

# **Изучение аллергенности и иммуотоксичности кальциевой соли N-(5-гидроксинокотиноил)-L-глутаминовой кислоты**

Киселев А.В., Стовбун С.В., Танирбергенов Т.Б. Институт химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, Москва;  
Арзамасцев Е.В., Малиновская К.И. Институт экспериментальной кардиологии Российского кардиологического научно-производственного комплекса МЗСР РФ, Москва.

## **ВВЕДЕНИЕ**

Спектр состояний, при которых имеются нарушения основных когнитивных функций, становится все шире и включает дефицит мнестических функций при травмах мозга, инсультах, хронической церебро-васкулярной недостаточности, постгипоксических энцефалопатиях, нейроинфекциях и поражениях мозга нейродегенеративного характера. Распространенность когнитивной патологии и ее разнообразие требует расширения арсенала веществ, нормализующих когнитивные функции.

На основе кальциевой соли N-(5-гидроксинокотиноил)-L-глутаминовой кислоты, КСГК (Патент РФ № 2314293 от 10.01.2008) недавно был разработан лекарственный препарат «Ампассе®» в лекарственной форме «раствор для внутривенного введения».

По спектру фармакологической активности и эффективности в экспериментах на животных он имеет значительные преимущества перед известными ноотропными, противоишемическими и противоинсультными препаратами.

Настоящая работа посвящена изучению возможных аллергенных и иммуотоксических свойств КСГК.

## **МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЙ**

### Лабораторные животные.

Мышей-гибридов F<sub>1</sub> (СВА х С57В16) (самцы, масса тела 18-20 г) получали из ГНЦ Биомедицинских технологий РАМН. Мышей содержали в клетках Т-3 по 8-10 особей, пестрых с большими белыми участками кожи морских свинок (самцы, масса тела 260-310 г) – в клетках Т-4 по 2-3 особи, в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-20°C и относительной влажности 60-65%, на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к корму (стандартный брикетированный корм ПК-120-1 производства ООО «Лабораторснаб») и водопроводной питьевой воде.

### Исследование аллергизирующих свойств

Изучение аллергизирующих свойств проведено в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO, 1997) и «Методическими указаниями по оценке аллергизирующих свойств фармакологических веществ» (Любимов с соавт., 2005) с использованием следующих тестов: определение анафилактической активности и реакции гиперчувствительности III типа у морских свинок и влияния на клеточность подколенного лимфоузла у мышей (Pilters, 2001).

### Исследование иммуотоксического действия

Изучение возможного иммуотоксического действия выполнено в соответствии с рекомендациями ВОЗ (WHO, 1997) и «Методическими указаниями по оценке иммуотоксического действия фармакологических веществ» (Хайтов с соавт., 2005). Используются методы определения числа антителообразующих клеток в селезенке по Эрне (Jerne, Nordin, 1973) и ядродержащих клеток в селезенке, оценки реакции гиперчувствительности замедленного типа.

Мышей иммунизировали эритроцитами барана (ЭБ), отмытыми в стерильном физиологическом растворе, в оптимальной иммуногенной дозе  $5 \times 10^8$  клеток/мышь.

Исследования выполнялись на мышах, которые были разделены на 7 групп по 5 животных в каждой. Мышам групп 1 и 2 за сутки до иммунизации ЭБ (день «-1») внутривенно (в/в), внутривенно (в/в) или подкожно (п/к) вводили препарат в дозах соответственно 13,4 и 6,7 мг/кг. Мышам групп 3 и 4 в/б вводили препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг в день иммунизации (через 1 час после иммунизации, день «0»). Животные групп 5 и 6 получали препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг через 24 часа после иммунизации ЭБ (день «+1»). Контрольным мышам в день «+1» в/б вводили соответствующие количества физиологического раствора (группа 7). Испытанные дозы препарата в 10 и 20 раз превышали высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для введения человеку.

Для определения клеточности селезёнку дезинтегрировали в гомогенизаторе типа стекло/стекло в растворе Хенкса. Суспензию клеток отделяли от элементов стромы фильтрованием через двухслойный капроновый фильтр, трехкратно отмывали и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. После лизиса клеток эритроидного ряда 3% уксусной кислотой в полученной суспензии подсчитывали количество кариоцитов на счетчике клеток «Пикоскель» (Венгрия). Для снижения вероятности спонтанной гибели клеточных элементов всю процедуру выделения клеток проводили на холоду.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Изучение возможного алергизирующего действия**

#### **Исследование анафилактической активности КСГК.**

Исследования выполнены на пестрых морских свинках, которые были разделены на 3 группы по 5 животных в каждой: 1 группа – контроль (физиологический раствор), 2 группа – КСГК 3,35 мг/кг, 3 группа – КСГК 6,7 мг/кг. Использованные дозы препарата соответствовали 5- и 10-кратной высшей терапевтической дозе, рекомендованной для человека (0,67 мг/кг). Животных сенсibilизировали 5-кратным с интервалом в 1 день в/б введением КСГК в указанных выше дозах. Контрольные животные получали соответствующие количества стерильного физиологического раствора, использованного для приготовления растворов препарата. Тест-введения (разрешающие дозы) КСГК и физиологического раствора вводили в/б на 14-й и 21-й дни после последней сенсibilизации.

