

ФАРМАКОЛОГІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. С.М. Марчишин
УДК 615.218.3:547.587.51:547.853.3

АНТИАЛЕРГІЧНА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНОГО 3-(ТЕТРАГІДРОБЕНЗО[В]ТІЄНО[2,3-D]ПІРИМІДИН-2-ІЛ)КУМАРИНІВ НА МОДЕЛІ АЛЕРГІЧНОЇ РЕАКЦІЇ НЕГАЙНОГО ТИПУ

© Л.В. Яковлева, О.Б. Леницька

Національний фармацевтичний університет, Харків
Центральна науково-дослідна лабораторія

Резюме: у статті наведено результати дослідження антиалергічної дії похідного 3-(тетрагідробензо[в]тієно[2,3-d]піримідин-2-іл)кумаринів, яку вивчали на моделі активної шкірної анафілаксії. За результатами отриманих даних встановлено виражену антиалергічну дію речовини під шифром "R-10", яка за деякими показниками перевищує ефективність препаратів порівняння "Лоратадин" та "Кетотифен".

Ключові слова: алергія, антиалергічна активність, активна шкірна анафілаксія.

ВСТУП. Збільшення алергізації населення та зростання числа алергічних захворювань пов'язано з забрудненням навколишнього середовища та агресивною дією багатьох алергенів і поллютантів, зміною способу життя людей, спадковою схильністю до захворювання. Актуальність даної проблеми зростає щороку та потребує розвитку нових підходів до лікування.

Термін алергія (від грец. *allos* – інший та *ergon* – дія) запропановани Pirquet у 1906 році для характеристики всіх можливих змін реактивності організму у відповідь на дію будь-яких агентів. У сучасній науці поняття алергія – це стан патологічно підвищеної реакції організму на будь-які речовини чужорідної природи, в основі якої лежать імунологічні механізми [5,12].

Згідно з найбільш обґрунтованою та поширеною клініко-патогенетичною класифікацією P.Gell та R.Coombs (1975), прийнято виділяти чотири основних типи алергічних реакцій: анафілактичний, цитотоксичний, імунокомплексний та сповільненої гіперчутливості [5, 12]. Власне, перший, анафілактичний тип алергічних реакцій зумовлює розвиток найпоширеніших класичних алергічних захворювань: полінозу, бронхіальної астми, кропив'янки, анафілактичного шоку тощо [6,10].

Анафілактичний тип реакції опосередкують молекули, які вивільняються опасистими клітинами при взаємодії алергену з антитілами на поверхні клітин: гістамін, триптаза та мембранні ліпідні медіатори – лейкотрієни, простагландини та фактор активації тромбоцитів. Вони зумовлюють розширення капілярів та підвищення їх проникності, розвиток набряку та неспецифічної гіперреактивності гладкої мускулатури, зокрема бронхів [12].

Медіатори опасистих клітин, насамперед гістамін, відіграють ключову роль в розвитку анафілаксії, ринкон'юнктивіту та кропив'янки, що зумовлює ефективне застосування блокаторів H₁-гістамінових рецепторів (лоратадин, астемізол, фексофенадин, цетеризин тощо). Однак роль гістаміну в розвитку бронхіальної астми та екземи мінімальна, про що свідчить неефективність антигістамінних засобів при лікуванні зазначених нозологій. Таким чином, у хворих на бронхіальну астму легкої форми стійкий клінічний ефект можна отримати при застосуванні стабілізаторів мембран опасистих клітин (інтал, кетотифен) [1, 3, 4, 10, 12].

Враховуючи вищезазначене, пошук та розробка лікарських засобів з антиалергічною дією потребує нових підходів, тобто створення засобів з комплексною дією, які впливали б на усі ланки патогенезу.

