

УДК 615.281.9:57.083.32

ОЦЕНКА СТЕПЕНИ СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ И АЛЛЕРГЕННОЙ ОПАСНОСТИ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ СУБСТАНЦИИ КЛИНДАМИЦИНА ГИДРОХЛОРИД В ЭКСПЕРИМЕНТАХ НА БЕЛЫХ МЫШАХ

Земцова В. О.¹, Богданов Р. В.¹, Шевляков В. В.¹, Филонюк В. А.^{1,2},
Чернышова Е. В.¹, Баранов С. А.¹

¹Республиканское унитарное предприятие «Научно-практический центр гигиены»,
г. Минск, Республика Беларусь

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь

Реферат. Изучение сенсibilизирующих свойств антибактериальных лекарственных средств (АБЛС) является неременным этапом их гигиенического нормирования в воздухе рабочей зоны и атмосферы.

Унифицирована постановка методики воспроизведения сенсibilизации к АБЛС в экспериментах на белых мышах с применением для внутрикожного введения в основание хвоста стандартной дозы препарата по 100 мкг в смеси 1 : 1 с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) в объеме 0,06 см³ на животное и выявления гиперчувствительности замедленного типа провокационным внутрикожным тестом опухания лапы (ВТОЛ) в разрешающей дозе препарата 120–140 мкг, что позволяет использовать критерии оценки степени сенсibilизирующей способности и аллергенной опасности промышленных аллергенов и обеспечивает объективность изучения специфических свойств и классифицирования аллергенной опасности новых АБЛС.

При апробации экспериментальной модели воспроизведения и выявления сенсibilизации на белых мышах установлено, что фармацевтическая субстанция антибиотика (КГ) даже в дозе 10 мкг проявляла эффективное сенсibilизирующее действие на организм, а в стандартной дозе 100 мкг препарат сенсibilизировал 83,3 % опытных животных (10 из 12) с превышением среднегрупповой величины интегрального показателя ВТОЛ у опытных мышей таковой в контрольной группе в 7,3 раза со статистическим их различием при $p < 0,001$ по критерию t и при $p < 0,01$ по критерию «Х» (6,42). На этой основе фармацевтическая субстанция КГ дифференцирована как обладающая сильной сенсibilизирующей способностью и отнесена к 1-му классу аллергенной опасности (чрезвычайно опасный промышленный аллерген).

Ключевые слова: антибактериальные лекарственные средства, фармацевтическая субстанция, клиндамицина гидрохлорид, сенсibilизирующая способность и класс аллергенной опасности, экспериментальная модель воспроизведения и выявления сенсibilизации на белых мышах.

Введение. Наиболее часто негативное специфическое действие АБЛС на организм проявляется аллергическими реакциями. Так, у 50 % лиц, профессионально контактирующих с антибиотиками, установлены те или иные проявления аллергической манифестации со стороны кожных покровов, слизистых оболочек, дыхательных путей [1, 2].

Сенсibilизирующая способность АБЛС определяется химическими свойствами и

структурой фармацевтических субстанций. Так, природные и частично полусинтетические АБЛС (антибиотики групп бензилпенициллинов, грамицидинов, полимиксинов, эритромицинов, тетрациклинов, цефалоспоринов и др.) как продукты микробиологического синтеза в основном являются полными антигенами, которые при поступлении в организм, особенно при повторном парентеральном и ингаляционном воздействии, формируют гипериммунный процесс со

смешанными механизмами всех четырех типов аллергической реакции с превалированием немедленного IgE-обусловленного анафилактического типа [3].

Полусинтетические и синтетические АБЛС – гаптены, способные конъюгировать с аутобелками организма и образовывать комплексный антиген, триггирующий гипериммунный ответ с развитием в основном аллергической реакции замедленного клеточноопосредованного типа гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) [4].

