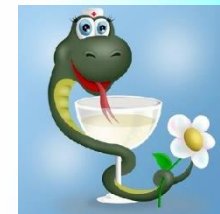


ХАКАССКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ
им. Н.Ф. Катанова
1939



Научно-практическая конференция
«Форум специалистов лабораторной медицины Республики Хакасия: современные
подходы к организации лабораторной службы, актуальные
аспекты исследований системы гемостаза в медицинской практике»

Использование методов лабораторной диагностики в доклиническом исследовании лекарственных средств

Дутова С. В.

проф. каф. фундаментальной
медицины и гигиены МПСИ

Доклинические исследования

- Это основополагающий этап разработки лекарственных средств, позволяющий изучить их фармакологические эффекты и оценить возможную токсичность.
- Результаты доклинических исследований новых лекарственных средств составляют значительную часть досье, формируемого с целью государственной регистрации.
- Доклинические исследования эффективности лекарственного средства проводится на моделях заболеваний лабораторных животных и является основой для разработки показаний к применению и дизайна дальнейших клинических исследований.



Цель и задачи исследования

Цель — провести доклиническое исследование иммуностропного действия суммарных извлечений из сырья эфирномасличных растений для разработки на их основе эффективной и безопасной фармацевтической субстанции, изучить механизмы ее действия.

Основные задачи:

- 1) провести доклиническое исследование иммуностропного действия наиболее активных извлечений, разработать фармацевтическую субстанцию, изучить механизм ее действия;
- 2) провести оценку безопасности разработанной фармацевтической субстанции по показателям острой и хронической токсичности.

Объекты исследования

Сем. *Lamiaceae*

Сем. *Rosaceae*

Ziziphora clinopodioides
Lam. – Зизифора
клиноподиевидная



Prunella vulgaris L. –
Черноголовка
обыкновенная



Schizonepeta multifida L. –
Схизонепета
многонадрезанная



Thymus petraeus Serg. –
Тимьян
каменный



Nepeta sibirica L. –
Котовник
сибирский



Coluria geoides (Pall.)
Ledeb. – Колюрия
гравилатовидная



Извлечения 40 % этанолом (*in vivo* – 50 мг/кг, *in vitro* – 10 мкг/мл пит. среды)

Препараты сравнения

настойка эхинацеи пурпурной, извлечения и эфирное масло из сырья
душицы обыкновенной и аира болотного

Материал исследования



Протокол экспериментальной части исследования
согласован с Этическим комитетом ХГУ им. Н. Ф.
Катанова
(Протокол № 1 от 10.10.2012г.).

Методы исследования

Этап исследования	Определяемые показатели	Методы исследования
1. Исследование иммунотропного действия, описание механизма действия	Интенсивность и активность фагоцитоза, абсолютное число лейкоцитов и спленоцитов, морфологический состав лейкоцитов, титр суммарных антител и IgG , относительное число антителообразующих клеток селезенки, содержание IgA, IgM, IgG, ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-8, ФНО α , ИНФ γ .	гематологические, иммунологические, серологические (РПГА, ИФА)
2. Оценка протективного действия на модели инфекции	Абсолютное число лейкоцитов и спленоцитов , морфологический состав лейкоцитов, индекс ядерного сдвига, интенсивность и активность фагоцитоза, титр специфических антител-агглютининов,	гематологические, иммунологические, серологические (РА)
3. Оценка острой и хронической активности	Влияние на гематологические показатели крови (абсолютное число лейкоцитов, эритроцитов, морфологический состав лейкоцитов)	гематологические

1. Исследование иммуотропного действия извлечений из сырья *Coluria geoides* (Rosaceae)



В качестве основы для фармацевтической субстанции с иммуотропным и противомикробным действием были выбраны суммарные извлечения из сырья *Coluria geoides* (Rosaceae), которые:

- стимулируют лимфопролиферативные процессы, фагоцитоз, окислительный взрыв в нейтрофилах сопоставимо с действием препарата сравнения (настойки эхинацеи);
- превосходят настойку эхинацеи по иммуностимулирующему действию (направленному на продукцию провоспалительных цитокинов и синтез иммуноглобулинов) и по иммунокорригирующему действию (направленному на пролиферацию антителообразующих клеток селезенки и синтез иммуноглобулинов).

