ISSN 2072-2419

№ 1

Международный вестник ветеринарии

INTERNATIONAL BULLETIN OF VETERINARY MEDICINE



САНКТ-ПЕТЕРБУРГ- 2016

www.spbgavm.ru

Международный вестник ветеринарии 1.2016

Редакционный совет
А.А. Стекольников – гл. ред., член-корр. РАСХН, д.в.н., проф., СПб
В.Д. Соколов – зам. гл. ред. д.в.н. проф., СПб
А.И. Ятусевич – зам. гл. ред. д.в.н. проф., Витебск
Редакционная коллегия
А.А. Алиев, д.в.н., проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
Л.М. Белова, д.б.н., проф., СПб.
М.И. Гулюкин, акад. РАСХН, д.в.н., проф. Москва.
Н.В. Зеленевский, д.в.н., проф., СПб.
Л.Ю.Карпенко, д.б.н., проф., СПб.
С.П. Ковалев, д.в.н., проф., СПб.
А.А. Кудряшов, д.в.н., проф., СПб.
В.А. Кузьмин, д.в.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
К.В. Племяшов, д.в.н., проф., СПб.
Б.С. Семенов, д.в.н., проф., СПб.
А.М. Смирнов, акад. РАСХН, д.в.н., проф., Москва.
А.А. Сухинин, д.б.н., проф., СПб.
А.Н. Шиков, д.ф.н., проф., СПб.
Редакционно-технический отдел
В.Д. Соколов, д.в.н. проф., СПб.
Н.Л. Андреева, д.б.н., проф., СПб.
М.Н. Макарова, д.м.н., проф., СПб.
А.В. Рыбакова , к.в.н., СПб.
Сдано в набор 04.04.2016
Подписано к печати 04.04.2016
Формат 70×100 1/16.
Бумага глянцевая № 1. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 5,2+1,63 цв. вкл.
Усл. Кр.-отт. 18,2. Тираж 1001 экз.

Editor –in– chief
A.A. Stekolnikov professor, DVM, Corresponding Member of the Russian Academy of Agricultural Sciences
Managing Editor
V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
A.I. Yatusevich - professor, DVM, Vitebsk
Editorial Board
A.A. Aliyev - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
L.M. Belova - professor, DBS, St. Petersburg
M.I. Gulyukina - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM, professor, Moscow
N.V. Zelenevski - professor, DVM, St. Petersburg
L.Y. Karpenko - professor, DBS, St. Petersburg
S.P. Kovalev - professor, DVM, St. Petersburg

A.A. Kudryashov - professor, DVM, St. Petersburg
V.A. Kuzmin - professor, DVM, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg .
K.V. Plemyshov - professor, DVM, St. Petersburg
B.S. Semenov - professor, DVM, St. Petersburg
A.M. Smirnov - Academician of the Agricultural Russian Academy of Agricultural Sciences, DVM, professor, Moscow
A.A. Sukhinin - professor, DVM, St. Petersburg
A.N. Shikov - professor, DFS, St. Petersburg
Technical Department
V.D. Sokolov - professor, DVM, St. Petersburg
N.L. Andreeva - professor, DBS, St. Petersburg
M.N. Makarova - professor, DBS, St. Petersburg
A.V. Rybakova - PhD, St. Petersburg
Sent to 03/10/2015
Signed for printing 14/09/2015
The format of 100 × 70 1/16 .
Glossy paper number 1. Offset printing.
Conv. Pec. liter. 5.2 1.63 fl. incl.
Conv. Cr. - ott . 18.2 . Circulation 1001 copies.

На 1 странице обложки расположено: Университет ветеринарной медицины г. Вена, является старейшим академическим учебным и научным учреждением ветеринарной медицины в немецкоязычном мире. Он считается одним из лучших учебных заведений ветеринарной медицины в Европе. Его центральное внимание уделяется охране здоровья человека и животных и контролю за производством пищевых продуктов. Ветеринарные лечебницы является интегрированным компонентом университета.

НАУЧНО-ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ ЖУРНАЛ

Номер госрегистрации СМИ ПИ № ФС 77-28268 от 18 мая 2007 г. Подписной индекс в агентстве Роспечать 82393.

Учредитель — Федеральное государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины» (ФГОУ ВПО «СПбГАВМ»)

Журнал основан в январе 2004 года в Санкт-Петербурге и входит в список ведущих лицензируемых научных журналов, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук.

Журнал распространяется по всем регионам России и Республике Беларусь (ВУЗЫ, НИИ, ВЕТЕРИНАРНЫЕ ОТДЕЛЫ).

Журнал выходит не менее 4 раз в год. В нем публикуются работы по всем основным вопросам ветеринарии и смежным дисциплинам.

В этот журнал Вы можете поместить рекламу Вашей фирмы. Объявления и коммерческая реклама публикуются после оплаты. Срок исполнения – в течение 3 месяцев.

Редакция не несет ответственности за содержание рекламных объявлений.

При перепечатке ссылка на журнал обязательна.

Мнение авторов и редакции по отдельным вопросам может не совпадать.

Плата с аспирантов за публикацию рукописи не взимается.

Справки и технические возможности типографии, в которой печатается журнал, оговариваются по телефону (812) 387-11-58.

