

На правах рукописи

ГОРДЕЕВА Марина Валерьевна

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ОРГАНОПРЕПАРАТА ИЗ СЕЛЕЗЕНКИ СВИНЕЙ И КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

ВОЛГОГРАД – 2015

Работа выполнена в лаборатории биологически активных соединений Научно-исследовательского института фармации Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель: кандидат биологических наук
Козин Сергей Валерьевич

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор,
Центр экспертизы безопасности лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» МЗ РФ,
заместитель директора,
Аляутдин Ренад Николаевич

доктор фармацевтических наук,
доцент, Государственное научно-учебное учреждение Факультет фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова,
заведующий кафедрой,
Каленикова Елена Игоревна

Ведущая организация: ОАО «Всероссийский научный центр по безопасности биологически активных веществ» (ОАО «ВНЦ БАВ»).

Защита состоится «__» _____ 2015 г. в ____ часов на заседании Диссертационного Совета Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России (400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1).

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru.

Автореферат разослан «__» «_____» 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Бугаева Любовь Ивановна

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. В настоящее время одной из актуальнейших проблем здравоохранения является широкое распространение патологических состояний, связанных с нарушением функций иммунитета человека. В связи с этим перед современной фармакологией стоит важная задача – поиск новых биологически активных веществ и разработка лекарственных препаратов на их основе, нормализующих функцию иммунитета и/или предотвращающих её нарушение (Козлов В.А. и др., 2009; Борисов А.Г. и др., 2008; Цибульский А.П., 2006; Ильина Н.И. и др., 2005; Бутенко Г.М., 1993).

Современная медицина располагает большим арсеналом иммуномодуляторов, применяемых при различных патологиях (Цыган В.Н. и др., 2008). Это препараты животного, микробного и растительного происхождения, а также синтетические средства (Хаитов Р.М. и др., 2009, 2004, 2002; Сепиашвили Р.И., 2002; Добрица В.П., 2001). Препараты всех указанных групп имеют свои достоинства и недостатки (Хаитов Р.М. и др., 2009; Симбирцев А.С., 2002). Это обуславливает необходимость создания новых эффективных и безопасных иммуностропных средств для обеспечения широкого спектра препаратов выбора для иммунокоррекции.

Одним из перспективных направлений в этой области является разработка препаратов на основе органов и тканей животного происхождения. Подобные научные изыскания, в том числе приведшие к созданию эффективных иммуномодуляторов, используемых в клинической практике, активно проводятся во всем мире с начала 20 века (Цыпин А.Б., 2004; Макарова Н.Е., 1997). В качестве примера можно привести лекарственные средства, показавшие выраженный иммуномодулирующий эффект, разработанные на основе: вилочковой железы, клеток костного мозга, эмбриональной ткани, плаценты, крови, кожи, брюшины и селезенки сельскохозяйственных животных (Хавинсон В.Х., 2009; Белова О.В., 2007; Цыпин А.Б., 2004; Ролик И.С., 2003; Новиков Д.К., 2002).

Особый интерес представляет использование с этой целью селезенки сельскохозяйственных животных, поскольку это самый богатый по количеству лимфоидной ткани орган. В ней содержится 25% Т- и 60% В-лимфоцитов от общего пула лимфоцитов в организме. Количество антител, вырабатываемых лимфоидной системой селезенки, значительно превышает их синтез в других лимфоидных органах. Основными проявлениями иммуностропной функции селезенки являются: продукция лимфоцитов и фагоцитирующих мононуклеарных клеток, фильтрация крови, фагоцитарная активность, участие в первичном иммунном ответе, выработка специфических антител и неспецифических иммуноглобулинов, образование биологически активных веществ, влияющих на различные звенья иммунного гомеостаза (Патент 2491944, 2013; Чучкова Н.Н., 2007; Никонов С.Д., 1997; Васильченко А.В., 1996). Ряд лекарственных препаратов, приготовленных из селезенки

(полиерга, диасплен, сплениум, спленин, спленопид и др.), проявили выраженные иммуномодулирующие свойства (Сафиулин З.Т., 2013; Пленина Л.В., 2008; Цыпин А.Б., 2004).

Таким образом, одним из методов решения проблемы фармакорегуляции иммунных процессов является использование препаратов на основе селезенки животных. В настоящее время в мировой медицинской практике используются различные препараты, полученные из селезенки животных. Однако в России подобные препараты не производятся.

Учитывая все сказанное выше, актуальным является разработка и изучение новых отечественных иммуномодулирующих средств из селезенки сельскохозяйственных животных.

Цель работы. Проведение предварительного фармакологического изучения нового иммуностропного лекарственного средства спленактив из селезенки свиней или крупного рогатого скота.

Основные задачи исследования:

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести сравнительное изучение содержания иммуностропных биологически активных веществ в различных сериях органопрепарата из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота физико-химическими и иммуноферментными методами.

2. Изучить иммуностропные свойства спленактива и проспленактива в модельных системах *in vitro* по их влиянию на функциональную активность фагоцитов (фагоцитарную и бактерицидную) и на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови.

3. Изучить влияние спленактива на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции на модели экспериментального сепсиса у мышей.

4. Изучить способность дигидрокверцетина в составе спленактива ингибировать развитие перекисных и свободнорадикальных реакций в процессе хранения препарата, и тем самым сохранять его биологическую активность.

5. Провести оценку безопасности применения спленактива по показателю острой токсичности (по LD_{50}) и аллергизирующему действию (по реакции общей анафилаксии).

Научная новизна:

1. Впервые в спленактиве, представляющем собой лиофилизированный гомогенат ткани селезенки свиней и крупного рогатого скота, выявлен комплекс биологически активных пептидов и определены молекулярные массы некоторых белков, среди которых обнаружен ряд цитокинов.

2. Впервые исследована иммуномодулирующая активность спленактива, в тестах *in vitro* и *in vivo*.

3. Впервые изучены механизмы иммуномодулирующего действия органопрепарата селезенки спленактив, опосредованные его способностью стимулировать эндогенный цитокиногенез и влиять на функциональную активность фагоцитов.

4. Экспериментально доказана перспективность использования дигидрокверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта в составе органопрепаратов селезенки.

5. Доказана высокая безопасность нового органопрепарата из селезенки крупного рогатого скота в тестах по изучению острой токсичности и реакции системной анафилаксии.

Научно-практическая значимость работы. Результаты работы имеют как теоретическое, так и практическое значение. Показана перспективность получения нового органопрепарата из селезенки крупного рогатого скота с введением в его состав антиоксиданта дигидрокверцетина. Результаты по оценке безопасности его применения, изучению иммуностропной активности на клетках крови, а также на животных позволили экспериментально обосновать терапевтическую эффективность спленактива и могут быть использованы при разработке проекта инструкции по медицинскому применению в качестве иммуностропного средства. Представленные в работе результаты изучения состава нового органопрепарата спленактив и влияния дигидрокверцетина на его устойчивость к окислению позволили доказать эффективность применения в качестве сырья селезенку крупного рогатого скота и дигидрокверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта.

Связь темы диссертации с планом научно-исследовательской работы учреждения. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом НИР Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России «Разработка научных основ технологии, стандартизации, организации производства и фармакоэкономики лекарственных средств» (номер государственной регистрации 01200907145).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Различными физико-химическими методами было обнаружено в органопрепарате селезенки значительное содержание веществ пептидной природы с молекулярной массой от 10 кДа до 74 кДа. Иммуноферментным методом определен ряд цитокинов, содержание которых принципиально не различается в препаратах, полученных из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота.

2. В исследованиях в модельных системах *in vitro* на иммунокомпетентных клетках донорской крови была обнаружена способность спленактива модулировать иммунные процессы, а именно: стимулировать выработку цитокинов, регулирующих иммунный ответ; повышать фагоцитарную и бактерицидную активность фагоцитов.

3. Спленактив повышал неспецифическую резистентность организма на модели бактериального сепсиса у мышей.

4. Дигидрокверцетин, присутствующий в препарате спленактив, защищает входящие в его состав биологически активные вещества от свободнорадикального окисления и не снижает его иммуностропную активность.

