

О. М. Колос¹, Г. В. Зайченко¹, О. В. Рубашкіна²,
О. А. Зайченко³, Т. О. Брюханова¹

Клінічні, біохімічні та імунологічні маркери гіперчутливості в мурчаків під впливом циклорину

¹Інститут підвищення кваліфікації спеціалістів фармації
Національного фармацевтичного університету, м. Харків

²КЗОЗ «Обласна дитяча клінічна лікарня № 1», м. Харків

³КЗОЗ «Обласна клінічна лікарня – Центр екстреної медичної допомоги
та медицини катастроф», м. Харків

Ключові слова: анафілаксія,
бронхообструктивний синдром,
маркери гіперчутливості, циклорин

Серед найважливіших проблем сучасної системи охорони здоров'я одне з перших місць посідає захворюваність на бронхіальну астму (БА). Бронхіальна астма (БА) – захворювання дихальних шляхів, в основі якого лежить хронічне запалення дихальних шляхів і гіперреактивність бронхів. Відповідно до даних літератури розповсюдженість БА у різних країнах світу становить від 1 до 10% населення. Не менше 5–7% жителів Землі страждають на це захворювання. Щороку БА стає причиною смерті не менше ніж 2 млн людей у світі. Одним із факторів високої захворюваності та розвитку ускладнень є нераціональне використання лікарських засобів для фармакологічної корекції БА або їхня недостатня ефективність [5].

Основною метою лікування хворих на БА є досягнення контролю над хворобою. Незважаючи на розробку та впровадження нових лікарських засобів для лікування БА, контроль над симптомами захворювання не досягається більш ніж у 70% пацієнтів. Відповідно до даних Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) тільки в 5% пацієнтів вдається досягти такого рівня контролю астми, який визначений GINA (Global database on the Implementation of Nutrition Action) [2]. Одним із головних напрямів лікування пацієнтів з БА є попередження загострення хвороби й подовження періодів ремісії. Алопатичні лікарські засоби, які

використовуються в фармакотерапії БА (глюкокортикостероїди, β_2 -адреноміметики, М-холіноблокатори та ін.), забезпечують ефективний контроль захворювання в період загострення, проте значна кількість побічних ефектів обмежує їхнє тривале використання в період ремісії. Одним із перспективних напрямів фармакотерапії в після- та міжприступний період є застосування фіто- та гомеопатичних препаратів (ГП) для попередження загострень захворювання. Гомеопатичні препарати використовуються в терапії БА протягом тривалого часу та демонструють високу ефективність, практично повну відсутність побічних ефектів у пацієнтів. Цикламен європейський є дослідженою та добре відомою рослиною, що здавна використовується в фітотерапії та гомеопатії для лікування запальних захворювань у отоларингології [10]. Проте на фармацевтичному ринку України відсутні ГП вітчизняного виробництва на основі цикламену. Саме тому з метою поповнення асортименту гомеопатичних ліків та реалізації концепції імпортозаміщення у Національному фармацевтичному університеті під керівництвом професора О. І. Тихонова було розроблено гомеопатичні гранули на основі цикламену європейського – «Циклорин». Даний препарат виявив високу ефективність на моделі алергічного риніту в мурчаків, тому доцільним було дослідити ефективність його превентивної дії на моделі гіперчутливості негайного типу, що розвивається як анафілактична реакція та супроводжується розвитком бронхообструктивного синдрому.

Мета дослідження – фармакологічне обґрунтування ефективності лікувально-профілактичної дії гомеопатичних гранул «Циклорин» при бронхообструктивному синдромі в мурчаків.

Матеріали та методи. Для моделювання бронхообструктивного синдрому (БОС) використовували найчутливіших для імунологічних досліджень тварин – мурчаків. Усіх тварин було розподілено на чотири експериментальні групи:

- 1) інтактний контроль (ІК) – здорові тварини;
- 2) контрольна патологія (КП) – тварини, у яких викликали БОС;
- 3) група тварин, які на фоні БОС отримували циклорин у дозі 37 мг/кг;
- 4) група тварин, які на фоні БОС отримували кетотифен у дозі 0,13 мг/кг.

Як препарат порівняння був обраний препарат кетотифен, який застосовується для профілактики та лікування алергічних захворювань (згідно з протоколами надання медичної допомоги хворим на БА, затверджених наказом Міністерства охорони здоров'я України від 28 грудня 2002 р. № 507).