Следовательно, изучение сенсибилизирующей способности АБЛС является непременным этапом обоснования их предельно допустимых концентраций в воздухе рабочей зоны (ПДКврз). В то же время в ранее действовавших в СССР методических указаниях по обоснованию ПДКврз антибиотиков приведены только требования определения сенсибилизирующего действия антибиотиков в соответствии с методическими рекомендациями «Постановка исследований по гигиеническому нормированию промышленных аллергенов в воздухе рабочей зоны» (МЗ СССР, № 2121-80) или рекомендациями по оценке аллергенных свойств фармакологических препаратов [5]. В указанных рекомендациях приведена схема токсиколого-аллергологических экспериментов, но только с использованием морских свинок – альбиносов или с крупными белыми пятнами на туловище как животных, наиболее чувствительных к воздействию аллергенов и пригодных для воспроизведения сенсибилизации всеми способами. Постановка методов не позволяет оценить степень выраженности сенсибилизирующей способности вещества и тем более классифицировать его аллергенную опасность, в отличие от определения токсического действия (ГОСТ 12.1.007-76).

Однако приобретение в настоящее время морских свинок, тем более альбиносов, затратно ввиду их высокой стоимости и труднодоступно из-за отсутствия в нашей стране питомника лабораторных животных.

Вместе с тем аллергия к химическим веществам (контактный дерматит, фотодерматит, ГЗТ и гиперчувствительность немедленного типа) с успехом воспроизводится на мышах. Так, А. Д. Черноусовым [6] был предложен метод определения сенсибилизирующей способности низкомолекулярных химических веществ на мышах с применением ПАФ, основываясь на том, что внутрикожное введение гаптенных совместно с ПАФ усиливает индукцию ГЗТ вследствие угнетения формирования субпопуляций

регуляторных Т-лимфоцитов-супрессоров, подавляющих ГЗТ, что сопровождается усилением аллергических реакций и позволяет выявить аллергенные свойства даже слабых химических аллергенов. Затем методика была модифицирована для стандартизированной оценки аллергенной активности и опасности химических веществ и включена в методические указания по гигиеническому нормированию химических аллергенов в воздухе рабочей зоны [7].

Более того, применение методики определения и оценки степени аллергенной активности и аллергенной опасности различных видов органической пыли по их растворимым белково-антигенным комплексам в экспериментах на белых мышах обосновано теоретическими данными о том, что использование для сенсибилизации белоксодержащего вещества в смеси с ПАФ, содержащим антигены туберкулезных бацилл и вводимым в организм внутрикожно (создание «депо»), стимулирует переключение хелперной регуляции иммунного ответа 2-го типа (Th2) на 1-й тип с развитием преимущественно клеточноопосредованных механизмов гиперчувствительности замедленного типа [8].

Поскольку методика экспериментальной модели воспроизведения сенсибилизации на мышах с применением ПАФ позволяет оценить степень сенсибилизирующей способности как гаптенных, так и белоксодержащих веществ как полных антигенов, то при адаптации условий постановки она вполне адекватно может быть использована для изучения и объективной оценки аллергенной активности и опасности любых АБЛС. В качестве аналога использовали методические подходы к постановке экспериментальной модели воспроизведения и выявления сенсибилизации на белых мышах, отработанные при изучении химических веществ и белоксодержащих аэрозолей [7, 8] с учетом применения стандартных сенсибилизирующих и разрешающих доз химических и биологических веществ и критериев определения степени сенсибилизирующей способности и классифицирования их аллергенной опасности [9].

Апробация методики изучения и оценки сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности в эксперименте на белых мышах выполнена на примере изучения фармацевтической субстанции КГ.

Цель работы – унификация постановки методики определения степени сенсибилизирующей способности и оценки аллергенной опасности АБЛС в экспериментах на белых мышах и ее апробация на примере изучения фармацевтической субстанции антибиотика КГ.

Материалы и методы. Объектом исследования являлась фармацевтическая субстанция КГ. Для определения и оценки степени сенсibilизирующей способности и аллергенной опасности КГ использовали доступную унифицированную экспериментальную модель на белых мышах, адекватную для воспроизведения и выявления ГЗТ как на полные антигены (антибиотики), так и на химические вещества – гаптены [7, 8].