Адрес редакции: 196084, СПб, ул. Черниговская дом 5, СПбГАВМ, редакция журнала «Международный вестник ветеринарии» (МВВ).

RESEARCH AND PRODUCTION JOURNAL

State registration number media PI № FS 77-28268 on May 18, 2007. Subscription Index Rospechat 82393.

Founded in January 2004 by Federal State Educational Institution of Higher Professional Education "Saint - Petersburg State Academy of Veterinary Medicine " (FSEI-HPE " SPbGAVM")

International Bulletin of Veterinary an academic international peer-reviewed journal that publishes original research articles as well as review articles in veterinary sciences and related academic disciplines. It covers all the scientific and technological aspects of veterinary sciences in general, anatomy, physiology, biochemistry, pharmacology, microbiology, pathology, public health, parasitology, infectious diseases, clinical sciences, alternative veterinary medicine and other biomedical fields.

The manuscripts submitted to this journal must be previously unpublished and not be under consideration for publication elsewhere. Manuscripts that are found to have been plagiarized from a manuscript by other authors, whether published or unpublished, will incur plagiarism sanctions.

This journal, including all individual contributions and illustrations published therein, is legally protected by copyright. Any use, exploitation or commercialisation is illegal and liable to criminal prosecution.

Requests about legal photocopy reproduction, copyright or duplication processing should be addressed to the editorial office:

196084, St. Petersburg, ul . Chernihiv house 5 SPbGAVM, Editorial Board of "International Bulletin of Veterinary Medicine" (IBVM), phone +7-812- 3871158 .

СОДЕРЖАНИЕ

Инвазионные болезни	• Сравнительная эффективность пиретроида и фипронилсодержащих препаратов при хориоптозе крупного рогатого скота. *Гаврилова Н.А.*	**7**
Фармако-логия, токсикология, фармация	• Импортозамещение ветеринарных препаратов (необходимость, алгоритм разработки, регламентация). *Андреева Н.Л., Соколов В.Д., Лунегов А.М.*	**12**
	• Эффективность различных доз препарата Азифлумин при лечении острой бронхопневмонии поросят. *Лобова П.С., Абрамов В.Е.*	**18**
	• Аспекты решения проблемы антибиотикотерапии в ветеринарной практике. *Барышев В.А, Глушкова О.С., Лунегов А.М.*	**23**
Зоогигиена, Санитария, Кормление	• Симбиоз стрептомицина и ярко-красного антибиотика живого тела растений и животных. *Кулясов П.А*	**28**
	• *Волховская губа ладожского* озера как источник загрязнения р.Невы. *Аршаница Н.М., Ляшенко О.А., Гребцов М.Р., Стекольников А.А. , Колосовская Е.В.*	**35**
	• Положительные и отрицательные аспекты диагностического использования мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (REAL - TIME PCR). *Сухинин А.А., Макавчик С.А, Прасолова О.В.*	**41**
Биохимия, анатомия, физиология	• Эхиноцитоз, интоксикация эритроцитов крыс фосфаколом и изменение уровня молекул средней массы. *Алистратова Ф. И. , Скопичев В.Г.*	**46**
	• Разработка энергометаболического состава и его эффективность для нормализации биохимических процессов при метаболическом ацидозе и кетозе у коров. *Евглевский А.А., Геков И.А., Михайлова И.И., Евглевская Е.П., Михайлова О.Н.*	**52**
	• Влияние доксирубицина и экспериментальной коррекционной схемы на гистологические характеристики миокарда. *Олейников Д.А., Яшин А.В.*	**59**
	•Определение остаточных количеств цифлутрина в молоке овец после применения препарата Цифлунит-флок. *Глухарева Е.В., Балышев А.В., Кочетков П.П, Кашковская Л.М.*	**63**
	• Антиагрегационные влияния сосудов на тромбоциты у телят молочного питания. *Завалишина С.Ю.*	**67**
Экспериментальная фармакология	•Оценка стабильности суспензий лекарственных препаратов для введения лабораторным животным. *Косман В.М., Пожарицкая О.Н., Шиков А.Н., Гущина С.В., Макарова М.Н.*	**71**
	• Анатомо-физиологическая характеристика пищеварительного тракта у человека и лабораторных животных. *Макарова М.Н., Рыбакова А.В., Гущин Я.А., Шедько В.В., Мужикян А.А., Макаров В.Г.*	**82**
	• Экспериментальные модели когнитивных нарушений. *Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г.*	**105**

