

*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](http://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 анафилактики).

**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 ЛД<sub>50</sub> 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 междисциплинарном 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- $\gamma$ , IL-4), провоспалительных (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) 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 грануляцитарно-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 грануляцитарно-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 % CO<sub>2</sub> 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 иммунотропного 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		Спленопид 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 <sup>**:+1</sup> (n=6)	279±20,5 (n=6)
TNF – α	1199±131,6 <sup>1</sup> (n=7)	1051±63,5 <sup>1</sup> (n=7)	950±52,2 <sup>1</sup> (n=8)	2916±116,1 <sup>**:+1</sup> (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 <sup>**</sup> (n=7)	490±56,9 (n=6)
Противовоспалительные цитокины					
IL-1RA	1556±85,1 <sup>1</sup> (n=8)	5800±440,3 <sup>*:1</sup> (n=8)	3017±241,8 <sup>1</sup> (n=8)	4526±403,2 <sup>**:+1</sup> (n=8)	1077±70,0 (n=7)
IL-10	955±134,3 <sup>1</sup> (n=6)	722±77,7 (n=6)	673±30,7 (n=6)	1162±67,1 <sup>**:+1</sup> (n=6)	635±78,2 (n=6)
Интерфероны					
IFN-γ	2733±172,9 <sup>1</sup> (n=7)	1875±124,3 <sup>*:1</sup> (n=7)	2085±153,9 <sup>1</sup> (n=7)	2682±108,9 <sup>**:+1</sup> (n=7)	331±36,8 (n=7)
Регуляторные цитокины					
IL-4	459±45,7 <sup>1</sup> (n=6)	630±41,2 <sup>*:1</sup> (n=6)	540±20,8 <sup>1</sup> (n=6)	590±37,4 <sup>1</sup> (n=6)	197±19,3 (n=6)
Факторы роста					
G-CSF	4101±151,5 <sup>1</sup> (n=8)	3476±139,5 <sup>*:1</sup> (n=8)	4480±124,1 <sup>1</sup> (n=8)	5190±159,1 <sup>**:+1</sup> (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); <sup>1</sup> - 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: П-6, где не замечено достоверного различия ни одного из препаратов со спленопидом и П-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 П-6 и П-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 зараженности 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 <sup>1</sup>	66±2,76	7,0±0,72*
	11,7 <sup>2</sup>	52±1,16 <sup>*,**</sup>	4,2±0,22 <sup>*,**</sup>
Проспленактив (n = 11)	3,1 <sup>1</sup>	63,9±6,47	6,7±1,11*
	11,5 <sup>2</sup>	48,3±2,55*	4,6±0,36*
Спленид (n = 11)	4,2 <sup>1</sup>	65,8±5,60	6,5±0,85*
	15,3 <sup>2</sup>	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; <sup>1,2</sup> – 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 (у.е.) ( $M \pm m$ )**

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 <sup>1</sup>	68 ± 1,9	131 ± 2,6 <sup>*,**</sup>	177 ± 8,7 <sup>**</sup>
<i>Индекс стимуляции</i>		1,15	1,31	1,05
Спленопид	15,3 <sup>1</sup>	62 ± 2,1 <sup>*,*+,+</sup>	128 ± 2,9 <sup>*,**</sup>	171 ± 6,9 <sup>**</sup>
<i>Индекс стимуляции</i>		1,05	1,28	1,02
Спленактив	17,6 <sup>2</sup>	125 ± 3,8 <sup>*,**,+;+</sup>	156 ± 3,3 <sup>*,*+,+</sup>	196 ± 7,9 <sup>*,*+,+</sup>
<i>Индекс стимуляции</i>		2,11	1,56	1,17
Спленопид	23 <sup>2</sup>	109 ± 4,5 <sup>*,**,+;+,+</sup>	138 ± 3,7 <sup>*,*+,+</sup>	184 ± 8,6 <sup>*,*+,+</sup>
<i>Индекс стимуляции</i>		1,84	1,38	1,09
Спленактив	29,3 <sup>3</sup>	268 ± 2,9 <sup>*,**,+;+,+</sup>	425 ± 9,5 <sup>*,**,+;+,+</sup>	654 ± 4,8 <sup>*,**,+;+,+</sup>
<i>Индекс стимуляции</i>		4,54	4,25	3,89
Спленопид	38,3 <sup>3</sup>	235 ± 4,8 <sup>*,**,+;+,+</sup>	407 ± 11,3 <sup>*,**,+;+,+</sup>	621 ± 8,6 <sup>*,**,+;+,+</sup>
<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 ( $p \leq 0,05$ ); <sup>1,2,3</sup> – 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) ( $Me[Q_1-Q_3]$ )**