5. При изучении безопасности применения спленактив показал себя малотоксичным препаратом по показателю ЛД₅₀ при внутримышечном введе-

нии мышам, а также проявил достаточно низкую аллергенную активность по реакции анафилактического шока у морских свинок.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на расширенных заседаниях (17.05.2011 г., 27.03.2012 г., 16.04.2013 г. и 18.03.2014 г.) Научно-исследовательского института фармации ГБОУ ВПО Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Минздрава России с приглашением представителей кафедр фармакологии, фармацевтической технологии, фармацевтической химии и фармакогнозии, а также на Общероссийском научно-практическом мероприятии - Эстафета «Вузовская наука - 2013». Победитель в номинации «Перспективная инновационная идея» в профильной научной платформе «Фармакология» (5 - 6 декабря 2013 г., г. Москва) и Всероссийском научном интердисциплинарном симпозиуме (с международным участием) «Медицинская антропология в России и за её пределами» (3 – 5 июля 2013 г., г. Москва) и второй научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (27.02.2014 г., г. Москва) и пятой научно-практической конференции «Актуальные проблемы оценки безопасности лекарственных средств» (20.03.2014 г., г. Москва).

Личный вклад автора. Автором осуществлен анализ отечественной и зарубежной литературы по теме диссертационной работы. Все эксперименты проведены автором лично или при его активном участии. Непосредственно автором проведена статистическая обработка, описание и анализ полученных результатов, сформулированы выводы и научно-практические рекомендации. Публикации по основным положениям диссертационной работы подготовлены при активном участии автора (авторский вклад составляет 85%).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 137 страницах и состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, характеристику материалов и методов исследования, полученные результаты и их обсуждение, выводов, научно-практических рекомендаций и списка литературы, включающего 181 отечественных и 76 зарубежных источников. Работа содержит 12 рисунков и 12 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе приведены данные отечественных и зарубежных авторов, в которых освещены проблемы фармакологической коррекции нарушений иммунного статуса организма человека, с помощью иммуномодулирующих лекарственных средств. Представлена современная классификация иммуномодуляторов, их многообразие и широкое применение. В данной главе освещены вопросы разработки и применения иммуностропных органопрепаратов на основе селезенки. Рассмотрена регуляция уровней цитокинов как

возможный механизм фармакологического действия иммуномодуляторов. Показана возможность использования стабилизаторов-антиоксидантов, в частности дигидрохверцетина, для предотвращения процессов перекисного окисления.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. В работе были исследованы органопрепараты **спленактив** (предварительное рабочее название), представляющий собой лиофилизированный комплекс гомогената ткани селезенки свиней или крупного рогатого скота и природного антиоксиданта дигидрохверцетина (производитель ЗАО «Научно-производственная фирма “Флавит”», Россия, г. Пущино), а также **проспленактив** (рабочее название) – органопрепарат аналогичный спленактиву, но не содержащий дигидрохверцетин. Использование в исследовании проспленактива связано с необходимостью выявления возможных особенностей фармакологической активности спленактива, вызванных наличием в его составе дигидрохверцетина. Селезенка закупалась на мясокомбинатах (ОАО «Подольский мясокомбинат», ЗАО «Мясокомбинат Ступинский»). Сырье было получено от животных из экологически чистых районов, прошедших полный санитарно-ветеринарный контроль, включая контроль по прионным болезням. К сырью прилагалось удостоверение о качестве. Препараты были разработаны на базе ФГБУ «Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» МЗ РФ.

Полученные препараты представляют собой лиофильно высушенный порошок светло-желтого цвета во флаконах объемом 10 мл. Один флакон спленактива содержит $0,176 \pm 0,01$ г сухого вещества. Содержание дигидрохверцетина в спленактиве составляет 28 мг на 1 г сухого вещества, что соответствует 4,8 мг в одном флаконе. Один флакон проспленактива содержал $0,172 \pm 0,01$ г сухого вещества. Органопрепараты хранили в течение 2 лет при температуре от 0 °С до +15 °С в сухом, защищенном от света месте. Для проведения исследований препараты растворяли в 5 мл дистиллированной воды, либо физиологическом растворе хлорида натрия.

В качестве **препарата сравнения** был использован **спленопид**. Препарат для инъекционного применения относится к фармакотерапевтической группе иммуностимулирующих средств. Представляет собой порошок светло-желтого цвета, хорошо растворимый в воде. Спленипид содержит в своем составе пептиды селезенки – $16 \pm 1,6$ мг (по белку), в качестве вспомогательных веществ гелофузин – $94 \pm 9,4$ мг и гентамицина сульфат – $0,35 \pm 0,035$ мг. В одном флаконе спленопида содержится $0,230 \pm 0,02$ г сухого вещества. Спленипид был разработан в ФГУ ФНЦТИО имени академика В. И. Шумакова. Зарегистрирован МЗ РФ, номер регистрационного удостоверения 001938/01-2002. Фармакопейная статья предприятия 42 – 0032004200. Патент РФ № 2012118016/15, 03.05.2012. Патент 2491944, 10.09.13. Патент 2152219, 27.04.2005. На данный момент срок регистрации препарата истек и по ряду экономических и организационных причин регистрация не была продлена. В работе использовались две серии препарата спленопид, изготовленные и стандартизованные по всем требованиям и правилам нормативно-

технической документации специально для данного исследования: серия № 14112010, изготовлена 11.2010, срок годности до 11.2012; серия № 15102012, изготовлена 10.2012, срок годности до 10.2014.

Несмотря на заметную разницу в массе содержимого одного флакона всех исследуемых препаратов (176 мг – спленактива, 172 мг – проспленактива и 230 мг – спленопида), их однократные дозы – содержимое одного флакона – являются изоэквивалентными в пересчете на сырье (ткань селезенки животных). Во всех случаях параллельных исследований концентрации (в экспериментах *in vitro*) и дозы (в экспериментах *in vivo*) спленактива, проспленактива и спленопида были также изоэквивалентны в пересчете на сырье.

При оценке влияния изучаемого препарата селезенки на оксидативную активность гранулацитарно-макрофагальных клеток крови в качестве препаратов сравнения были использованы наиболее часто используемые в настоящее время иммуномодуляторы, а именно ликопад («Пептек», Москва); циклоферон («Полисан», Санкт-Петербург); интерферон $\alpha 2$ (ООО «Ферон», Москва); полиоксидоний (ООО «Иммофарма», Москва). Изучение влияния спленактива на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками проводили параллельно с препаратом сравнения – пирогеналом (производство филиала «Медгамал» ГУНИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи МЗСР России). Все препараты закупались в аптеках города Москвы.

Эксперименты *in vivo* были проведены на 165 белых нелинейных мышках-самцах массой 22–23 г и 32 морских свинках, самках и самцах, массой 250–300 г. Подопытных животных содержали в виварии Первого МГМУ имени И.М. Сеченова в стандартных условиях с использованием стандартной диеты (ГОСТ Р 9.804-2006 и РД-АПК 3.10.07.02-09). Исследования проводили в соответствии с правилами качественной лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказ МЗиСР РФ №708н от 23.08.2010 «Об утверждении Правил лабораторной практики»), согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под ред. А.Н. Миронова и соавт., 2012), а также правилами и Международными рекомендациями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18 марта 1986 года (текст изменен в соответствии с положениями Протокола ETS № 170 от 2 декабря 2005 года). Все исследования *in vivo* были проведены в осенне-зимние периоды года.

Изучение химического состава препаратов из селезенки свиней и крупного рогатого скота проводили по определению содержания общего белка методом **BCA (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, “Sigma”, США)** (Smith P.K., 1985), а также методом **капиллярного электрофореза** на автоматическом анализаторе биополимеров и клеток Agilent 2100 Bioanalyzer по методике фирмы Agilent (Agilent High Sensitivity Protein 250 Kit Guide).

В органопрепаратах спленактив и проспленактив **методом иммуноферментного анализа** было идентифицировано и определено относительное

количественное содержание ряда биологически активных веществ – цитокинов, а именно: регуляторных (IFN- γ , IL-4), провоспалительных (IL-1 β , TNF- α) и противовоспалительных (IL-10, IL-1RA) и пересчитаны эти данные на содержание в одном флаконе (разовая доза). Одновременно с помощью этого метода анализировали препарат сравнения – спленопид. Исследование было проведено согласно ранее использованной методике определения содержания цитокинов в препарате спленопид (Патент 2491944, 2013). Полученные данные могут быть использованы для сравнения относительного содержания цитокинов в препаратах спленактив, проспленактив, спленопид и не могут быть использованы для оценки их абсолютного количества. Анализ проводили методом «сэндвич»-варианта твердофазного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией производителя (Патент 2491944, 2013; Белова О.В., 2007).