Для экспериментов при изучении КГ подбирали группы белых мышей по 12 особей массой 20–24 г. Воспроизведение сенсibilизации белых мышей осуществляли однократным внутрикожным введением в основание хвоста опытных животных КГ в дозе по 10 мкг/животное (1-я опытная группа для возможного установления минимальной сенсibilизирующей дозы (MSD)) и стандартную дозу КГ по 100 мкг/животное (2-я опытная группа) в смеси 1 : 1 с ПАФ в общем объеме 0,06 см³. Животным контрольной группы аналогично вводили смесь 1 : 1 стерильного физиологического раствора и ПАФ.

Выявление ГЗТ осуществляли через шесть суток после введения сенсibilизирующей дозы постановкой провокационной пробы – ВТОЛ путем внутрикожного введения туберкулиновыми шприцами по 0,04 см³ в апоневроз задних

коллатеральных лап животных контрольной и опытных групп КГ в разрешающей дозе по 140 мкг/животное, не вызывающей у интактных животных после внутрикожного введения в лапу существенной воспалительно-отечной реакции кожи (величина отека не более 9×10^{-2} мм).

Выраженность отечно-воспалительной реакции кожи определяли у всех животных контрольной и опытных групп путем измерения микрометром толщины коллатеральных задних лап (апоневроз) в мм до и через 24 ч после тестирования, оценивали абсолютную величину отека лап в 10^{-2} мм по разнице в их толщине после и до тестирования, переводили результаты в относительные величины интегрального показателя ВТОЛ в баллах по шкале [7, 8].

Поскольку соблюдены требования по унифицированным условиям постановки методики, стандартным сенсibilизирующим и тестирующим дозам, то для дифференцировки изучаемых фармацевтических субстанций АБЛС по степени сенсibilизирующей способности и классу аллергенной опасности обоснована объективная возможность использования критериев, применяемых для оценки промышленных веществ химической и биологической природы [9], приведенных в таблице 1.

Таблица 1 – Критерии классификационной оценки степени сенсibilизирующей способности (аллергенной активности) и аллергенной опасности фармацевтических субстанций АБЛС

Критерии	Классы аллергенной опасности (степень выраженности сенсibilизирующей способности/степень аллергенной опасности)			
	1-й (сильная/чрезвычайно опасная)	2-й (выраженная/высокоопасная)	3-й (умеренная/умеренно опасная)	4-й (слабая/малоопасная)
H ¹⁾	≥75	>50	≥50	≥25
pt ²⁾	<0,01–0,001	<0,05–0,01	<0,05	>0,05
pX ³⁾	<0,01	<0,05	>0,05	>0,05
¹⁾ H – выявляемость сенсibilизации по частоте положительного теста ВТОЛ в баллах у животных опытной группы в %. ²⁾ pt – уровень значимости достоверных различий среднegrupповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опытной и контрольной группах по критерию t (U). ³⁾ pX – то же по критерию «X» Ван-дер-Вардена.				

Согласно приведенным в таблице критериям изученные фармацевтические субстанции АБЛС разделяют на группы:

– с сильной сенсibilизирующей способностью (аллергенной активностью) и 1-го класса

аллергенной опасности относят – препараты, на которые при тестировании опытных животных, сенсibilизированных стандартной дозой в смеси с ПАФ, выявляют положительные интегральные показатели ВТОЛ у 75 % животных и более (9–12

белых мышей из 12) с достоверным различием среднегрупповых величин кожного тестирования в опыте и контроле по критерию «X» при уровне значимости $p < 0,01$;

– выраженной сенсibilизирующей способностью (аллергенной активностью) и 2-го класса аллергенной опасности – препараты, на которые при тестировании установлены положительные интегральные показатели ВТОЛ у более 50 % опытных животных с достоверностью различий среднегрупповых величин кожных реакций в опыте и контроле при $p < 0,05$ по критерию «X»;

