

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИФфуЗИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА ПИЯВИТ ЧЕРЕЗ РОГОВИЦУ ГЛАЗА КРОЛИКА

В. И. Севастьянов<sup>1</sup>, Н. В. Перова<sup>1</sup>, И. А. Довжик<sup>1</sup>,  
А. Н. Самойлов<sup>2</sup>, И. П. Баскова<sup>3</sup>

В эксперименте на кроликах показана высокая способность препарата пиявит проникать через роговицу в переднюю камеру глаза, обладающего выраженными тромболитическими свойствами. Предполагается, что входящие в состав пиявита биологически активные вещества обуславливают транспорт лекарственного средства через роговичный барьер, тем самым обеспечивая максимальную концентрацию, что может явиться положительным моментом при лечении травм и заболеваний глаза, сопровождающиеся кровоизлияниями.

**Ключевые слова:** пиявит, роговица, диффузия, кровоизлияние

### ВВЕДЕНИЕ

Актуальной задачей офтальмологов остается поиск и разработка новых лекарственных средств для лечения травм и заболеваний глаз, сопровождающихся кровоизлияниями в среды глаза. До сих пор не создано эффективного лекарства в удобной форме.

Медицинская пиявка оказывает многостороннее положительное действие при ряде заболеваний [1]. Кроме ингибиторов протеолитических ферментов, как гирудин, бделлины и эглины, а также фермента гиалуронидазы, в секрете слюнных желез медицинских пиявок обнаружены фермент дестабилаза [9, 10], разрушающий изопептидные связи в стабилизированном фибрине и оказывающий тромболитическое действие, ингибитор калликреина плазмы крови, а также простаноиды, по спектру действия подобные простаглицлину и его стабильным аналогам [2 – 5]. Независимо от наличия гирудина секрет блокирует контактную стадию внутреннего механизма свертывания крови путем ингибирования калликреина плазмы крови и фактора Хагемана [4]. Поскольку терапия живыми пиявками не удобна, был создан препарат пиявит, представляющий собой находящаяся в желатиновой капсуле лиофилизат гомогената цельной медицинской пиявки. Препарат зарегистрирован в Минздраве РФ (№ 94/302/1 от 30.12. 1994) и разрешен к клиническому применению как тромболитическое средство для приема внутрь.

При лечении травм и заболеваний глаз пероральная форма пиявита не может обеспечить высокой локальной концентрации лекарства в месте повреждения, что вызвало необходимость создания глазных форм пиявита.

Высокая эффективность глазных капель пиявит доказана на экспериментальной модели кровоизлияния в передней камере глаза кролика [6]. Однако известно, что роговица играет роль своеобразного барьера на пути проникновения в глаз различных веществ, в том числе и лекарственных.

В связи с этим целью настоящей работы явилось доказательство возможной диффузии препарата пиявит в виде глазных капель через роговицу кролика в условиях *in vivo* по динамике его накопления в передней камере глаза.

Объектом исследования служил пиявит в виде глазных капель. Их состав: пиявит — 0,3 % (3 мг/мл), бензалкония хлорид (консервант) — 0,01 %, нейтральные вещества и дистиллированная вода.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

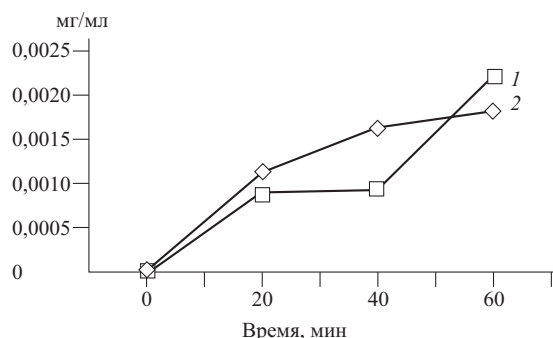
Эксперименты проводили на кроликах (самках) породы шиншилла массой 2 – 3 кг. Количество наносимого на роговицу лекарственного средства (ЛС) в 1 мл глазных капель составляло 0,3 мг. После нанесения ЛС на роговицу через каждые 20 мин в течение 1 ч проводили взятие проб внутриглазной жидкости инсулиновым шприцем. Объем проб составлял 0,2 мл и был практически равен количеству влаги передней камеры глаза. Количество ЛС в пробах внутриглазной жидкости определяли на спектрофотометре марки Ult-raspec II (ЛКБ, Швеция) в диапазоне длин волн от 360 до 560 нм. Перед измерением отобранные пробы влаги передней камеры разбавляли 0,9 % раствором натрия хлорида в 5 раз. Исследованное ЛС идентифицировали по характерным пикам поглощения, сравнивая данные с калибровочной кривой.