Изучение иммуотропных свойств спленактива и проспленактива в **модельной системе in vitro** проводили на изолированных иммунокомпетентных клетках крови человека. В экспериментах была использована кровь доноров, мужчин и женщин, со средним возрастом 31 \pm 1,2 года. Кровь для исследования брали из вены в первой половине дня, натощак. В качестве антикоагулянта использовали гепарин, из расчета 10 единиц гепарина на 1 мл крови.

Для получения клеточной суспензии гепаринизированную кровь смешивали с 1% желатином в равных объемах и инкубировали 30 минут при 37 $^{\circ}$ C. Затем 3 раза отмывали фосфатным буфером путем центрифугирования в течение 10 минут. После чего осадок суспендировали в 1 мл фосфатного буфера. Концентрацию клеток определяли путем разведения 50 мкл суспензии крови в 450 мкл 3%-ной уксусной кислоты и последующим подсчетом в камере Горяева. Концентрацию клеточной суспензии доводили до 1-2 млн/мл. Для оценки процента живых гранулацитарно-макрофагальных клеток полученную суспензию подкрашивали 0,1% раствором трипанового синего и подсчитывали в камере Горяева число мертвых (окрашенных) и живых (неокрашенных) клеток (Канюков В. Н. И др., 2013). В экспериментах использовали только популяции клеток, с жизнеспособностью более 95%.

Поглотительную способность фагоцитов оценивали по фагоцитарному индексу (ФИ) и проценту фагоцитоза (ПФ).

Изучение влияния препаратов на кислородзависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток осуществляли при помощи НСТ-теста, основанного на восстановлении поглощенного фагоцитом растворимого красителя нитросинего тетразолия в нерастворимый диформазан под влиянием супероксид-аниона, образующегося в НАДФН-оксидазной реакции. Учет результатов проводился на спектрофотометре при длине волны 650 нм. Результаты выражались в условных единицах. Вычисляли индекс стимуляции (ИС):

$$\text{ИС} = \frac{\text{интенсивность НСТ стимулированного (y.e.)}}{\text{интенсивность НСТ спонтанного (y.e.)}}$$

Изучение влияния препаратов на кислороднезависимую активность грануляцитарно-макрофагальных клеток проводили при помощи хемилюминометра Lucy 2 (Anthos, Австрия) и компьютерных программ в соответствии с инструкцией производителя микропланшетным методом (Друх В.М. и др., 2004; Кондрашова Е.А. и др., 1999; Фархутдинов Р.Р., 1995). О повышении кислороднезависимой активности нейтрофилов свидетельствует усиление хемилюминесценции по сравнению со спонтанной люминолзависимой хемилюминесценцией (ЛЗХЛ) (контроль – лейкоцитарная суспензия в фосфатном буфере, культивируемая без добавления активатора). Как и при использовании НСТ-теста, вычисляли индекс стимуляции (ИС):

$$\text{ИС} = \frac{\text{уровень ЛЗХЛ с препаратами}}{\text{уровень спонтанной, исходной ЛЗХЛ без препаратов}}$$

При ИС > 1,1 – наблюдалась активация процесса, ИС < 1,0 – супрессия, ИС = 1,0 – отсутствие эффекта.

Для оценки влияния исследуемых препаратов на цитокиногенез проводилось определение цитокинов с помощью иммуноферментного анализа. Донорскую кровь помещали в пробирку с гепарином (2МЕ/мл), тщательно перемешивали и разводили в среде RPMI 1640 (Sigma) с добавлением 2 мМ L-глутамин (Sigma) и 80 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводили при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ и абсолютной влажности 95 % в присутствии изучаемого препарата в течение 24 часов. В качестве контроля использовались интактные клетки. Определение количества интерлейкина-1β (IL1β), фактора некроза опухоли α (TNFα), интерлейкина-10 (IL-10), антагониста рецептора IL-1 (IL1-RA), интерферона-γ (IFNγ) в исследуемых супернатантах осуществляли твердофазным иммуноферментным методом при помощи тест-систем ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург) согласно прилагаемой инструкции.

Изучение иммулотропного действия спленактива *in vivo* проводили на модели экспериментального сепсиса, который вызывали внутрибрюшинным введением мышам-самцам однодневной живой культуры *Staphylococcus Aureus*, штамм «Wood-46» в дозе 0,2 мл с концентрацией 1 млрд. клеток в 1 мл (Миронов А.Н., 2012). Сепсис развивался на 3 сутки с гибелью 50% животных. После заражения животные были разделены на 3 группы по 35 животных в каждой (контрольная, подопытная и группа сравнения). Контрольной группе на 3, 4, 5 сутки после заражения внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл физиологического раствора. Подопытной на 3, 4, 5 сутки после заражения внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл раствора спленактива, что соответствует дозе 32,7 мг/кг (доза пересчитана исходя из предполагаемой для человека по правилу дозопереноса) (Гуськова Т.А., 2013). Группе сравнения на 3, 4, 5 сутки после заражения внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл раствора препарата спленопид, что соответствует дозе 42,7 мг/кг. Эффект оценивали по количеству выживших мышей в течение 30 суток.

Антиоксидантные свойства дигидрохверцетина в составе органо-препарата спленактив. Антиоксидантную активность органо-препаратов спленактив и проспленактив и содержание в них малонового диальдегида – определяли непосредственно после их приготовления (по 10 образцов), а также по окончании периода хранения (по 10 образцов), предварительно растворяя их в изотоническом растворе хлорида натрия до концентрации 35,2 мг/мл – спленактив и 34,4 мг/мл – проспленактив. Концентрация рассчитана исходя из предполагаемой однократной дозы при инъекционном введении человеку.

Для измерения антиоксидантной активности спленактива и проспленактива использовали модельную систему, в которой окисление люминола индуцировали водорастворимыми пероксильными радикалами, образующимися при термическом разложении 2,2'-азобис(2-амидинопропан) дигидрохлорида (АБАП). Процесс окисления люминола регистрировали по его хемилюминесценции (ХЛ). При этом фиксировали продолжительность латентного периода ХЛ люминола. Зависимость продолжительности латентного периода от концентрации испытываемого вещества в кювете носит линейный характер. График этой зависимости сравнивали с графиком зависимости хемилюминесценции от концентрации стандартного антиоксиданта — тролокса. Тангенсы угла наклона прямых графиков этих зависимостей использовали для расчета антиоксидантной активности (АОА) вещества, которая выражается в мкмоль тролокса на 1 г сухого вещества – «тролоксовый эквивалент» (Фархутдинов Р.Р. и соавт., 1995; Федоров Г.Н. и соавт., 2007; Владимиров Ю.А. и соавт., 2009; Чехани Н.Р. и соавт., 2012).

$$\text{АОА} = \frac{\text{tg } \alpha (\text{препарат})}{\text{tg } \alpha (\text{тролокс})}$$

где $\text{tg } \alpha$ (препарат) – тангенс угла наклона прямой препарата;

$\text{tg } \alpha$ (тролокс) – тангенс угла наклона прямой тролокса.

Об интенсивности реакций перекисного окисления липидов в спленактиве и проспленактиве судили по содержанию в них малонового диальдегида, которое определяли спектрофотометрически по реакции с тиобарбитуровой кислотой и представляли в виде нмоль малонового диальдегида на 1 г сухого вещества (Стальная И.Д. и соавт., 1977; Куликова А.И. и соавт., 2008).

Изучение безопасности органо-препаратов спленактив и проспленактив.

Исследования проведены в соответствии с современными требованиями Минздрава России к изучению безопасности новых лекарственных препаратов (Миронов А.Н., 2012).

Определение острой токсичности спленактива и проспленактива проводили при внутримышечном введении мышам объемом до 0,5 мл. Параллельно в группе контроля вводили раствор натрия хлорида в аналогичном объеме. Общая продолжительность наблюдения за животными при определении острой токсичности составляла 14 суток. Для регистрации картины интоксика-

ции учитывали общее состояние животных, поведенческие реакции, время возникновения и характер интоксикации, ее тяжесть, обратимость, гибель животных и ее сроки.

