

Приводится с сокращениями

**Российская Академия Медицинских Наук
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФАРМАКОЛОГИИ
имени В.В. ЗАКУСОВА РАМН**

**ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ
на тему**

«Изучение иммунофармакологических свойств препарата «Фламена® D»»

Москва 2009

Список сотрудников лаборатории лекарственной токсикологии НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН, принимавших участие в изучении иммунофармакологических свойств препарата «Фламена® D»:

Ответственный исполнитель: ведущий научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН,
доктор биологических наук Л.П. Коваленко

Соисполнители: старший научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН,
кандидат медицинских наук Е.В. Шипаева

научный сотрудник лаборатории лекарственной токсикологии
НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН
А.В. Таллерова

РЕФЕРАТ

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТА «Фламена® D»

Целью исследования явилась оценка иммунофармакологических свойств препарата «Фламена® D».

Препарат «Фламена® D» вводили перорально и внутривенно в дозе по дигидрокверцетину (ДГК) 50 мг/кг.

Определение активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции показало, что пероральное **введение препарата «Фламена® D» в дозе по ДГК 50 мг/кг приводило к значимому подавлению интенсивности хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан в 4,4 раза.** Не наблюдалось подобного действия через 1,5 часа после перорального введения субстанции ДГК в дозе 50 мг/кг.

Вторичный иммунодефицит вызывали внутрибрюшинным введением циклофосфида (ЦФ) в дозе 150 мг/кг. На 8-е сутки после введения ЦФ наблюдали статистически значимые изменения: уменьшение массы тимуса, компенсаторную гиперплазию селезенки, уменьшение содержания Т-лимфоцитов селезенки в основном за счет CD4⁺-популяции и уменьшение соотношения CD4⁺/CD8⁺. Трехкратное внутривенное и пероральное введение препарата «Фламена® D» в дозе по ДГК 50 мг/кг на фоне вторичного иммунодефицита **не оказывало** статистически значимого действия на массу тимуса, массу селезенки, содержание CD4⁺-лимфоцитов и соотношение CD4⁺/CD8⁺. Введение препарата «Фламена® D» **регр не изменяло** содержания CD3⁺-лимфоцитов.

Результаты проведенного исследования позволяют заключить, что при определении активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции через 1,5 часа после однократного перорального введения препарата «Фламена® D» в дозе по ДГК 50 мг/кг происходит **подавление способности нейтрофилов мышей продуцировать активные формы кислорода.**

Трехкратное внутривенное и пероральное введение препарата «Фламена® D» в дозе 50 мг/кг при вторичном иммунодефиците, вызванном введением ЦФ, **проявлялось в тенденции к нормализации соотношения CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитов.** При этом установлено, что препарат «Фламена® D» не оказывает действия на массу тимуса, селезенки и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов в тех же условиях.

Изучение иммунофармакологических свойств препарата «Фламена® D» проводили согласно «Методическим указаниям по оценке иммуностропной активности фармакологических веществ» М., 2005 г (1). В работе использовали самцов мышей линии BALB/c и гибридов F₁ (CBA x C57BL/6) массой 20-22 г. Препарат «Фламена® D» вводили перорально и внутривенно в дозе по ДГК 50 мг/кг. Исходную суспензию «Фламена® D» с концентрацией ДГК 8 мг/мл разводили стерильной водой для инъекций. Препарат сравнения, субстанцию ДГК, вводили per os в дозе 50 мг/кг в 1% растворе крахмала.

Определение активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции

Для изучения влияния препарата «Фламена® D» на активность нейтрофилов крови мышей гибридов F₁ (CBA x C57BL/6) в тесте хемилюминесценции были сформированы следующие группы:

1. Контроль – однократное введение per os воды для инъекций, 10 мышей;
2. «Фламена® D» 50 мг/кг по ДГК, однократное введение per os, 10 мышей;
3. ДГК 50 мг/кг, однократное введение per os, 10 мышей.

В качестве источника нейтрофилов использовали гепаринизированную кровь мышей гибридов F₁ (CBA x C57BL/6), выделенную путем декапитации животных.

Для стимуляции хемилюминесценции был использован опсонизированный зимозан (рецептор-опосредованный стимулятор).

Спонтанный уровень хемилюминесценции измеряли в течение 1 минуты, затем к содержимому кюветы добавляли 10 мкл опсонизированного мышьиной сывороткой зимозана в концентрации 10 мг/мл.

