ВИВЧЕННЯ СЕНСИБІЛІЗУЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ПРИРОДНОЇ СИРОВИНИ КАПСУЛ "ГЕПАФІСАН"

Л.В.Яковлєва, О.Б.Леницька, О.В.Геруш, О.М.Горбань***

Національний фармацевтичний університет
Буковинський державний медичний університет*
Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика**

Ключові слова: сенсибілізуючі властивості; капсули "Гепафісан"; активна шкірна анафілаксія; кон'юнктивальна проба; дегрануляція мастоцитів

Стаття присвячена доклінічному вивченню нешкідливості нового препарату гепатотропної дії — капсул "Гепафісан", створеного на основі природної сировини, а саме його сенсибілізуючих властивостей. Вивчення можливої сенсибілізуючої дії капсул "Гепафісан" проведено в реакції in vitro: непряма дегрануляція мастоцитів і в тестах in vivo: "кон'юнктивальна проба" та "активна шкірна анафілаксія". Досліджуваний препарат в умовно терапевтичній дозі 108 мг/кг та в дозі, яка в 10 разів перевищує умовно терапевтичну — 1080 мг/кг, не проявляє анафілактогенних властивостей, не викликає підвищення кількості дегранульованих мастоцитів і появу гомоцитотропних антитіл. Також при введенні гепафісану видимі ознаки запальної реакції на слизовій оболонці ока відсутні. Таким чином, капсули "Гепафісан" не викликають сенсибілізації організму, що свідчить про високий рівень безпеки досліджуваного фармакологічного засобу, який можна рекомендувати у виробництво або клінічну практику як новий гепатопротектор, що не виявляє антигенних властивостей.

Проблема алергії сьогодні — одна з важливих у медицині. В останнє десятиріччя зросла кількість людей з алергічними захворюваннями, при цьому серед них багато хворих, у яких алергізація розвивається на тлі основного захворювання [6]. Сучасні синтетичні лікарські препарати, які використовують для лікування, виявляють велику кількість побічних ефектів, у тому числі й алергічних реакцій. Тому ліки рослинного походження на сучасному фармацевтичному ринку займають дуже велику частку. В останні роки багато відомо про корисні властивості лікарських рослин та широкі можливості їх використання, але дуже мало — про їх протипоказання [8].

Вищенаведене свідчить про актуальність питання нешкідливості нових лікарських засобів, в тому числі й рослинного походження. Згідно з існуючими вимогами МОЗ України при доклінічному вивченні нових лікарських засобів, у тому числі рослинного походження, визначення сенсибілізуючих властивостей є обов'язковою вимогою Фармакологічного комітету МОЗ України [1, 5].

Метою даної роботи стало вивчення можливої сенсибілізуючої дії капсул "Гепафісан", який було розроблено як новий гепатопротектор, до складу якого входять 7 рослинних компонентів: плоди розторопші, коріння кульбаби, листя м'яти, трава бобівника трилистного, квітки нагідок, трава реп'яшка, трава рутки лікарської [7, 9, 10].

Матеріали та методи

Можливі сенсибілізуючі властивості досліджуваного препарату оцінювали за його здатністю викликати реакції гіперчутливості негайного та повільного типів на моделі активної шкірної анафілаксії та в тестах непрямої дегрануляції мастоцитів та кон'юнктивальної проби [1].

Експерименти проводили на 2-х видах тварин: морських свинках (кон'юнктивальна проба та активна шкірна анафілаксія) та 29-ти білих безпородних щурах (реакція дегрануляції мастоцитів). Оскільки досліджуваний препарат призначений для перорального застосування, його вводили тваринам перорально (морським свинкам) та внутрішньошлунково (щурам) в умовно терапевтичній дозі 108 мг/кг, яка була встановлена

Л.В.Яковлева — доктор фармац. наук, професор, завідувачка Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

О.В.Геруш — канд. фармац. наук, завідувач кафедри фармації Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці)

О.М.Горбань — канд. біол. наук, доцент кафедри організації і економіки фармації Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика (м. Київ)

Таблиця 1

Вивчення сенсибілізуючих властивостей капсул "Гепафісан" у тесті "Кон'юнктивальна проба", M (min_M – max_M)

Групи тварин	Доза, мг/кг	n	Вираженість офтальмореакції, бали	
			15 хвилин	24 години
Капсули "Гепафісан"	108	7	0	0
	1080	6	0	0

Примітка: n — кількість тварин у групі.

під час вивчення фармакологічної (гепатопротекторної) активності, та в дозі, яка в 10 разів її перевищує — 1080 мг/кг [1].

