic and dual therapeutic dose effectively coped with the effects of acid burn and traumatic erosion when used in the form of eye drops for 28 days.

Conclusion. Cytochrome C eye drops, used at a therapeutic dose and a dose exceeding the therapeutic dose 2 times, have a pronounced regenerative effect in traumatic erosion and acid burn of the rabbit eye cornea. The effect of Cytochrome C eye drops at half the therapeutic dose, as well as the reference drug (emoxipin) at the therapeutic dose, is not very pronounced.

Keywords: traumatic erosion, acid burn, Cytochrome C, emoxipin.

Conflict of interest: no conflict of interest.

For citation: Ivkin D. Yu., Burenkov P. V., Ivkina A. S., Karev V. E., Eletskaia E. I., Semivelichenko E. D., Plisko G. A. Comparative efficiency of cytochrome C eye drops during experimental eye damage. *Drug development & registration*. 2019; 8(1): 78–84.

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром С является метаболическим препаратом, который оказывает антигипоксическое, трофическое действие, стимулирует процессы регенерации. Является катализатором клеточного дыхания. Механизм действия препарата связан с наличием в простетической группе железа, способного переходить из окисленного состояния в восстановленное. В результате ускоряются эндогенные окислительно-восстановительные реакции и обменные процессы в тканях, улучшается утилизация кислорода и снижается гипоксия тканей при различных патологических состояниях [1, 2].

Цель работы – определение специфической активности глазных капель Цитохром С, 0,25%, при ежедневном (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивальном введении в трех экспериментальных дозах самцам лабораторных кроликов после моделирования травматической эрозии и кислотного ожога глаз. В качестве препарата сравнения были использованы глазные капли Эмоксипин, 1%.

Оба препарата обладают антигипоксическим действием и относятся к группе препаратов, стимулирующих процессы регенерации тканей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препарат Цитохром С (таблица 1) в лекарственной форме капли глазные зарегистрирован на территории РФ и используется для комплексной терапии дистрофии и помутнения роговицы и кератита в стадии эпителизации (Регистрационный номер ЛП-000631).

Таблица 1. Характеристика испытываемого препарата и препарата сравнения

Table 1. Characteristics of the test drug and the comparison drug

Характеристика	Испытуемый препарат
Торговое название, производитель, форма выпуска	Цитохром С (ООО «Самсон-Мед»), капли глазные 0,25%: флакон 2 мл с крышкой-капельницей
Рег. номер	ЛП-000631
МНН	Цитохром С
Активное вещество	Цитохром С
Условия хранения	В сухом, защищенном от света месте, при температуре от 4 °С до 20 °С. Вскрытый флакон хранить в холодильнике не более 3 суток в закрытом виде
Характеристика	Препарат сравнения
МНН, форма выпуска	Метилэтилпиридинола гидрохлорид, капли глазные 1%, флакон 5 мл с крышкой-капельницей
Тривиальное название	Эмоксипин
Условия хранения	В защищённом от света месте при температуре не выше 25 °С

В качестве тест-системы были выбраны лабораторные кролики породы советская шиншилла (44 самца). Количество животных, использованных в исследовании, было достаточно для получения статистически достоверных результатов, и при этом было минималь-

ным по биоэтическим принципам. Лабораторные кролики являются стандартной тест-системой в опытах по изучению специфической активности глазных капель [3]. Имеющиеся на настоящий момент научные познания и утвержденные рекомендации не предоставляют приемлемых *in vitro* альтернатив к использованию лабораторных животных в качестве тест-системы в настоящем исследовании. Исследования на полноценном живом организме наиболее правильно и полно отражают всю динамику взаимодействий различных типов клеток, тканей и органов в организме человека [4].

Животные содержались в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими требованиями к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 29 августа 2014 г. № 51), Методическими указаниями по содержанию и использованию лабораторных животных (Guide for the care and use of laboratory animals. National Academy press. – Washington, D.C., 1996) и Директивой 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, а также правилами, утвержденными Приказом Минздрава России от 01 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Животные в период карантина и эксперимента содержались по 1 особи в металлических клетках для кроликов типа Euroa BIOSCAPE с пластиковым поддоном (ZOONLAB, Германия) (размер пола клетки 73 x 73 см, высота отсека 52 см). Данные условия содержания соответствуют требованиям таблице 2.1. Директивы 2010/63/EU европейского парламента и совета европейского союза от 22 сентября 2010 года. по охране животных (площадь пола клетки не менее 4200 см² и высота не менее 45 см для кроликов массой от 3 до 5 кг). Клетки оборудованы кормушками из нержавеющей стали, пластиковыми поилками и держателями этикеток. Подстил не использовался.

Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре 17–23 °С и относительной влажности 30–70%. В комнатах содержания животных поддерживался 12 часовой цикл освещения и, по крайней мере, 10-ти кратная смена объема воздуха комнаты в час. Температура и влажность постоянно контролировались с помощью термогигрометров Microzele LP03.

Животные получали стандартный гранулированный корм «Полнораационный комбикорм для лабораторных кроликов и морских свинок» К-122, производства ООО «ЛАБОРАТОРКОРМ», Россия ad libitum в кормушку клетки. Животным давалась вода, соответствующая СанПиН 2.1.4.1074-01 «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества. Гигиенические требования к обеспечению

безопасности систем горячего водоснабжения», приготовленная методом фильтрации водопроводной воды через систему фильтров Аквафор. Питьевая вода давалась ad libitum в стандартных питьевых бутылочках с полной заменой воды 3 раза в неделю. Образцы воды были проанализированы на микробиологическое загрязнение и химические элементы. Анализ проводился в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» с периодичностью 1 раз в квартал.

Период карантирования животных составил 14 дней до начала введения. Во время этого периода осуществлялся ежедневный ветеринарный осмотр и визуальный контроль потребления корма и воды. Животных с отклонениями в период карантина зарегистрировано не было. Перед началом исследования все животные, прошедшие карантинирование были включены в эксперимент и распределены на группы, которые формировали случайным образом, отклонение массы тела животных от среднего значения допускалось не более чем на 10%. В период карантина животные размещались в клетках, которые были идентифицированы карточкой, содержащей следующую информацию: пол и количество животных, дата получения, возраст/масса тела животных при получении, назначение животных. После карантина каждому отобранному в исследование животному был присвоен индивидуальный идентификационный номер. Нумерация была сквозной – от 1-го до 44-го номера. Идентификационный номер был нанесён специальным нетоксичным маркером на внутреннюю поверхность уха животного. Каждая клетка была идентифицирована карточкой, содержащей следующую информацию: название исследования, номер исследуемой группы, пол и количество животных в клетке, а также индивидуальный номер животного.

Процедуры с животными были рассмотрены и утверждены биоэтической комиссией ФГБОУ ВО СПбХФА Минздрава России (Протокол № Rabbits-1/2-17 от 07.11.2017).

Оценка внешнего вида животных проводилась в рамках ежедневного ветеринарного осмотра в период карантина и проведения эксперимента. Клинический осмотр каждого животного на открытой площадке с обязательным офтальмологическим осмотром проводился при формировании групп, еженедельно в последующем на 8-й и 15-й, 22-й и 29-й дни после первого введения препаратов.

Осмотр подопытных животных в клетках содержания, с целью выявления смертности или признаков отклонения в состоянии здоровья, проводили ежедневно.

Массу тела регистрировали при формировании групп, непосредственно перед первым введением, еженедельно в ходе исследования.

Дизайн исследования был разработан на основании методик кислотного ожога и механической трав-

мы глаза кролика и инструкции по применению глазных капель Цитохром С.

Перед введением препаратов моделировали патологию глаз – травматическую эрозию (ТЭ) и кислотный ожог (КО). При формировании эрозии применяли метод С. Hanna, J.E. O'Brien (1960) [3], согласно которому под местной анестезией (закапывание раствора 0,4% инокаина) легким прижатием трепана с поршнем диаметром 8 мм на роговицу наносили метку, окрашенную 0,1% раствором флюоресцеина натрия. В пределах метки лезвием соскабливали эпителий роговицы. Дефект эпителия повторно окрашивали раствором флюоресцеина для того, чтобы отчетливее визуализировались форма и размер эрозии роговицы. Кислотный ожог в эксперименте формировали под местной анестезией (0,4% инокаином) аппликацией фильтровальной бумаги (в виде круга диаметром 8 мм), смоченной 3% раствором уксусной кислоты с экспозицией 5 секунд на роговицу [2].