– умеренной сенсibilизирующей способностью (аллергенной активностью) и 3-го класса аллергенной опасности – препараты, на которые выявлены положительные интегральные показатели ВТОЛ у половины и более опытных животных, но при статистической значимости различий среднегрупповых величин кожных тест-реакций в опыте и контроле только по критерию t (U);

– слабой сенсibilизирующей способностью (аллергенной активностью) и 4-го класса аллергенной опасности — препараты, при тестировании которыми положительные интегральные показатели ВТОЛ в баллах выявляют у более чем 25 % опытных животных при отсутствии статистически достоверных различий среднегрупповых показателей с контролем даже по критерию t (U);

– не обладающие аллергенной активностью, но представляющий потенциальный риск формирования аллергопатологии у лиц с ослабленной или нарушенной иммунологической реактивностью организма — препараты, на которые положительные тест-реакции регистрируются у 25 % опытных животных и менее, что считается проявлением повышенной индивидуальной чувствительности.

Условия содержания, обращения, проведения экспериментов и выведения лабораторных животных из опыта соответствовали требованиям технических нормативных правовых актов и основывались на международных принципах биоэтики.

Результаты исследования подвергались статистической обработке общепринятыми методами параметрической и непараметрической статистики с использованием лицензионного программного обеспечения Microsoft Office Excel 11 (Microsoft, США) и STATISTICA 10 (StatSoft, США) при сравнении результатов опыта с показателями контроля. В качестве критерия достоверности различий между сравниваемыми показателями принимали уровень значимости $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение. По описанной выше унифицированной методике определения и оценки степени сенсibilизирующей способности и класса аллергенной опасности КГ на белых мышах получены следующие результаты (таблица 2).

Таблица 2 – Частота и выраженность показателей провокационной пробы ВТОЛ у белых мышей, сенсibilизированных КГ в дозах 10 и 100 мкг в смеси с ПАФ

Показатели, ед. измерения	Группы сравнения ($M \pm m$)		
	Контрольная группа (n=12)	1-я опытная группа (КГ – 10 мкг; n=12)	2-я опытная группа (КГ – 100 мкг; n = 12)
ГЗТ по ВТОЛ: 10^{-2} мм	$7,58 \pm 1,40$	$18,1 \pm 3,46^{1)}$	$28,8 \pm 5,36^{2)}$
Н	4/12	9/12	10/12
Балл	$0,33 \pm 0,14$	$1,33 \pm 0,33^{3)}$	$2,42 \pm 0,53^{4)}$
Х	-	5,06	6,42
¹⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,05$ по критерию t . ²⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,01$ по критерию t . ³⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,05$ по критериям «X» и t . ⁴⁾ Достоверные различия с контролем при $p < 0,001$ по критерию t и $p < 0,001$ по критерию «X».			

Примечание: Н: числитель – количество животных с положительными результатами ВТОЛ, знаменатель – всего в группе.

У 4 из 12 животных контрольной группы была несколько повышена абсолютная величина отека лапы на введение провокационной тест-дозы КГ, что свидетельствует о неспецифическом раздражающем действии препарата на ткани лап в дозе 140 мкг и необходимости ее снижения в последующих экспериментах.

Однако у животных 1-й опытной группы положительные кожные реакции на провокационную пробу с интенсивностью 1–4 балла регистрировались у 9 из 12 белых мышей (75 %), а среднегрупповая величина абсолютного показателя провокационной внутрикожной пробы превышала таковой в контрольной группе в 2,4 раза ($p < 0,05$).

Причем и интегральный показатель ВТОЛ у животных 1-й опытной группы достоверно как по критерию t ($p < 0,05$), так и по «жесткому» критерию «Х» ($p < 0,05$) превышал контрольный уровень в 4 раза. Следовательно, препарат КГ даже в дозе 10 мкг проявлял эффективное сенсибилизирующее действие на организм.

КГ в стандартной дозе 100 мкг сенсибилизировал 10 из 12 животных 2-й опытной группы с выраженностью абсолютного показателя ВТОЛ, превышающего таковой в контроле в 4 раза ($p < 0,01$), тогда как среднегрупповая величина интегрального показателя, интенсивность которого у 8 лабораторных животных 2-й опытной группы составляла 2–5 баллов, была выше таковой в контрольной группе белых мышей в 7,3 раза ($p < 0,001$ по критерию t).