Модель "кон'юнктивальна проба" є відтворенням алергічної реакції на слизовій кон'юнктиви і рогівки [1, 5]. Для постановки даної моделі використовували 13 морських свинок масою 450-500 г, яких сенсибілізували досліджуваним препаратом у дозах 108 та 1080 мг/кг шляхом перорального введення протягом 14 днів [1, 5].

На 21-й день після початку сенсибілізації проводили закапування 1-ї краплі розрізняльної дози препарату під верхню повіку і враховували реакцію слизової оболонки через 15 хвилин і через 24 години. Друге око служило контролем на дистильовану воду [1, 5].

Оцінку результатів кон'юнктивального тесту виражали в балах:

1 — легке почервоніння сльозової протоки;

2 — почервоніння сльозової протоки і склери в напрямку до роговиці;

3 — почервоніння всієї кон'юнктиви і склери.

Модель активної шкірної анафілаксії є реакцією негайного типу і дозволяє виявити можливу сенсибілізуючу дію в умовах in vivo [1]. Експеримент проводили на 14-ти морських свинках. На даній моделі використовували оптимальну схему сенсибілізації: тваринам дослідних груп уводили перорально водну суспензію досліджуваного препарату в дозі 108 мг/кг протягом 14-ти днів. Контрольним тваринам вводили воду.

На 21-у добу після початку сенсибілізації дослідним і контрольним тваринам на вистрижені ділянки шкіри спини вводили внутрішньошкірно 40 мкл суспензії досліджуваного препарату в концентрації, яка не викликає неспецифічної запальної реакції. Для контролю розчинника на ділянці протилежного боку тварини внутрішньошкірно вводили 40 мкл фізіологічного розчину. Потім внутрішньовенно — 0,5 мл 1% розчину синього Еванса. Через 30 хв тварин знеживлювали передозуванням ефірного наркозу, відсепаровували ділянки шкіри і визначали площу синіх плям у місці введення препарату. Показником місцевої анафілактичної реакції на моделі активної шкірної анафілаксії є діаметр забарвленої плями в місці внутрішньошкірної ін'єкції антигену. Чим більша площа плями, тим більш виразна реакція [1, 4].

З метою одержання більш повної уяви про можливі сенсибілізуючі властивості досліджуваного препарату нами було проведене алергологічне тестування in vitro: реакція непрямої дегрануляції мастоцитів, що є результатом взаємодії перитонеальних мастоцитів інтактних щурів із сироваткою крові сенсибілізованої тварини і відповідним алергеном, який вивчається та виявляє здатність досліджуваного препарату викликати появу гомоцитотропних антитіл [1-3].

Для постановки тесту використовували 29 білих безпородних щурів самців. Сенсибілізацію досліджуваним препаратом у дозах 108 та 1080 мг/кг проводили за умов внутрішньошлункового введення протягом 14 діб. Контрольні тварини отримували воду.

Для сенсибілізації тварин дослідних груп застосовували водну суспензію препарату, а в реакціях in vitro використовували суспензію досліджуваного препарату в фізіологічному розчині натрію хлориду та серію його дворазових розведень.

На 21-у добу тварин виводили з експерименту методом декапітації під ефірним наркозом, одержували сироватку для постановки реакції. У попередніх експериментах підбирали концентрацію розчину досліджуваного препарату, яка викликає не більше 10% неспецифічної дегрануляції. Препарати готували на предметному склі, яке попередньо фарбували 0,3% спиртовим розчином нейтрального червоного. До 30 мкл суспензії мастоцитів, отриманих з перитонеального ексудату інтактних тварин, додавали 30 мкл сироватки дослідної або контрольної тварини і 30 мкл розчину досліджуваного препарату. При постановці реакції з метою виключення спонтанної дегрануляції мастоцитів і дегрануляції під впливом розчинника враховували наступні види контролю: 1) контроль сироватки: 30 мкл суспензії мастоцитів, 30 мкл досліджуваних сироваток, 30 мкл фізіологічного розчину; 2) контроль алергену: 30 мкл суспензії мастоцитів, 30 мкл фізіологічного розчину і 30 мкл алергену (розчин досліджуваного препарату).

Після 15-хвилинної інкубації при 37°С препарати вивчали під мікроскопом і підраховували по 100 клітин. Оцінку результатів проводили, підраховуючи відсоток дегранульованих мастоцитів.

Реакцію вважали позитивною, якщо кількість дегранульованих клітин перевищує 10%. Ступінь сенсибілізуючої дії досліджуваного препарату визначали за шкалою: слабка — від 10 до 20% дегранульованих клітин; позитивна — від 20 до 30% дегранульованих клітин; різко позитивна — від 30% і більше дегранульованих клітин.