Испытуемые препараты вводили животным ежедневно (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивально, контрольное вещество не использовали. Данный путь введения аналогичен пути введения испытуемой ГЛФ человеку и применяется в клинической практике. Индивидуальный объём вводимой дозы для каждого животного был рассчитан исходя из значения массы тела полученного после последнего взвешивания. Процедуру введения препаратов проводили с помощью дозатора Biohit объемом 10–100 мкл и 100–1000 мкл.

В исследовании были использованы три дозы испытуемого препарата: минимальная – доза эквивалентная половине высшей суточной дозе для человека, средняя – доза эквивалентная высшей суточной дозе для человека и максимальная – доза, в 2 раза превышающая высшую суточную дозу для человека. Расчет доз препаратов для используемого вида тест-системы проводился по методике Freireich et al., 1966 [5], на основании данных инструкции по медицинскому применению.

Высшая терапевтическая доза испытуемого препарата (Доза 2) для кроликов = высшая терапевтическая доза для человека, согласно инструкции по применению (8 капель), умножить на коэффициент пересчета 3,2 (по методике Freireich) и разделить на средний вес человека 70 кг.

Высшая терапевтическая доза эмоксипина для кроликов = высшая терапевтическая доза для человека, согласно инструкции по применению (6 капель), умножить на коэффициент пересчета 3,2 (по методике Freireich) и разделить на средний вес человека 70 кг.

Доза 2 = $8 \times 3,2 / 70 = 0,366$ капель/кг

Доза 1 = $0,366 / 2 = 0,183$ капель/кг

Доза 3 = $0,366 \times 2 = 0,73$ капель/кг

Доза эмоксипина = $6 \times 3,2 / 70 = 0,274$ капель/кг

Из расчета, что 1 мл содержит 20 капель, объем 1 капли равен 0,05 мл = 50 мкл.

$$V_{\text{капли}} = \frac{1 \text{ мл} \cdot 1}{20}, \text{ мл.}$$

Следовательно, объем в мкл Доз для введения был равен:

Доза 2 = 0,366 капель/кг × 50мкл = 18,3 мкл/кг

Доза 1 = 0,183 капель/кг × 50мкл = 9,1 мкл/кг

Доза 3 = 0,73 капель/кг × 50мкл = 36,5 мкл/кг

Доза для эмоксипина = 0,274 капель/кг × 50 мкл = 13,7 мкл/кг

Дозировки рассчитаны на один глаз животного. Перед введением данный объем умножается на 2.

Были сформированы 11 групп животных по 4 особи в каждой группе. Всего 44 животных.

Первая группа – интактная, в которой находились животные без индукции патологии.

Вторая и третья группы состояли из животных, подвергшихся моделированию патологии (ТЭ и КО соответственно) без лечения.

Четвертая, шестая и восьмая группы – группы, в которых животные с ТЭ получали испытуемый препарат в исследуемых дозах.

Пятая, седьмая и девятая группы были сформированы из животных с КО, которые получали испытуемый препарат в исследуемых дозах.

10-я и 11-я группы – группы, состоящие из животных с патологией ТЭ и КО соответственно, которые получали препарат сравнения в терапевтической дозе.

Таблица 2. Дизайн исследования специфической активности испытуемой ГЛФ при ежедневном (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивальном введении лабораторным кроликам самцам

Table 2. Design of the study of the specific activity of the tested SFF with daily (1 time per day for 28 days) conjunctival administration to laboratory rabbits by males

№ группы	n	Патология	Вещество	Доза (мкл/кг)	
1	4	Интактная	–	–	
2	4	ТЭ	–	–	
3	4	КО	–	–	
4	4	ТЭ	Цитохром С	½ ВТД (9,1 мкл/кг)	
5	4	КО		½ ВТД (9,1 мкл/кг)	
6	4	ТЭ		ВТД (18,3 мкл/кг)	
7	4	КО		ВТД (18,3 мкл/кг)	
8	4	ТЭ		2 ВТД (36,5 мкл/кг)	
9	4	КО		2 ВТД (36,5 мкл/кг)	
10	4	ТЭ		эмоксипин	ВТД (13,7 мкл/кг)
11	4	КО			ВТД (13,7 мкл/кг)

На 29 день после начала введения препаратов животные подвергались эвтаназии путем наркотизации углекислым газом в CO₂-боксе с последующим извлечением глазных яблок, которые фиксировали в 10% нейтральном формалине.

