

Рекомендована д.м.н., професором С.М.Дрогвоз

УДК 615.9:615.454.1

ВИВЧЕННЯ ІМУНОТОКСИЧНОЇ ДІЇ ГЕЛЮ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ОПОРНО-РУХОВОГО АПАРАТУ ТА ФЛЕБІТІВ

О.Ю.Кошова, К.П.Бездітко, Д.С.Пуляєв, В.І.Чуєшов

Національний фармацевтичний університет

Вивчено імунотоксичну дію гелю під умовною назвою “Альгозан”, до складу якого входить диклофенак діетиламіну та екстракт з насіння гіркокаштану. Встановлено, що гель “Альгозан” при на шкірному нанесенні виявляє імунодепресивну дію на Т-клітинну ланку імунітету, що є характерним для багатьох НПЗЗ, але на відміну від інших він не впливає на гуморальний компонент імунітету.

Висока поширеність серед населення ревматологічних захворювань, які характеризуються прогресуючим перебігом, високою частотою ураження осіб працездатного віку, раннім зниженням функціональної працездатності, втратою професійних та соціальних навичок та високою (1/3 усіх пацієнтів) інвалідизацією хворих, та обмежений вибір ефективних, низькотоксичних та доступних лікарських засобів обумовлюють актуальність пошуку та створення нових лікарських препаратів для використання в ревматологічній практиці [9, 12]. З огляду на цей факт на кафедрі промислової фармації Національного фармацевтичного університету спільно з ВАТ ХФЗ “Червона зірка” був підібраний склад, розроблена технологія виробництва гелю під умовною назвою “Альгозан”, діючими речовинами якого є диклофенак діетиламіну та екстракт з насіння гіркокаштану [6, 11]. При проведенні доклінічних досліджень гелю у ЦНДЛ НФаУ під керівництвом д.ф.н., проф. Л.В.Яковлевої встановлені його виражені протизапальні, анагетичні властивості, позитивний вплив на лізис тромба та на реологічні властивості крові. Поряд з високою фармакологічною активністю однією з найважливіших характеристик лікарських препаратів, що створюються, є їх безпечність. Сучасні вимоги до пошуку та створення нових лікарських засобів передбачають обов'язкове вивчення їх імунотоксичності, дослідження якої і стало метою даної роботи.

Матеріали та методи

Для визначення можливої імунотоксичної дії гелю “Альгозан” досліджували характер його впливу на головні ланки імунної системи, а саме на гуморальну і клітинну імунну відповідь. Дослідження

імунотоксичних властивостей проводили відповідно до вимог Фармакологічного центру МОЗ України з доклінічного вивчення нових лікарських засобів [1].

Вивчення впливу досліджуваного гелю на клітинну ланку імунітету проведено в реакції гіперчутливості повільного типу (ГПТ) за методом К.Р.Kitamura [1, 8]. Тест проведений на 30-и статевозрілих мишах самцях масою 18-20 г. Тварин імунізували однократним внутрішньоочеревинним введенням суспензії свіжовідмитих еритроцитів барана в дозі $2 \cdot 10^5$ клітин в об'ємі 0,5 мл фізіологічного розчину натрію хлориду на 20 г маси тіла. Гель наносили тонким шаром на вистрижену ділянку шкіри спини, яка складала приблизно 5% від площі шкірних покривів тварин, а саме $2 \times 1,5$ см один раз на добу [1]. Для визначення впливу досліджуваного об'єкту на індуктивну і продуктивну фазу імунної відповіді його наносили щоденно протягом 10-и днів перед імунізацією і 4 дні після неї до дня обліку результатів (5-а доба). Загальна тривалість нанесення досліджуваного об'єкту склала 14 діб. Як контроль використовували імунізованих і неімунізованих (інтактних) тварин.

На 5-у добу для виявлення імунізації мишам під апоневротичну пластинку однієї з нижніх кінцівок (дослідна лапа) вводили завершальну дозу антигену, що містила до 10^8 еритроцитів барана, в об'ємі 0,02 мл на тварину. У контрлатеральну лапу (контрольна лапа) вводили фізіологічний розчин у тому ж об'ємі. Через 24 год тварин виводили з експерименту шляхом зсуву шийних хребців під ефірним наркозом. Вилучали селезінку, зважували її для розрахунку масового коефіцієнта органу як додаткового показника стану імуногенезу. Для оцінки місцевої реакції відрізували стопи задніх кінцівок на рівні надступакового-мілкового суглоба, які зважували на торсійних вагах ВТ-500. Індекс реакції (ІР) розраховували за формулою (1):

$$IP = \frac{m_{д. лапи} - m_{к. лапи}}{m_{к. лапи}} \times 100\% ,$$

де: $m_{д. лапи}$ — маса дослідної лапи, мг;
 $m_{к. лапи}$ — маса контрольної лапи, мг.

