

ПРОТОКОЛ

испытаний антиаллергенных свойств физиологического раствора, экспонированного на компактдисках с излучением дексона

Цель испытаний – установить наличие или отсутствие способности физиологического раствора (физраствор), экспонированного на компакт диске с излучением дексона влиять на развитие аллергических реакций.

Исследования проведены в соответствии с требованиями, изложенными в “Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ”, М., 2000, оценки аллергенной (анафилактогенной) активности лекарственных средств.

Принцип метода. Способность физраствора (0.9%-ный раствор NaCl, аптечный препарат), экспонированного на диске с излучением дексона, угнетать развитие аллергических реакций разного типа оценивали по влиянию на аллергические реакции гуморального типа (реакция гиперчувствительности немедленного типа – ГНТ, по другой терминологии – реакция анафилаксии) и клеточного типа (реакция гиперчувствительности замедленного типа – ГЗТ). Обе эти аллергические реакции хорошо воспроизводятся на лабораторных животных и применяются при доклинических испытаниях лекарственных средств.

В экспериментальной практике реакции гиперчувствительности, в зависимости от антигена, индуцируются вначале сенсибилизирующей инъекцией, а затем разрешающей инъекцией стандартного лабораторного образца сыворотки крови лошади (реакция ГНТ), или эритроцитов барана (реакция ГЗТ).

Эксперименты проведены в «слепом» варианте – исполнители до завершения эксперимента и обработки результатов (достоверность различий между группами по критерию Стьюдента) не имели информации о специфичности использованных дисков. Диски с излучением дексона предоставлены Фондом ДСТ в соответствии с инструкцией (сайт newpharm.ru).

Реакция гиперчувствительности немедленного типа – ГНТ. Антиаллергенные свойства образцов физраствора, экспонированных (в течение 20 час) или неэкспонированных на диске с излучением дексона, изучали на половозрелых крысах-самцах «Вистар» массой 230-250 г., содержащихся в условиях вивария в стандартных полипропиленовых клетках на стандартном пищевом рационе.

Для развития реакции ГНТ животных сенсибилизировали введением подкожно по 0,1 мл нормальной лошадиной сыворотки (продажный препарат). Сразу после сенсибилизации и за сутки перед введением разрешающей дозы лошадиной сыворотки (по 1,5 мл) животным однократно внутрибрюшинно вводили: одной группе (9 особей) по 3 мл физраствора, экспонированного на чистом диске (контроль), другой (10 особей) – по 3 мл физраствора, экспонированного на диске с излучением дексона (опыт).

На 15 сутки после сенсibilизации для получения анафилактического шока разрешающую дозу лошадиной сыворотки вводили внутривенно в объеме 1,5 мл.

Оценку анафилактической реакции проводили по общепринятой четырехплюсовой схеме:

+ – кратковременное почесывание носа, взъерошивание шерсти, падение температуры тела не менее, чем на 1°C ;

++ – четко выраженные частые почесывания, единичные чихания, падение температуры тела;

+++ – спастический кашель, боковое положение животного, отделение кала и мочи;

++++ – спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги, животное погибает.

Интенсивность реакции анафилаксии оценивали индивидуально и вычисляли индекс реакции по формуле Вейгла:

$$\text{ИР} = [(A \times 1) + (B \times 2) + (C \times 3) + (D \times 4)] : [(A + B + C + D)],$$

где А, В, С, D – число животных с соответствующей оценкой реакции: минимальная – А (+); – В (++); – С (+++); максимальная – D (++++); реакция отсутствует (-) – D.

Исследования показали (табл. 1), что у крыс, которым вводили экспонированный на чистом диске физраствор (9 особей, группа контроль), разрешающая инъекция вызывала выраженные признаки анафилаксии: у 1-ой крысы кратковременное почесывание носа и взъерошивание шерсти (оценка реакции +); у 5-ти крыс четко выраженные почесывания и единичные чихания, что согласно используемой схеме оценивалось как ++; у 3-х крыс спастический кашель, боковое положение, отделение кала и мочи (оценка реакции +++).