При регистрации хемилюминесценции учитывали следующие параметры:

$I_{\text{сп}}$ – максимум спонтанной вспышки хемилюминесценции;

$I_{\text{макс}}$ - максимальная величина хемилюминесценции после добавления стимула;

ΔI – интенсивность стимулированной хемилюминесценции (разница между $I_{\text{макс}}$ и $I_{\text{сп}}$);

S – интегральный показатель светосуммы хемилюминесценции за 20 минут после добавления зимозана;

$t_{\text{макс}}$ - время достижения максимальной интенсивности хемилюминесценции после добавления стимула.

Параметры хемилюминесценции нейтрофилов исследовались после однократного введения препарата «Фламена® D» в дозе 50 мг/кг. У группы контрольных мышей уровень спонтанной хемилюминесценции суспензии нейтрофилов - $I_{\text{сп}}$ составлял $0,9 \pm 0,1$ mV. Пероральное введение препарата «Фламена® D» в дозе 50 мг/кг и субстанции ДГК в дозе 50 мг/кг не оказывало значимого влияния на уровень спонтанной хемилюминесценции, указанные показатели составляли $0,7 \pm 0,1$ mV и $0,7 \pm 0,1$ mV.

После добавления к суспензии нейтрофилов зимозана в указанной ранее концентрации уровень стимулированной хемилюминесценции - ΔI у контрольных животных составил $68,5 \pm 16,2$ mV. Интегральный показатель хемилюминесценции – S составлял 36394,6

$\pm 9155,2$ ед., а время достижения максимального уровня хемилюминесценции - $t_{\text{макс}}$ составляло $1092,9 \pm 35,3$ секунд (табл. 1, рис. 1).

При изучении кинетики хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на зимозан в контрольной и опытных группах животных установлено, что при однократном пероральном введении препарата «Фламена[®] D» в дозе по ДГК 50 мг/кг через 1,5 часа вызывало достоверное уменьшение интенсивности стимулированного хемилюминесцентного ответа клеток в 4,4 раза. Через 1,5 часа после перорального введения препарата сравнения - субстанции ДГК, не отмечали статистически значимого изменения параметров хемилюминесцентного ответа по сравнению с контрольным уровнем.

Таким образом, однократное пероральное введение препарата «Фламена[®] D» в дозе по ДГК 50 мг/кг приводило к подавлению продукции активных форм кислорода нейтрофилами крови мышей, регистрируемых методом ХЛ, через 1,5 часа после введения комплекса. Однократное пероральное введение субстанции ДГК не оказывало достоверного влияния на параметры хемилюминесценции полиморфоядерных гранулоцитов, активированных опсонизированным зимозаном.