Для моделювання бронхообструкції відтворювали алергічну реакцію негайного типу – анафілаксію. Тварин груп КП, циклорину та кетотифену сенситивізували 0,1 нормальною конячою сироваткою (НКС) за допомогою трьох ін'єкцій (по 0,2 мл НКС): перша ін'єкція підшкірно, друга і третя – внутрішньом'язово (ін'єкції проводяться на 1-й, 3-й та 5-й дні відповідно). На 21-й день тваринам усіх груп вводили розв'язувальну дозу антигена (РДА) – НКС, 1 мл внутрішньочеревинно. У тварин виникла анафілактична реакція з розвитком бронхоспазму. Тваринам третьої та четвертої груп, починаючи з першого дня сенситивізації до 21-го включно, вводили досліджуваній препарат циклорин або препарат порівняння – кетотифен, внутрішньошлунково в дозах 37 мг/кг та 0,13 мг/кг відповідно.

Виразність патологічної реакції оцінювали візуально за шкалою від 0 до 4 балів (за методом Ф. Ф. Лукманової та W. O. Weige та співавт.): 0 балів – ознаки реакції відсутні; 1 бал – реакція слабого ступеня: прискорене дихання,

деякий неспокій, короточасне почухування мордочки, мимовільне сечовиділення, дефекація; 2 бали – реакція помірного ступеня: невеликі судоми, виражене почухування мордочки, виражений прояв бронхоспазму; 3 бали – реакція тяжкого ступеня: судоми, асфіксія, спастичний кашель, чхання, хрипи при диханні, мимовільне сечовиділення і дефекація, тварина падає на бік, проте не гине; 4 бали – загибель тварини [4, 6]. Антиалергічну активність досліджуваних препаратів визначали за їхньою здатністю зменшувати виразність анафілактичної реакції та бронхообструкції. Критеріями оцінки ефективності дії досліджуваних препаратів були наступні показники: клінічні (здатність препаратів попереджати розвиток БОС), імунологічні (кількість лейкоцитів, рівень циркулюючих імунних комплексів (ЦІК), титр гетерофільних аглютининів, уміст інтерлейкіну-1 β та гістаміну в сироватці крові), біометричні (визначення масових коефіцієнтів легенів, селезінки та тимуса) [1, 3, 7–9].

При застосуванні методів математичної статистики був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$. Для проведення математичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм Statistica 6.0.

Результати та їх обговорення. Стартовим етапом роботи стала оцінка клінічних проявів БОС після введення розв'язуючої дози антигена (РДА) (табл. 1).

У тварин групи КП введення РДА супроводжувалось розвитком реакції анафілаксії з проявами бронхоспазму, яка була в середньому оцінена в 3 бали, 2 тварини загинули. Профілактичне введення циклорину та кетотифену ефективно попереджало розвиток БОС на фоні анафілаксії, виразність реакції було оцінено в середньому в 1,6 і 1,25 бала відповідно, що достовірно відрізнялося від даних тварин групи КП.

Алергічна реакція супроводжувалась розвитком системної запальної реакції, що відбивалось збільшенням кількості лейкоцитів у крові тварин групи КП майже в 3 рази. Превентивне введення циклорину та кетотифену стримувало розвиток системної запальної

Виразність алергічної реакції за моделювання анафілаксії в мурчаків і впливу циклорину та кетотифену, n = 6

Показник, бали (UQ÷LQ)	Інтактний контроль	Контрольна патологія	БОС + циклорин	БОС+ кетотифен
Виразність алергічної реакції	–	3 (2÷4)	1,6 (0÷3)*	1,25 (0÷2)*

Примітка. n – кількість тварин у групі; *відхилення достовірне відносно показника контрольної патології ($p \leq 0,05$).

реакції, що підтверджувалося показниками кількості лейкоцитів, які достовірно не відрізнялись від показника ІК (табл. 2). Сенсibilізація організму тварин супроводжувалась утворенням надмірної кількості антитіл, що виражалось у збільшенні титру гетерофільних аглютининів (ГА) у сироватці крові тварин групи КП. Профілактичне введення циклорину та кетотифену ефективно гальмувало процес антитілоутворення (показники достовірно відрізнялись від КП) (табл. 2). Уведення РДА супроводжувалося утворенням комплексів антиген-антитіло (збільшувався рівень ЦІК у тварин групи КП), що провокують дегрануляцію мастоцитів та опосередковують розвиток клінічної картини БОС. Циклорин ефективно попереджав утворення комплексів антиген-антитіло і відповідно – розвиток БОС (це підтверджувалося зниженням титру ЦІК, який достовірно не відрізнявся від показників тварин групи ІК). Крім того, за впливом на рівень ЦІК циклорин достовірно перевищував препарат порівняння кетотифен (табл. 2).