Для оценки спектра иммуотропного действия *C. geoides* исследовали активность двух суммарных извлечений из сырья растения:

- **С-1 (40 % этанолом)**
- **С-2 (70 % этанолом).**

Распределение животных на группы

Первая
контрольная
группа

Вторая
контрольная
группа

Первая
экспериментальная
группа

Вторая
экспериментальная
группа

Третья
экспериментальная
группа

Введение
физиологического
раствора

Моделирование иммунодефицита (введение циклофосфана)

Введение извлечений
C. geoides (C1 и C2)

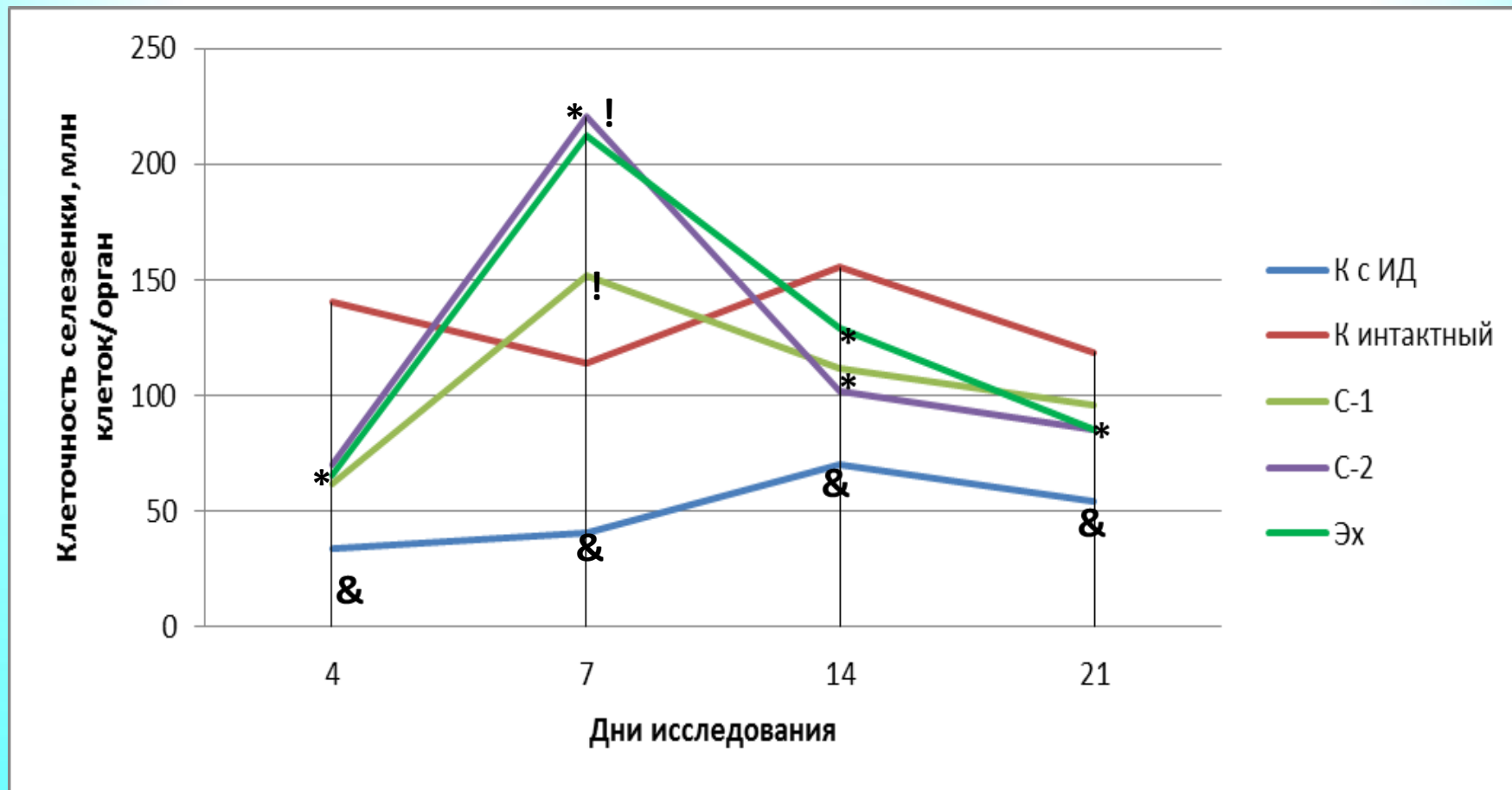
Введение настойки
Echinacea purpurea

Введение эритроцитов барана

Забор материала: селезенки, сыворотки крови, на 4, 7, 14, 21 сутки

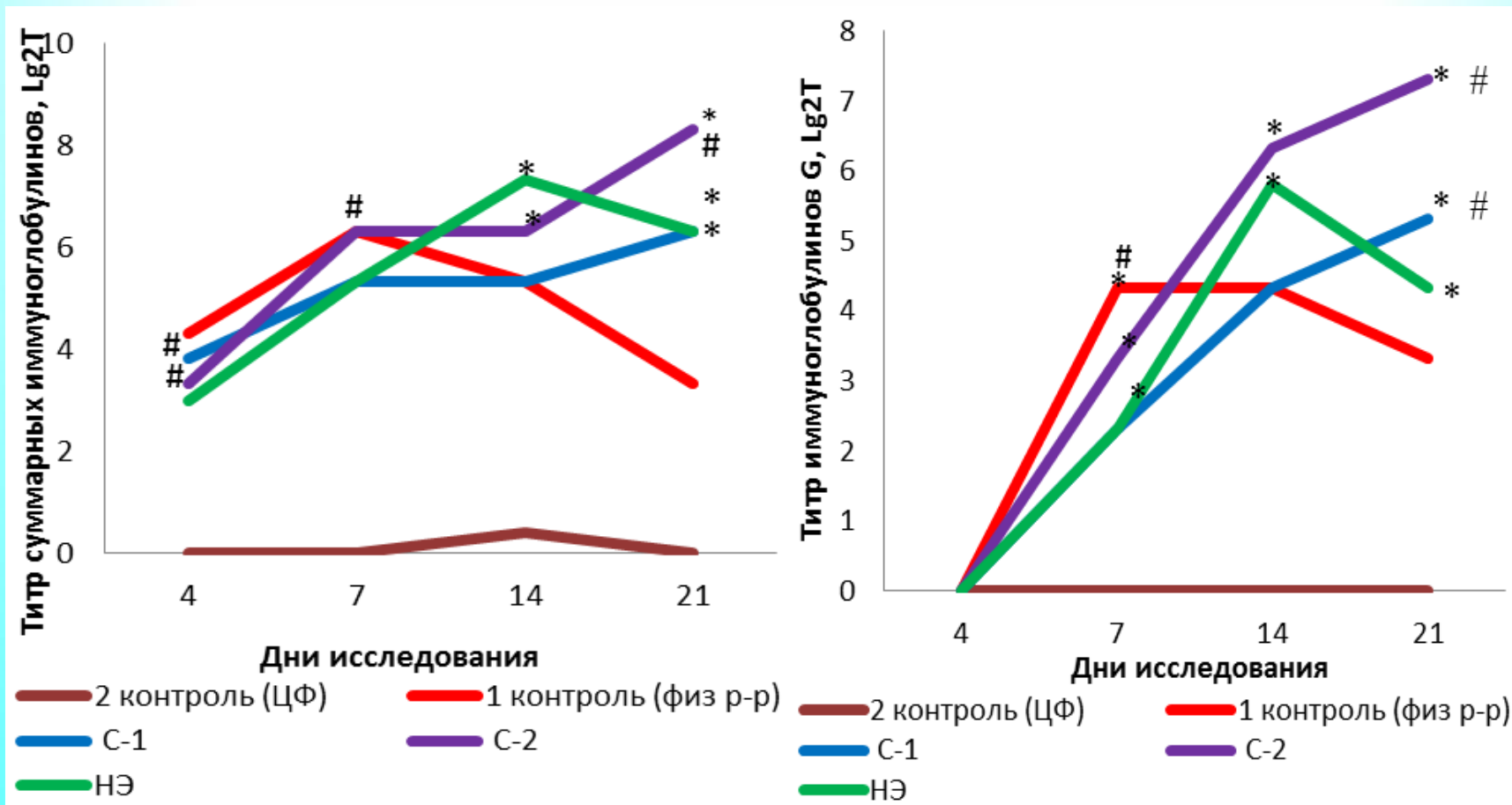
Подсчет числа антителообразующих клеток селезенки, общей клеточности селезенки, титра антиэритроцитарных антител в РПГА

