

## **СОВРЕМЕННЫЕ МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ВОСПАЛЕНИИ У КРЫС**

**Авдеев С. В., Кан А. Е., А., Лыков К. А., Ососков В. С.**

ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России, направление подготовки «Биология» (400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1), e-mail: 16b1kan@bk.ru

Иммунитет – способ защиты организма от различных патогенов: бактерий, вирусов, грибов, чужеродных веществ. Посредством иммунитета контролируется генетическая целостность живого организма, обеспечивается его защита от различных заболеваний.

Иммуномодуляторы – лекарственные средства, восстанавливающие, стабилизирующие защитные функции иммунитета, то есть, в зависимости от состояния больного, либо повышают его, либо, напротив, понижают.

Иммуностимуляторы – лекарственные средства, усиливающие способность иммунитета защищать организм от патогенов, используются при пониженном иммунитете.

Иммунодепрессанты – лекарственные средства, которые подавляют действие иммунитета, применяются при избыточном иммунитете.

Российский рынок иммуномодуляторов по данным Государственного реестра лекарственных средств 2016 г., согласно делению препаратов на группы по происхождению представлен: микробными, тимическими иммуномодуляторами, цитокинами, нуклеиновыми кислотами, растительными и химическими чистыми иммуномодуляторами. По числу торговых наименований (51,9%) и лекарственных препаратов с учетом всех форм выпуска и дозировок (57,4%) лидируют цитокины. Препараты иммуномодуляторов производятся преимущественно в России (69,6%). Среди зарубежных фирм-производителей лидируют предприятия Швейцарии и Бельгии.

Следует отметить тот факт, что на Западном фармацевтическом рынке иммуномодуляторы имеют узкую и специфичную область применения. В качестве примера отмечаются редко встречаемые вторичные иммунодефициты. В то же время значительная часть иммуномодуляторов, представленных на Российском рынке, представлена лекарственными средствами, назначаемыми врачами для лечения более широкого спектра заболеваний различного рода, к которым относятся хронические

воспалительные процессы, вирусные инфекции (в частности, вирус герпеса) и опухолевых заболеваний.

В статье рассматриваются методы оценки эффективности иммуномодулирующих лекарственных средств на фоне экспериментального воспаления.

Ключевые слова: воспаление, экспериментальные исследования, иммунитет, полидоксоний, митогены, гипоксия.

## MODERN METHODOLOGICAL APPROACHES TO STUDY THE EFFICACY OF IMMUNOMODULATORS IN EXPERIMENTAL INFLAMMATION IN RATS

Avdeev S. V., Kan A. E., A., Lykov K. A., Ososkov V. S.

FSBOU VAUD VolgGMU of the Ministry of Health of Russia, training direction Biology (400131, Russia, Volgograd, Fallen Wrestlers Square, 1), e-mail: 16b1kan@bk.ru

Immunity is a way to protect the body from various pathogens: bacteria, viruses, fungi, foreign substances. Through immunity, the genetic integrity of a living organism is controlled and protected against various diseases.

Immunomodulators are drugs that restore, stabilize the protective functions of immunity, that is, depending on the condition of the patient, either increase it or, on the contrary, decrease it.

Immunostimulators - drugs that enhance the ability of immunity to protect the body from pathogens are used under reduced immunity.

Immunodepressants are drugs that suppress the effect of immunity and are used in excess immunity.

The Russian market of immunomodulators according to the State Register of Medicines 2016, according to the division of drugs into groups by origin is represented by microbial, thymic immunomodulators, cytokines, nucleic acids, plant and chemical pure immunomodulators. Cytokines lead in the number of trade names (51.9%) and medicines taking into account all forms of production and dosages (57.4%). Immunomodulator preparations are produced mainly in Russia (69.6%). Among foreign manufacturing firms, enterprises in Switzerland and Belgium lead.

It should be noted that in the Western pharmaceutical market immunomodulators have a narrow and specific field of application. Rare secondary immunodeficiency is noted as an example. At the same time, a large part of the immunomodulators

presented on the Russian market are drugs prescribed by doctors for the treatment of a wider range of diseases of various kinds, which include chronic inflammatory processes, viral infections (in particular herpes virus) and tumor diseases.

The article discusses methods of assessing the effectiveness of immunomodulatory drugs against the background of experimental inflammation.

**Keywords:** inflammation, experimental studies, immunity, polydoxonium, mitogens, hypoxia.

## Введение

Иммуномодулирующие препараты делятся на шесть групп: препараты микробного, костного мозга, нуклеиновые кислоты, цитокины, тимус, а также химически чистые иммуномодуляторы.

Препараты микробного происхождения условно делятся на 3 поколения:

1. I-й: (вакцина БЦЖ (бациллы Кальметта-Герена), пирогенал, продигозан)
2. II-й: продукты лизиса бактерий, лизаты (бронхомунал, рибомунил). Эти препараты воспринимаются иммунной системой как иностранные. При приеме препаратов второго поколения помимо специфического иммунитета развивается и наблюдается иммуностимулирующий эффект;
3. Третье поколение относится, например, к ликопиду, состоящему из природного дисахарида - глюкозаминилмурамила и синтетического дипептида - L-alanyl-D-изоглутамина, прикрепленного к нему.