Соответственно рассчитанный статистический показатель «Х» различия между опытной и контрольной группами сравнения равнялся 6,42 ($p < 0,01$).

Следовательно, в унифицированных условиях эксперимента КГ в стандартной дозе 100 мкг в смеси с ПАФ сенсибилизировал 83,3 % животных опытной группы с достоверностью различий среднегрупповых величин интегрального показателя ВТОЛ в опытной и контрольной группах белых мышей по критерию «Х» при уровне значимости $p < 0,01$, что, согласно классификационным критериям [9], характеризует препарат как обладающий сильной сенсибилизирующей способностью (аллергенной активностью) и определяет его отнесение к 1-му классу аллергенной опасности (чрезвычайно опасный промышленный аллерген).

Заключение. Из представленных результатов выполненных экспериментальных исследований вытекают следующие выводы.

1. На анализе литературных источников и действующих нормативно-методических

документов по изучению аллергенных свойств промышленных веществ обоснована возможность использования для определения степени сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности АБЛС экспериментальной методики воспроизведения и выявления ГЗТ на более доступных и дешевых по сравнению с морскими свинками лабораторных животных – белых мышах.

2. Унифицирована и апробирована постановка методики воспроизведения сенсибилизации в экспериментах на белых мышах с применением для внутрикожного введения в основание хвоста стандартной дозы АБЛС 100 мкг в смеси с ПАФ и выявления ГЗТ ВТОЛ в стандартной разрешающей дозе препарата 140 мкг, что позволяет использовать критерии оценки степени сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности промышленных аллергенов и обеспечивает объективность изучения специфических свойств и классифицирования аллергенной опасности новых АБЛС.

3. На экспериментальной модели воспроизведения и выявления сенсибилизации на белых мышах установлено, что фармацевтическая субстанция антибиотика КГ даже в дозе 10 мкг проявляла эффективное сенсибилизирующее действие на организм, а в стандартной дозе 100 мкг препарат сенсибилизировал 83,3 % животных опытной группы (10 из 12, а у 8 из них с интенсивностью ВТОЛ 2–5 баллов), причем среднегрупповая величина интегрального показателя ВТОЛ у опытных мышей была выше таковой в контроле в 7,3 раза ($p < 0,001$ по t) и соответственно рассчитанный статистический показатель «Х» различий между опытной и контрольной группами сравнения равнялся 6,42 ($p < 0,01$).

Следовательно, препарат КГ проявил сильную сенсибилизирующую способность и дифференцирован к 1-му классу аллергенной опасности (чрезвычайно опасный промышленный аллерген).

4. Разработан протокол исследований сенсибилизирующего действия АБЛС, включающий унифицированную постановку экспериментальной методики воспроизведения и выявления ГЗТ на белых мышах, оценку степени выраженности сенсибилизирующей способности и аллергенной опасности.

Обязательными параметрами оценки сенсибилизирующих свойств АБЛС определены показатели степени выраженности сенсибилизирующей способности и класс аллергенной опасности.