Влияние извлечений *C. geoides* на иммунопролиферативные процессы в селезенке в процессе гуморального иммунного ответа при экспериментальном иммунодефиците (Медиана, n=8-10)



Различие достоверно при $p \leq 0,05$ между показателями: & – 1 и 2 контрольной группы;
 * – экспериментальных и 2-ой контрольной группы;
 # – групп животных, получавших исследуемые извлечения и ЛП сравнения;
 ! – экспериментальных и 1 контрольной группы (без иммунодефицита).

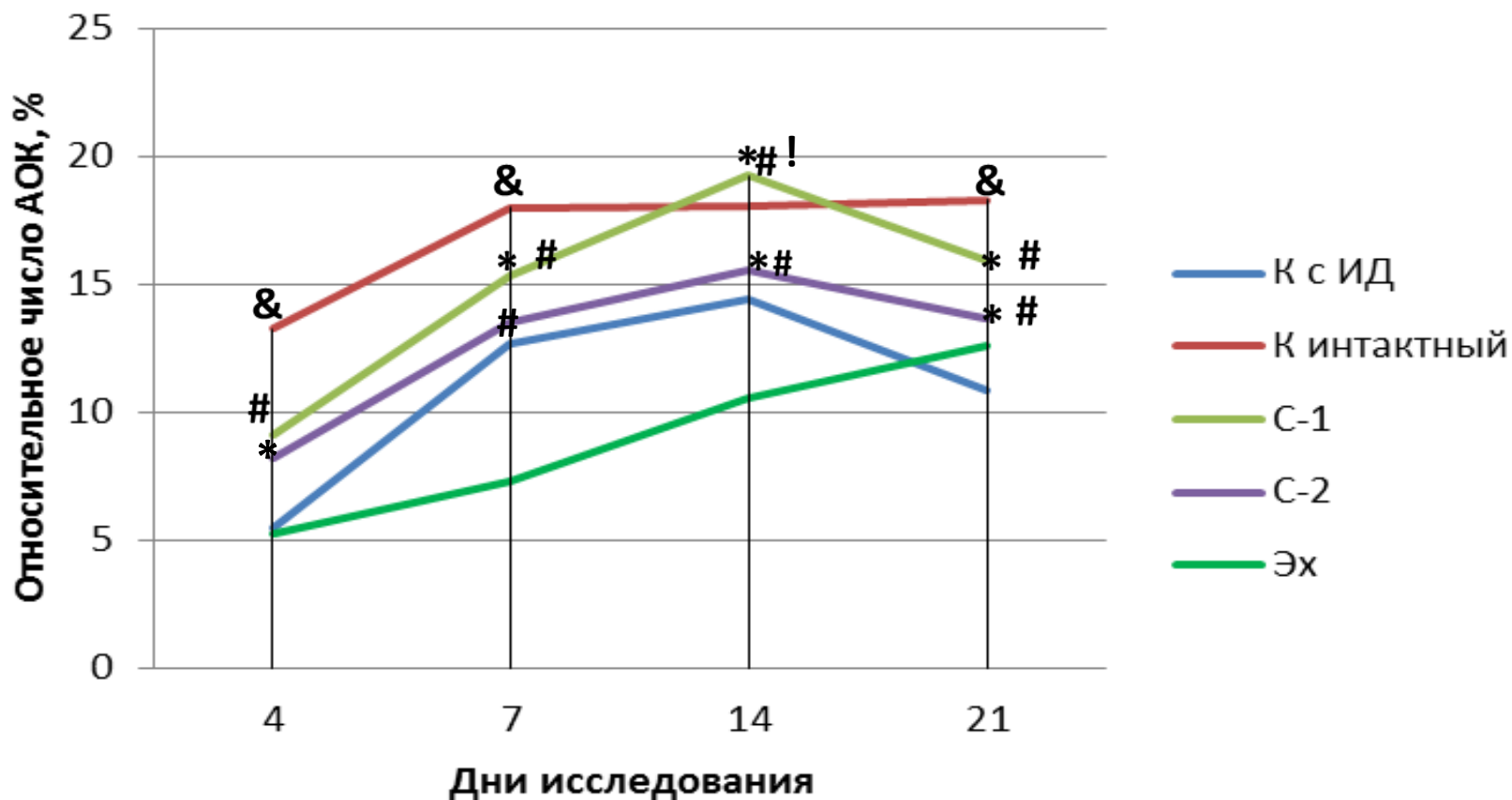
Влияние извлечений *C. geoides* на синтез суммарных иммуноглобулинов к эритроцитам барана в процессе гуморального иммунного при экспериментальном иммунодефиците (Медиана, n=8-10)