CONTENTS

Invasive disease	• Comparative effectiveness of pyrethroid and fipronil based drugs in cattle chorioptic mange. *N. Gavrilova.*	**7**
Pharmacology, toxicology, pharmacy	• Import substitution of veterinary drug (necessity, algorithm of development, regulation). *N. Andreeva, V. Sokolov, A. Lunegov.*	**12**
	• Efficacy of different dose regimens of Aziflumin in treatment of acute broncho-pneumonia in pigs. *P. Lobova.*	**18**
	• Aspects to solve the problem antibiotic therapy in veterinary practice. *V. Barishev, O. Glushkov, A. Lunegov.*	**23**
Zoohygiene, Sanitation, Feeding	• Symbiosis of Streptomycin and Bright Red Antibiotic of Living Body of Plants and animals. *P. Kulyasov.*	**28**
	• The Volkhov Bay of Ladoga Lake as a Source of Pollution of the Neva River. *N. Arshanitsa, O. Liashenko, M. Grebtsov, A. Stekolnikov, E. Kolosovskaia.*	**35**
	• Positive and negative aspects of diagnostic usage of multiplex polymerase chain reaction in real time (Real - time PCR). *Suchinin A.A., Makavchik S.A., Prasolova O.V.*	**41**
Biochemistry, anatomy, physiology	• Echinocytosis, fosfakol intoxication of erythrocytes of rats and change of the level of molecules of average weight. *F. Alistratova, V. Skopichev.*	**46**
	• Development of energymetabolic composition and its effectiveness for normalization of biochemical processes in cows with metabolic acidosis and ketosis. *A. Evglevsky, I. Mikhailova, E. Evglevskaya, O. Mikhailova, I. Gecov.*	**52**
	• Influence of doxorubicin and experimental correction scheme on histological characteristics of cardiac muscle. *Oleinikov D.A., Iashin A.V.*	**59**
	• Determination of residues of cyfluthrin in milk of sheeps after treatment by Ciflunit-Flock. *E. Gluchareva, A. Balishev, P. Kochetkov.*	**63**
	• Antiaggregation influence vessels on platelet calves milk supply. *S. Zavalishina.*	**67**
Experimental pharmacology	• . Evaluation of stability of solid drugs suspensions for administration to laboratory animals. *V.M. Kosman, O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov, S.V. Gushcina, M.N. Makarova.*	**71**
	• Anatomical and physiological characteristics of digestive tract in humans and laboratory animals. *M. Makarova, A. Rybakova, Ya. Gushchin, V. Shedko, A. Muzhikyan, V. Makarov.*	**82**
	• Modeling of cognitive impairment. *Shekunova E., Kashkin V., Makarova M., Makarov V.*	**105**

12. Medvedev I.N. Approcci metodologici per valutare l'aggregazione piastrinica / I.N. Medvedev, S.Yu. Zavalishina, N.V. Kutafina, E.G. Krasnova // Italian Science Review. – 2015. – №1(22).– P.15-17.
13. Medvedev I.N. Dynamics of the Intravascular Activity of Platelets in Young Men with High Normal Blood Pressure Regularly Practicing Physical Activity / I.N. Medvedev, A.P. Savchenko, Ya.V. Kiperman // Biology and Medicine (Aligarh) 2015. 7:1 BM-069-15.
14. Oskar Nagy. Age-related changes in the concentrations of serum proteins in calves // J. of Applied Animal Research.–2014.– Vol.42, №4.–P.451-458.
15.Tóthová Csilla. Changes in the concentrations of serum proteins in calves during the first month of life // J. of Applied Animal Research.–2016.– Vol.44, №1.–P.338-346.



ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

УДК 619+615.038+615.013

ОЦЕНКА СТАБИЛЬНОСТИ СУСПЕНЗИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ ВВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫМ ЖИВОТНЫМ

Косман В.М.[1]-к.ф.н., с.н.т., Пожарицкая О.Н.[1]- к.ф.н., в.н.с., Шиков А.Н.[1]- д.ф.н., в.н.с., , Гущина С.В. [2]– рук. провизорской службы, Макарова М.Н.[2]– д.м.н.,
[1]ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», [2]ЗАО НПО «Дом Фармации»



РЕФЕРАТ

Внутрижелудочное введение твердых лекарственных препаратов в виде суспензий в инертных носителях является общепринятым в фармакологических доклинических исследованиях с использованием лабораторных животных. Для получения достоверных результатов таких исследований важна стабильность суспензий от момента их приготовления до момента введения.

По результатам экспериментальной работы установлена стабильность модельных суспензий в 1% крахмальном геле по показателям однородность частиц дисперсной фазы, высота отстоявшегося слоя, ресуспендируемость, pH и сухой остаток в течение 4 часов – максимально допустимого срока между приготовлением суспензии и введением животным.

Установлена стабильность суспензий после пропускания через зонды для внутрижелудочного введения мышам и крысам.

Выполнены валидационные испытания стабильности модельных суспензий для введения животным по показателю pH по параметру прецизионность, по показателю высота отстоявшегося слоя по параметрам линейность и прецизионность, по показателю сухой остаток по параметрам линейность, точность и прецизионность. Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным критериям.

На примере дарунавира показано, что суспензия препарата для введения животным

стабильна по содержанию основного действующего вещества, pH и содержанию сухого остатка. Это позволяет предположить, что при проведении рутинных экспериментов двух показателей – pH и содержание сухого остатка может быть достаточно для оценки качества суспензии дарунавира для введения лабораторным животным.

Ключевые слова: суспензия для введения животным, стабильность, валидация.

ВВЕДЕНИЕ

Доклинические исследования являются важным этапом разработки лекарственного препарата, позволяющим изучить его фармакологические и токсические свойства.