При проведенні в даному напрямку пошукових робіт в НФаУ на кафедрі органічної хімії аспірантом С.В. Власовим під керівництвом чл.-кор. НАН України, проф. В.П. Черниха були синтезовані 16 об'єктів – похідні 3-(тетрагідробензо[в]тієно[2,3-d]піримідин-2-іл)кумаринів. В ЦНДЛ НФаУ проведено скринінг досліджуваних речовин за антиалергічною активністю на моделях "Офтальморекція на введення гістаміну" та "Анафілактичний шок", в результаті якого визначена найбільш перспективна речовина під шифром "R-10" [16]. Наступним етапом є більш глибоке вивчення антиалергічної дії речовини під шифром "R-10" на моделях алергічних реакцій негайного та сповільненого типів.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ. Модель "Активна шкірна анафілаксія" використана з метою визначення

здатності похідного 3-(тетрагідробензо[b]тієно[2,3-d]піримідин-2-іл)кумаринів інгібувати розвиток алергічних реакцій, які розвиваються за негайним типом [7].

Дослідження проводили на статевозрілих мурчаках масою 350-450 г. Дослідних тварин розподіляли на 5 груп по 8 тварин у кожній: 1-ша група – інтактний контроль (ІК), 2-га група – позитивний контроль (ПК), 3-тя група – тварини, яким вводили речовину під шифром "R-10" в дозі 1 мг/кг, 4-та та 5-та групи – тварини, яким вводили препарати порівняння "Лоратадин" в дозі 1 мг/кг, виробництва корпорація "Артеріум", ВАТ "Київмедпрепарат" серія № 60907, та "Кетотифен" в дозі 0,13 мг/кг, виробництва ЗАТ "Лекхім-Харків" серія №10108 відповідно.

Для відтворення активної шкірної анафілаксії використовували оптимальну схему сенсibilізації: тваринам дослідних груп (окрім групи інтактного контролю) вводили підшкірно 0,2 мл 1 % розчину яєчного білка трикратно через 2 дні. Досліджувану речовину та препарати порівняння вводили внутрішньошлунково з першого дня сенсibilізації протягом 21-го дня [7].

Вплив досліджуваної речовини на розвиток сенсibilізації у мурчаків визначали перед введенням розв'язувальної дози антигену. Ступінь розвитку сенсibilізації оцінювали за імунологічними та біохімічними показниками в сироватці крові, яку отримували за умов внутрішньосерцевого забору крові. Імунологічний статус тварин оцінювали за вмістом циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) (набір виробництва НПЛ "Гранум"), оскільки алергічна реакція супроводжується утворенням комплексів "антиген-антитіло" [11]. Для визначення стану неспецифічної реактивності тварин та синтетичної функції печінки як імунокомпетентного органа використовували набори для визначення загального білка (виробництва "Lachema") [9] та співвідношення білкового спектра сироватці крові (виробництва ТОВ НВП "Філіст-Діагностика") [11, 16]. За активністю АлАТ (виробництва "Lachema") досліджували можливі цитолітичні процеси в печінці [9]. Для раннього виявлення функціональних зсувів в організмі в період сенсibilізації також проводили аналіз лейкоцитарного профілю крові, яку отримували з вушної вени експериментальних тварин, для чого підраховували загальну кількість лейкоцитів в камері Горяєва [11].

Антиалергічну активність досліджуваної речовини визначали за допомогою методів *in vitro* та *in vivo*. Дослідження *in vitro* проведено за допомогою гематологічного тесту – реакція специфічної агрегації лейкоцитів, який засновано на здатності підсилення агрегації лейкоцитів крові сенсibilізованої тварини при додаванні

алергену, що дозволяє виявити навіть приховну сенсibilізацію. В основі РСАЛ лежить феномен склеювання білих кров'яних тілець в цитратній крові за Флексом [13].

Дослідження *in vivo* проведено на 21-й день від моменту першої сенсibilізуючої ін'єкції. Усіх дослідних та контрольних тварин наркотизували ефіром. На вистрижену ділянку шкіри правого боку внутрішньошкірно вводили розв'язувальну дозу 40 мкл розчину яєчного білка, який готували на фізіологічному розчині. Для контролю розчинника на ділянку лівого боку внутрішньошкірно вводили 40 мкл фізіологічного розчину. Потім мурчакам внутрішньовенно вводили 0,5 мл 1 % розчину синього Еванса. Через 30 хв тварин декапітували ефіром, відсепаровували шкіру та визначали площу забарвлених плям на внутрішній поверхні шкіри в місці введення розв'язувальної ін'єкції [7].