Список цитированных источников

1. Аллергия на антибиотики [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://s-p-a.com/article/570-allergiya-na-antibiotiki.html>. – Дата доступа: 02.02.2021.
2. Профессиональные вредности в производстве антибиотиков [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://studbooks.net/2501031/tovarovedenie/professionalnye_vrednosti_proizvodstve_antibiotikov. – Дата доступа: 02.02.2021.
3. Антибиотики как аллергены [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://allergiianet.ru/na-lekarstva/allergiya-na-antibiotiki.html>. – Дата доступа: 02.02.2021.
4. Алексеева, О. Г. Аллергия к промышленным химическим соединениям / О. Г. Алексеева, Л. А. Дуева. – Москва : Медицина, 1978. – 270 с.
5. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств / Г. П. Кудрина [и др.] ; Фарм. комитет МЗ СССР № 13. – Москва, 1988. – 19 с.
6. Черноусов, А. Д. Метод определения аллергенной активности низкомолекулярных химических веществ на мышах / А. Д. Черноусов // Гигиена труда и проф. патология. – 1987. – № 5. – С. 45–47.
7. Требования к постановке экспериментальных исследований по изучению аллергенных свойств и обоснованию предельно допустимых концентраций химических аллергенов в воздухе рабочей зоны и атмосферы : метод. указания № 1.1.11-12-5-2003 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь ; разработ. : В. В. Шевляков [и др.] // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / Респ. центр гигиены, эпидем. и обществ. здоровья, Респ. науч.-практ. центр гигиены ; под общ. ред. В. П. Филонова, С. М. Соколова. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – Ч. 14. – С. 133–156.
8. Требования к постановке токсиколого-аллергологических исследований при гигиеническом нормировании белоксодержащих аэрозолей в воздухе рабочей зоны : метод. указания 11-11-10 РБ-02 / М-во здравоохранения. Респ. Беларусь ; разработ. : В. В. Шевляков [и др.] // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / Респ. центр гигиены, эпидем. и обществ. здоровья, Респ. науч.-практ. центр гигиены ; под общ. ред. В. П. Филонова, С. М. Соколова. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2004. – Ч. 14. – С. 4–49.
9. Классификация и перечень алергоопасных для человека промышленных веществ, основные меры профилактики : руководство Р11-11-11 РБ 02 / М-во здравоохранения Респ. Беларусь ; разработ. : В. В. Шевляков [и др.] // Сборник официальных документов по медицине труда и производственной санитарии / Респ. центр гигиены, эпидем. и обществ. здоровья, Респ. науч.-практ. центр гигиены ; под общ. ред. В. П. Филонова, С. М. Соколова. – Минск : ПЧУП «Бизнесофсет», 2003. – Ч. 11. – С. 94–126.

Assessment of the degree of sensitizing ability and allergenic hazard of a pharmaceutical substance clindamycin hydrochloride in experiments on white mice

Zemtsova V. O.¹, Bogdanov R. V.¹, Shevlyakov V. V.¹, Filonyuk V. A.^{1, 2}, Chernyshova E. V.¹, Baranov S. A.¹

¹*Scientific practical Centre of Hygiene, Minsk, Republic of Belarus;*

²*Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus*

The study of the sensitizing properties of antibacterial drugs (hereinafter referred to as PABD) is an indispensable stage of their hygienic standardization in the air of the working area and atmosphere.

The method of reproducing sensitization to PABD in experiments on white mice was unified using a standard dose of 100 mcg of the drug in a 1 : 1 mixture with Freund's complete adjuvant in a volume of 0.06 cm³ per animal for intradermal injection into the base of the tail and the detection of delayed-type hypersensitivity by provocative intradermal paw swelling test (hereinafter referred to as IPST) in a resolving dose of the drug of 120–140 mcg, which allows the use of criteria for assessing the degree of sensitizing ability and



allergenic danger of industrial allergens and ensures the objectivity of studying the specific properties and classification of the allergenic danger of new PABD.

When testing an experimental model for the reproduction and detection of sensitization on white mice, it was found that the pharmaceutical substance of the antibiotic KG, even at a dose of 10 mcg, showed an effective sensitizing effect on the body, and at a standard dose of 100 mcg, the drug sensitized 83.3 % of experimental animals (10 out of 12) with the group average value of the integral indicator of IPST in experimental mice exceeded that in the control group by 7.3 times with their statistical difference at $p < 0.001$ according to the t criterion and at $p < 0.01$ according to the “X” criterion (6,42). On this basis, the drug KG was differentiated as having a strong sensitizing ability and classified as class 1 allergenic hazard (an extremely dangerous industrial allergen).

Keywords: antibacterial drugs, pharmaceutical substance of the antibiotic clindamycin hydrochloride, sensitizing ability and allergenic hazard class, experimental model for reproducing and identifying sensitization in white mice.

Поступила 05.06.2024