Аллергизирующее действие спленактива исследовали в реакции общей анафилаксии (анафилактического шока) на морских свинках, самках и самцах, разделенных на 4 группы: группа «1ЭТД» – животных сенсibilизировали препаратом спленактив в дозе эквивалентной одной терапевтической дозе; группа «10ЭТД» – животных сенсibilизировали препаратом спленактив в дозе эквивалентной десяти терапевтическим дозам; группа «контроль №1» – животных сенсibilизировали 0,9 % раствором хлорида натрия (отрицательный контроль); группа «контроль №2» – животных сенсibilизировали 0,26% раствором белка куриного яйца (БКЯ) (положительный контроль). Первая сенсibilизирующая инъекция препарата животным групп «1ЭТД» и «10ЭТД» вводилась подкожно (1-й день эксперимента), вторая и третья инъекции вводились внутримышечно через день в область бедра. В группе «контроль №1» стерильный растворитель (изотонический раствор хлорида натрия) вводили по аналогичной схеме в эквивалентных объемах. В группе «контроль №2» морских свинок иммунизировали перорально 0,6 % раствором белка куриного яйца (БКЯ) в дозе 4 мл/кг, что составило 1,2 мл на свинку массой 300 г в течение трех дней (растворенный в физиологическом растворе БКЯ морским свинкам вводили через зонд). Животным групп «1ЭТД» и «10ЭТД» на 14-ый день эксперимента вводили внутримышечно разрешающую инъекцию, которая была равна суммарной сенсibilизирующей дозе: соответственно 10,5 мг и 100,5 мг на свинку массой 300 г (объем инъекции составлял в обеих группах 0,9 мл на свинку массой 300 г). В группе «контроль №1» животным в качестве разрешающей дозы вводили внутримышечно раствор спленактива, что и в группе «10ЭТД». В группе «контроль №2» животным, сенсibilизированным овальбумином, вводили внутрисердечно овальбумин в дозе 1 мг на 300 г массы тела. После введения разрешающей дозы морские свинки наблюдались в течение 5 минут. Учет интенсивности анафилактического шока проводился в индексах по Weigle.

Статистическая обработка полученных результатов проведена с использованием лицензионного статистического пакета программ «Statistica»-6.0. Статистическую достоверность различия результатов оценивали с помощью параметрического t-критерия Стьюдента и непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. Различия показателей считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Выписка из протокола № 02-14 заседания Локального Комитета по этике от 19.02.2014 о рассмотрении соответствия исследований в рамках данной работы этическим нормам имеется.

В третьей главе представлены результаты изучения фармакологических свойств нового органопрепарата из селезенки свиней и крупного рогатого скота.

Сравнительное исследование состава препаратов спленактив и про-спленактив. По данным, полученным при измерении оптической плотности

на планшетном спектрофотометре, количественное содержание общего белка в препаратах спленактив и проспленактив, полученных из селезенки свиней и из селезенки крупного рогатого в пересчете на один флакон составила (табл. 1).

Таблица 1
Количественное содержание общего белка в одном флаконе препаратов спленактив и проспленактив изготовленных из селезенки свиней и крупного рогатого скота (M±m)

Препарат	Содержание общего белка в препаратах из сырья, мг (n=6):	
	Свиного	КРС
Спленактив	112 ± 5,7	110 ± 6,9
Проспленактив	108 ± 6,1	109 ± 7,2

Данные электрофоретического анализа препаратов спленактив и проспленактив, полученных из селезенки свиней и селезенки крупного рогатого скота, свидетельствуют о наличии веществ белковой природы с мажорными компонентами с молекулярными массами от 12,1 кДа до 44 кДа и минорными компонентами с молекулярными массами от 10,4 кДа до 74 кДа.

Методом иммуноферментного анализа в пептидной фракции препаратов спленактив и проспленактив были идентифицированы и определены относительные количественные содержания некоторых цитокинов (табл. 2).

Таблица 2
Количественное содержание основных цитокинов в препаратах спленактив и проспленактив (пг/флакон) (M±m)

Цитокины	Спленактив, пг/флакон		Проспленактив, пг/флакон		Спленид пг/флакон
	Сырье крупного рогатого скота (КРС)	Сырье свиней (С)	Сырье крупного рогатого скота (КРС)	Сырье свиней (С)	
Провоспалительные цитокины					
IL-1β	238±15,1 (n=6)	240±16,3 (n=6)	271±27,6 (n=6)	178±16,3 ^{**:+1} (n=6)	279±20,5 (n=6)
TNF – α	1199±131,6 ¹ (n=7)	1051±63,5 ¹ (n=7)	950±52,2 ¹ (n=8)	2916±116,1 ^{**:+1} (n=8)	260±14,5 (n=7)
IL-6	500±36,3 (n=6)	462±36,7 (n=6)	439±18,1 (n=7)	557±27,5 ^{**} (n=7)	490±56,9 (n=6)
Противовоспалительные цитокины					
IL-1RA	1556±85,1 ¹ (n=8)	5800±440,3 ^{*:1} (n=8)	3017±241,8 ¹ (n=8)	4526±403,2 ^{**:+1} (n=8)	1077±70,0 (n=7)
IL-10	955±134,3 ¹ (n=6)	722±77,7 (n=6)	673±30,7 (n=6)	1162±67,1 ^{**:+1} (n=6)	635±78,2 (n=6)
Интерфероны					
IFN-γ	2733±172,9 ¹ (n=7)	1875±124,3 ^{*:1} (n=7)	2085±153,9 ¹ (n=7)	2682±108,9 ^{**:+1} (n=7)	331±36,8 (n=7)
Регуляторные цитокины					
IL-4	459±45,7 ¹ (n=6)	630±41,2 ^{*:1} (n=6)	540±20,8 ¹ (n=6)	590±37,4 ¹ (n=6)	197±19,3 (n=6)
Факторы роста					
G-CSF	4101±151,5 ¹ (n=8)	3476±139,5 ^{*:1} (n=8)	4480±124,1 ¹ (n=8)	5190±159,1 ^{**:+1} (n=8)	349±37,6 (n=7)

Примечание: * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату спленактив (КРС); ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату проспленактив (КРС); + - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препара-

ту спленактив (С); ++ - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату проспленактив (С); ¹ - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к препарату спленопид.

По содержанию большинства цитокинов как спленактив, так и проспленактив из обоих видов сырья значительно превосходят препарат сравнения спленопид (табл. 2). Исключение составляют: ПЛ-6, где не замечено достоверного различия ни одного из препаратов со спленопидом и ПЛ-1β, где наблюдается схожая картина, а проспленактив из селезенки свиней даже содержит достоверно меньше этого цитокина, чем спленопид. Также не отмечено достоверного отличия от спленопида по содержанию ПЛ-6 и ПЛ-10 в спленактиве из сырья свиней и проспленактиве из сырья крупного рогатого скота. Таким образом, можно сделать вывод, что в целом относительное содержание цитокинов в новом препарате селезенки значительно больше, чем в препарате сравнения – спленопиде. Следует отметить, что результаты нашего исследования препарата спленопид методом иммуноферментного анализа практически не отличались от результатов, полученных ранее по аналогичной методике (Патент 2491944, 2013). Анализ полученных результатов, указывает на незначительную и непринципиальную разницу количественного содержания цитокинов в препаратах полученных из селезенки свиней и из селезенки крупного рогатого скота.

Использование для приготовления препарата селезенки крупного рогатого скота исключает ряд проблем, связанных с социальными, экономическими и санитарно-ветеринарными условиями применения свиного сырья. А именно: большая вероятность заражения различными заболеваниями, например, африканской чумой свиней; вытекающие из этого карантинные мероприятия, непредсказуемо сокращающие сырьевую базу; уменьшение рынка сбыта препарата за счет лиц, которые не могут принимать свиное сырье по религиозным соображениям. Также следует учитывать, что селезенка крупного рогатого скота в 3,5 раза больше, чем у свиньи, что говорит о преимуществе использования селезенки крупного рогатого скота с экономической точки зрения. Поэтому в дальнейшем изучении мы использовали препараты, полученные из селезенки крупного рогатого скота.

Оценка иммунотропной активности препаратов спленактив и проспленактив в модельной системе *in vitro*.