* - $p \leq 0,05$ – степень достоверности различия относительно контроля 1,

- $p \leq 0,05$ – степень достоверности различия относительно настойки эхинацеи (НЭ)

Влияние извлечений *C. geoides* на пролиферацию АОК селезенки в процессе гуморального иммунного при экспериментальном иммунодефиците (Медиана, n=8-10)



Различие достоверно при $p \leq 0,05$ между показателями:

& – 1 и 2 контрольной группы;

* – экспериментальных и 2-ой контрольной группы

– групп животных, получавших исследуемые извлечения и ЛП сравнения;

! – экспериментальных и 1 контрольной группы (без иммунодефицита).

**Влияние извлечений *C. geoides* на цитокинпродуцирующую способность лейкоцитов больных хроническим гастритом
(Медиана, 25%÷75%, n=10)**

Условия стимуляции	Уровень продукции интерлейкинов, пкг/мл		
	ИЛ-1 β	ИЛ-2	ИЛ-4
Без стимуляции (контроль)	7,93 (4,23÷17,32)	3,50 (0,61÷13,28)	1,75 (0,77÷13,80)
ФГА	31,85 (16,72÷50,56)*	11,86 (2,54÷22,73)	1,59 (0,32÷13,71)
Настойка эхинацеи	14,95 (8,12÷18,68)	13,19 (3,39÷23,54)	2,89 (0,39÷5,42)
С-1	31,44 (19,54÷45,13)*	12,05 (2,16÷21,19)	5,34 (0,61÷7,77)
С-2	25,70 (9,66÷33,16)*	13,10 (2,37÷25,07)	2,74 (0,09÷5,14)

* - значение достоверно выше контроля при $p \leq 0,05$.

2. Изучение механизма действия извлечений из сырья *Coluria geoides* (Rosaceae)



Возможным механизмом иммунокорригирующего действия фармацевтических субстанций является стимуляция пролиферации иммунокомпетентных клеток , синтеза иммуноглобулинов и провоспалительных цитокинов.

**Влияние извлечений *C. geoides* на цитокин-продуцирующую способность МНК
условно здоровых доноров,
(Медиана, 25%÷75%, n=12)**

Условия стимуляции	Уровень продукции интерлейкинов и ИНФγ, пкг/мл				
	ИЛ-1β	ИЛ-2	ИЛ-4	ИЛ-8	ИНФγ
Без стимуляции	77,12 (60,21÷121,35)	9,22 (5,77÷14,53)	2,00 (0,97÷7,56)	411,28 (150,34÷597,7)	0,00 (0,00÷9,65)
ФГА	257,71 (176,75÷302,43)*	19,73 (12,83÷24,84)*	3,49 (1,31÷8,95)	655,03 (593,23÷770,01)*	14,81 (14,25÷15,36)*
Н-ка эхинацеи	116,27 (76,67÷144,44)	12,10 (9,56÷16,75)	3,84 (1,55÷4,76)	459,34 (283,34÷590,62)	0,00 (0,00÷4,15)
С-1	183,950 (94,575÷239,368)*	20,94 (15,813÷28,760)*	3,87 (1,028÷6,295)	458,67 (271,33÷743,14)	8,25 (5,83÷11,51)
С-2	144,66 (83,36÷222,95)*	14,56 (11,44÷16,46)*	3,29 (1,01÷5,31)	165,64 (72,08÷616,98)	6,69 (5,37÷12,48)