Контролем служил 10 % водный раствор флюоресцеина, имеющий максимум поглощения при длине волны 490 нм [7]. На роговицу наносили 0,1 мл водного раствора красителя, содержащего 1 мг флюоресцеина.

<sup>1</sup> НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ, Москва.

<sup>2</sup> Кафедра глазных болезней (зав. — проф. М. В. Кузнецова) Казанской государственной медицинской академии, Казань, 420012, ул. Мушгари, 11.

<sup>3</sup> Кафедра физиологии человека и животных (зав. — акад. РАМН И. П. Ашмарин) Московского государственного университета им. М. И. Ломоносова, Москва.



Скорость накопления испытуемых веществ во влаге передней камеры.

1 — пиявит, 2 — флюоресцеин.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Уже через 20 мин после нанесения 100 мкл глазной формы пиявита, содержащего 0,3 мг ЛС, на роговицу глаза кролика, ЛС было обнаружено в передней камере глаза.

В таблице представлены содержание пиявита и флюоресцеина в трех отобранных каждые 20 мин пробах (0,2 мл) влаги передней камере глаза в течение 60 мин диффузии веществ через роговицу кролика.

Флюоресцеин имеет значительно меньшую молекулярную массу (389,4 дальтон) по сравнению с молекулярной массой пиявита (несколько тысяч дальтон), в состав которого входят высокомолекулярные вещества белковой природы. Это означает, что коэффициент диффузии флюоресцеина много выше коэффициента диффузии пиявита. Кроме того, в наносимой на роговицу пробы объемом 100 мкл флюоресцеина было в 3 раза больше (1 мг), по сравнению с пиявитом (0,3 мг).

Из уравнения Фика [8]:  $J = DC_0/d$ , мг/см<sup>2</sup>мин, где  $D$  — коэффициент диффузии, см<sup>2</sup>/мин;  $d$  — средняя толщина роговицы, см;  $C_0$  — концентрация вещества на роговице, следует, что чем больше значения  $D$  и  $C_0$  тем больше диффузионный поток данного вещества через роговицу глаза. Другими словами, в один и тот же отрезок времени количество продиффундировавшего флюоресцеина в переднюю камеру глаза кролика должно быть существенно больше, чем пиявита.

Однако из таблицы видно, что за время эксперимента в переднюю камеру диффундирует  $(30 \pm 5)$  % пия-

вита и  $(0,80 \pm 0,12)$  % флюоресцеина от общего количества наносимых на роговицу глаза веществ.

На рисунке представлены динамика изменений значений скоростей накопления пиявита и флюоресцеина, вычисленных из экспериментальных данных (см. таблицу).

Из рисунка видно, что в интервале времени от 40 до 60 мин скорость диффузии пиявита через роговицу, в отличие от флюоресцеина, изменяется незначительно. Это свидетельствует о том, что процесс диффузии ЛС уже на 60-й минуте переходит в режим стационарного диффузионного потока, что также нельзя объяснить с позиций пассивных диффузионных процессов [8].

В зависимости от свойств лекарства и барьеров, через которое оно проникает, а также способа введения все механизмы всасывания можно разделить на четыре основных вида: диффузия (проникновение молекул за счет теплового движения), фильтрация (прохождение молекул через поры под действием давления), активный транспорт (перенос с затратами энергии) и осмос (молекула лекарства как бы продавливается через оболочку мембраны).