Гистологическому исследованию подвергались структуры передних отделов глазных яблок всех животных. После стандартной гистологической проводки и имбибии парафином с помощью ротационного микротомы были изготовлены срезы ткани толщиной

4 мкм, помещенные на предметные стекла, окрашенные гематоксилином и эозином и заключенные под покровные стекла. Гистологические препараты изучались в проходящем свете при суммарном увеличении микроскопа ×100, ×200 и ×400.

В отношении всех количественных данных применялись методы описательной статистики: подсчитывались средние выборочные значения (M) и стандартные отклонения (SD), согласно рекомендациям Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств [3].

Распределение в каждой выборке данных анализировали при помощи критерия Шапиро-Уилка. При нормальном распределении использовали дисперсионный анализ с последующим апостериорным анализом (критерий Тьюки). В случае, если данные имели ненормальное распределение, рассчитывали критерий Краскела-Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Все животные переносили введение удовлетворительно: процедура не сопровождалась какими-либо негативными признаками болезненности. Гибели на протяжении 28-и суток от момента первого введения препаратов не наблюдалось.

Внешний вид

По результатам проведенного клинического осмотра было выявлено, что изменения в поведении, общем состоянии и состоянии нервной системы на протяжении эксперимента у животных отсутствовали. После индукции патологии (как КО, так и ТЭ) поведение животных не изменялось. Было отмечено, что животные опытных групп выглядели так же, как и животные контрольной группы. Отличий в поведении животных между группами не выявлено на протяжении всего эксперимента.

У всех подопытных животных нос был умеренно влажный, патологические выделения отсутствовали. Уши бледно-розовые, обычной температуры, нагноений, воспаления, загрязнений за весь период наблюдения ни у кого отмечено не было. Зубы у всех сохранены. Дыхание в целом было нормальным у всех экспериментальных животных, признаков одышки отмечено не было.

Шерсть у всех животных опрятная, блестящая, без очагов облысения. Тонус мускулатуры у всех животных был нормальным. Видимые слизистые оболочки бледно-розовой окраски, блестящие. Деформации или отека конечностей нет. Кожа без признаков раздражения или воспаления. Половые органы самцов правильно выражены.

Все животные нормального телосложения, удовлетворительного питания. У 100% кроликов всех групп двигательная активность была в норме. В целом поведение было стандартным. Кровотечений у животных не наблюдали.

В ходе офтальмологического осмотра было отмечено, что на этапе формирования групп роговица глаз у всех кроликов находилась в состоянии нормы. После моделирования патологии у групп кроликов с КО наблюдалось помутнение роговицы, отек и слизистое нагноение (рисунок 1А), а животные с ТЭ характеризовались наличием слезотечения и светобоязни, а также зеленоватым оттенком роговицы глаза после взаимодействия белков раневой поверхности с флуоресцеином (рисунки 1Б, 1В).



Рисунок 1. 1А – последствия кислотного ожога на следующий день после моделирования; 1Б – взаимодействие поверхности эрозии с флуоресцеином; 1В – последствия травматической эрозии на следующий день после моделирования

Figure 1. 1А – the effects of acid burn on the day after the simulation; 1Б – interaction of the erosion surface with fluorescein; 1В – the effects of traumatic erosion on the day after modeling

В течение первой недели введения препаратов Цитохром С и эмоксипина значимых различий визуально не наблюдалось – глазная щель была сужена, отмечались нагноения, которые удаляли ватой, смоченной в изотоническом растворе.

К концу второй недели размер глазной щели у кроликов пришел в норму у большинства животных. Нагноительные процессы структур глазных яблок были слабой степени выраженности у животных, получавших глазные капли Цитохром С в дозе 2 ВТД.

В течение третьей недели определить визуально наличие патологии стало невозможно у животных, которым вводили Цитохром С в дозах ВТД и 2ВТД, а также у половины животных, получавших препарат сравнения и Цитохром С в дозе 1/2ВТД.

К окончанию эксперимента визуальное состояние глаз всех животных без исключения пришло в норму.

Масса тела

Оценка динамики массы тела кроликов показала, что ежедневное (1 раз в день в течение 28 дней) конъюнктивальное введение животным испытуемого препарата и препарата сравнения не оказало влияния на данный показатель. Масса тела кроликов равномерно увеличивалась в течение всего периода наблюдения. В период наблюдения животные потребляли корм и воду в рамках физиологических потребностей.