Получение воспроизводимых и достоверных данных в ходе доклинических исследований гарантируется соблюдением принципов GLP, которые регулируются в России Приказом Минздравсоцразвития РФ №708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и ГОСТ Р-33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

Многие виды доклинических исследований, прежде всего изучение токсичности, предполагают проведение экспериментов с использованием лабораторных животных. Особенности введения изучаемых лекарственных препаратов экспериментальным животным обусловлены с одной стороны биологическим видом тест -системы (кролики, крысы, мыши и др.), с другой – лекарственной формой и агрегатным состоянием изучаемого объекта. Способ введения препаратов при проведении доклинических исследований должен быть таким же, как рекомендованный для их дальнейшего применения. Пероральный прием является одним из наиболее распространенных способов введения лекарств человеку. При проведении экспериментов с лабораторными животными этот путь может быть реализован введением препарата с кормом и/или водой; в таблетках (в целом виде) или с помощью внутрижелудочного зонда [5,6,9-11]. Введение с пищей или водой не позволяет быстро и точно дозировать необходимое количество лекарственного препарата; введение в таблетках с помощью таблектодавателя возможно только крупным животным (собаки, кошки, мини-пиги) и затруднительно при работе с мелкими грызунами (крысы, мыши), являющимися наиболее частой тест-системой доклинических испытаний. Поэтому одним из наиболее распространенных способов введения изучаемых препаратов лабораторным животным является внутрижелудочное введение исследуемых объектов с помощью специального зонда. Этот способ рекомендован [6], как обеспечивающий наиболее точное дозирование лекарственных препаратов.

Зонды для внутрижелудочного введения представляют собой металлические изогнутые трубки с оливой на конце, надеваемые на шприц-дозатор. Размеры зондов зависят от вида животных, для которых они предназначены. Зонд для введения мышам обычно имеет диаметр оливы до 1,5 мм, толщину трубки до 1 мм, длину – 3-4 см; зонд для введения крысам имеет диаметр оливы до 4 мм, толщину – до 2,5 мм, длину – 9-10 см [3]. С помощью зонда легко дозировать препараты в виде жидких лекарственных форм (растворы, слизи, эмульсии, суспензии, настои и отвары, настойки, жидкие экстракты, микстуры). Для дозирования твердых лекарственных форм (таблетки, драже, порошки, гранулы, пилюли и др.) необходимы предварительные манипуляции – измельчение, растворение, разведение и т.п. Известны рекомендации о введении таких объектов виде суспензий в воде, молоке [3,4], инертных носителях, в том числе в 1% крахмальном геле [2,9,10].

Необходимо подчеркнуть, что в таком

случае при выполнении фармакологических экспериментов суспензии используют не как самостоятельную лекарственную форму, а лишь как способ перевода испытуемого объекта в вид, приемлемый для введения лабораторным животным.

Важным аспектом получения достоверных результатов исследований является стабильность суспензий, предназначенных для введения лабораторным животным, от момента их приготовления до момента введения. В доступной литературе нами не найдены подобные данные.

Целью настоящего исследования являлась оценка стабильности суспензий для введения животным, используемых при проведении фармакологических экспериментов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения 1% крахмального геля и модельных суспензий на его основе использованы: крахмал растворимый (чда, ЗАО Вектон); микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) (Comprecel, тип M102D+, Mintai, chemical co. LTD., Тайвань), дарунавир («Презиста, таблетки, покрытые пленочной оболочкой, 600 мг», Janssen-Cilag International NV, Belgien), приобретенный в аптечной сети.

Крахмальный гель (1%) получали согласно [1]. Модельные суспензии с наполнением МКЦ 5%, 10%, 15% и 20%, а также суспензии дарунавира, готовили следующим образом: необходимое количество МКЦ или таблеток растирали в ступке, прибавляли часть предварительного отмеренного носителя (1 % крахмального геля) в массо-объемном соотношении 1:0,5 или 0,5 мл на 1 таблетку и растирали до получения пульпы. Затем прибавляли еще порцию геля - примерно ¼ часть всего объёма или 1,5 мл на 1 таблетку, растирали, количественно переносили в мерный цилиндр, смывая небольшими порциями геля. Суспензию доводили до заданного объема, перемешивали, переносили в стеклянный флакон. Хранили при комнатной температуре в течение рабочего дня, перед отбором проб суспензию взбалтывали 15 с.

Однородность частиц дисперсной фазы оценивали микроскопически при помощи светооптического микроскопа Carl Zeiss (Германия). Микрофотографирование проводили при помощи цифровой фотокамеры Axio Scope A1 (Германия). Размеры частиц не должны превышать 50 мкм, критерий оценки да/нет.

Ресуспендируемость определяли, как способность частиц дисперсной фазы равномерно распределятся во всем объеме суспензии после взбалтывания в течение 20 секунд, определение проводили для 10 мл суспензии, критерий оценки да/нет.

Значение pH и сухого остатка определяли согласно требованиям ГФ XI [1, ч. 1, с. 89; ч. 2, с. 148]. Для определения сухого остатка суспензию взбалтывали, отбирали 5 мл в предварительно взвешенный бюкс, взвешивали, высушивали при температуре 100-105 ºС до постоянной массы.

Для оценки высоты отстоявшегося слоя, характеризующего седиментационную стабильность суспензий, равные объемы суспензий (10 мл), помещали в одинаковые пробирки, взбалтывали в течение 15 с и оставляли для отстаивания. Через 1 час измеряли высоту отстоявшегося слоя.