Результати та їх обговорення

Як видно з табл. 1, внаслідок проведення реакції кон'юнктивальної проби у всіх піддослідних тварин були відсутні видимі ознаки алергічної запальної реакції на слизовій оболонці ока, що вказує

Таблиця 2

Визначення сенсибілізуючих властивостей капсул "Гепафісан" у тесті "Активна шкірна анафілаксія", $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Групи тварин	Доза, мг/кг	n	Діаметр забарвленої плями, мм	Площа забарвленої плями, мм^2
Інтактний контроль	—	7	2,71±0,42	13,23±3,50
Капсули "Гепафісан"	108	7	3,43±0,30	19,29±3,67

Примітка: n — кількість тварин у групі.

Таблиця 3

Вплив капсул "Гепафісан" на дегрануляцію мастоцитів, $\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$

Групи тварин	Доза, мг/кг	Шлях сенсибілізації	n	Кількість дегранульованих мастоцитів, %
Інтактний контроль	—	—	9	6,11±0,75
Капсули "Гепафісан"	108	внутрішньошлунковий	10	5,50±0,56
	1080	внутрішньошлунковий	10	6,00±0,89

Примітка: n — кількість тварин у групі.

на відсутність сенсибілізуючої дії досліджуваного препарату.

На моделі активної шкірної анафілаксії капсули "Гепафісан" у дозі 108 мг/кг не проявляють анафілактогенної дії, оскільки результати експерименту, наведені в табл. 2, свідчать про те, що при введенні антигену (розчин досліджуваного препарату) дослідним тваринам площа пофарбованої плями в місці ін'єкції антигену залишалась на рівні показника в групі інтактного контролю.

У тесті in vitro досліджуваний препарат — капсули "Гепафісан" не проявляє здатності викликати появу гомоцитотропних антитіл (табл. 3), які призводять до дегрануляції мастоцитів і, як слід, вивільнення медіаторів алергічної реакції, оскільки показники дегрануляції мастоцитів у групі інтактних тварин та тварин, яким вводили досліджуваний препарат, не мали достовірних розбіжностей. Отже, капсули "Гепафісан" не проявляють сенсибілізуючої активності в тесті "непряма реакція дегрануляції мастоцитів".

ВИСНОВКИ

На підставі вищенаведених даних можна стверджувати, що досліджуваний препарат — капсули "Гепафісан" при внутрішньошлунковому введенні в дозах 108 та 1080 мг/кг не проявляє сенсибілізуючих властивостей в тестах "Активна шкірна анафілаксія" і "Кон'юнктивальна проба" та в реакції непрямої дегрануляції мастоцитів.

Наведені результати токсикологічного дослідження дозволили встановити, що капсули "Гепафісан" є відносно нешкідливим лікарським засобом. Таким чином, досліджуваний препарат можна рекомендувати у виробництво або клінічну практику як новий гепатопротектор, який не виявляє антигенних властивостей.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Доклінічне вивчення сенсибілізуючої дії лікарських засобів: Метод. рекоменд. / За ред. О.В.Стефанова. — К., 2002. — 27 с.*
2. *Ишимова Л.М. Тучные клетки соединительной ткани и базофилов крови в диагностике аллергии немедленного типа / В сб. "Проблемы иммунологической реактивности и аллергии". — М.: Медицина, 1971. — С. 186.*
3. *Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2-х т. Т. 1. — Мн: Беларусь, 2000. — 495 с.*
4. *Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотнщкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.*
5. *Трубицкая Г.П. Конъюнктивальная проба в эксперименте на морских свинках. Актуальные вопросы аллергологии и иммунологии. — Ташкент, 1978. — С. 79-83.*
6. *Anderson J.A. //JAMA. — 1992. — Vol. 268. — P. 2845-2857.*
7. *Bravo L. //Nutr. Rev. — 1998. — №56. — P. 317-333.*
8. *Brubn J.G. //Acta Pharm. Nord. — 1989. — Vol. 1, №3. — P. 117-130.*
9. *DeLeve L.D., Kaplowitz N. //Gastroenterol. Clin. N. Am. — 1995. — Vol. 24. — P. 787-810.*
10. *Robak J., Gryglewski R.J. //Pol. J. Pharmacol. — 1996. — Vol. 48, №6. — P. 555-564.*

Адреса для листування: 61002, м. Харків,
вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 714-27-15.
Національний фармацевтичний університет

Надійшла до редакції 23.09.2011 р.