В результате индекс реакции по Вейглу был равен

$$\text{ИР} = [(1 \times 1) + (5 \times 2) + (3 \times 3)] : 9 = 2,2$$

Разрешающая инъекция крысам (10 особей, группа опыт), которым вводили экспонированный на диске с излучением дексона физраствор, вызывала: у 7-и крыс кратковременное почесывание носа (оценка реакции +), у 1-ой крысы – четко выраженные почесывания и единичные чихания (++), у 2-х крыс – спастический кашель, боковое положение и отделение кала и мочи (+++).

Соответственно индекс реакции по Вейглу был равен

$$\text{ИР} = [(7 \times 1) + (1 \times 2) + (2 \times 3)] : 10 = 1,5$$

Индекс реакции в группе «опыт» был достоверно ниже (по критерию Стьюдента $p < 0,05$), чем в группе «контроль». Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности физраствора после экспонирования на диске с излучением дексона тормозить развитие аллергической реакции немедленного типа.

Таблица 1. Влияние введения образцов физраствора, экспонированных на контрольном или опытном дисках, на реакцию гиперчувствительности немедленного типа (ГНТ) у крыс

Группа животных	Индекс реакции, $M \pm m$
Физраствор, экспонированный на чистом диске	2.2 ± 0.2
Физраствор, экспонированный на диске с излучением дексона	$1.5 \pm 0.26^*$

Примечание: * – достоверно значимые ($p < 0,05$) отличия от контроля

Реакция гиперчувствительности замедленного типа – ГЗТ.

Эксперименты выполнены на мышах-самцах гибридах F1(CBA x C57Bl/6) массой 22-25 г. Животные содержались в условиях вивария в стандартных пластиковых клетках на стандартном пищевом рационе.

Исследовали антиаллергенные свойства физраствора, экспонированного на дисках: без излучения дексона (контроль) и на диске с излучением дексона.

Образцы физраствора, экспонированные на дисках, вводили внутрибрюшинно в течение 4-х дней по 0,5 мл в сутки до сенсibilизации мышей эритроцитами барана. Подопытная (введение физраствора, экспонированного на диске с излучением дексона) и контрольная (введение физраствора, экспонированного на чистом диске) группы мышей содержали по 8 особей.

Сенсibilизацию проводили подкожным введением в холку животных эритроцитов в дозе 2×10^8 клеток на мышь; разрешение (выявление реакции ГЗТ) проводили через 5 суток введением эритроцитов в дозе 1×10^8 клеток на мышь под апоневротическую пластинку одной из задних лап (опыт); в контрлатеральную лапу вводили адекватный объем физраствора (без экспонирования). Через 24 часа мышей забивали, отсекали лапы на уровне голеностопного сустава, определяли их массу и вычисляли индекс реакции по формуле:

$$ИР = (M_o - M_k) : M_k \times 100 \%,$$

где M_o – масса опытной лапы, M_k – масса контрлатеральной лапы.

Проведенные исследования показали (табл.2), что в группе мышей, которые до сенсibilизации эритроцитами барана получали внутрибрюшинно в течение 4-х дней физраствор, экспонированный на диске с излучением дексона, наблюдалось угнетение реакции ГЗТ – индекс реакции был достоверно снижен по сравнению с группой мышей, которые получали физраствор, экспонированный на чистом диске. Следовательно, экспонированный с излучением дексона физраствор при внутривенном

введении мышам угнетает развитие у них реакции гиперчувствительности замедленного типа, индуцированный эритроцитами барана.

Таблица 2. Индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у мышей с введением физраствора, экспонированного на чистом диске (контроль) или на диске с излучением дексона (опыт)

Группа животных	ИР, %
Физраствор, экспонированный на чистом диске (Контроль)	22.0±2.5
Физраствор, экспонированный на диске с излучением дексона (Опыт)	14.8±1.7*

Примечание: *- достоверно значимые различия ($p < 0,05$) с контрольной группой

Заключение

Получены экспериментальные данные, которые свидетельствуют о том, что экспонирование физраствора с излучением дексона воспроизводит в нем антиаллергическую активность, свойственную субстанции дексона. Данная активность направлена как в отношении аллергических реакций (реакций гиперчувствительности) обусловленных гуморальными (ГНТ), так и клеточными факторами (ГЗТ).

Заведующий лабораторией радиационной иммунологии
ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр»
Минздравсоцразвития РФ, д.б.н.



Суринов Б.П.

Ведущий научный сотрудник, к.б.н.



Исаева В.Г.