

ВИВЧЕННЯ СЕНСИБІЛІЗУЮЧИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРЕПАРАТУ НА ОСНОВІ ПРИРОДНОЇ СИРОВИНИ КАПСУЛ “ГЕПАФІСАН”

Л.В.Яковлева, О.Б.Леницька, О.В.Геруш*, О.М.Горбань**

Національний фармацевтичний університет

Буковинський державний медичний університет*

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика**

Ключові слова: сенсibilізуючі властивості; капсули “Гепатісан”; активна шкірна анафілаксія; кон’юнктивальна проба; дегрануляція мастоцитів

*Стаття присвячена доклінічному вивченню нешкідливості нового препарату гепатотропної дії — капсул “Гепатісан”, створеного на основі природної сировини, а саме його сенсibilізуючих властивостей. Вивчення можливої сенсibilізуючої дії капсул “Гепатісан” проведено в реакції *in vitro*: непряма дегрануляція мастоцитів і в тестах *in vivo*: “кон’юнктивальна проба” та “активна шкірна анафілаксія”. Досліджуваний препарат в умовно терапевтичній дозі 108 мг/кг та в дозі, яка в 10 разів перевищує умовно терапевтичну — 1080 мг/кг, не проявляє анафілактогенних властивостей, не викликає підвищення кількості дегранульованих мастоцитів і появу гомоцитотропних антитіл. Також при введенні гепатісану видимі ознаки запальної реакції на слизовій оболонці ока відсутні. Таким чином, капсули “Гепатісан” не викликають сенсibilізації організму, що свідчить про високий рівень безпеки досліджуваного фармакологічного засобу, який можна рекомендувати у виробництво або клінічну практику як новий гепатопротектор, що не виявляє антигенних властивостей.*

Проблема алергії сьогодні — одна з важливих у медицині. В останнє десятиріччя зростає кількість людей з алергічними захворюваннями, при цьому серед них багато хворих, у яких алергізація розвивається на тлі основного захворювання [6]. Сучасні синтетичні лікарські препарати, які використовують для лікування, виявляють велику кількість побічних ефектів, у тому числі й алергічних реакцій. Тому ліки рослинного походження на сучасному фармацевтичному ринку займають дуже велику частку. В останні роки багато відомо про корисні властивості лікарських рослин та широкі можливості їх ви-

користання, але дуже мало — про їх протипоказання [8].

Вищенаведене свідчить про актуальність питання нешкідливості нових лікарських засобів, в тому числі й рослинного походження. Згідно з існуючими вимогами МОЗ України при доклінічному вивченні нових лікарських засобів, у тому числі рослинного походження, визначення сенсibilізуючих властивостей є обов’язковою вимогою Фармакологічного комітету МОЗ України [1, 5].

Метою даної роботи стало вивчення можливої сенсibilізуючої дії капсул “Гепатісан”, який було розроблено як новий гепатопротектор, до складу якого входять

7 рослинних компонентів: плоди розторопші, коріння кульбаби, листя м’яти, трава бобівника трилистного, квітки нагідок, трава реп’яшка, трава рутки лікарської [7, 9, 10].

Матеріали та методи

Можливі сенсibilізуючі властивості досліджуваного препарату оцінювали за його здатністю викликати реакції гіперчутливості негайного та повільного типів на моделі активної шкірної анафілаксії та в тестах непрямой дегрануляції мастоцитів та кон’юнктивальної проби [1].

Експерименти проводили на 2-х видах тварин: морських свинках (кон’юнктивальна проба та активна шкірна анафілаксія) та 29-ти білих безпородних щурах (реакція дегрануляції мастоцитів). Оскільки досліджуваний препарат призначений для перорального застосування, його вводили тваринам перорально (морським свинкам) та внутрішньошлункково (щурам) в умовно терапевтичній дозі 108 мг/кг, яка була встановлена

Л.В.Яковлева — доктор фармац. наук, професор, завідувачка Центральної науково-дослідної лабораторії Національного фармацевтичного університету (м. Харків)

О.В.Геруш — канд. фармац. наук, завідувач кафедри фармації Буковинського державного медичного університету (м. Чернівці)

О.М.Горбань — канд. біол. наук, доцент кафедри організації і економіки фармації Національної медичної академії післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика (м. Київ)

Таблиця 1

Вивчення сенсibiliзуючих властивостей капсул “Гепафiсан” у тестi “Кон’юнктивальна проба”, M (min_M – max_M)

Групи тварин	Доза, мг/кг	n	Вираженість офтальмореакції, бали	
			15 хвилин	24 години
Капсули “Гепафiсан”	108	7	0	0
	1080	6	0	0

Примітка: n — кількість тварин у групі.

під час вивчення фармакологічної (гепатопротекторної) активності, та в дозі, яка в 10 разів її перевищує — 1080 мг/кг [1].