* – значение достоверно выше контроля при $p \leq 0,05$

**Влияние извлечений *C. geoides* на продукцию иммуноглобулинов
(Медиана, 25%÷75%), n=10-12**

Условия стимуляции	Уровень продукции иммуноглобулинов, мг/мл		
	IgM	IgG	IgA
Без стимуляции (контроль)	3,23 (2,77÷3,23)	31,65 (25,69÷34,77)	2,29 (1,66÷3,09)
Митоген лаконоса	3,79 (3,02÷4,31)*	34,42 (29,30÷42,01)	3,06 (2,42÷3,54)
Настойка эхинацеи	3,74 (3,03÷4,14)	31,04 (25,99÷40,89)	2,68 (2,34÷3,27)
С-1	3,91 (3,33÷4,51)*	34,11 (29,24÷44,44)	3,22 (2,85÷3,64)*
С-2	4,17 (3,47÷4,53)*	31,38 (25,31÷36,04)	2,93 (2,22÷3,95)

* - значение достоверно выше контроля при $p \leq 0,05$.

3. Оценка безопасности разработанной фармацевтической субстанции по показателям острой и хронической токсичности



Исследуемую субстанцию Сg вводили животным в дозах:

- 1000, 2000, 4000 и 5000 мг/кг (при исследовании острой токсичности)
- 1000, 2000 мг/кг (при исследовании хронической токсичности).

Падеж животных во всех вариантах эксперимента отсутствовал, LD50 в нашем исследовании определить не удалось.

Субстанция Сg при однократном и длительном пероральном введении в дозе 2000 мг/кг не оказывала общетоксического действия, оцениваемого гематологическим показателям, неврологическому статусу, состоянию вегетативных функций, поведенческой активности, приросту массы тела.

Полученные результаты дают право утверждать, что исследуемый комплекс БАС растительного происхождения не обладает токсическим эффектом при однократном и длительном пероральном введении и относится к классу малотоксичных веществ.

Гематологические показатели аутобредных мышей при оценке острой токсичности субстанции Сg, (Медиана (25%÷75%), n=9-10)

Группа животных	Абсолютное число лейкоцитов, *10 ⁹ /л		Абсолютное число эритроцитов, *10 ¹² /л	
	до введения Сg	в конце эксперимента	до введения Сg	в конце эксперимента
Самки	5,08 (4,53÷7,59)	5,65 (3,86÷7,25)	4,62 (4,44÷7,02)	7,52 (7,03÷8,19)*
Самцы	4,08 (3,31÷5,45)	5,40 (4,46÷6,59)	7,76 (5,05÷8,52)	6,29 (5,48÷7,20)

Примечание – * – различие между показателями до введения извлечения и в конце эксперимента достоверно при $p \leq 0,05$

Гематологические показатели аутобредных мышей при оценке хронической токсичности субстанции Сg (Медиана (25%÷75%), n=10)

Группа животных	Абсолютное число лейкоцитов, *10 ⁹ /л		Абсолютное число эритроцитов, *10 ¹² /л	
	до введения Сg	в конце эксперимента	до введения Сg	в конце эксперимента
Контрольная, самки	5,93	9,95 (8,84÷12,00)#	3,73	7,02 (5,47÷7,60)#
Экспериментальная, самки	(5,08÷6,30)	8,75 (6,70÷9,55)#	(2,10÷4,46)	5,99 (4,06÷7,08)#
Контрольная, самцы	6,78	8,13 (5,90÷8,51)	4,50	6,84 (4,88÷7,43)#
Экспериментальная, самцы	(5,64÷9,98)	8,75 (6,70÷9,55)	(3,63÷4,95)	7,20 (6,44÷8,51)#

Примечание – # – различие достоверно при $p \leq 0,05$ для показателей внутри групп в начале и в конце эксперимента.

Заключение



Разработанная фармацевтическая субстанция, представляющая собой извлечение из корневищ с корнями и травы *C. geoides* (*Rosaceae*) 40 % спиртом этиловым, рекомендуется в качестве основы для создания лекарственных препаратов с иммуностимулирующим, иммунокорригирующим и противомикробным действием.