Содержание дарунавира определяли методом обращено-фазовой ВЭЖХ на хроматографе высокого давления LC-20 Prominence фирмы Shimadzu (Япония) с диодно-матричным детектором и колонкой Luna C_{18} (2) (4,6x150 мм; размер частиц сорбента 5 мкм) и предколонкой (3 мм) заполненной тем же сорбентом (Phenomenex, США) в градиентном режиме элюирования смесью 0,03% раствора трифторуксусной кислоты и ацетонитрила, скорость подачи элюента 1,0 мл/мин, объём пробы 10 мкл, длина волны детек-

тирования 265 нм. Количественный анализ выполнен методом внешнего стандарта с использованием субстанции дарунавира (Pharmachem private limited, India) в качестве рабочего стандартного образца (РСО). Аликвоту суспензии разбавляли 50% водным раствором ацетонитрила в 200 раз, обрабатывали ультразвуком в течение 15 минут, отфильтровывали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм (Phenex PTFE, Phenomenex, США) в виалу для ВЭЖХ-анализа.

Статистическая обработка результатов выполнена в соответствии с требованиями [1] с помощью программного обеспечения Microsoft Office Excel 2007 с расчетом средних арифметических значений ($\overline{X}$), соответствующих им стандартных отклонений (SD) и относительных стандартных отклонений (RSD, %); попарное сравнение выборок с применением критерия Стьюдента выполнено с помощью функции TTECT.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В данной работе рассмотрен подход, основанный на оценке стабильности суспензий для введения лабораторным животным на примере модельных суспензий. Для получения модельных суспензий выбрана МКЦ, часто применяемая в составе твердых лекарственных форм. В качестве жидкой фазы суспензий выбран 1% крахмальный гель, как носитель, наиболее часто используемый в практике фармакологических исследований на лабораторных животных [2].

На первом этапе оценили стабильность 1% крахмального геля по параметрам pH и сухой остаток (табл. 1) при хранении в холодильнике при температуре + 2-8 ºС.

Относительные стандартные отклонения, полученные при усреднении всех значений для каждого показателя, не превышали 3,9% для значений pH и 6,4% для содержания сухого остатка. Таким образом, носитель (1% крахмальный гель) стабилен в течение не менее 2 суток.

Данные по оценке качества и стабильности модельных суспензий МКЦ по параметрам: однородность частиц дисперсной фазы, ресуспендируемость, значение pH, сухой остаток и высота отстоявшегося слоя представлены в табл. 2. Выбор концентраций модельных суспензий МКЦ обусловлен их свойствами. Верхний уровень концентраций ограничен физическими свойствами суспензий на основе МКЦ - при попытке приготовить смеси более высокой концентрации (более 20%) не удавалось получить суспензии МКЦ, продукт представлял собой пастообразную, не расслаивающуюся массу; нижний (5%) – необходимостью значимых отличий от базового уровня носителя (1 % крахмального геля). Необходимо подчеркнуть, что данный диапазон концентраций характерен именно для МКЦ. Для других веществ/объектов он может быть совершенно иным. Так, рассматриваемые ниже суспензии дарунавира (масса 1 таблетки около 1,3 г) имели массовые концентрации, выходящие за пределы диапазона 5-20% (около 3,4% - суспензия для введения мышам; около 21,7% - суспензия для введения крысам), при этом сохраняли все свойства суспензий.

Обсуждая вопрос качества модельных суспензий, следует принять во внимание, что критерии качества для рассматриваемых суспензий по большинству параметров не регламентированы нормативными документами. Существуют общие требования по показателям однородность частиц дисперсной фазы и ресуспендируемость, которым модельные суспензии соответствовали во всех случаях. По показателям pH, высота отстоявшегося слоя и сухой остаток получены близкие значения для всех модельных суспензий (pH) или для каждой модели с различными концентрациями МКЦ (высота отстоявшегося слоя, сухой остаток). Полученные численные значения могут быть приняты

Таблица 1

Данные по стабильности 1% крахмального геля, $\overline{X}$ ±SD

Время от приготовления, ч	pH	Сухой остаток, %
0	3,44±0,03	0,89±0,01
2	3,53±0,06	0,94±0,07
4	3,51±0,08	0,97±0,07
24	3,70±0,07	0,91±0,01
48	3,74±0,10	0,96±0,09
Среднее ($\overline{X}$ ±SD)	3,58±0,14	0,93±0,06
RSD, %	3,9	6,4

за опорные (соответствующие качественным суспензиям), а приготовленные модельные суспензии можно считать качественными.

Данные таблицы 2 свидетельствуют о стабильности всех показателей качества модельных суспензий – относительные стандартные отклонения (RSD, %) значений численных показателей (pH, высота слоя, сухой остаток) не превышали 9,1%, наибольшие значения RSD получены для показателя высота отстоявшегося слоя, что может быть связано с его вариабельностью и несовершенством методики измерения. Выборки данных, полученные для численных значений (pH, высота отстоявшегося слоя, сухой остаток), подвергнуты статистической обработке с применением критерия Стьюдента (при доверительной вероятности P=95%). При сопоставлении результатов, полученных для временных точек 2 и 4 часа, с исходными (0 часов) данными, а также между собой для всех обсуждаемых параметров достоверных отличий не выявлено.