Модель “кон’юнктивальна проба” є відтворенням алергічної реакції на слизовій кон’юнктиві і рогівки [1, 5]. Для постановки даної моделі використовували 13 морських свинок масою 450-500 г, яких сенсibiliзували досліджуваним препаратом у дозах 108 та 1080 мг/кг шляхом перорального введення протягом 14 днів [1, 5].

На 21-й день після початку сенсibiliзації проводили закапування 1-ї краплі розрізняльної дози препарату під верхню повіку і враховували реакцію слизової оболонки через 15 хвилин і через 24 години. Друге око служило контролем на дистильовану воду [1, 5].

Оцінку результатів кон’юнктивального тесту виражали в балах:

- 1 — легке почервоніння слъзової протоки;
- 2 — почервоніння слъзової протоки і склери в напрямку до роговиці;
- 3 — почервоніння всієї кон’юнктиви і склери.

Модель активної шкірної анафілаксії є реакцією негайного типу і дозволяє виявити можливу сенсibiliзуючу дію в умовах *in vivo* [1]. Експеримент проводили на 14-ти морських свинках. На даній моделі використовували оптимальну схему сенсibiliзації: тваринам дослідних груп вводили перорально водну суспензію досліджуваного препарату в дозі 108 мг/кг протягом 14-ти днів. Контрольним тваринам вводили воду.

На 21-у добу після початку сенсibiliзації дослідним і контрольним тваринам на вистрижені ділянки шкіри спини вводили внутрішньошкірно 40 мкл суспен-

зії досліджуваного препарату в концентрації, яка не викликає неспецифічної запальної реакції. Для контролю розчинника на ділянці протилежного боку тварини внутрішньошкірно вводили 40 мкл фізіологічного розчину. Потім внутрішньовенно — 0,5 мл 1% розчину синього Еванса. Через 30 хв тварин знеживлювали передозуванням ефірного наркозу, відсепарували ділянки шкіри і визначали площу синіх плям у місці введення препарату. Показником місцевої анафілактичної реакції на моделі активної шкірної анафілаксії є діаметр забарвленої плями в місці внутрішньошкірної ін’єкції антигену. Чим більша площа плями, тим більш виразна реакція [1, 4].

З метою одержання більш повної уяви про можливі сенсibiliзуючі властивості досліджуваного препарату нами було проведено алергологічне тестування *in vitro*: реакція непрямой дегрануляції мастоцитів, що є результатом взаємодії перитонеальних мастоцитів інтактних щурів із сироваткою крові сенсibiliзованої тварини і відповідним алергеном, який вивчається та виявляє здатність досліджуваного препарату викликати появу гомоцитотропних антитіл [1-3].

Для постановки тесту використовували 29 білих безпородних щурів самців. Сенсibiliзацію досліджуваним препаратом у дозах 108 та 1080 мг/кг проводили за умов внутрішньошлункового введення протягом 14 дб. Контрольні тварини отримували воду.

Для сенсibiliзації тварин дослідних груп застосовували водну суспензію препарату, а в реакціях *in vitro* використовували суспензію досліджуваного препарату в фізіологічному розчині нат-

рію хлориду та серію його дворазових розведень.

На 21-у добу тварин виводили з експерименту методом декапітації під ефірним наркозом, одержували сироватку для постановки реакції. У попередніх експериментах підбирали концентрацію розчину досліджуваного препарату, яка викликає не більше 10% неспецифічної дегрануляції. Препарати готували на предметному склі, яке попередньо фарбували 0,3% спиртовим розчином нейтрального червоного. До 30 мкл суспензії мастоцитів, отриманих з перитонеального ексудату інтактних тварин, додавали 30 мкл сироватки дослідної або контрольної тварини і 30 мкл розчину досліджуваного препарату. При постановці реакції з метою виключення спонтанної дегрануляції мастоцитів і дегрануляції під впливом розчинника враховували наступні види контролю: 1) контроль сироватки: 30 мкл суспензії мастоцитів, 30 мкл досліджуваних сироваток, 30 мкл фізіологічного розчину; 2) контроль алергену: 30 мкл суспензії мастоцитів, 30 мкл фізіологічного розчину і 30 мкл алергену (розчин досліджуваного препарату).

Після 15-хвилинної інкубації при 37°C препарати вивчали під мікроскопом і підраховували по 100 клітин. Оцінку результатів проводили, підраховуючи відсоток дегранульованих мастоцитів.

Реакцію вважали позитивною, якщо кількість дегранульованих клітин перевищує 10%. Ступінь сенсibiliзуючої дії досліджуваного препарату визначали за шкалою: слабка — від 10 до 20% дегранульованих клітин; позитивна — від 20 до 30% дегранульованих клітин; різко позитивна — від 30% і більше дегранульованих клітин.