Использование лекарственных препаратов костного мозга, в частности миелопида, стимулирует пролиферацию гемопоэтических клеток костного мозга, а также их дифференцировку клеток-предшественников в направлении В-лимфоцитов. Благодаря миелопептиду-1 активизируется дифференцировка Т-лимфоцитов и усиливается гранулоцитопоз. Фагоцитарная активность гранулоцитов возрастает под влиянием миелопептида-3. В связи с увеличением количества гранулоцитов, Т- и VILMOcytes в периферической крови уровень антител в ней также значительно возрастает.

Препараты нуклеиновых кислот являются активаторами усиленной пролиферации клеток костного мозга и лимфопоэза. Натриевая соль нуклеиновой кислоты, полученная гидролизом дрожжей, представляет собой нуклеат натрия, который содержится в большом количестве предшественников нуклеиновых кислот. Большое количество таких предшественников стимулирует рост и пролиферацию наиболее быстро делящихся клеток. Благодаря стимуляции деления Т и В лимфоцитов иммунная реакция организма на патогены также усиливается. В группу препаратов входят деринат, натриевая соль, ДНК, молокосетин, ридостин, РНК, пекарские дрожжи, а также некоторые другие синтетические препараты.

Цитокины представляют собой комплекс иммуномодулирующих молекул, а также рекомбинантные препараты цитокинов.

Тимусовые препараты - пептидные гормоны вилочковой железы. При попадании в кровь эти пептиды оказывают стимулирующее действие на всю

периферическую иммунную систему, усиливают дифференцировку и пролиферацию лимфоидных клеток.

Химически чистые иммуномодуляторы делятся на две подгруппы: низкомолекулярный и высокомолекулярный. Представитель первой подгруппы, левамизол, фенилимидазоль, первоначально был антигельминтным лекарственным средством, которое получилось в результате иммуномодулятора, который оказывает стимулирующее действие на макрофаги и гранулоциты. Препараты с высокой молекулярной массой похожи на препараты нуклеиновых кислот. Например, полиоксидоний обеспечивает метаболизм азотистых оснований, необходимых для активной пролиферации быстро делящихся клеток.

Разработка этиотропного лечения состояний вторичного иммунодефицита при острых бронхолегочных заболеваниях, в частности, пневмония, на сегодняшний день остается приоритетным. Однако применение антибактериальных средств терапии становится менее эффективным и зачастую приводит к усилению затяжного характера течения заболеваний и его хронизации.

Попытки выделить один из ведущих механизмов возникновения острой пневмонии была безуспешной. Однако большинство специфических различий обусловлены этиологическим фактором на клеточном уровне. Такими универсальными процессами при острых бронхолегочных заболеваниях являются нарушение кислородного режима и изменение иммунного ответа.

Из-за метаболических изменений при дефиците кислорода центральным звеном является так называемая биоэнергетическая гипоксия, которая основана на последовательных изменениях свойств комплекса митохондриальных ферментов, приводящих к нарушениям энергосинтезирующей функции дыхательной цепи. Все стадии биоэнергетической гипоксии коррелируют с изменениями содержания АТФ в ведущих энергозависимых процессах в клетках. Уровень аденнуклеотидов и, в частности, величина энергетического заряда аденильной системы являются информативными в условиях гипоксии, связанных с бронхолегочным воспалением.

Иммунный статус является одним из наиболее важных факторов, определяющих исход воспалительного процесса в сочетании с длительной персистенцией бактериальной, вирусной или микоплазменной инфекции. Характеристики процесса воспаления легких связаны с иммунным статусом, поэтому выявление функционального состояния Т и В лимфоцитов и фагоцитов в остром бронхолегочном воспалении позволяют использовать

иммунологические исследования в качестве дополнительных методов диагностики и прогноза заболеваний, а также оценки активности и направления воспалительного процесса.

Учитывая сложный характер нарушений, которые протекают в организмах с бронхогенным воспалением, связь с механизмом воздействия на организм, системой снабжения организма кислородом, процессами энергообеспечения и обмена веществ, а также иммунной системой, которые имеют целевое использование лечебных средств с широкий спектр фармакологической активности.

Для этого требуются недавно появившиеся препараты трекрезана и полиоксидония.

Трекрезан относится к малотоксичным соединениям ( $LD_{50}$  для крыс  $> 3700$  мг / кг с внутрибрюшинным и  $> 6500$  мг / кг при пероральном введении), оказывает стрессозащитное действие на моделях иммобилизации и снятия боли гиподинамический стресс, который обладает способностью ускорять восстановление поврежденных тканей (печени, миокарда, мышц), защищает внутренние органы от повреждающего воздействия токсинов, микроволнового излучения, инфекционный фактор. Препарат обладает выраженной антиоксидантной активностью и иммуностимулирующими свойствами.