Дослідження проведено на лабораторних тваринах – безпородних мурчаках світлої масті обох статей, вирощених у віварію ЦНДЛ НФаУ. Усіх дослідних тварин після періоду акліматизації утримували у стандартних санітарних умовах віварію. Під час експерименту тварини знаходились у віварію при t 20-24 °С, вологості 50-55 %, природному світловому режимі "день-ніч", у пластикових клітках, на збалансованому харчовому раціоні відповідно до діючих норм [8].

Усі дослідження проводили з дотриманням правил "Європейської конвенції із захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та наукових цілей" [2].

Для отримання статистичних висновків при порівнянні вибірок відповідних перемінних, після того, як однофакторний дисперсійний аналіз (або критерій Крускала-Уолліса для даних, які не підлягають нормальному закону розподілу) виявив різницю між експериментальними групами, застосовували критерій Н'юмена-Кейлса для чисельних порівнянь (або критерій Манна-Уїтні). Розрахунки проводили за допомогою спеціальної програми Statistica 6.0 for Windows ПК Pentium 2000 [14].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. З огляду, що розвиток алергічної реакції супроводжується запальним процесом, у тварин групи ПК спостерігали достовірне відносно ІК підвищення кількості лейкоцитів в крові (табл.1). Також період сенсibilізації в групі ПК характеризувався накопиченням комплексів "антиген-антитіло", про що свідчить достовірне збільшення відносно ІК ЦІК в сироватці крові (табл.1). Накопиченні ЦІК в період сенсibilізації призводять після введення розв'язувальної дози антигену до вивільнення хемокінів і прояву алергії [11].

Таблиця 1. Вплив речовини під шифром "R-10" на показники, які визначали до та після введення розв'язувальної дози антигену

Показники	n	Групи тварин					
		Інтактний контроль	Позитивний контроль	Речовина під шифром "R-10"	Таблетки "Лоратадин"	Таблетки "Кетотифен"	
до введення розв'язувальної дози антигену							
Кількість лейкоцитів, 10 ⁹ /л	8	6,46±0,77	11,04±0,68*	8,70±0,81**	7,55±0,82**	6,17±0,68**	
АлАТ, мкмоль/л	7	0,44±0,04	0,52±0,09	0,47±0,09	0,44±0,04	0,44±0,04	
ЦІК, од. опт. густини	7	0,233±0,028	0,328±0,035*	0,191±0,020**/****	0,174±0,014**	0,086±0,003*/**	
Загальний білок, г/л	7	77,73±3,07	99,46±7,04	89,98±2,70	90,22±7,37	84,27±6,41	
Білкові фракції, %							
Альбуміни	7	18,51±2,06	19,29±2,33	53,46±2,75*/**/****/*****	63,62±3,15*/**	35,30±5,22*/**	
Глобуліни	α ₁	7	25,80±2,45	33,90±2,95	17,88±2,00**/****	14,99±2,82**	36,29±5,63
	α ₂	7	19,43±2,78	9,68±1,59*	13,82±1,47*/****	11,22±1,91*	22,95±1,45**
	β	7	6,47±1,78	17,17±1,71*	6,22±0,85**	5,81±1,01**	4,31±0,62**
	γ	7	14,72±0,89	24,92±4,88*	12,23±2,38**	5,51±1,12*/**	4,96±1,06*/**
після введення розв'язувальної дози антигену							
Площа забарвленої плями, мм ²	8	9,42±1,92	272,92±12,63*	61,62±5,10*/**/****/*****	115,40±17,25*/**	129,05±14,64*/**	
РСАЛ, %	дослід	5,8±0,6	14,7±1,9*/****	6,1±0,7**	7,2±1,2**	9,2±1,3**	
	контроль	6,5±0,5	6,7±1,3	7,0±1,0	7,0±1,0	5,3±1,9	