Оскільки в патогенезі БОС важливу роль відіграє підвищення активності

клітинної ланки імунної системи, зокрема вихід до кровоносного русла еозинофілів та міграція їх у зону алергійного запалення, наступним етапом роботи був аналіз лейкоцитарної формули, яку оцінювали до та після введення РДА. Лейкоцитарна формула після введення РДА відповідала клінічній картині алергічного запалення негайного типу. У тварин групи КП спостерігалася виразна еозинофілія, у той час, як профілактичне введення циклорину й кетотифену попереджало збільшення цього показника (табл. 3).

Один із початкових етапів у розвитку БОС – продукція макрофагами прозапального інтерлейкіну-1 β (ІЛ-1 β). Це відбивалося достовірним підвищенням цього показника у тварин групи КП. Превентивне введення циклорину ефективно запобігало розвитку БОС у сенсibilізованих тварин, про що свідчило попередження підвищення показника ІЛ-1 β , який достовірно не відрізнявся від ІК, проте достовірно переважав препарат порівняння (табл. 4). Введення РДА супроводжувалося розвитком вираженого БОС у тварин групи КП, що зумовлено зв'язуванням

Таблиця 2

Імунологічні показники за умов моделювання анафілаксії в мурчаків і застосування циклорину та кетотифену, n = 6

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія	БОС + циклорин	БОС + кетотифен
Кількість лейкоцитів, 10 ⁹ /г·л	6,46 ± 0,92	17,17 ± 0,49*	6,75 ± 0,77**	8,81 ± 1,66**
Титри ГА, log ₂	0 (0÷0)	3,33 (3÷4)*	2,00 (1÷3) */**	2,25 (2÷3) */**
Рівень ЦІК, середнього розміру, ум.од	0,016 ± 0,005	0,025 ± 0,002*	0,014 ± 0,005**/**	0,041 ± 0,009*

Примітка. Тут і в табл. 4: n – кількість тварин у групі; * відхилення достовірне відносно показника інтактного контролю ($p \leq 0,05$); **відхилення достовірне відносно показника контрольної патології ($p \leq 0,001$); ***відхилення достовірно відносно показника референтного препарату ($p \leq 0,05$).

Кількість еозинофілів у крові мурчаків за умов моделювання анафілаксії та застосування циклорину та кетотифену, n = 6

Показник	Термін спостереження	Інтактний контроль	Контрольна патологія	БОС + циклорин	БОС + кетотифен
Кількість еозинофілів	Вихідні дані	0,67 ± 0,49	1,20 ± 0,73	1,17 ± 0,47	0,75 ± 0,47
	Після моделювання анафілаксії	0,66 ± 0,21	1,40 ± 0,25*	0,73 ± 0,15**	0,67 ± 0,33**

Примітка.*Відхилення достовірне відносно показника інтактного контролю ($p \leq 0,05$);

**відхилення достовірне відносно показника контрольної патології ($p \leq 0,001$).

гістаміну з H_1 -гістаміновими рецепторами (цим пояснюється більш низький показник умісту вільного гістаміну). Профілактичне введення циклорину та кетотифену попереджало розвиток БОС шляхом запобігання зв'язуванню гістаміну з його рецепторами (більш високі показники в групі тварин, які отримували циклорин порівняно з тваринами групи КП). Це дозволяє припустити антигістаміновий механізм дії циклорину (табл. 4). Сенсibiliзація організму та наступне введення розв'язувальної дози антигена супроводжувалося змінами коефіцієнтів маси імункомпетентних (тимус та селезінка) та таргетного (легені) органів.

Спостерігалася інволюція тимуса та селезінки у тварин групи КП за рахунок виходу імункомпетентних клітин, у той час як профілактичне введення циклорину й кетотифену попереджало

розвиток патологічного процесу та компенсаторні зміни з боку головних імункомпетентних органів.