Проведенные исследования показали, что КСГК в разрешающей дозе 6,7 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза для человека) при в/б введении как на 14-й, так и на 21-й день сенсibilизации не вызывает проявления анафилактического шока.

#### **Реакция гиперчувствительности III типа на морских свинках.**

Исследования выполнены на пестрых морских свинках, которые были разделены на 3 группы по 5 животных в каждой: 1 группа – контроль, 2 группа – КСГК 3,35 мг/кг, 3 группа – КСГК 6,7 мг/кг. Использованные дозы изучаемого препарата соответствовали 5- и 10-кратным высшим терапевтическим дозам, рекомендованным для человека. Животных сенсibilизировали 5-кратным с интервалом 5 дней в/м введением препарата в указанных дозах. Контрольные животные получали в/м соответствующие количества физиологического раствора. На 10-й день после последней сенсibilизации у животных на коже спины на участке 3x3 см выстригали шерсть и внутрикожно в одну точку вводили по 0,05 мл растворов КСГК, использованных для сенсibilизации, в другую точку – такой же объем физиологического раствора. Учет реакции кожи оценивали визуально по шкале кожных проб С.В. Суворова через 1, 4 и 24 часа после введения разрешающей дозы.

Как показали результаты проведенных исследований, ни в одном случае не обнаружено гиперемии, признаков отека или воспаления.

### **Влияние КСГК на клеточность подколенного лимфоузла у мышей.**

Исследования выполнены на 10 мышах, которым в подушечку правой задней лапы вводили 50 мкл стерильного физиологического раствора (контроль). В подушечку контрлатеральной лапы инъецировали 50 мкл КСГК (6,7 мг/кг, 10-кратная высшая терапевтическая доза для человека). Через 7 дней у мышей определяли клеточность правого и левого подколенных лимфоузлов, вычисляли относительный индекс путем деления показателей левого лимфоузла на аналогичные показатели правого лимфоузла. Результаты определения клеточности подколенных лимфоузлов представлены в табл. 1.

Таблица 1. Влияние КСГК на клеточность подколенных лимфоузлов у мышей.

Группы животных	Клеточность подколенных лимфоузлов (млн/мл)
КСГК (6,7 мг/кг)	0,39±0,04
Контроль	0,35±0,03

Проведенные исследования показали, что субплантарное введение КСГК не вызывает увеличения клеточности подколенного лимфоузла у мышей, что свидетельствует об отсутствии аллергенного потенциала у данного препарата. При этом относительный индекс клеточности подколенных лимфоузлов опытных и контрольных лап составил 1,11.

Таким образом, исследование аллергизирующего действия КСГК показало, что препарат не обладает аллергизирующими свойствами при оценке влияния препарата на клеточность подколенных лимфоузлов у мышей.

### **Исследование возможных иммунотоксических свойств**

#### **Влияние КСГК на число антителообразующих клеток в селезенке.**

Для изучения влияния препарата на число антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей использовали прямой метод локального гемолиза, который позволяет определить клетки, образующие иммуноглобулин М – антитела с высокой гемолитической активностью (Jerne, Nordin, 1973).

На 4-е сутки после иммунизации (ЭБ, в/б) определяли число АОК в селезенке мышей по методу Эрне. Результаты опытов представлены в табл. 2, из которой видно, что в использованных дозах и схеме иммунизации КСГК не оказывает существенного влияния на число АОК в селезенке мышей, иммунизированных ЭБ, и, следовательно, не влияет на первичный иммунный ответ.

Таблица 2. Изучение иммунотоксических свойств КСГК.