Примітки: 1) * – відхилення показника достовірно відносно показника інтактного контролю, p<0,05;
2) ** – відхилення показника достовірно відносно показника позитивного контролю, p<0,05;
3) *** – відхилення показника достовірно відносно показника препарату порівняння таблеток "Кетотифен", p<0,05;
4) **** – відхилення показника достовірно відносно показника препарату порівняння таблеток "Лоратадин", p<0,05;
5) ***** – відхилення показника достовірно відносно показника контрольної проби, p<0,05.

Відомо, що усі антитіла належать до класу імуноглобулінів (Ig), які синтезуються рибосомами зернистої ендоплазматичної сітки печінки. Слід відмітити, що γ- та β-глобуліни представляють фракцію різних імуноглобулінів. До класу IgE належать антитіла, які відповідають за розвиток алергічних реакцій. У період сенсibilізації організму також спостерігають збільшення інших класів Ig. Тому визначення співвідношення білкових фракцій у сироватці крові відображає вміст імуноглобулінів та стан неспецифічної реактивності організму [15]. Як видно з таблиці 1, період сенсibilізації в групі ПК супроводжувався достовірним зростанням фракції γ- та β-глобулінів відносно ІК, що спричинено підсиленням антигенної стимуляції в період сенсibilізації організму та відображає активацію гуморальної ланки імунітету. Формування алергічного запалення в групі ПК відбулося також на достовірному зниженні фракції α₂-глобулінів відносно ІК.

Введення розв'язувальної дози антигену in vivo призводило в групі ПК до достовірного зростання показника агрегації лейкоцитів відносно ІК та контрольної проби, що свідчить про розвиток сенсibilізації.

Діаметр забарвленої плями на місці внутрішньошкірної ін'єкції антигену є показником місцевої анафілактичної реакції. При введенні антигену утворюється комплекс "антиген-антитіло", який викликає вивільнення гістаміну з клітинного депо. Під дією гістаміну різко підвищується проникливість стінок капілярів шкіри, що призводить до виходу барвника в тканину. Чим більший діаметр плями, тим яскравіше виражена реакція [7]. Дані таблиці 1 свідчать про те, що в групі ПК достовірно зростає розмір забарвленої плями на місці внутрішньошкірного введення антигену порівняно з розмірами забарвленої плями групи ІК.

Введення на тлі розвитку патології досліджуваної речовини під шифром "R-10" та препаратів порівняння сприяло достовірному зниженню кількості лейкоцитів в крові, ЦІК та β-глобулінів в сироватці крові, а також зниженню показника РСАЛ відносно ПК до рівня ІК, що свідчить про зниження рівня сенсibilізації тварин. Однак таблетки "Кетотифен" проявляють більш агресивну дію, про що свідчить достовірне зниження рівня ЦІК відносно ІК. Перевагою антиалергічної дії речовини під шифром "R-10" є зниження рівня γ-глобулінів до рівня ІК достовірно відносно ПК, тоді

як препарати порівняння знижують цей показник достовірно ІК та ПК. Зниження розвитку алергічного запалення супроводжується достовірним зростанням відносно ПК фракції альбумінів, транспортних білків, які виконують ще й дезінтоксикаційну функцію в організмі, на тлі введення досліджуваної речовини та препаратів порівняння. Речовина під шифром "R-10" та препарат порівняння "Лоратадин" поступалися за впливом на фракцію α_2 -глобулінів препарату "Кетотифен", який підвищував цей показник до рівня ІК.

Місцева анафілактична реакція організму більш ефективно знижувалася на тлі введення досліджуваної речовини під шифром "R-10", про що свідчить достовірне зниження площі забарвленої плями відносно ПК та препаратів порівняння таблеток "Лоратадин" та "Кетотифен".