В целом, полученные данные свидетельствуют о том, что модельные суспензии стабильны и сохраняют свое качество в течение не менее 4 часов с момента приготовления.

Отдельно рассмотрена стабильность суспензий для введения животным до и после пропускания через зонды для внутрижелудочного введения. Этот аспект представлялся важным, поскольку пропускание через узкие трубки (толщиной менее 2,5 мм для введения крысам и менее 1 мм для введения мышам) может оказать влияние на реологические свойства суспензий.

Для оценки стабильности до и после пропускания через зонд для внутрижелудочного введения крысам выбрана модельная суспензия с содержанием МКЦ 5%. Качество суспензии оценивали по показателям pH, высота отстоявшегося слоя и сухой остаток (табл. 3).

В результате статистической обработки данных с применением критерия Стьюдента (доверительная вероятность P=95%) при сопоставлении результатов, полученных до и после пропускания через зонд для введения крысам для всех контролируемых параметров на всех временных точках, достоверных отличий не выявлено.

Зонд для внутрижелудочного введения мышам имеет меньший диаметр, чем для крыс; модельная суспензия с содержанием МКЦ 5% оказалась не подходя-

Таблица 2

Данные по оценке качества и стабильности модельных суспензий

МКЦ в 1% крахмальном геле, $\overline{X}$ ±SD

Время от приготовления, ч	Однородность частиц дисперсной фазы	Ресус-пенди-руемость	pH	Высота отстоявшегося слоя, см	Сухой остаток, %
5% МКЦ					
0	да	да	5,35±0,01	1,7±0,2	5,7±0,3
2	да	да	5,39±0,04	1,8±0,2	5,8±0,3
4	да	да	5,38±0,04	1,6±0,1	5,9±0,1
Среднее ($\overline{X}$ ±SD)	да	да	5,37±0,03	1,7±0,2	5,8±0,2
RSD, %	0*	0*	0,6	9,1	4,1
10 % МКЦ					
0	да	да	5,36±0,04	3,9±0,5	11,5±0,4
2	да	да	5,40±0,04	4,0±0,3	11,5±0,4
4	да	да	5,41±0,04	3,9±0,2	11,2±0,4
Среднее ($\overline{X}$ ±SD)	да	да	5,39±0,04	3,9±0,3	11,1±0,6
RSD, %	0*	0*	0,7	8,4	5,1
15 % МКЦ					
0	да	да	5,35±0,01	5,8±0,3	15,1±0,5
2	да	да	5,39±0,04	5,8±0,2	15,5±0,1
4	да	да	5,38±0,04	5,9±0,2	15,6±0,3
Среднее ($\overline{X}$ ±SD)	да	да	5,36±0,03	5,8±0,2	15,4±0,4
RSD, %	0*	0*	0,6	3,3	2,4
20 % МКЦ					
0	да	да	5,66±0,06	8,3±0,4	20,2±0,5
2	да	да	5,54±0,07	8,3±0,2	21,5±1,3
4	да	да	5,49±0,13	8,4±0,2	20,5±1,0
Среднее ($\overline{X}$ ±SD)	да	да	5,56±0,11	8,3±0,2	20,8±1,0
RSD, %	0*	0*	2,0	2,3	4,8

Примечание: * - поскольку во всех случаях получен одинаковый результат испытаний – ответ «да», среднее значение по данному критерию принято так же «да», стандартное отклонение и относительное стандартное отклонение приняты равными нулю.

Таблица 3

Данные по оценке стабильности модельной суспензии с содержанием МКЦ 5% до и после пропускания через зонд для внутрижелудочного введения крысам, $\overline{X}$ ±SD

Показатель	Время от приготовления суспензии, ч	Значения до пропускания через зонд	Значения после пропускания через зонд
pH	0	5,34±0,01	5,38±0,02
	2	5,38±0,02	5,37±0,02
	4	5,39±0,03	5,38±0,01
Высота отстоявшегося слоя, см	0	1,8±0,1	1,9±0,1
	2	1,9±0,2	1,9±0,2
	4	1,8±0,2	1,8±0,2
Сухой остаток, %	0	5,78±0,25	5,72±0,10
	2	5,91±0,23	5,60±0,33
	4	5,76±0,29	5,84±0,16

Таблица 4

Данные по оценке стабильности суспензии дарунавира (для введения мышам) до и после пропускания через зонд для внутрижелудочного введения мышам, $\overline{X}$ ±SD

Показатель	Время от приготовления суспензии, ч	Значения до пропускания через зонд ($\overline{X}$ ±SD)	Значения после пропускания через зонд ($\overline{X}$ ±SD)
pH	0	6,19±0,08	6,16±0,06
	4	6,14±0,06	6,13±0,05
Высота отстоявшегося слоя, см	0	1,7±0,2	1,6±0,2
	4	1,7±0,2	1,6±0,2
Сухой остаток, %	0	3,70±0,15	3,70±0,04
	4	3,76±0,11	3,69±0,05

щей для пропускания через зонд для введения мышам. Поэтому для оценки стабильности до и после пропускания через зонд для внутрижелудочного введения мышам выбрана суспензия дарунавира аналогичная использованной при выполнении доклинического исследования препарата. В исследовании доза, вводимая животным (мышам), составляла 500 мг/кг; суспензию (для введения мышам) готовили исходя из соотношения 38,4 мл суспензии из 1 таблетки препарата. Качество суспензии оценивали по показателям pH, высота отстоявшегося слоя и сухой остаток (табл. 4).