Основним «шоковим» органом при анафілаксії є бронхи та легені. Коефіцієнти маси легенів у тварин групи КП були достовірно вищими, ніж у трьох інших дослідних групах. Це може бути пояснено підвищеним кровонаповненням легенів, збільшенням тиску у венозних судинах і спазмом артеріальних судин, що створювало передумови для розвитку набряку легенів, наростання дихальної недостатності та загибелі тварин. Превентивне введення досліджуваних препаратів попереджало розвиток таких порушень, що підтверджувалося нормалізацією коефіцієнтів маси легенів, показник яких достовірно не відрізнявся від таких у інтактного контролю (табл. 5).

Таблиця 4

Уміст гістаміну та інтерлейкіну-1 β у сироватці крові мурчаків за моделювання анафілаксії та застосування циклорину та кетотифену, n = 6

Показник	Інтактний контроль	Контрольна патологія	БОС + циклорин	БОС + кетотифен
Гістамін, мг/мл	148,46 ± 3,28	62,00 ± 3,00*	116,58 ± 3,60*/**/**	101,81 ± 2,35*/**
ІЛ-1 β , пк/мл	280,00 ± 1,26	310,67 ± 11,19*	282,83 ± 4,47**	307,47 ± 3,56

Таблиця 5

Коефіцієнти маси внутрішніх органів за моделювання анафілаксії в мурчаків і застосування циклорину та кетотифену, n = 6

Внутрішні органи	Інтактний контроль	Контрольна патологія	БОС + циклорин	БОС + кетотифен
Легені	0,64 ± 0,04	0,83 ± 0,01*	0,77 ± 0,81**	0,72 ± 0,03**
Селезінка	0,22 ± 0,02	0,14 ± 0,01*	0,22 ± 0,02**	0,24 ± 0,02**
Тимус	0,090 ± 0,006	0,040 ± 0,004*	0,060 ± 0,001*/**	0,060 ± 0,003*/**

Примітка. n – кількість тварин у групі; *відхилення достовірне відносно показника інтактного контролю ($p \leq 0,05$); **відхилення достовірне відносно показника контрольної патології ($p \leq 0,05$); ***відхилення достовірне відносно показника контрольної референтного препарату ($p \leq 0,05$).

Висновок

Досліджуваний препарат – гомеопатичні гранули Циклорин при 21-денному профілактичному введенні в дозі 37 мг/кг ефективно попереджає розвиток БОС у сенсibilізованих тварин після введення РДА. За результатами клінічних, лабораторних, біометричних показників циклорин не поступається препарату порівняння кетотифену у дозі 0,13 мг/кг, а за впливом на окремі показники (ІЛ-1 β , гістамін, рівень ЦІК) перевищує його.

Отримані результати свідчать про ефективність гомеопатичних гранул

Циклорин, зумовлену наявністю антигістамінового та гіпосенсибілізуючого компонентів протиалергічної дії. Отримані дані розширюють уявлення про можливі механізми фармакологічної дії гомеопатичних лікарських засобів, зокрема таких, що містять БАР цикламену європейського. Результати проведених експериментальних досліджень є підґрунтям подальших клінічних випробувань екстракту цикламену та створення на його основі нового ефективного та безпечного гомеопатичного препарату.

1. Chuch K. Martin. H₁-antihistamines and inflammation / Chuch K. // Clin. Exp. Allergy.– 2001.– V. 3.– P. 1341–1343.
2. <http://www.who.int/ru/>
3. Moncada S. Prostaglandins, prostacyclin, thromboxane A2 and leukotrienes. In: Gilman A.G., Goodman L.S. et.al / S. Moncada, R.J. Flower & J.R. Vane // The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th ed.pp.– MacMillan Publishing Co., New York, 1985.– P. 660–673.
4. Weiss K. B. An economic evaluation of asthma in the United States / K. B. Weiss, P. J. Gergen, T. A. Hodson // N Engl J. Med.– 1992.– V. 326.– P. 862–866.
5. Бронхиальная астма. Современный взгляд на лечение и профилактику: В. Н. Стручкова.– Санкт-Петербург, ИГ «Весь», 2008.– 160 с.
6. Доклінічне вивчення сенсibilізуючої дії лікарських засобів. Методичні рекомендації: За ред. О. В. Стефанова.– К., 2002.– С. 5–27.
7. Йегер Л. Клиническая иммунология. Аллергология. Т. 2 / Л. Йегер.– М., 1990.– 237 с.
8. Руководство по иммунофармакологии / Под ред. М. М. Дейла, Д. К. Формена.– М.: Медицина, 1998.– 332 с.
9. Климкина Н. В. Колориметрический метод определения гистамина в крови и органах лабораторных животных / Н. В. Климкина, С. И. Плитман // Биохимические методы исследования в гигиене.– М.: Медицина, 1973.– С. 87–91.
10. Пфаар О. Назальный спрей на основе цикламена европейского: инновационный фитотерапевтический продукт для лечения острого риносинусита. Рандомизированное двойное слепое контролируемое исследование / О. Пфаар // Ринология.– 2012.– № 50 (1).– С. 37–44.