Література

1. Ciprandi G., Buscaglia S., Catrullo A. et al. Loratadine in the treatment of cough associated with allergic rhinoconjunctivitis // Ann. Allergy Asthma Immunol. – 1995. – Vol. 74. – P. 1-6.
2. Commission of the European Communities: Council Directive of 18 December 1986 on the Laws, regulating the Application of Principles of Good Laboratory Practice and the Verification of Their Applications for Tests on Chemical Substances (87/18/EEC). The Rules Governing Medicinal Products in the European Community – 1991. – Vol. 1. – P. 145-146.
3. Handley D., Magnetti A., Higgins A. Therapeutic advantages of third generation antihistamines // Exp. Opin. Invest. Drugs. – 1998. – Vol. 7, № 7. – P. 1045-1054.
4. Simons F.R., Simons F.J. The pharmacology and use of H_1 -receptor-antagonist drugs // New Engl. J. Med. – 1994. – Vol. 330. – P. 1663-1670.
5. Адо А.Д. Общая аллергология. – М.: Медицина, 1978. – С. 170.
6. Гушин И. Фармакологический контроль аллергии // Врач. – 1993. – № 1. – С. 29-31.
7. Доклінічне вивчення сенсibiliзуючої дії лікарських засобів: Методичні рекомендації. – К., 2002. – С. 5-27.
8. Западнюк М.П., Западнюк В.И., Захария Е.А. Лабораторные животные. Использование в эксперименте. – Киев: Высшая школа, 1983. – 382 с.

ВИСНОВКИ. Аналіз отриманих даних показав, що досліджувана речовина під шифром "R-10" в дозі 1 мг/кг пригнічує алергічну реакцію, яка розвивається за негайним типом, на рівні препаратів порівняння "Лоратадин" та "Кетотифен" за впливом на кількість лейкоцитів, фракцію β -глобулінів та агрегацію лейкоцитів та перевищує їх ефективність за впливом на площу забарвленої плями та показник фракції γ -глобулінів. Таблетки "Кетотифен" також поступаються речовині під шифром "R-10" за впливом на рівень ЦІК, оскільки надмірно його знижують.

Таким чином, похідний 3-(тетрагідробензо[b]тієно[2,3-d]піримідин-2-іл)кумаринів на моделі активної шкірної анафілаксії проявляє виражену антиалергічну дію.

9. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: В 2 т. – Минск: Беларусь, 2000. – Т. 1. – 495 с., Т. 2. – 463 с.
10. Клиническая аллергология / Под ред. Р.М. Хаитова. – М.: Медпрес-информ, 2002. – 624 с.
11. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / В.В. Меньшиков, Л.Н. Делекторская, Р.П. Золотницкая и др.; Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 348 с.
12. Пыцкий В.И., Адрианова Н.В., Атрюмова А.В. Аллергические заболевания. – Харьков: Триада, 1999. – 470 с.
13. Сосонкин И.Е. Агломерация лейкоцитов при диагностике аллергии, вызванной химическими лекарственными соединениями // Лаб. Дело. – 1968. – № 12. – С. 707-709.
14. Стентон Г. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999. – 459 с.
15. Чернушенко Е.Ф., Когосова Л.С. Иммунологические исследования в клинике.
16. Яковлева Л.В., Леницкая О.Б., Власов С.В. Визначення антиалергічної активності нових похідних 3-(тетрагідробензо[b]тієно[2,3-d]піримідин-2-іл)кумаринів // Ліки. – 2007. – № 1-2. – С. 63-67.

АНТИАЛЛЕРГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО 3-(ТЕТРАГИДРОБЕНЗО[В]ТИЕНО[2,3-D]ПИРИМИДИН-2-ИЛ)КУМАРИНОВ НА МОДЕЛИ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ НЕМЕДЛЕННОГО ТИПА

Л.В. Яковлева, Е.Б. Леницкая

Национальный фармацевтический университет, Харьков
Центральная научно-исследовательская лаборатория

Резюме: в статье приведены результаты исследования антиаллергического действия производного 3-(тетрагидробензо[b]тієно[2,3-d]піримідин-2-іл)кумаринів, которое изучали на модели активной кожной

анафілаксії. На основани полученных данных установлено выраженное антиаллергическое действие вещества под шифром "R-10", которое по некоторым показателям превосходит эффективность препаратов сравнения "Лоратадин" и "Кетотифен".