В результате статистической обработки данных с применением критерия Стьюдента (доверительная вероятность P=95%) при сопоставлении результатов, полученных до и после пропускания через зонд для мышей для всех контролируемых параметров на всех временных точках, достоверных отличий не выявлено.

На основании полученных результатов подтверждена стабильность суспензий после пропускания через зонды для внутрижелудочного введения мышам и крысам.

Полученные результаты позволяют перейти к валидации стабильности суспензий для введения лабораторным животным. Валидационные испытания выполнены для основных показателей качества модельных суспензий.

Для валидации стабильности модельных суспензий по показателю pH выполнены испытания по параметру прецизионность. Мерой прецизионности является величина относительного стандартного отклонения (RSD,%), полученная при усреднении результатов измерений, выполненных на одних объектах, одним аналитиком, на одном приборе, в течение короткого промежутка времени [10, 11]. Оценка прецизионности выполнена по результатам анализа модельных суспензий на четырех уровнях концентраций. Измерение pH проводили не менее, чем в трехкратной повторности, сразу после приготовления, через 2 и через 4 часа с момента приготовления суспензий. По результатам измерений на каждой временной точке судили о прецизионности внутри серии, по результатам всех измерений – о прецизионности между сериями. Прецизионность pH внутри серий измерений не превышала 2,5%, общая прецизионность (между сериями) не превышала 2%. Поскольку значения pH оказались не зависящими от концентрации модельной суспензии, допустимо усреднение всех значений. При этом получено среднее значение pH 5,43±0,1, относительное стандартное отклонение этого значения составило 1,8%. Таким образом, прецизионность pH суспензий для введения животным не превышает 2%, что соответствует общим требованиям, согласно которым, прецизионность должна быть не более 15% [7, 8].

Для валидации стабильности модельных суспензий по показателю высота отстоявшегося слоя выполнены испытания по параметрам линейность и прецизионность на четырех уровнях концентраций.

Выбор концентраций модельных суспензий МКЦ при оценке линейности обусловлен их свойствами. Верхний уровень ограничен физическими свойствами суспензий МКЦ - смеси с более высокой концентрацией представляли собой пастообразную, не расслаивающуюся массу. Измерение высоты отстоявшегося слоя проводили не менее, чем в трехкратной повторности, сразу после приготовления суспензий, через 2 и через 4 часа после приготовления; использовали усредненные значения. По результатам измерений получено уравнение регрессии y=0,434x-0,5 с коэффициентом корреляции r=0,9986 (r>0,99), что свидетельствует о высокой степени линейной корреляции аналитического отклика (высоты отстояв-

шегося слоя) от концентрации суспензии.

Прецизионность высоты отстоявшегося слоя внутри серий измерений (на каждой из временных точек 0, 2 и 4 часа после приготовления) не превышала 13%, общая прецизионность (между сериями) не превышала 9,5%. Полученные результаты соответствуют общим требованиям, согласно которым, прецизионность должна быть не более 15% [7, 8].

Для валидации стабильности модельных суспензий по показателю содержание сухого остатка выполнены испытания по параметрам линейность, точность и прецизионность на четырех уровнях концентраций.

Носитель, использованный для получения модельных суспензий (1% крахмальный гель), также имеет сухой остаток и вносит свой вклад в итоговое значение, получаемое при анализе модельных суспензий. Поэтому при оценке линейности содержания сухого остатка рассматривали как абсолютное значение сухого остатка, полученное для модельных суспензий, так и приведенное – за вычетом сухого остатка, соответствующего носителю (0,9%, табл. 1). По результатам измерений получены уравнения регрессии y=0,988x+0,94 и y=0,984x+0,1 для абсолютных и приведенных значений сухого остатка с коэффициентами корреляции r=0,9994 и 0,9988 (r>0,99) соответственно. Полученные данные свидетельствуют о высокой степени линейной корреляции аналитического отклика (содержания сухого остатка) от концентрации суспензии.

Точность характеризует близость результатов испытаний, полученных с помощью данной методики, к истинному значению. Точность оценивали по принципу «внесено-найдено» как относительную систематическую погрешность (δ) в процентах от внесенного количества. При расчетах использовали не абсолютные, а приведенные значения содержания сухого остатка (за вычетом сухого остатка, соответствующего 1% крахмальному гелю; 0,9%, табл. 1). Систематическая погрешность (δ) не превышала 3,5%, что свидетельствует об удовлетворительной точности определения сухого остатка. Следует подчеркнуть важность этого результата, поскольку сухой остаток является основном количественном показателем качества модельных суспензий для введения животным.

Прецизионность содержания сухого остатка внутри серий измерений (на каждой из временных точек 0, 2 и 4 часа после приготовления) не превышала 6%, общая прецизионность (между сериями) не превышала 5,5%. Полученные результаты соответствуют общим требованиям, согласно которым, прецизионность должна быть не более 15% [7, 8].

Таким образом, валидирована стабильность суспензий для введения животным по показателю pH по параметру прецизионность, по показателю высота отстоявшегося слоя по параметрам линейность и прецизионность, по показателю сухой остаток по параметрам линейность, точность и прецизионность. Получены удовлетворительные результаты по всем валидационным критериям.