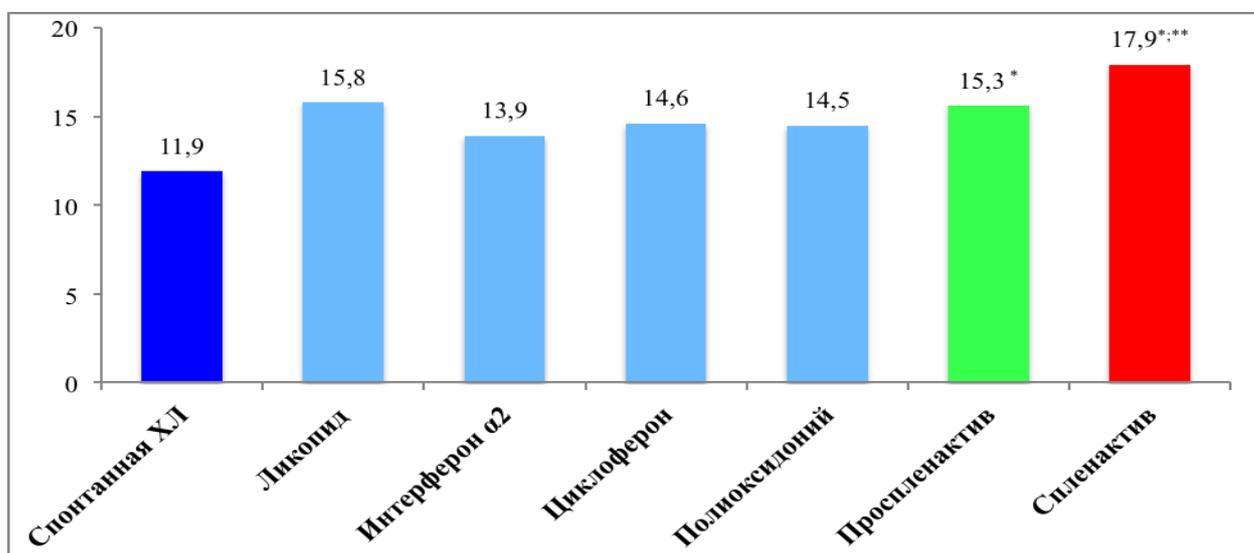
Группа (n=11)	Концентрация веществ в реакционной смеси (мг/мл)	Люминолзависимая хемилюминесценция	Индекс стимуляции (ИС)
Контроль – спонтанная ЛЗХЛ	0	11,9 (9,7 – 13,4)	1
Спленактив – индуцированная ЛЗХЛ	7,8 <sup>1</sup>	17,9 (16,2 - 22,5) <sup>*,**</sup>	1,50
	14,7 <sup>2</sup>	15,6 (14,4 – 20,0) <sup>*,**</sup>	1,31
Проспленактив – индуцированная ЛЗХЛ	7,6 <sup>1</sup>	15,3 (13,7 – 18,5) <sup>*</sup>	1,30
	14,3 <sup>2</sup>	13,3 (12,9 – 15,8) <sup>*</sup>	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;  $Q_1$  – низкий квартиль (25%);  $Q_3$  – высокий квартиль (75%) = дисперсия отклонений от медианы; <sup>1,2</sup> – 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., Сибирак 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 $\beta$  и TNF- $\alpha$  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[Q<sub>1</sub>-Q<sub>3</sub>])**