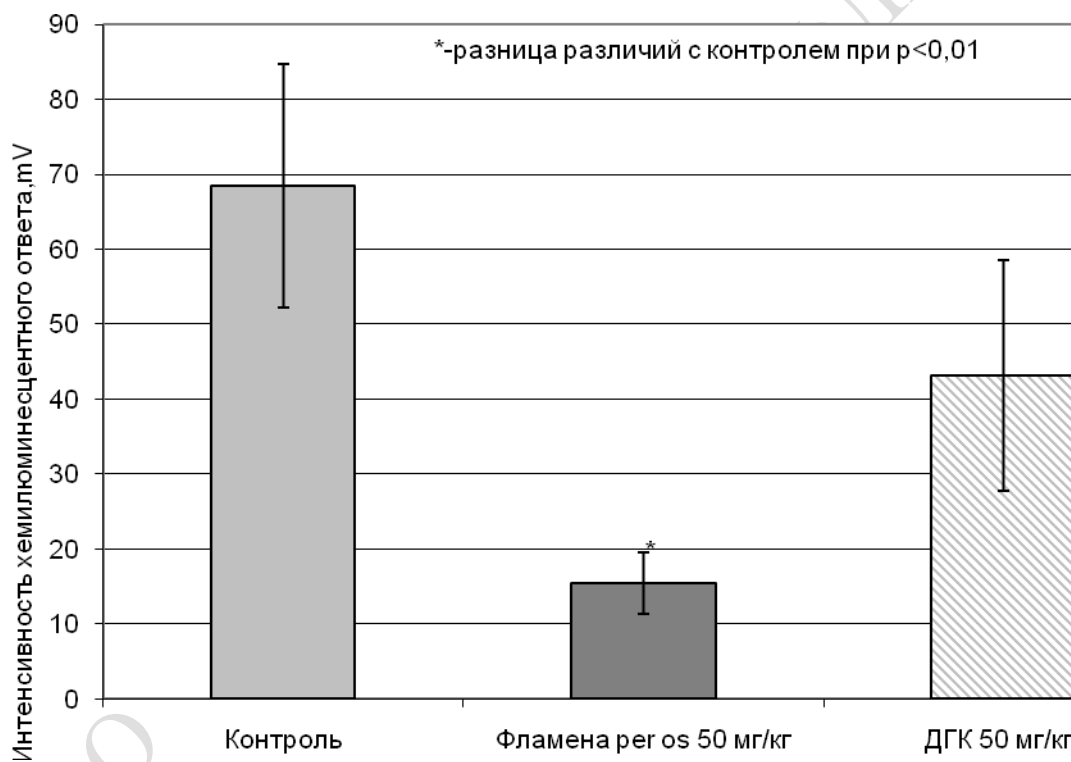


Рисунок 1. Влияние препарата «Фламена[®] D» на интенсивность стимулированного зимозаном хемилюминесцентного ответа.

Исследование иммунокорригирующего действия препарата «Фламена® D» на субпопуляционный состав Т-лимфоцитов селезенки методом проточной цитометрии на модели вторичного иммунодефицита, вызванного введением циклофосфамида (ЦФ)

При изучении иммунокорригирующего действия на субпопуляционный состав лимфоцитов селезенки линии BALB/c исследуемые соединения вводили трехкратно, первое введение - через 24 часа после внутрибрюшинного введения ЦФ в дозе 150 мг/кг. Были сформированы следующие группы мышей линии BALB/c.

1. Контроль – трехкратное введение per os воды для инъекций, 9 мышей;
2. Циклофосфамид, 150 мг/кг, в/б; трехкратное введение per os воды для инъекций, 10 мышей;
3. Циклофосфамид, 150 мг/кг, в/б; «Фламена® D» 50 мг/кг, трехкратное введение внутривенно, 12 мышей;
4. Циклофосфамид, 150 мг/кг, в/б; «Фламена® D» 50 мг/кг, трехкратное введение per os, 9 мышей.

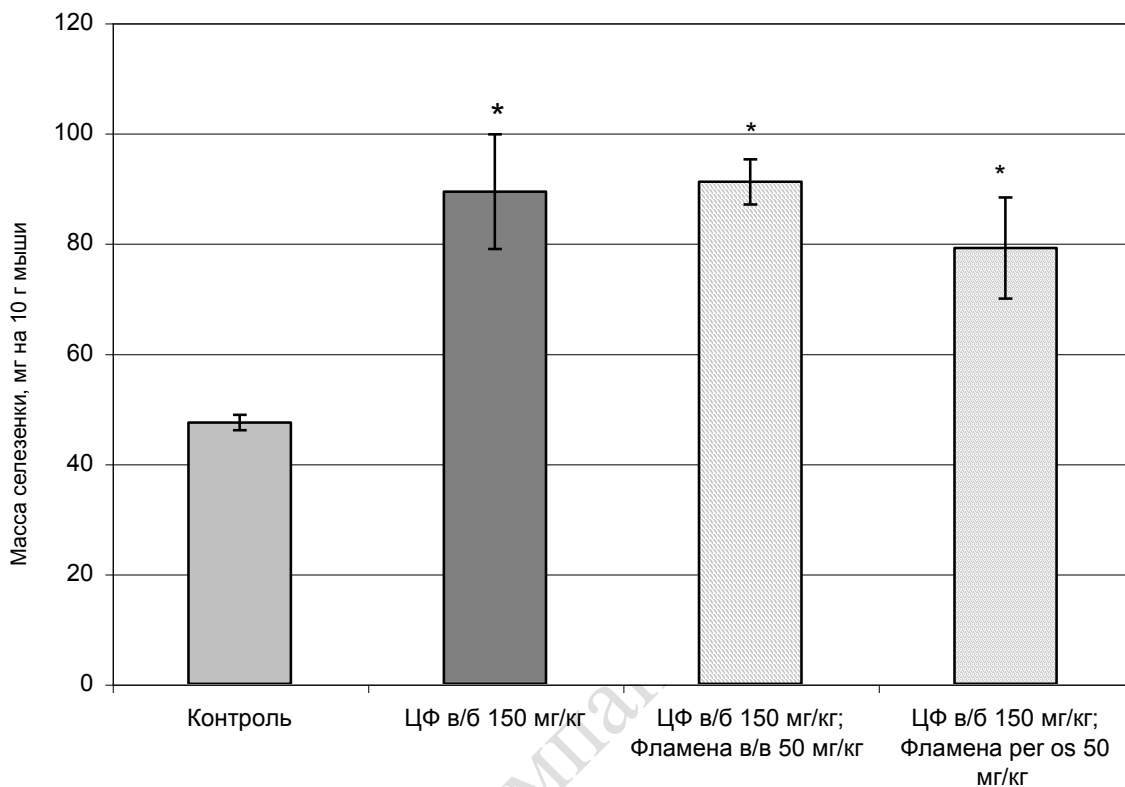
Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов селезенки, массы тимуса мышей проводили через 8 дней после введения ЦФ. Использовали антитела, меченные FITC (флуоресцин-изотиоционатом), к мышинным CD3, CD4, CD8. Индекс иммунореактивности рассчитывали как соотношение процентов клеток, несущих поверхностные маркеры CD4 и CD8 ($CD4^+ / CD8^+$).