А. Н. Колос, А. В. Зайченко, Е. В. Рубашкина, Е. А. Зайченко, Т. А. Брюханова **Клинические, биохимические и иммунологические маркеры** **гиперчувствительности у морских свинок под влиянием циклорина**

В статье представлены результаты изучения фармакологической активности нового гомеопатического препарата «Циклорин», содержащего экстракт цикламена европейского, на модели реакции гиперчувствительности немедленного типа с бронхообструктивным синдромом у морских свинок. Установлено, что исследуемый препарат «Циклорин» эффективно предупреждает развитие бронхообструктивного синдрома у сенсibilізованных животных. Циклорин при 21-дневном внутривнутреннем введении в дозе 37 мг/кг оказывает положительное влияние на биохимические, иммунологические и биометрические показатели, не уступая препарату сравнения кетотифену в дозе 0,13 мг/кг. По влиянию на отдельные показатели (интерлейкин-1 β , содержание гистамина, уровень циркулирующих иммунных комплексов) циклорин превосходит препарат сравнения.

Ключевые слова: анафилаксия, бронхообструктивный синдром, маркеры гиперчувствительности, циклорин

О. М. Kolos, G. V. Zaychenko, O. V. Rubashkina, O. A. Zaychenko, T. O. Bruhanova **Clinical, biochemical and immunological markers' of hypersensibility of guinea** **pigs in response to cyclorine**

The search for new medicinal products for pharmacological correction of allergic diseases, including bronchial asthma, is an actual problem of contemporary pharmacology. The prospective branch of pharmacotherapy for broncho-obstructive syndrome – is the application of homeopathic medicinal products. With the purpose of creation a new domestic homeopathic medicinal product for curing allergic diseases, «Cyclorine» medicinal product has been developed in the national university of pharmacy on the

basis of extract of *Cyclamen europaeum*, which is widely used in homeopathic medicine for curing sinusitis, headache and bronchial asthma. The authors of the article describe results of experimental study of pharmacological activity of «Cyclorine» homeopathic medicinal product at the model of hypersensitive reaction at broncho-obstructive syndrome of guinea pigs. The animals have been divided into four experimental groups: intact control; control pathology; Cyclorine + broncho-obstructive syndrome; Ketotifen + broncho-obstructive syndrome. Within 21 days, all the animals, but for the group of intact control, are being sensitized with normal horse serum, with further introduction of a solving dose of antigen. Cyclorine and Ketotifen are given intragastrically at the dose of 37 mg/kg and 0.13 mg/kg correspondingly, during 21 days, starting with the first day of sensibilization. It was determined that the studied product was effective for prevention of broncho-obstructive syndrome development at sensitized animals. 21-days introduction of Cyclorine at the dose of 37 mg/kg had positive impact on the dynamics of biochemical, immunological and biometrical indices. As of impact on leucocytes and eosinophils, titer of heterophil agglutinins, mass coefficients of internals (lungs, thymus, and lien) Cyclorine was as good as comparative substance Ketotifen. As of impact on certain indices (interleukin-1 β , histamine, level of circulating immune complexes), Cyclorine was better than the comparative substance. Effectiveness of the product was due to stabilization of membranes of mast cells and impact on histamine release.

Key words: anaphylaxis, broncho-obstructive syndrome, hypersensitivity markers, cyclorine

Надійшла: 01.11.2013 р.

Контактна особа: Зайченко Ганна Володимирівна, доктор медичних наук, кафедра клінічної фармакології ІПКСФ, Національний фармацевтичний університет, буд. 3, вул. Челюскінців, м. Харків, 61013. Тел.: +38 0 57 704 15 54.