Гистологическое исследование

Гистологической оценке подвергались глазные яблоки всех животных.

В 28 случаях значимой патологии выявлено не было:

Роговица состоит из пяти слоев, многослойный плоский эпителий обычного строения, сосуды не определяются, патологической клеточной инфильтрации не выявлено (рисунок 2.1).

Строение радужки, ресничного тела не нарушено (рисунок 2.2).

Лимб обычного строения, с минимально выраженной лимфо-гистиоцитарной инфильтрацией (рисунок 2.3).

Склера, сосудистая, сетчатая оболочка нормального строения.

В 16 случаях выявлены следующие патологические изменения (отражены от наименее к наиболее выраженным):

5,6 (травматическая эрозия без лечения) – выраженная распространенная фибропластическая реакция роговицы с ее утолщением (рисунок 2.4) в одном из глазных яблок.

9-12 (кислотный ожог без лечения), 16 (травматическая эрозия + цитохром С, 1/2ВТД), 17, 19 (кислотный ожог + цитохром С, 1/2ВТД), 42 (кислотный ожог + эмоксиоптик), 44 (кислотный ожог + эмоксиоптик) – очаговая гипертрофия структур роговицы с ее очаговым утолщением (рисунок 2.5) в одном из глазных яблок.

41 (кислотный ожог + эмоксипин) – очаговая гипертрофия структур роговицы с ее очаговым утолщением в двух глазных яблоках.

7 (травматическая эрозия без лечения) – слабо выраженный кератит и слабо выраженная патологическая васкуляризация роговицы (рисунок 2.6) в одном из глазных яблок.

8 (травматическая эрозия без лечения) – тяжелый язвенный кератит с выраженной экссудативной клеточной реакцией (рисунок 2.7), очаговый экссудативный иридоциклит (рисунок 2.8) в одном из глазных яблок.

39 (травматическая эрозия+эмокси-оптик) – распространенный экссудативный кератит с фокусами некроза (рисунок 2.9), слабо выраженный очаговый экссудативный иридоциклит в одном из глазных яблок.

40 (травматическая эрозия + эмоксипин) – распространенный экссудативный кератит с фокусами некроза в одном из глазных яблок (рисунок 2.10), слабо выраженный кератит и слабо выраженная патологическая васкуляризация роговицы в другом глазном яблоке.

Для объективизации морфологических изменений роговицы при травматической эрозии и кислотном ожоге была использована полуколичественная шкала характера и степени выраженности патологического процесса. В качестве критериев учитывались наличие или отсутствие патологических изменений, наличие и выраженность текущего экссудативного воспаления (с последующей патологической васкуляризацией роговицы), наличие и распространенность фибропластических изменений роговицы процесса (как проявления обратного развития патологического процесса и организации в его исходе) (таблица 3). Распределение

Таблица 3. Классификация патологического процесса в баллах

Table 3. Classification of the pathological process in points

Классификация патологического процесса в баллах	Нет патологии (0 баллов)	Фибропластическая реакция роговицы с формированием ограниченного (1 балл) или обширного (2 балла) рубца	Кератит разной степени выраженности (от слабо выраженного (3 балла), средней степени выраженности (4 балла), до тяжелого язвенного (5 баллов))
Баллы, № жив	0	1 балл: 9, 10, 11, 12, 16, 17, 19, 41 (оба глаза), 42, 44 2 балла: 5, 6;	3 балла: 7; 39(1 глаз) 4 балла: 39 (2 глаз), 40; 5 баллов: 8;

патологических изменений, отраженных в баллах при различных стратегиях терапии отражено в таблице 4.

Таким образом, интерпретируя результаты исследования можно сделать следующие выводы:

А) состоятельность моделей травматической эрозии и кислотного ожога подтверждена гистологически [9].

Б) терапевтическая эффективность глазных капель эмоксипина в полной дозе была недостаточно выраженной и сопоставимой с таковой у цитохрома С в 1/2ТД.

В) Цитохром С в терапевтической и двойной терапевтической дозе эффективно справлялся с последствиями КО и ТЭ при применении в форме глазных капель в течение 28 дней.