В результате проведенных исследований установлено на 8-е сутки после введения ЦФ выраженное уменьшение массы тимуса в 2,2 раза и компенсаторная гиперплазия селезенки в 1,9 раза (табл. 2, рис. 2, 3). Как при внутривенном, так и при пероральном введении препарата «Фламена® D» не происходило достоверного изменения массы селезенки и массы тимуса у мышей с иммунодефицитом, вызванным введением ЦФ.

Вторичный иммунодефицит на 8-й день после введения ЦФ характеризовался уменьшением процентного содержания Т-лимфоцитов селезенки в основном за счет уменьшения на 24,4 % содержания $CD4^+$ -популяции ($p < 0,05$) (табл. 3, рис. 4). Снижение количества $CD8^+$ -лимфоцитов после введения ЦФ не носило достоверного характера. На фоне вторичного иммунодефицита установлено статистически значимое уменьшение индекса иммунореактивности на 14,2 % (табл. 3, рис. 5).

После перорального введения препарата «Фламена® D» в дозе по ДГК 50 мг/кг не отмечалось достоверного изменения количества Т-лимфоцитов, внутривенное введение препарата «Фламена® D» в дозе 50 мг/кг по ДГК приводило к уменьшению содержания $CD3^+$ -лимфоцитов у мышей с циклофосфановым иммунодефицитом за счет $CD8^+$ -популяции.

Отмечалась тенденция к восстановлению индекса иммунореактивности после трехкратного внутривенного и перорального введения препарата «Фламена® D» в изученной дозе на фоне иммунодефицита, вызванного введением ЦФ.



* - разница различий с контролем при $p < 0,01$

Рисунок 2. Действие препарата «Фламена® D» на массу селезенки у мышей с иммунодефицитом, вызванным введением циклофосфида.