Ключевые слова: аллергия, антиаллергическая активность, активная кожная анафилаксия.

ANTIALLERGIC ACTIVITY OF 3-(TETRAHYDROBENZO[B]TIE-NO[2,3-D]PIRIMIDIN-2-IL)KUMARINS DERIVATIVES ON MODEL OF IMMEDIATE TYPE ALLERGIC REACTION

L.V. Yakovleva, O.B. Lenytska

National Pharmaceutical University, Kharkiv
Central Scientific-Research Laboratory

Summary: the results of research of antiallergic action of 3-(tetrahydrobenzo[b]tieno[2,3-d]pyrimidin-2-yl)kumarins derivatives, which were studied on the model of active skin anaphylaxis, are adduced in this article. Basing on the received data it was established the expressed antiallergic action of substance under the code "R-10" which on some parameters surpasses the efficiency of preparations of comparison "Loratadine" and "Ketotifen".

Key words: allergy, antiallergic activity, active skin anaphylaxis.

Рекомендована д-м фармац. наук, проф. Т.А. Грошовим

УДК 615.451.1:616.147.17-007.64

ВИВЧЕННЯ СЕНСИБІЛІЗУВАЛЬНОЇ ТА МІСЦЕВОПОДРАЗНЮВАЛЬНОЇ ДІЇ НОВОЇ ВІТЧИЗНЯНОЇ МАЗІ "ЕСТАН"

©К.П. Бездітко

Національний фармацевтичний університет, Харків

Резюме: наведені результати вивчення сенсibilізувальної та місцевоподразнювальної дії нової мазі "Естан", розробленої на основі екстрактів кори дуба та насіння кінського каштана. Враховуючи призначення до застосування мазі "Естан" та її фізико-хімічні властивості, вивчення сенсibilізувальної дії проводили на моделі наскірних аплікацій. Місцевоподразнювальний вплив мазі досліджували при її одноразовому та тривалому застосуванні. Встановлено, що мазь "Естан" не чинить сенсibilізувальної та місцевоподразнювальної дії.

Ключові слова: токсичність, сенсibilізувальна та місцевоподразнювальна дія, експериментальне вивчення, мазь "Естан".

ВСТУП. Створення нових ефективних препаратів на основі рослинної сировини є актуальним і пріоритетним напрямком сучасної фармації. Однією з найголовніших характеристик лікарських препаратів, що створюються поряд з високою фармакологічною активністю, є їх безпечність. Спеціалістами ВАТ "ХФЗ "Червона зірка" для місцевого лікування геморою та інших проктологічних захворювань на основі екстракту кори дуба та екстракту з насіння кінського каштана була створена мазь "Естан". Вивчення її сенсibilізувальної та місцевоподразнювальної дії було метою даного дослідження.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Вивчення можливої сенсibilізувальної дії мазі "Естан" проведено на

моделі наскірних аплікацій на 12-ти статевозрілих мурчаках обох статей світлої масті масою 280-310 г, які були поділені на дві групи по 6 тварин у кожній. Тваринам першої групи наносили мазь "Естан" в умовотерапевтичній дозі 25 мг/см², тваринам другої групи (негативний контроль) наносили відповідну кількість основи лікарського засобу. Мазь та основу тваринам наносили на шкірно один раз на добу щоденно протягом всього терміну дослідження на вистрижену ділянку шкіри (правий бік) розміром 5×5 см [1, 5, 7]. Завершальну дозу мазі "Естан" наносили на 11-й та 21-й дні досліду на вистрижену ділянку шкіри мурчаків розміром 5×5 см (лівий бік). Два терміни нанесення завершальної дози пояснюються тим,