Изучение влияния исследуемых препаратов на фагоцитарную активность нейтрофилов. При инкубации нейтрофилов с препаратами спленактив и проспленактив в концентрациях 3,2 мг/мл и 3,1 мг/мл соответственно не было отмечено достоверной разницы показателей фагоцитоза по сравнению с контролем (табл. 3). Повышение концентрации вело к достоверному снижению этого показателя. Фагоцитарное число в тестах с обоими препаратами в концентрациях 3,2 мг/мл и 3,1 мг/мл достоверно ($p \leq 0,05$) повышалось, однако повышение концентраций до 11,7 мг/мл и 11,5 мг/мл вело к значимому ($p \leq 0,05$) снижению этого показателя ниже уровня контроля при достоверном различии между этими препаратами. Эти результаты согласуются с данными литературы об обратном дозозависимом эффекте ряда стимуляторов гранулоцитарно-макрофагальных клеток (Разумная Ф.Г., 2011). Препарат

сравнения спленопид в изоэквивалентных в пересчете на сырье концентрациях в описываемом тесте показал аналогичные результаты без достоверной разницы с препаратами спленактив и проспленактив.

Таблица 3

Влияния препаратов спленактив и проспленактив на фагоцитарную активность нейтрофилов ($M \pm \sigma_x$)

Группы	Концентрация вещества в реакционной смеси (мг/мл)	Исследуемые показатели	
		Фагоцитоз, %	Фагоцитарное число, количество стафилококков на клетку
Контроль (n = 10)	-	67±2,86	5,8±0,9
Спленактив (n = 13)	3,2 ¹	66±2,76	7,0±0,72*
	11,7 ²	52±1,16 ^{*,**}	4,2±0,22 ^{*,**}
Проспленактив (n = 11)	3,1 ¹	63,9±6,47	6,7±1,11*
	11,5 ²	48,3±2,55*	4,6±0,36*
Спленид (n = 11)	4,2 ¹	65,8±5,60	6,5±0,85*
	15,3 ²	50±2,76*	4,4±0,38*

Примечание: * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в препарате проспленактив; ^{1,2} – концентрации спленактива, проспленактива и спленоида изоэквивалентны в пересчете на сырье.

Влияние препарата спленактив на кислородопосредованную бактерицидность грануляцитарно-макрофагальных клеток в НСТ-тесте. Как известно, даже среди здоровых людей существуют различия в способности нейтрофилов генерировать активные формы кислорода (АФК). В связи с этим все чаще в исследованиях веществ влияющих на этот показатель используется разделение доноров крови на группы по интенсивности генерации АФК (Владимиров Ю. А., 2004; Темнова В.В., 2006).

Препарат спленактив в диапазоне концентраций 11,7 мг/мл – 29,3 мг/мл проявил способность стимулировать выработку нейтрофилами АФК, причем наиболее заметен этот эффект был в случаях использования нейтрофилов со сниженной продукцией АФК. Аналогичным образом проявлял себя и препарат сравнения — спленопид (табл. 4). Однако эффект препарата спленактив в ряде случаев достоверно превосходил таковой у спленоида. Так, это наблюдалось у крови доноров с гипопродукцией АФК во всех концентрациях, с нормальной продукцией АФК в концентрациях спленактива 17,6 мг/мл и спленоида 23 мг/мл, спленактива 29,3 мг/мл и спленоида 38,3 мг/мл, а также с гиперпродукцией АФК в аналогичных концентрациях, как и с нормальной продукцией.

Исследование влияния препаратов спленактив и проспленактив на кислороднезависимую активность грануляцитарно-макрофагальных клеток было проведено с помощью теста люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ). При этом интенсивность хемилюминесценции нейтрофилов в присутствии растворов препаратов спленактив и проспленактив в изоэквивалентных концентрациях 7,8 мг/мл; 14,7 мг/мл и 7,6 мг/мл; 14,3 мг/мл соответственно сравнивали с интенсивностью спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов (табл. 5).

Таблица 4

Влияние различных концентраций раствора препарата спленактив на продукцию активных форм кислорода (АФК) в НСТ-тесте (y.e.) (M±m)

Группы Общее количество доноров – 51	Конц-я в-в в реакционной смеси (мг/мл)	С гипопродукцией АФК (n=17)	С нормальной продукцией АФК (n=21)	С гиперпродукцией АФК (n=13)
Интенсивность НСТ спонтанного	-	59 ± 3,6	100 ± 3,2	168 ± 2,7
Индукцированный контроль	<i>Staphylococcus aureus</i>	74 ± 2,9*	149 ± 2,4*	192 ± 3,7*
<i>Индекс стимуляции</i>		1,25	1,49	1,14
Спленактив	11,7 ¹	68 ± 1,9	131 ± 2,6 ^{*,**}	177 ± 8,7 ^{**}
<i>Индекс стимуляции</i>		1,15	1,31	1,05
Спленопид	15,3 ¹	62 ± 2,1 ^{*,*+,+}	128 ± 2,9 ^{*,**}	171 ± 6,9 ^{**}
<i>Индекс стимуляции</i>		1,05	1,28	1,02
Спленактив	17,6 ²	125 ± 3,8 ^{*,**,+;}	156 ± 3,3 ^{*,++}	196 ± 7,9 ^{*,++}
<i>Индекс стимуляции</i>		2,11	1,56	1,17
Спленопид	23 ²	109 ± 4,5 ^{*,**,+;+}	138 ± 3,7 ^{*,*+,+}	184 ± 8,6 ^{*,+}
<i>Индекс стимуляции</i>		1,84	1,38	1,09
Спленактив	29,3 ³	268 ± 2,9 ^{*,**,+;}	425 ± 9,5 ^{*,**,+;}	654 ± 4,8 ^{*,**,+;}
<i>Индекс стимуляции</i>		4,54	4,25	3,89
Спленопид	38,3 ³	235 ± 4,8 ^{*,**,+;+}	407 ± 11,3 ^{*,**,+;+}	621 ± 8,6 ^{*,**,+;+}
<i>Индекс стимуляции</i>		3,98	4,07	3,69

Примечание: * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению НСТ спонтанного; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; + - значимые отличия по отношению к значению спленактива в изоквивалентной концентрации ($p \leq 0,05$); ++ - значимые отличия по отношению к эффекту того же препарата в предыдущей (меньшей) концентрации ($p \leq 0,05$); ^{1,2,3} - концентрации спленактива и спленопида соответственно изоквивалентны в пересчете на сырье.

Таблица 5

Влияние спленактива и проспленактива на кислороднезависимую активность гранулацитарно-макрофагальных клеток в тесте люминолзависимой хемилюминесценции (ЛЗХЛ) (Me[Q₁-Q₃])

Группа (n=11)	Концентрация веществ в реакционной смеси (мг/мл)	Люминолзависимая хемилюминесценция	Индекс стимуляции (ИС)
Контроль – спонтанная ЛЗХЛ	0	11,9 (9,7 – 13,4)	1
Спленактив – индуцированная ЛЗХЛ	7,8 ¹	17,9 (16,2 - 22,5) ^{*,**}	1,50
	14,7 ²	15,6 (14,4 – 20,0) ^{*,**}	1,31
Проспленактив – индуцированная ЛЗХЛ	7,6 ¹	15,3 (13,7 – 18,5) [*]	1,30
	14,3 ²	13,3 (12,9 – 15,8) [*]	1,12

Примечание: значимость различий по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни ($p < 0,05$). * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению проспленактива в аналогичных концентрациях. Me – медиана; Q₁ – низкий квартиль (25%); Q₃ – высокий квартиль (75%) = дисперсия отклонений от медианы; ^{1,2} – концентрации спленактива и проспленактива попарно изоквивалентны в пересчете на сырье.

Спленактив и проспленактив повышали интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов. Интересно, что в концентрациях 7,8 мг/мл и 7,6 мг/мл этот эффект был более выражен, чем в концентрациях 14,7 мг/мл и 14,3 мг/мл: индекс стимуляции – 1,50 против 1,31 соответственно у спленактива при $p \leq 0,05$; у проспленактива наблюдалась аналогичная тенденция, хотя и менее выраженная: индекс стимуляции 1,30 против 1,12 соответственно ($p \leq 0,05$).

Факт снижения эффективности препаратов селезенки при увеличении концентрации в 2 раза согласуется с литературными данными об особенностях действия некоторых других лекарственных препаратов, например афобазола (Разумная Ф.Г., Сибирияк С.В., 2011).

В параллельных исследованиях с рядом других широко применяемых иммуномодуляторов спленактив проявил наибольшую эффективность по влиянию на ЛЗХЛ (рис. 1).