Результати та їх обговорення

Як видно з табл. 1, внаслідок проведення реакції кон’юнктивальної проби у всіх піддослідних тварин були відсутні видимі ознаки алергічної запальної реакції на слизовій оболонці ока, що вказує

Таблиця 2
**Визначення сенсibiliзуючих властивостей капсул
 “Гепафiсан” у тестi “Активна шкiрна анафiлаксия”, $\bar{X} \pm S\bar{X}$**

Групи тварин	Доза, мг/кг	n	Дiаметр забарвленої плями, мм	Площа забарвленої плями, мм ²
Інтактний контроль	—	7	2,71±0,42	13,23±3,50
Капсули “Гепафiсан”	108	7	3,43±0,30	19,29±3,67

Примiтка: n — кiлькiсть тварин у групi.

Таблиця 3
**Вплив капсул “Гепафiсан” на дегрануляцiю
 мастоцитiв, $\bar{X} \pm S\bar{X}$**

Групи тварин	Доза, мг/кг	Шлях сенсibiliзацiї	n	Кiлькiсть дегранульованих мастоцитiв, %
Інтактний контроль	—	—	9	6,11±0,75
Капсули “Гепафiсан”	108	внутрiшньошлунковий	10	5,50±0,56
	1080	внутрiшньошлунковий	10	6,00±0,89

Примiтка: n — кiлькiсть тварин у групi.

на вiдсутнiсть сенсibiliзуючої дiї дослiджуваного препарату.

На моделi активної шкiрної анафiлаксии капсули “Гепафiсан” у дозi 108 мг/кг не проявляють анафiлактогенної дiї, оскiльки результати експерименту, наведенi в табл. 2, свiдчать про те, що при введеннi антигену (розчин дослi-

джуваного препарату) дослiдним тваринам площа пофарбованої плями в мiсцi ин’екцiї антигену залишалась на рiвнi показника в групi iнтактного контролю.

У тестi in vitro дослiджуваний препарат — капсули “Гепафiсан” не проявляє здатностi викликати появу гомоцитотропних антитiл

(табл. 3), якi призводять до дегрануляцiї мастоцитiв i, як слiд, вивiльнення медiаторiв алергiчної реакцiї, оскiльки показники дегрануляцiї мастоцитiв у групi iнтактних тварин та тварин, яким вводили дослiджуваний препарат, не мали достовiрних розбiжностей. Отже, капсули “Гепафiсан” не проявляють сенсibiliзуючої активностi в тестi “непряма реакцiя дегрануляцiї мастоцитiв”.

ВИСНОВКИ

На пiдставi вищенаведених даних можна стверджувати, що дослiджуваний препарат — капсули “Гепафiсан” при внутрiшньошлунковому введеннi в дозах 108 та 1080 мг/кг не проявляє сенсibiliзуючих властивостей в тестах “Активна шкiрна анафiлаксия” i “Кон’юнктивальна проба” та в реакцiї непрямої дегрануляцiї мастоцитiв.

Наведенi результати токсикологiчного дослiдження дозволили встановити, що капсули “Гепафiсан” є вiдносно нешкiдливим лiкарським засобом. Таким чином, дослiджуваний препарат можна рекомендувати у виробництво або клiнiчну практику як новий гепатопротектор, який не виявляє антигенних властивостей.

ЛІТЕРАТУРА

1. Доклiнiчне вивчення сенсibiliзуючої дiї лiкарських засобiв: Метод. рекомендацiї. / За ред. О.В. Стефанова. — К., 2002. — 27 с.
2. Ишимова Л.М. Тучные клетки соединительной ткани и базофилов крови в диагностике аллергии немедленного типа / В сб. “Проблемы иммунологической реактивности и аллергии”. — М.: Медицина, 1971. — С. 186.
3. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике. В 2-х т. Т. 1. — Мн: Беларусь, 2000. — 495 с.
4. Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П. и др. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
5. Трубицкая Г.П. Кон’юнктивальная проба в эксперименте на морских свинках. Актуальные вопросы аллергологии и иммунологии. — Ташкент, 1978. — С. 79-83.
6. Anderson J.A. // JAMA. — 1992. — Vol. 268. — P. 2845-2857.
7. Bravo L. // Nutr. Rev. — 1998. — №56. — P. 317-333.
8. Brubn J.G. // Acta Pharm. Nord. — 1989. — Vol. 1, №3. — P. 117-130.
9. DeLeve L.D., Kaplowitz N. // Gastroenterol. Clin. N. Am. — 1995. — Vol. 24. — P. 787-810.
10. Robak J., Gryglewski R.J. // Pol. J. Pharmacol. — 1996. — Vol. 48, №6. — P. 555-564.

Адреса для листування: 61002, м. Харкiв,
 вул. Мельникова, 12. Тел. (57) 714-27-15.
 Нацiональний фармацевтичний унiверситет

Надiйшла до редакцiї 23.09.2011 р.