Таблица 4. Распределение патологических изменений в баллах при различных стратегиях терапии

Table 4. Distribution of pathological changes in the scores with different treatment strategies

Группа №	Патология	Препарат, Доза	Распределение патологического процесса по баллам, n глаз					Сумма баллов оценки патологического процесса	
			0	1	2	3	4		5
1	Интакт	-	8	0	0	0	0	0	0
2	ТЭ	-	4	0	2	1	0	1	12
3	КО	-	4	4	0	0	0	0	4
4	ТЭ	Цитохром С ½ ВТД	7	1	0	0	0	0	1
5	КО	Цитохром С ½ ВТД	6	2	0	0	0	0	2
6	ТЭ	Цитохром С ВТД	8	0	0	0	0	0	0
7	КО	Цитохром С ВТД	8	0	0	0	0	0	0
8	ТЭ	Цитохром С 2ВТД	8	0	0	0	0	0	0
9	КО	Цитохром С 2ВТД	8	0	0	0	0	0	0
10	ТЭ	Эмоксипин ВТД	5	0	0	1	2	0	11
11	КО	Эмоксипин ВТД	4	4	0	0	0	0	4

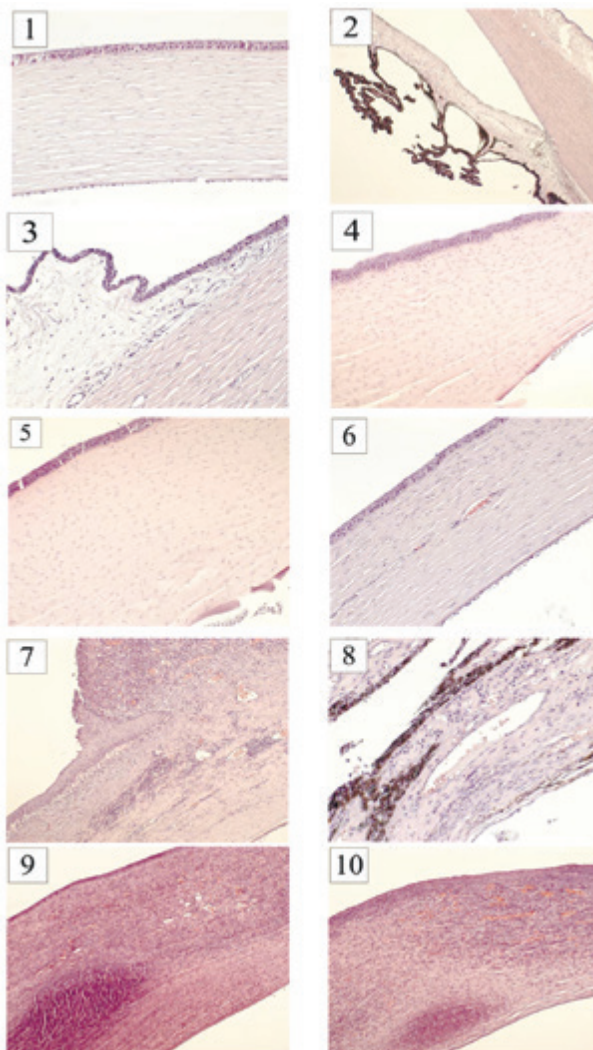


Рисунок 2. Гистологическое исследование глаз кроликов, окраска гематоксилином и эозином: 1 – интактная роговица, ув. $\times 100$; 2 – интактная радужная оболочка, ув. $\times 50$; 3 – обычное строение лимба, ув. $\times 100$; 4 – утолщение роговицы за счет обширной фибропластической реакции. Утолщение эпителиальной выстилки роговицы, ув. $\times 100$; 5 – утолщение роговицы за счет обширной фибропластической реакции. Утолщение эпителиальной выстилки роговицы, ув. $\times 100$; 6 – слабо выраженная патологическая васкуляризация роговицы, ув. $\times 100$; 7 – тяжелый язвенный кератит с выраженной экссудативной клеточной реакцией, разрастанием грануляционной ткани и обильной патологической васкуляризацией роговицы, ув. $\times 100$; 8 – очаговый экссудативный иридоциклит, ув. $\times 200$; 9 – распространенный экссудативный кератит с фокусом некроза и патологической васкуляризацией роговицы, ув. $\times 100$; 10 – распространенный экссудативный кератит с фокусом некроза и патологической васкуляризацией роговицы, ув. $\times 100$