Механизм активного (трансмембранного) переноса пиявита можно объяснить существованием в его составе фермента дестабилазы, содержащий белковый и липидный компоненты. При изучении поведения дестабилазы в модельных средах с разной полярностью была установлена мицеллярная природа данного соединения [5].

Благодаря липидной составляющей, образующие мицеллы обладают способностью менять свою пространственную ориентацию в зависимости от полярности окружающей среды. Другими словами, в неполярной среде внешний слой образующихся мицелл из агрегатов дестабилазы обогащен гидрофобными группами. При переходе в полярную среду в результате переориентации функциональных групп фермента на поверхности мицелл преобладают гидрофильные группы. Данная способность мицелл и делает возможным трансмембранный перенос пиявита через роговицу с помощью тех же механизмов, которые обеспечивают в клетке обмен веществ с окружающей средой.

## ВЫВОДЫ

1. В экспериментах *in vivo* пиявит в виде глазных капель хорошо проникает через роговицу в переднюю камеру глаза кролика.

2. Входящие в состав пиявита биологически активные вещества обуславливают активный перенос лекарственного средства через роговицу глаза, что, в отличие от пассивного диффузионного переноса, приводит к быстрому повышению концентрации пиявита в передней камере глаза.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Щеголев, М. С. Федорова, *Медицинская пиявка и ее применение*, Медгиз, Москва (1955).

Динамика накопления пиявита и флюоресцеина во влаге передней камеры глаза кролика

Время, мин	Пиявит, мг	Флюоресцеин, мг
0	0	0
20	0,0225	0,017
40	0,054	0,035
60	0,0895	0,0785

2. И. П. Баскова, Г. И. Никонов, *Биохимия*, 50, 424 – 431 (1985).
3. И. П. Баскова, Г. И. Никонов, *ДАН СССР*, № 6, 1492 – 1493 (1987).
4. И. П. Баскова, Г. И. Никонов, *Биохимия*, 52(9), 1461 – 1467 (1987).
5. Г. И. Никонов, *Медицинская пиявка. Основы гирудотерапии. "СДС"*, Петербург (1998).
6. А. Н. Самойлов, *Тезисы докладов VIII Российского национального конгресса "Человек и лекарство"*, Москва (2001), сс. 614 – 615.
7. Р. Б. Гольдин, Л. В. Белецкая, И. Н. Крюкова, К. Л. Шахина, *Иммунолюминесценция в медицине*, Медицина, Москва (1977).
8. А. Б. Рубин, *Лекции по биофизике*, Из-во МГУ, Москва (1994).
9. I. P. Baskova, *Biokhimiia*, 50(3), 424 – 31 (1985).
10. L. L. Zavalova, *Biokhimiia*, 57(3), 468 – 72 (1992).

Поступила 15.12.03

## STUDYING THE DIFFUSION OF PIYAVIT THROUGH RABBIT EYE CORNEA

V. I. Sevast'yanov<sup>1</sup>, N. V. Perova<sup>1</sup>, I. A. Dovzhik<sup>1</sup>, A. N. Samoilov<sup>2</sup>, and I. P. Baskova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Transplantology and Artificial Organs, Ministry of Public Health, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> Department of Eye Diseases, State Medical Academy, ul. Mushtari 11, Kazan, Tatarstan, 420012 Russia;

<sup>3</sup> Human and Animal Physiology Chair, Department of Biology, Moscow State University, Vorob'evy gory 1/12, Moscow, 119992 Russia

The results of experiments on rabbits showed that the new drug piyavit, possessing pronounced thrombolytic properties, readily diffuses through cornea to the anterior chamber of eye. It is suggested that the biologically active components of piyavot facilitate the drug penetration through the corneal barrier. This favors maximum drug concentration and positively influences the therapy of traumas and eye diseases accompanied by hemorrhages.