	Метод Эрне	Клеточность селезенки на фоне антигенного стимула	Реакция гиперчувствительности замедленного типа
	Количество АОК в	Количество	Индекс реакции

	селезенке ( $1 \times 10^4$ )	кариоцитов в селезенке ( $1 \times 10^7$ )	
1 группа, КСГК 13,4 мг/кг, день «-1»	3,08±0,67	28,35±3,45	20,08±3,15
2 группа, КСГК 6,7 мг/кг, день «-1»	3,42±1,17	22,65±5,05	25,32±6,63
3 группа, КСГК 13,4 мг/кг, день «0»	3,47±0,73	34,18±6,15	22,57±2,75
4 группа, КСГК 6,7 мг/кг, день «0»	3,11±0,94	27,58±3,52	19,35±5,61
5 группа, КСГК 13,4 мг/кг, день «+1»	3,73±0,36	27,25±4,42	20,28±3,07
6 группа, КСГК 6,7 мг/кг, день «+1»	4,02±1,22	34,15±5,06	23,41±5,08
7 группа, контроль, день «+1»	3,66±0,57	29,7±4,78	23,59±4,91

#### **Влияние КСГК на количество ядросодержащих клеток в селезенке мышей.**

На 4-е сутки после иммунизации мышей (ЭБ, в/в) забивали дислокацией шейных позвонков, извлекали селезенку и определяли в ней количество ядросодержащих клеток.

Результаты этой серии экспериментов по оценке влияния КСГК на клеточность селезенки на фоне антигенного стимула представлены в табл. 2.

Представленные данные показывают, что однократное в/б введение КСГК в испытанных дозах 13,4 и 6,7 мг/кг за день до иммунизации, в день иммунизации и через 1 день после иммунизации не влияет на клеточность селезенки.

#### **Влияние КСГК на реакцию гиперчувствительности замедленного типа.**

На 5-е сутки после иммунизации (ЭБ, п/к в межлопаточную область) все животные получали субплантарно в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе  $1 \times 10^8$  клеток/мышь в объеме 50 мкл («опытная лапа»). В подушечку контралатеральной лапы («контрольная лапа») инъецировали 50 мкл стерильного физиологического раствора. Результаты реакции регистрировали через 24 часа путем взвешивания «контрольной» и «опытной» лап.

Разница в массе «опытной» и «контрольной» лап характеризовала величину отека и интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа. Результаты эксперимента представлены в табл. 2.

Анализ представленных данных свидетельствует о том, что препарат КСГК в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг не влияет на формирование реакции гиперчувствительности замедленного типа и, соответственно, на клеточный иммунитет.

### **ВЫВОДЫ**

При изучении алергизирующих свойств КСГК на морских свинках установлено, что при 5-кратном внутрибрюшинном введении препарата в сенсibiliзирующих дозах 3,35 и 6,7 мг/кг и внутрибрюшинном введении разрешающей дозы препарата 6,7 мг/кг на 14-й и 21-й день после сенсibiliзации КСГК не вызывает анафилактического шока.

Препарат в испытанных дозах и схемах сенсibilизации не проявляет аллeргизирующего действия в реакции гиперчувствительности III типа у морских свинок и не влияет на реакцию подколенного лимфоузла у мышей.

В испытанных дозах 6,7 и 13,4 мг/кг (10- и 20-кратные высшие терапевтические дозы, рекомендованные для человека) КСГК не влияет на число антителообразующих и ядрoсодержащих клеток в селезенке, а также на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии негативного влияния КСГК на гуморальный и клеточный иммунитет и, следовательно, об отсутствии у препарата иммунотоксичности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Воронина Т. А., Гарибова Т. Л., Хромова И. В. и др./ Фармакология и токсикология. – 1990. – № 53 (4). – С. 13-16.
2. Кузнецова Е. А., Воронина Т. А., Хромова И. В. и др. / Химико-фармацевтический журнал. – 1989. – № 12. – С. 1425-1431.
3. Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. и др. Методические указания по оценке аллeргизирующих свойств фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ. 2-е изд., перераб. и доп. / Редкол.: Хабриев Р.У. и др. – М., 2005. – С. 54-69.
4. Хаитов Р.М., Иванова А.С., Мастернак Т.Б. и др. Методические указания по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению фармакологических веществ. 2-е изд., перераб. и доп. / Редкол.: Хабриев Р.У. и др. – М., 2005. – С. 70-86.
5. Якимук П.В., Стовбун С.В., Литвин А.А. Патент на изобретение № 2314293 «Одно- и двухвалентные соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты, обладающие психотропным (антидепрессивным и анксиолитическим), нейропротекторным, геропротекторным и противоинсультным действием». Официальный бюллетень Федеральной службы РФ по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам, № 1 (2008).
6. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals. Environmental Health Criteria, Vol.180, WHO, Geneva, 1997.
7. Jerne N.K., Nordin A.A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells / Science. – 1963. – V. 140. – P. 405.
8. Pilters R., The popliteal lymph node assay: a tool for predicting drug allergies/ Toxicol. – 2001. – Vol. 158, № 1-2. – P. 65-69.