Таблиця 1
Вплив гелю “Альгозан” на перебіг реакції ГПТ ($\bar{X} \pm S_x$)

| Групи тварин | Кількість тварин, особин | Індекс реакції | Масовий коефіцієнт селезінки |
|-----------------------|--------------------------|----------------|------------------------------|
| Інтактний контроль | 8 | 4,90±2,08* | 0,78±0,08 |
| Імунізований контроль | 7 | 11,00±1,75 | 0,69±0,07 |
| Гель “Альгозан” | 7 | 3,86±0,90* | 0,71±0,11 |

Примітка. * — відхилення вірогідне щодо показників імунізованого контролю, $p < 0,05$.

Таблиця 2
Вплив гелю “Альгозан” на кількість АУК селезінки мишей при первинній імунній відповіді ($\bar{X} \pm S_x$)

| Групи тварин | Кількість тварин, особин | Кількість АУК на селезінку |
|------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Імунізований контроль | 7 | 11500,00±2240,00 |
| Гель “Альгозан” | 9 | 18140,00±3250,00 |
| Основа гелю “Альгозан” | 7 | 7706,67±1680,72 |

Для вивчення впливу досліджуваного гелю на показники функціональної активності В-системи 30 статевозрілих мишей самців масою 20-22 г імунізували однократним введенням 3% суспензії свіжовідмитих еритроцитів барана (внутрішньоочеревинно в об'ємі 0,2 мл/20 г маси). Гель “Альгозан” наносили тонким шаром на вистрижену ділянку шкіри спини розміром 2×1,5 см один раз на добу [1]. Для визначення впливу досліджуваного об'єкту на індуктивну і продуктивну фазу імунної відповіді його наносили щоденно протягом 10-и днів перед імунізацією і 4 дні після неї до дня обліку результатів (5-а доба). Загальна тривалість нанесення досліджуваного об'єкту склала 14 діб. Контрольною групою були імунізовані тварини.

Таблиця 3
Рівень сироваткових гемаглютининів при первинній імунній відповіді у мишей, які отримували гель “Альгозан” ($\bar{X} \pm S_x$)

| Препарат | Кількість тварин, особин | Титри ГА, Log ₂ |
|------------------------|--------------------------|----------------------------|
| Імунізований контроль | 8 | 10,90±0,85 |
| Гель “Альгозан” | 8 | 12,83±1,10 |
| Основа гелю “Альгозан” | 8 | 9,75±0,49 |

Примітка. * — відхилення вірогідне щодо показників імунізованого контролю, $p < 0,05$.

Характер впливу гелю на гуморальну ланку імунітету оцінювали на 5-у добу імунізації за рівнем гемаглютининів (ГА) у сироватці крові та кількістю антитілоутворюючих клітин (АУК) у селезінці. Титри ГА у сироватці крові імунізованих тварин визначали методом серійних розведень у полістиролових планшетах [2]. Визначення кількості АУК селезінки проводили за допомогою методу локального гемолізу в гелі (метод Єрне і Нордін) [7]. Кількість продуцентів антитіл на лімфоїдний орган підраховували за числом макроскопічно видимих зон гемолізу навколо АУК.

Отримані експериментальні дані обробляли методом варіаційної статистики за допомогою стандартного пакету програм “Statistica 6,0” [4]. При застосуванні методів математичної статистики був прийнятий рівень значущості $p < 0,05$.

Утримання тварин та всі маніпуляції з ними здійснювали згідно з санітарно-гігієнічними нормами та принципами Європейської конвенції з захисту лабораторних тварин (Strasbourg, 1986) [3].

Результати та їх обговорення

Вплив випробуваного гелю на клітинну ланку імунітету досліджено в реакції ГПТ, що націлена на визначення здатності препарату впливати на продукцію сенсibilізованими лімфоцитами-ефекторами медіаторів, які призводять до інфільтрації тканини клітинними елементами і до розвитку локального набряку [1, 8].

Результати дослідження, наведені в табл. 1, свідчать, що гель “Альгозан” проявляє імунодепресивну дію щодо функціональної активності Т-клітин — ефекторів реакції ГПТ. Встановлена імунодепресивна дія гелю обумовлена антиексудативною дією диклофенаку, тобто його пригнічуючим впливом на медіатори запалення (гістамін, серотонін, кініні, простагландини), які виділяються сенсibilізованими лімфоцитами-ефекторами та призводять до інфільтрації тканини і до розвитку локального набряку, яким характеризується реакція ГПТ. Але на масовий коефіцієнт (МК) селезінки нанесення гелю не впливало, що свідчить про нетоксичність засобу, який досліджується.