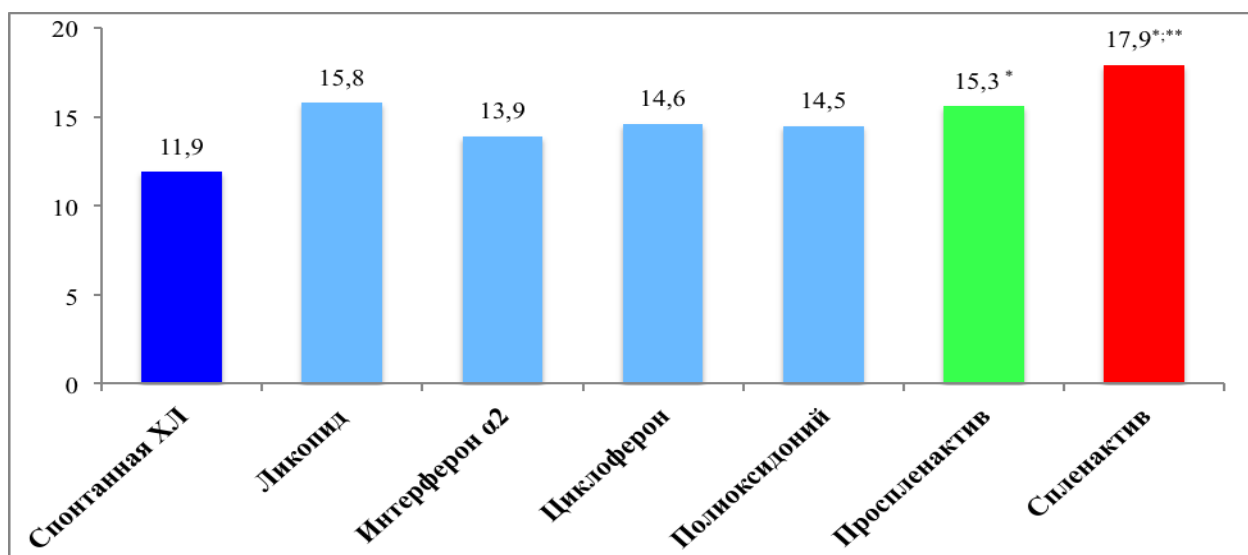


Рис. 1. Сравнительная оценка оксидазной активности гранулацитарно-макрофагальных клеток со спектром иммуномодуляторов основных классов.

Примечание: Концентрация растворов препаратов спленактив и проспленактив в реакционной смеси составляли 7,8 мг/мл и 7,6 мг/мл соответственно, ликопид — 100 мг/мл; интерферон α2 — 500 МЕ/мл; циклоферон — 125 мг/мл; полиоксидоний — 6 мг/мл. * - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия ($p \leq 0,05$) по отношению к значению проспленактива в аналогичных концентрациях.

Следует отметить, что проспленактив хотя и превосходил практически все другие исследуемые препараты, однако уступал спленактиву. Наличие дигидрокверцетина в препарате селезенки по крайней мере не снижало и даже несколько повышало его эффективность по влиянию на функциональную активность нейтрофилов крови. Это может быть связано со стабилизацией химического состава спленактива.

Таким образом, можно утверждать, что в проведенных экспериментах на моделях *in vitro* исследуемые препараты селезенки увеличивали функциональную активность нейтрофилов. Спленактив и проспленактив влияли как на поглотительную функцию нейтрофилов, так и на их кислородопосредо-

ванную и кислороднезависимую активность, что подтверждается тестами НСТ и ЛЗХЛ.

Изучение влияния спленактива на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками проводили в модельной системе *in vitro*. Количество цитокинов, продуцированных клетками крови при культивировании в присутствии исследуемого препарата, сравнивали со спонтанной продукцией (синтезированными клетками при культивировании в отсутствие препарата — контроль). Клеточную взвесь инкубировали с раствором препарата спленактив в концентрациях 0,7 мг/мл, 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл.

В ходе эксперимента выявлено достоверное повышение выработки *провоспалительных цитокинов* IL-1 β и TNF- α при добавлении в культуру раствора препарата спленактив во всех исследованных концентрациях по сравнению с контролем. Повышение концентрации исследуемого препарата увеличивало продукцию этих цитокинов (табл. 6).

Таблица 6

Влияние спленактива в концентрациях 0,7 мг/мл, 3,2 мг/мл и 5,9 мг/мл на продукцию цитокинов клетками крови здоровых доноров, пг/мл (Me[Q₁-Q₃])

Цитокины, пг/мл	Спонтанная продукция (контроль)	Индуцированная продукция			Сыворотка крови
		Спленактив, концентрация (мг/мл)			
		0,7	3,2	5,9	
Провоспалительные цитокины					
IL-1 β (n=10)	81 [47-127]	98 [69-149]*	276 [179-422]**	420 [337-502]**;+	23-37
TNF- α (n=10)	136 [70-151]	221 [115-333]*	337 [210-441]**	344 [247-431]**	26-40
Противовоспалительные цитокины					
IL-10 (n=8)	76 [44-116]	67 [45-90]	89 [63-109]	109 [74-150]**	37-50
IL1RA (n=9)	218 [155-275]	252 [170-360]	344 [220-442]*	414 [325-483]**	210-260
Регуляторный цитокин					
IFN γ (n=9)	150 [130-179]	198 [165-225]*	177 [169-191]*	420 [283-555]**;+	82-100

Примечание: значимость различий по критерию Вилкоксона–Манна–Уитни ($p < 0,05$). * - значимые отличия по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия по отношению к значению спленактива в концентрации 0,7 мг/мл; + - значимые отличия по отношению к значению спленактива в концентрации 3,2 мг/мл. Me – медиана; Q₁ – низкий квартиль (25%); Q₃ – высокий квартиль (75%) = дисперсия отклонений от медианы.

Стимулирующее влияние на продукцию *противовоспалительных цитокинов* спленактив проявлял лишь в высоких концентрациях. Так, достоверное повышение продукции IL-10 по сравнению с контролем наблюдалось только в максимальной исследованной концентрации 5,9 мг/мл, а IL1RA — начиная с концентрации 3,2 мг/мл.

Как видно из представленных данных, спленактив индуцирует синтез *регуляторного цитокина* IFN- γ и этот эффект носит дозозависимый характер. Так, в концентрации 5,9 мг/мл спленактив увеличивал уровень IFN- γ почти в

3 раза по сравнению с контролем. Учитывая иммуномодулирующее влияние IFN- γ , это подтверждает иммуномодулирующее действие спленактива.

По той же методике было проведено сравнительное изучение эффективности спленактива и проспленактива по их влиянию на продукцию цитокинов (IL-1 β ; TNF α ; IL-10; IL-1RA). В качестве препарата сравнения был использован пирогенал. При этом спленактив был испытан в концентрации 3,2 мг/мл, проспленактив в изоквивалентной в пересчете на сырье концентрации 3,1 мг/мл, а пирогенал – 3,2 мг/мл.

Оба изучаемых препарата селезенки достоверно повышали концентрации IL-1 β ; TNF α ; IL-1RA в среде культивирования изолированных лейкоцитов (рис. 2). При этом, если влияние на синтез IL-1 β спленактива и проспленактива было практически одинаковым, то препарат содержащий дигидрокверцетин, почти в 2 раза сильнее, чем проспленактив повышал выделение TNF α и IL-1RA. На синтез IL-10 оба исследуемых препарата не влияли.

Препарат сравнения — пирогенал повышал продукцию всех определяемых цитокинов. При этом по стимулирующему влиянию на синтез IL-1 β он уступал обоим препаратам селезенки в 2-2,5 раза, однако продукция TNF α и IL-1RA под влиянием пирогенала была более чем на 20 % выше, по сравнению со спленактивом и примерно на 50% выше, чем у проспленактива; уровень IL-10 повышался в 3 раза ($p \leq 0,05$ во всех случаях) (рис. 2).