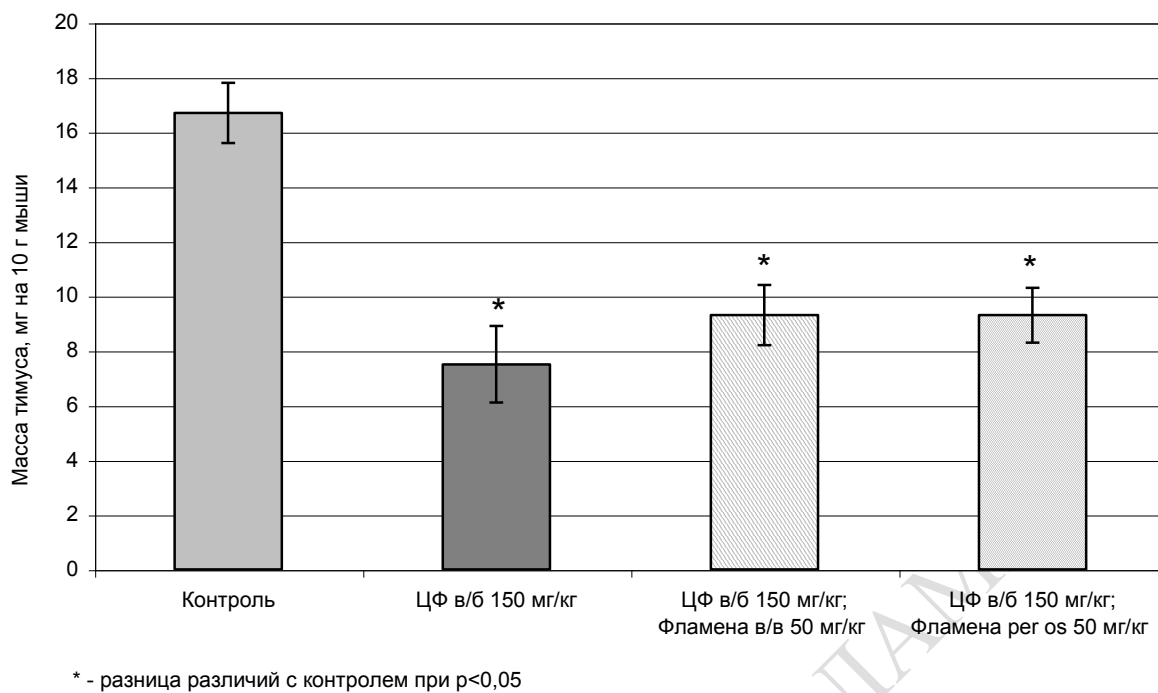


Рисунок 3. Действие препарата «Фламена® D» на массу тимуса у мышей с иммунодефицитом, вызванным введением циклофосфида.

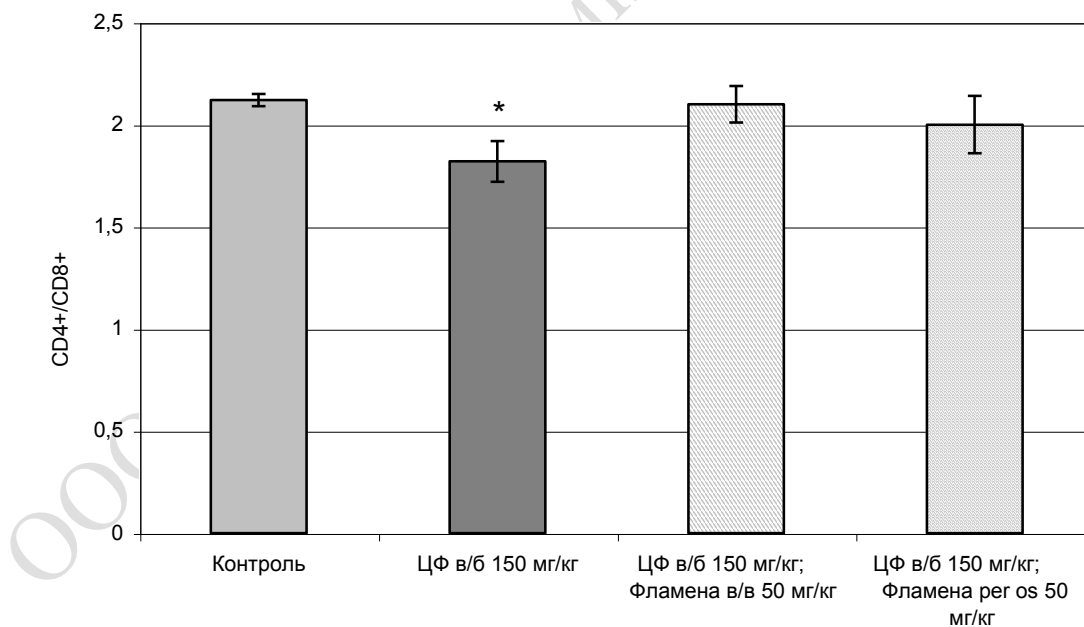


Рисунок 4. Влияние введения препарата «Фламена® D» на соотношение CD4+/CD8+-лимфоцитов селезенки мышей линии BALB/c с вторичным иммунодефицитом, вызванным введением ЦФ. * - $p < 0,05$ по сравнению с группой интактных мышей; # - $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Заключение

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что препарат «Фламена[®] D» при однократном пероральном введении в дозе 50 мг/кг в опытах на мышах подавлял продукцию активных форм кислорода нейтрофилами крови мышей при заборе крови через 1,5 часа после введения исследуемого комплекса. После перорального введения субстанции ДГК подобный эффект отсутствовал.

Имунокорректирующее действие трехкратного внутривенного и перорального введения препарата «Фламена[®] D» в дозе 50 мг/кг при иммунодефиците, вызванном введением ЦФ, проявлялось в тенденции к нормализации соотношения CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоцитов. Не выявлено действия на массу тимуса, селезенки и субпопуляционный состав Т-лимфоцитов после трехкратного внутривенного и перорального введения препарата «Фламена[®] D» в дозе 50 мг/кг при иммунодефиците, вызванном введением ЦФ.

ООО "Научная компания "ФЛАМЕНА"