Цитокины, пг/мл	Спонтанная продукция (контроль)	Индуцированная продукция			Сыворотка крови
		Спленактив, концентрация (мг/мл)			
		0,7	3,2	5,9	
<b>Провоспалительные цитокины</b>					
IL-1 $\beta$ (n=10)	81 [47-127]	98 [69-149]*	276 [179-422]**	420 [337-502]**;+	23-37
TNF- $\alpha$ (n=10)	136 [70-151]	221 [115-333]*	337 [210-441]**	344 [247-431]**	26-40
<b>Противовоспалительные цитокины</b>					
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
<b>Регуляторный цитокин</b>					
IFN $\gamma$ (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; Q<sub>1</sub> – низкий квартиль (25%); Q<sub>3</sub> – 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.

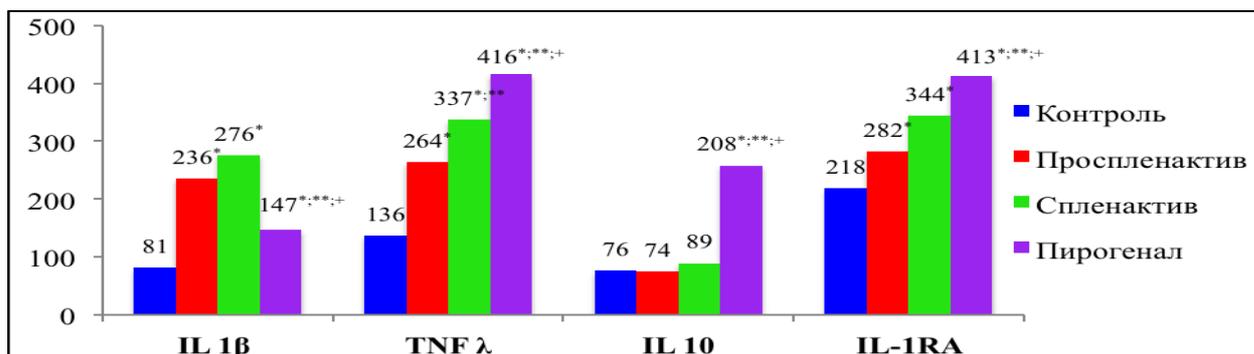
Как видно из представленных данных, спленактив индуцирует синтез *регуляторного цитокина* IFN- $\gamma$  и этот эффект носит дозозависимый характер. Так, в концентрации 5,9 мг/мл спленактив увеличивал уровень IFN- $\gamma$  почти в

3 раза по сравнению с контролем. Учитывая иммуномодулирующее влияние IFN- $\gamma$ , 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 $\beta$ ; TNF $\alpha$ ; 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 $\beta$ ; TNF $\alpha$ ; IL-1RA в среде культивирования изолированных лейкоцитов (рис. 2). При этом, если влияние на синтез IL-1 $\beta$  спленактива и проспленактива было практически одинаковым, то препарат содержащий дигидрокверцетин, почти в 2 раза сильнее, чем проспленактив повышал выделение TNF $\alpha$  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 $\beta$  он уступал обоим препаратам селезенки в 2-2,5 раза, однако продукция TNF $\alpha$  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 мышью 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 спленопид 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, ЛД<sub>50</sub> 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 Вейгля 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 иммуностимулирующую 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 ЛД<sub>50</sub> 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 иммунотропных 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 <sub>50</sub>	- 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 $\alpha$	- интерлейкин-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	- интерлейкин-1 $\beta$
IL-1Ra	- антагонист рецептора интерлейкина 1
IFN $\gamma$	- интерферон $\gamma$
G-CSF	- гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ)
TNF $\alpha$	- фактор некроза опухоли $\alpha$