Figure 2. Histological examination of the eyes of rabbits, stained with hematoxylin and eosin: 1 – intact cornea, SW. $\times 100$; 2 – intact iris, SW. $\times 50$; 3 – the usual structure of the limb, SW. $\times 100$; 4 – corneal thickening due to extensive fibroplastic reaction. Thickening of the epithelial lining of the cornea, SW. $\times 100$; 5 – cornea thickening due to extensive fibroplastic reaction. Thickening of the epithelial lining of the cornea, SW. $\times 100$; 6 – mild pathological corneal vascularization, SW. $\times 100$; 7 – severe ulcerative keratitis with severe exudative cellular reaction, proliferation of granulation tissue and abundant pathological corneal vascularization, SW. $\times 100$; 8 – focal exudative iridocyclitis, SW. $\times 200$; 9 – common exudative keratitis with a focus of necrosis and pathological corneal vascularization, SW. $\times 100$; 10 – common exudative keratitis with necrosis focus and pathological cornea vascularization, SW. $\times 100$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных, в т.ч. гистологического исследования, было выявлено, что глазные капли Цитохром С, применяемые в терапевтической дозе и дозе, превышающей терапевтическую в 2 раза оказывают выраженный регенераторный эффект при травматической эрозии и кислотном ожоге роговицы глаза кролика. Эффект при применении глазных капель Цитохрома С в половинной терапевтической дозе, равно как и препарата сравнения (эмоксипин) в терапевтической дозе, выражен незначительно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ивкин Д. Ю., Оковитый С. В. Патогенетическая терапия состояний гипоксии органов и тканей на клеточном уровне. *Лечащий врач*. 2017; 7: 11–15.
2. Официальная инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Цитохром С (капли глазные). Available at: <http://samsonmed.ru/catalog/tsitokhrom-s-kapli-glaznye-0-25>. (accessed 13.11.2017).
3. Канюков В. Н., Стадников А. А., Трубина О. М., Яхина О. М. Экспериментальное моделирование травматических повреждений роговицы. *Вестник ОГУ*. 2014; 12 (173): 156–159.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: *Гриф и К*, 2012; 944 с.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях под ред.: Н. Н. Каркищенко и С. В. Грачева. М.: *Профиль-2С*, 2010; 358 с.
6. Freireich E. J., Gehan E. A., Rail D. P. et al. *Cancer Chemother. Rep.* 1966; 50(4): 219–244.

7. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies, U.S. F.D.A. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2006 Jan.
8. Position Statement on the Use of Animals in Research, 1993 Feb 26; *NIH Guide* 22(8).
9. Ивкина А. С., Ивкин Д. Ю., Семивеличенко Е. Д., Плиско Г. А., Буренков П. В. Моделирование травматических повреждений роговицы глаза. *Лабораторные животные для научных исследований*. 2018; 2: 30–37.

REFERENCES

1. Ivkin D.Yu., Okovity S.V. Pathogenetic therapy of hypoxia of organs and tissues at the cellular level. *Attending physician*. 2017; 7: 11–15 (In Russ.).
2. Official instructions for the medical use of the drug Cytochrome C (eye drops). Available at: <http://samsonmed.ru/catalog/tsitokhrom-s-kapli-glaznye-0-25>. (accessed 13.11.2017).
3. Kanyukov V. N., Stadnikov A. A., Trubina O. M., Yakhina O. M. Experimental modeling of traumatic corneal damage. *Bulletin of OSU*. 2014; 12(173): 156(In Russ.).159 (In Russ.).
4. Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part one. М.: *Grief and K*, 2012; 944 p. (In Russ.).
5. Guide to laboratory animals and alternative models in biomedical technologies. Ed.: N.N. Karkishchenko and S.V. Grachev. М.: *Profil-2S*, 2010: 358 p. (In Russ.).
6. Freireich E.J., Gehan E.A., Rail D.P. et al. *Cancer Chemother. Rep.* 1966; 50(4): 219–244.
7. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies, U.S. F.D.A. Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2006 Jan.
8. Positioning of Animals in Research, 1993 Feb 26; *NIH Guide* 22 (8).
9. Ivkina A. S., Ivkin D. Yu., Semivlichenko E. D., Plisko G. A., Burenkov P. V. Simulation of traumatic corneal damage. *Laboratory animals for scientific research*. 2018; 2: 30–37 (In Russ.).