Для апробации предлагаемого подхода выполнена оценка стабильности суспензии дарунавира, аналогичной готовившейся при проведении доклинического исследования. В исследовании доза, вводимая животным (крысам), составляла 2000 мг/кг; суспензию (для введения крысам) готовили исходя из соотношения 6 мл суспензии из 1 таблетки препарата; расчетная концентрация действующего вещества - дарунавира в суспензии составляла 100 мг/мл.

Оценку качества суспензии дарунавира проводили сразу после приготовления и через 4 часа после приготовления по показателям pH, высота отстоявшегося слоя, сухой остаток и содержание дарунавира (табл. 5).

Таблица 5

Данные по оценке стабильности суспензии дарунавира (для введения крысам), $\overline{X}$ ±SD

Показатель	Сразу после приготовления	Через 4 часа после приготовления
pH	6,32±0,04	6,27±0,04
Высота отстоявшегося слоя, см	5,4±0,1	5,5±0,1
Сухой остаток, %	18,3±0,3	18,3±0,1
Содержание дарунавира, мг/мл	98,8±1,6	98,1±2,4

Данные таблицы 5 свидетельствуют о стабильности всех показателей качества суспензии дарунавира в течение 4 часов. В результате статистической обработки данных с применением критерия Стьюдента (доверительная вероятность P=95%) при сопоставлении результатов, полученных для временных точек 4 часа, с исходными (0 часов) данными, для всех обсуждаемых параметров достоверных отличий не выявлено. Полученные данные свидетельствуют о том, суспензия дарунавира стабильна и сохраняет свое качество в течение не менее, чем 4 часов с момента приготовления.

Таким образом, в результате эксперимента показана стабильность суспензии по содержанию основного действующего компонента (дарунавира), pH, высоте отстоявшегося слоя и сухому остатку. Можно предполагать, что при рутинных экспериментах для подтверждения стабильности суспензий дарунавира для введения лабораторным животным достаточно использовать показатели pH и содержание сухого остатка.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов можно предложить оценивать стабильность суспензий дарунавира для введения лабораторным животным по двум основным показателям качества – pH и содержание сухого остатка, измерение которых следует проводить не менее, чем в трехкратной повторности сразу после приготовления суспензий и через 4 часа после приготовления.

Evaluation of stability of solid drugs suspensions for administration to laboratory animals. V.M. Kosman, O.N. Pozharitskaya, A.N. Shikov, S.V. Gushcina, M.N. Makarova.

ABSTRACT

Intragastric administration of solid formulations in the form of suspensions in the inert carrier is a common approach for pharmacological experiments in preclinical studies on laboratory animals. A stability of suspensions after its preparation till administration to animals became high importance.

The stability of model suspensions in 1% starch slime was studied during 4 hours. The next parameters were evaluated: uniformity of solid particles, a height of solid phase after sedimentation, pH and dry residue.

Stability of suspensions after transit through gavages for intragastric administration for mice and rats was studied.

Validation tests for pH (precision), height of solid phase after sedimentation (linearity and precision), dry residue (linearity, accuracy and precision) were done. Tolerable results for all validation criteria were received.

It was shown that suspension of darunavir was stable by concentration of active

compound, pH and dry residue during 4 hours after preparation. These results allowed us to suggest that the stability of darunavir suspension could be assayed by pH and dry residue in routine experiments.

Key words: suspension for application to animals, stability, validation.

ЛИТЕРАТУРА

1. Государственная Фармакопея СССР. Изд. XI., вып.1.М.: Медицина, 1987. 336 с. вып. 2., Медицина, Москва, 1989. 400 с.
2. Гущина С.В., Макарова М.Н., Пожарицкая О.Н. Сравнительное токсикологическое изучение носителей для лекарственных средств, применяемых в доклинических исследованиях. // Международный Вестник Ветеринарии. 2015. №3. С. 92-98.
3. Западнюк И.П., Западнюк В.И., Захария Е.А., Западнюк Б.В., Лабораторные животные. Разведение, содержание, использование в эксперименте. Киев: Вища школа, 3-е изд., 1983. 383 с.
4. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях. М.: Профиль–2С, 2010. 358 с.
5. Методические рекомендации 1.2.0068-12. Исследование канцерогенных свойств химических веществ и биологических продуктов в хронических опытах на животных, М.: Федеральный центр гигие-ны и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
7. Guidance for Industry: Bioanalytical method for validation. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for veterinary medicine, Rockville, MD, U.S., 2001.
8. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP192217/2009, Committee for medicinal products for human use (CHMP), London, 2011.
9. Morton D.B., Jennings M., Buckwell A., Ewbank R., Godfrey C., Holgate B., Inglis I., James R., Page C., Sharman I., Verschoyle R., Westall L., Wilson A.B. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVAAWF/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement. Laboratory Animals. 2001, Vol. 35, P. 1- 41.
10. Nebendahl K. Routes of administration, in: The laboratory rat, Elsevier, Hannover 2000. P. 463-482.
11. Shimuzu S. Routes of administration, in: The laboratory mouse, Elsevier, Hannover 2004. P. 527-541.