Визначення кількості антитілопродуцентів селезінки проводили за допомогою методу локального гемолізу в гелі. Цей метод засновано на здатності лімфоїдних клітин експериментальних тварин, імунізованих чужорідними еритроцитами, секретувати антиеритроцитарні антитіла, які викликають лізис еритроцитів у присутності комплексу [1, 7]. За числом макроскопічно видимих зон гемолізу навколо антитілоутворювальних клітин підраховували кількість продуцентів антитіл на лімфоїдний орган. Результати дослідження показали, що гель “Альгозан” та його основа при нашкірній імунізації не виявляють достовірного впливу відносно імунізованого контролю на кількість АУК у селезінці мишей, що свідчить про

відсутність дії препарату на В-клітинну ланку імунітету (табл. 2). Незначне підвищення кількості АУК можна пояснити за рахунок впливу екстракту з насіння гіркокаштану, до складу якого входять біофлавоноїди, що за даними літератури проявляють деяку стимулювальну дію на гуморальну ланку імунітету [5, 10].

Реакція аглютинації ґрунтується на здатності антитіл (аглютинінів), які містяться в сироватці крові імунованих тварин, склеювати в ізотонічному розчині хлористого натрію еритроцити барана, що використовуються як антиген [1, 2]. Результати проведеного експерименту свідчать про те, що нанесення тестованого гелю тваринам про-

тягом всього періоду імунізації не впливає на рівень циркулюючих антитіл у сироватці крові експериментальних тварин (табл. 3).

ВИСНОВКИ

1. Гель “Альгозан” при нашкірному нанесенні виявляє імунодепресивну дію на Т-клітинну ланку імунітету, що є характерним для багатьох НПЗЗ, але на відміну від інших НПЗЗ гель “Альгозан” не впливає на гуморальний компонент імунітету та МК селезінки, що свідчить про його нетоксичність щодо імунної системи тварин.

2. Доцільне подальше вивчення гелю “Альгозан” з метою створення нового препарату місцевої дії для лікування ревматичних захворювань.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бутенко Г.М., Терешина О.П., Максимов Ю.М. та ін. Доклінічні дослідження лікарських засобів: Метод. рекомендації. / За ред. О.В. Стефанова. — К.: Авіценна, 2001. — С. 102-114.
2. Иммунологические методы / Под ред. Х.Фримеля. — М.: Медицина, 1987. — 472 с.
3. Надлежащая производственная практика лекарственных средств / Под. ред. Н.А.Ляпунова, В.А.Загория, В.П.Георгиевского, Е.П.Безуглой. — К.:МОРИОН, 1999. — С. 508-545.
4. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М.: Ремедиум, 2000. — С. 349-454.
5. Чекман І.С. // Фітотерапія в Україні. — 2000. — №2. — С. 3-15.
6. British Pharmacopoeia. — London: HMSO Publication, 2007. — Vol. 1. — P. 664.
7. Ierne K.N., Nordin A.A. // Sci. — 1963. — Vol. 140. — P. 405-406.
8. Kitamura K.A. // J. Immunol. Methods. — 1980. — Vol. 39. — P. 277-283.
9. Marjorie M.M., Brigitte Santos-Eggimann // Sozial- und Praventivmedizin. — 2005. — Vol. 50, №1. — P. 45-51.
10. Middleton E.Jr. // Adv. Exp. Med. Biol. — 1998. — №439. — P. 82-175.
11. United States Pharmacopeia and the National Formulary (USP 30/NF 25). — Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, Inc., 2007. — P. 954.
12. Vanhoof J., Declerck K., Geusens P. // Ann. Rheum. Dis. — 2002. — №61. — P. 453-455.

УДК 615.9:615.454.1

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ГЕЛЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОГО АППАРАТА И ФЛЕБИТОВ

Е.Ю.Кошечая, Е.П.Бездетко, Д.С.Пуляев, В.И.Чуешов

Изучено иммунотоксическое действие геля под условным названием “Альгозан”, в состав которого входит диклофенак диэтиламина и экстракт из семян каштана конского. Установлено, что гель “Альгозан” при накожном нанесении проявляет иммунодепрессивное действие на Т-клеточное звено иммунитета, которое является характерным для многих НПВС, но в отличие от других он не влияет на гуморальный компонент иммунитета.

UDC 615.9:615.454.1

THE STUDY OF IMMUNOTOXIC ACTION OF A GEL TREATING THE LOCOMOTOR SYSTEM DISEASES AND PHLEBITIS

Ye.Yu.Koshevaya, Ye.P.Bezdetko, D.S.Pulyaev, V.I.Chuyeshov

The immunotoxic action of a gel under the conditional name “Algozan” containing diclofenac diethylamine and horse-chestnut extract has been studied. When applied on the skin “Algozan” gel has been found to display the immunosuppressive action, which are characteristic for many NSAIDs, on T-cell part of immunity, but unlike other NSAIDs it does not influence the humoral component of immunity.