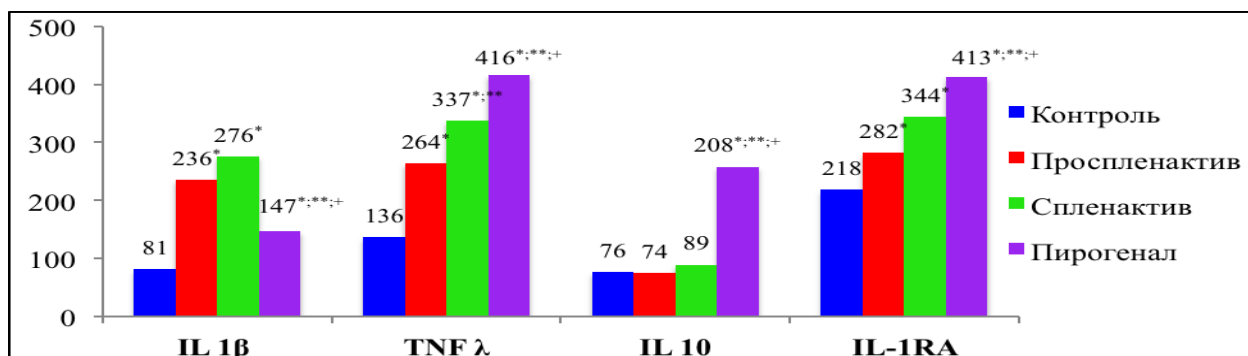


Рис. 2. Влияние препаратов спленактив, проспленактив, пирогенал на продукцию цитокинов. Примечание: концентрации растворов препаратов спленактив и проспленактив в реакционной смеси 3,2 мг/мл и 3,1 мг/мл соответственно изоквивалентны в пересчете на сырье. Значимость различий по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни ($p \leq 0,05$): * - значимые отличия по отношению к значению в контроле; ** - значимые отличия по отношению к значению проспленактива; + - значимые отличия по отношению к значению спленактива.

Изучение влияния препарата спленактив на неспецифическую резистентность к бактериальной инфекции на модели экспериментального сепсиса у мышей.

При внутрибрюшинном введении на 3, 4, 5 сутки после заражения мышей летальной дозой *Staphylococcus aureus* спленактив предотвращал развитие смертельной стафилококковой инфекции (табл. 7). В дозе 32,7 мг/кг спленактив повышал выживаемость мышей до 74,3 % при 34,3 % в контроле. В этом эксперименте препарат сравнения спленоцид в изоквивалентной дозе 42,7 мг/кг показал статистически не отличающийся результат – 71,4 %. То

есть оба препарата продемонстрировали высокую и практически одинаковую эффективность в данном тесте.

Таблица 7

Влияние введения препарата спленактив на показатели устойчивости белых беспородных мышей к стафилококковой инфекции

Группы Животных	Доза препарата, мг/кг	Количество мышей	Количество выживших мышей	% выживших мышей
Контроль	-	35	12	34,3
Спленактив	32,7*	35	26	74,3
Спленопид	42,7*	35	25	71,4

* - дозы препаратов спленактив и спленопид изоэквивалентны в пересчете на сырье.

Изучение эффективности дигидрокверцетина в качестве стабилизатора-антиоксиданта в составе препарата спленактив.

В ходе исследования в модельной системе АБАП-люминол у спленактива и проспленактива была обнаружена антиоксидантная активность, что проявилось в увеличении латентного периода свечения в их присутствии. Это можно объяснить ингибирующим влиянием антиоксидантов, входящих в состав изученных препаратов, на окисление люминола.

На основании результатов были рассчитаны значения антиоксидантной активности спленактива и проспленактива (табл. 8). Исходное значение (до хранения) антиоксидантной активности спленактива было в 87 раз выше, чем у проспленактива ($p < 0,01$). После хранения в течение 2-х лет антиоксидантная активность спленактива практически не изменилась, тогда как у проспленактива уменьшилась в 10 раз ($p < 0,01$). Этот факт, по-видимому, связан с тем, что в процессе хранения проспленактива происходила активация свободнорадикальных реакций. Это приводило к окислению содержащихся в нем различных биологических субстратов, в том числе антиоксидантов. В то же время дигидрокверцетин, присутствующий в препарате спленактив, защищал входящие в его состав биологически активные вещества от свободно-радикального окисления, поэтому существенного изменения антиоксидантных свойств этого препарата за исследованный период хранения не наблюдалось.

Таблица 8

Антиоксидантная активность препаратов спленактив и проспленактив и содержания в них малонового диальдегида ($M \pm m$)

Препараты	Антиоксидантная активность, мкмоль/г		Малоновый диальдегид, нмоль/г	
	Исходно	После 2-х лет хранения	Исходно	После 2-х лет хранения
Проспленактив	36,0 ± 1,7	3,5 ± 0,2**	2,24 ± 0,01	4,47 ± 0,01**
Спленактив	3158,7 ± 157,9	3078,2 ± 153,9	2,23 ± 0,01	2,46 ± 0,01*

Примечание: * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$ - уровень значимости различий при сравнении с исходным значением соответствующего показателя.

Одной из важнейших составляющих окислительных процессов, протекающих в ходе хранения исследуемых препаратов, является перекисное окисление липидов. В качестве интегрального показателя интенсивности перекисного окисления липидов традиционно используется малоновый диальдегид (конечный продукт перекисного окисления липидов). В проведенных исследованиях исходное содержание малонового диальдегида в спленактиве и проспленактиве не различалось (табл. 8). После 2-летнего хранения его количество в проспленактиве увеличилось в 2, а в спленактиве – только в 1,1 раза ($p < 0,01$ и $p < 0,05$ соответственно). То есть, дигидрокверцетин практически полностью ингибировал развитие реакций перекисного окисления липидов в процессе хранения спленактива.

Таким образом, дигидрокверцетин достоверно тормозил свободнорадикальные процессы протекающие в препарате в процессе хранения. То есть проявил себя в качестве эффективного стабилизатора-антиоксиданта органо-препарата селезенки.

Изучение острой токсичности при однократном введении лабораторным животным.

В процессе изучения острой токсичности органо-препаратов селезенки спленактив и проспленактив была испытана их максимальная технически возможная для введения доза 5733 мг/кг. В ходе эксперимента не было обнаружено никаких достоверных различий между животными, получавшими исследуемые препараты, и контрольными мышами ни по одному из фиксируемых показателей: гибель мышей, их поведение, потребление корма и воды, внешний вид и др.

Таким образом, LD_{50} спленактива и проспленактива для мышей при внутримышечном введении определить не удалось, однако она более 5733 мг/кг. То есть изученные препараты селезенки являются малотоксичными.

Аллергизирующее действие спленактива. Реакция системной анафилаксии.

Анализируя результаты изучения анафилактогенной активности препарата спленактив можно отметить, что при использовании терапевтической дозы препарата (группа «1ЭТД») наблюдалось слабое проявление аллергенного действия – индекс по Вейглю составил 0,9 (табл. 9). При увеличении дозы в 10 раз (группа «10ЭТД») проявление анафилактогенной активности достоверно повышалось ($p \leq 0,05$) – средний индекс по Вейглю составил 1,8. Однако индексы Вейглю у животных групп «1ЭТД» и «10ЭТД» были достоверно ниже, чем в группе с положительным контролем (группа «контроль №2»). Разрешающая инъекция препарата спленактив в дозе 10ЭТД морским свинкам получавшим только изотонический раствор хлорида натрия (группа «контроль №1») не вызывала никаких проявлений анафилактогенной реакции.

Таким образом, в данном исследовании препарат спленактив проявил относительно низкую анафилактогенную активность.

Таблица 9

Влияние спленактива на интенсивность анафилактического шока у морских свинок

Группы	Число животных в группе	Индекс реакции по Weigle
«1ЭТД»	8	0,9*
«10ЭТД»	8	1,8*,**
«контроль №1»	8	0
«контроль №2»	8	3,3

Примечание: * - достоверность различий с группами «контроль №1», «контроль №2» при $p \leq 0,01$ (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни); ** - достоверность различий с группой «1ЭТД» при $p \leq 0,05$ (критерий Вилкоксона-Манна-Уитни).

В обсуждении полученных результатов рассматриваются возможные механизмы специфических фармакологических свойств нового органопрепарата из селезенки крупного рогатого скота. Они могут быть связаны с наличием в составе спленактива ряда биологически активных веществ пептидной природы. По результатам фармакологического изучения спленактива в модельных системах *in vitro* и *in vivo* сделан вывод о механизмах его иммуномодулирующего действия, опосредованных его способностью стимулировать эндогенный цитокиногенез и влиять на функциональную активность фагоцитов. По всем изученным показателям спленактив не уступал препаратам сравнения – спленопиду, а также ряду других широко распространенных иммуномодуляторов. Предложен возможный способ защиты органопрепарата селезенки от процессов перекисного окисления путем использования в качестве стабилизатора-антиоксиданта дигидрокверцетина. При изучении безопасности по показателю острой токсичности и по реакции системной анафилаксии спленактив показал себя малотоксичным препаратом и проявил достаточно низкую анафилактогенную активность.