Одним из перспективных иммуномодуляторов является полиоксидоний. Препарат оказывает активирующее влияние на наблюдаемую резистентность организма, фагоцитоз, гуморальный и клеточный иммунитет. Одним из основных биологических свойств является способность стимулировать антиинфекционную резистентность организма. Полиоксидоний действует на все звенья фагоцитарного процесса: активизирует миграцию фагоцитов, усиливает очистку от посторонних частиц из кровотока, повышенная абсорбция и бактерицидная активность фагоцитов.

Известно, что бактерицидная активность фагоцитов обусловлена кислородзависимыми и кислородзависимыми механизмами. Оказалось, что полиоксидоний подавляет спонтанное образование внеклеточного, но стимулирует образование внутриклеточных активных форм кислорода. Что касается индукции синтеза цитокинов, полиоксидоний, который является истинным иммуномодулятором, стимулирует их самопроизвольное и индуцированный синтез. Наряду с иммуномодулирующими свойствами полиоксидоний должен оказывать анитоксическое, антиоксидантное и мембранотропное действие.

## **Методика**

Эксперименты выполняются на 106 крысах самцах Вистар, выращенных в виварии в стандартных условиях освещения и питания. Острое бронхолегочное воспаление (бронхопневмонию) моделируют путем введения 0,1 мл живичного скипидара в просвет трахеи хирургическим путем.

Непосредственно после операции и далее на протяжении 5 дней животным опытной группы внутрибрюшинно вводили раствор исследуемого препаратов: метапрота (25 мг/кг), трекрезана (25 мг/кг) или полиоксидония (0,75 мг/кг) либо их комбинации, используя те же дозы. Выбор доз определялся на основании проведенных ранее исследований и доказательств действия препаратов именно в этих дозах как иммуномодуляторов. На пятые сутки эксперимента животных декапитируют. На пятые сутки определяют выживаемость крыс, морфологически исследовали ткань легкого и проводили иммунологические исследования по показателям крови животных. Дополнительно оценивали состояние флавиновых и пиридиновых нуклеотидов в иммунокомпетентных клетках крови методом их прижизненной флуориметрии в альвеолярных макрофагах и лимфоцитах.

Для изучения клеточного компонента иммунитета нами была использована реакция ингибирования миграции лейкоцитов (RTML) митогенами. В качестве последнего использовались фитогемагглютинин (РНА) и конканавалин А (Con A). Состояние механизмов неспецифической защиты организма оценивали по показателям фагоцитоза, лизосомально-катионного теста (ЛКТ), теста на восстановление нитрозин-тетразолия (НСТ тест).

Кровь для проведения прижизненной флуориметрии флавиновых и пиридиновых нуклеотидов отбирается из сердца после внутрибрюшинного введения 0,5 мл 10% тиопентала натрия. Лимфоциты выделяли по градиенту плотности фиколл-уротруст ( $\rho = 1,077$  г / мл), рабочая концентрация которого составляла  $1 \times 10^6$  клеток на 1 мл. Альвеолярные макрофаги получали в бронхоальвеолярных мазках с использованием раствора Хенкса (рН 7,4). В работе использовали суспензию альвеолярных макрофагов, содержащую  $1 \times 10^6$  клеток в 1 мл. Адгезия макрофагов к стеклу достигалась путем 20-минутной инкубации во влажной камере при  $37^\circ \text{C}$ . Состояние флавиновых (FP) и пиридиновых нуклеотидов в изолированных иммунокомпетентных клетках крови изучали *in situ* с помощью люминесцентной микроскопии перед введением лекарственного средства и против него. предыстория их действий. Все препараты вводили в клеточную среду в объеме 10 мкл в следующих концентрациях: метапрот - 0,1 мМ, трекрезан - 0,1 мМ, полиоксидоний - 500 мкг / мл. При комбинировании препаратов используются одинаковые концентрации. Метод позволяет одновременно измерять собственную флуоресценцию NADH и флавопротеинов в режиме реального времени. Интенсивность собственной флуоресценции нуклеотидов измеряли с использованием установки,

включающей люминесцентный микроскоп LUMAM-P8. Образец для каждой группы животных составлял не менее 10 крыс.

### Список литературы

1. Зарубина И.В., Шабанов П.Д. Антиоксидантное действие полиоксидония и метапрота при бронхолегочном воспалении у крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т.160, №8. – С.200-204. 5
2. Морозов В.Г., Хавинсон В.Х. Методические рекомендации по проведению иммунологических исследований (методы оценки Т- и В-систем иммунитета). – Л., 1980. – 44 с.
3. Пинегин Б.В., Некрасов А.В., Хаитов Р.М. Иммуномодулятор «полиоксидоний»: механизмы действия и аспекты клинического применения // Медлайн экспересс. – 2005. – Т.177, №1. – С. 19-23.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. В.П. Фисенко. – М.: МЗ РФ, 2000. – 398 с.
5. Шабанов П.Д., Мокренко Е.В. Противовоспалительные и иммуностимулирующие эффекты трекрезана при лечении воспалительно-дегенеративных поражений мягких тканей пародонта // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2015. – Т.13, №2. – С. 34-42.