ВЫВОДЫ

1. Новый комплекс биологически активных соединений, представляющий собой лиофилизированный гомогенат ткани селезенки свиней и крупного рогатого скота, спленактив содержит пептидную фракцию с молекулярной массой от 10 кДа до 74 кДа, в состав которой входит ряд природных биологически активных веществ – цитокинов.
2. Спленактив продемонстрировал достоверную иммуностропную активность в исследованиях в модельных системах *in vitro*, что проявилось: в повышении им фагоцитарной и бактерицидной активности изолированных нейтрофилов; в повышении синтеза цитокинов клетками донорской крови при инкубировании со спленактивом. В использованных тестах спленактив, по крайней мере, не уступал по своей эффективности препаратам сравнения.
3. Спленактив достоверно повышал неспецифическую резистентность организма к бактериальной инфекции на модели экспериментального сепсиса у мышей. Это проявилось в увеличении показателя выживаемости зараженных мышей с 34,3% в контроле до 74,3% в группе получавшей спленактив, что практически не отличается от результата препарата сравнения спленопида (71,4%).

4. Дигидрокверцетин проявил себя высокоэффективным и перспективным стабилизатором-антиоксидантом в составе органопрепарата селезенки, не ухудшающим его фармакологические свойства. Об этом свидетельствует полное сохранение антиоксидантной активности спленактива в течение 2х лет хранения (при снижении этого показателя в 10 раз у проспленактива, который не содержит в своем составе дигидрокверцетин), а также повышение содержания в нем малонового диальдегида после 2-летнего хранения лишь на 10% (в то время, как без дигидрокверцетина оно возрастает на 100% по сравнению с исходным содержанием).

5. Спленактив показал себя малотоксичным соединением при однократном внутримышечном введении мышам. Его ЛД₅₀ была выше 5733 мг/кг. По результатам исследования с помощью теста реакции общей анафилаксии (анафилактический шок) спленактив проявил достаточно низкую анафилактогенную активность.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Спленактив, представляющий собой лиофильно высушенный экстракт селезенки крупного рогатого скота с использованием антиоксиданта дигидрокверцетина, рекомендуется для дальнейшего доклинического изучения с целью внедрения его в клиническую практику в качестве эффективного и безопасного иммуномодулирующего средства. Рекомендуется также расширить применение дигидрокверцетина в качестве антиоксиданта-стабилизатора в составе других лекарственных препаратов, в частности препаратов животного сырья.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

Статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Заико, М.В. Изучение состава нового органопрепарат из селезенки свиной методом высокоэффективной хроматографии и электрофоретического анализа [Текст] / **М.В. Заико**, Л.А. Павлова, С.В. Козин, А.Б. Цыпин, И.М. Иванов, Н.Л. Меркулова, Д.С. Лоторев, М.И. Брылев // **Бутлеровские сообщения**. – 2012. – Т. 32, № 11. – С. 61 – 63.
2. Заико, М.В. История и перспективы медицинского применения сырья животного происхождения на примере органопрепаратов селезенки свиньи [Текст] / **М.В. Заико**, Л.А. Павлова, С.В. Козин // **Традиционная медицина**. – 2014. – № 1 (36). – С. 42 – 48.
3. Заико, М.В. Антиоксидантное действие дигидрокверцетина в составе нового органопрепарата селезенки [Текст] / **М.В. Заико**, Ю.О. Теселкин, Л.А. Павлова, С.В. Козин // **Вестник РГМУ**. – 2014. – № 1. – С. 57 – 60.
4. Заико, М.В. Новый органопрепарат селезенки Спленактив – источник природных цитокинов, регуляторов иммунного гомеостаза [Текст] / **М.В. Заико**, С.В. Козин, Л.А. Павлова, А.Б. Цыпин, В.С. Сускова, С.И. Сусков, И.М. Иванов // **Бутлеровские сообщения**. – 2014. – Т. 37, № 3. – С. 120 – 124.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций

5. Заико, М.В. Спленактив – новый органопрепарат иммуномодулирующего действия [Текст] / **М.В. Заико**, С.В. Козин // Вестник РГМУ, специальный выпуск. – 2013. – № 1. – С. 159.
6. Заико, М.В. Консервирующее (антиоксидантное) действие дигидрокверцетина в составе нового органопрепарата селезенки [Текст] / **М.В. Заико**, Ю.О. Теселкин, С.В. Козин // Всероссийская научно–практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации». Санкт-Петербург. – 2013. – С. 126.
7. Заико, М.В. Изучение состава нового органопрепарата из селезенки свиньи [Текст] / **М.В. Заико**, С.В. Козин, Н.Л. Меркулова, Д.С. Лоторев, М.И. Брылев, А.Б. Цыпин, И.М. Иванов // Традиционная медицина. – 2012. – № 5. – С. 234 – 238.
8. Заико, М.В. Изучение состава нового органопрепарата из селезенки свиньи методом ВЭЖХ [Текст] / **М.В. Заико** // Сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 70-летию профессора А.А. Чумакова. Ярославль. – 2012. – № 66. – С. 360.
9. Заико, М.В. Новый иммуностимулирующий препарат из селезенки свиней [Текст] / **М.В. Заико**, С.В. Козин, Л.А. Павлова, Н.Л. Меркулова, Д.С. Лоторев, М.И. Брылев, А.Б. Цыпин, И.М. Иванов // Сеченовский вестник. – 2013. – С. 74.
10. Заико, М.В. Органопрепараты из селезенки животных: история и перспективы [Текст] / **М.В. Заико**, Л.А. Павлова, С.В. Козин // Сборник статей по материалам 19 международной заочной научно-практической конференции. Научная дискуссия: Инновации в современном мире. – 2013. – № 11 (19). – С. 133 – 140.
11. Заико, М.В. Сравнительный анализ содержания биологически активных веществ в органопрепарате селезенки Спленактив, приготовленного из сырья различного происхождения [Текст] / **М.В. Заико** // Сборник трудов XV-ой научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука в XXI веке». – 2014. – С. 196.
12. Заико, М.В. Идентификация цитокинов, входящих в органопрепарат селезенки Спленактив [Текст] / **М.В. Заико** // Сборник научных работ студентов и молодых ученых Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти академика М.И. Перельмана. Ярославль. – 2014. – С. 33.
13. Заико, М.В. Влияние органопрепарата Спленактив на продукцию цитокинов клетками крови [Текст] / **М.В. Заико** // Сборник всеукраинской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Современные аспекты медицины и фармации - 2014». Запорожье. – 2014. – С. 17.
14. Заико, М.В. Использование селезенки свиньи и крупного рогатого скота при разработке иммуностропных органопрепаратов [Текст] / **М.В. Заико**,

С.В. Козин, Л.А. Павлова // Сборник научно-практической конференции «Новые химико-фармацевтические технологии». – 2014. – С. 57 – 59.

15. Заико, М.В. Изучение безопасности и фармакологической активности нового иммуотропного препарата Спленактив в модельных системах *in vivo* и *in vitro* / **М.В. Заико**, С.В. Козин, Л.А. Павлова // Сеченовский вестник. – 2014. – № 2 (16). – С. 117.

16. Заико, М.В. Изучение иммуотропных свойств нового органопрепарата Спленактив [Текст] / **М.В. Заико** // Сеченовский вестник. – 2014. – № 2 (16). – С. 96.

17. Заико, М.В. Изучение влияния Спленактива на продукцию цитокинов иммунокомпетентными клетками крови с помощью метода иммуоферментного анализа [Текст] / **М.В. Заико**, С.В. Козин // *Materialy X mezinarodni vedecko-practicka konference. Praha.* – 2014. – С. 80 – 82.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АБАП	- 2,2'-азобис(2-амидинопропан)
АОА	- антиоксидантная активность
АФК	- активные формы кислорода
ИС	- индекс стимуляции
ЛД ₅₀	- летальная доза, вызывающая 50 % гибели животных
ЛЗХЛ	- люминолзависимая хемилюминесценция
НСТ	- нитросиний тетразолий
С	- сырье свиней
КРС	- сырье крупного рогатого скота
ХЛ	- хемилюминесценция
IL-4	- интерлейкин-4
IL-6	- интерлейкин-6
IL-10	- интерлейкин-10
IL-1 α	- интерлейкин-1 α
IL-1 β	- интерлейкин-1 β
IL-1Ra	- антагонист рецептора интерлейкина 1
IFN γ	- интерферон γ
G-CSF	- гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ)
TNF α	- фактор некроза опухоли α