

ОЦЕНКА ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ И ИНТЕГРАЛЬНЫХ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИНДЕКСОВ НОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ ПРЕПАРАТА ПЕДИФЕН

Стосман К.И.^{1,2}, Кубарская Л.Г.¹, Золотоверхая Е.А.¹, Мелихова М.В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства», 192019, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Бехтерева, д.1

²Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, д. 15/17

Резюме.

Актуальность. Ингаляционные химические поражения – основная причина обращений за медицинской помощью при авариях на промышленных объектах и при техногенных катастрофах. Отравление пульмонотоксикантами сопровождается поражением дыхательных путей, а также может приводить к развитию токсического отека легких. Поиск новых средств антидотной терапии этой патологии является актуальным.

Цель – изучить влияние новой лекарственной формы препарата Педифен для терапии токсического отека легких на иммунологические показатели и интегральные гематологические индексы.

Материалы и методы. Исследование выполнено на 86 мышах самцах линии СВА, 15 морских свинках самцах, 30 беспородных крысах самцах. Изучали влияние препарата Педифен на реакцию гиперчувствительности замедленного типа, продукцию иммуноглобулинов G и M, фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов, определяли массовые коэффициенты тимуса и селезенки. Аллергизирующие свойства оценивали в реакции гиперчувствительности замедленного типа и методом конъюнктивальной пробы. Рассчитывали интегральные гематологические индексы, характеризующие иммунореактивность организма.

Результаты. Показано, что ингаляционное введение препарата Педифен в течение 14 дней мышам в дозе 3,4 мг/кг не повлияло на врожденный и адаптивный иммунитет, на массовые коэффициенты тимуса и селезенки. Доза препарата, равная 10,2 мг/кг, оказала стимулирующее влияние на функциональную активность клеток всех звеньев иммунной системы животных. Общий титр антител, титр IgG, индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа и фагоцитарная активность перитонеальных макрофагов у мышей из

опытной группы и контроля статически достоверно отличались. Гематологические маркеры, характеризующие иммунологическую реактивность, не изменялись после 14 дней введения препарата в дозах 2 мг/кг и 6 мг/кг крысам. Педифен не обладал аллергизирующей активностью.

Заключение. В экспериментах *in vivo* у препарата Педифен показано отсутствие иммунотоксического действия и аллергизирующих свойств. Трехкратное повышение терапевтической дозы приводило к стимуляции функциональной активности клеток адаптивного и врожденного иммунитета.

Ключевые слова: токсический отек легких; иммунотоксическое действие; аллергизирующие свойства; гематологические индексы

EVALUATION OF THE IMMUNOBIOLOGICAL SAFETY AND INTEGRAL HAEMATOLOGICAL INDICES OF A NEW PEDIFEN PHARMACEUTICAL FORM

Stosman K.I.^{1,2}, Kubarskaya L.G.¹, Zolotoverkhaya E.A.¹, Melikhova M.V.¹

¹ *The Federal State-Financed Institution Golikov Research Clinical Center of Toxicology under the Federal Medical Biological Agency, Russia, 192019, St.-Petersburg, st. Bekhtereva, 1*

² *Smorodintsev Research Institute of Influenza, Russian Federation, 197376, Saint-Petersburg, prof. Popov street, 15/17*

Summary.

Inhalation chemical injuries are a major cause of medical treatment in industrial accidents and man-made disasters. Pulmonotoxicant poisoning is manifested by damage to the respiratory tract, and can also lead to the development of toxic pulmonary edema. The search for new antidote therapy for this pathology is relevant.

The aim is to study the effect of a new pharmaceutical form of Pedifen for the treatment of toxic pulmonary edema on immunological parameters and integral hematological indices.

Materials and methods. The study was performed in 86 male CBA mice, 15 male guinea pigs, and 30 male outbred rats. The effect of Pedifen on delayed-type hypersensitivity reaction, of immunoglobulins G and M production, of peritoneal macrophages phagocytic activity were studied, and spleen and thymus weight and their organ to body weight ratio were determined. Allergenicity was assessed in mice and guinea pigs using delayed hypersensitivity reactions and the conjunctival tests. Integral hematological indices characterizing the immunoreactivity were calculated.

Results. It was shown that inhalation of Pedifen to mice at a dose 3.4 mg/kg for 14 days did not affect the innate and adaptive immunity, the organ-to-body weight ratio of thymus and spleen. The dose of the drug, equal to 10.2 mg/kg, had a stimulating effect on the cells functional activity of

the immune system. The total titer of antibodies, IgG titer, delayed hypersensitivity reaction index and phagocytic activity of peritoneal macrophages in mice from the experimental and the control group were significantly different. Hematological markers did not change after 14 days of the drug administration at doses of 2 mg/kg and 6 mg/kg to rats. Pedifen demonstrated no allergenic activity.

Conclusion. Pedifen demonstrated no immunotoxicity and allergenicity. A threefold increase in the therapeutic dose resulted in immune stimulation of the cells functional activity of adaptive and innate immunity.

Keywords: toxic pulmonary edema; immunotoxicity; hypersensitivity reaction; hematological indices

Введение.

Вследствие интенсификации производства постоянно увеличивается выброс загрязняющих веществ в окружающую среду, повышается распространенность и выраженность экологически обусловленной патологии, возрастает риск производственных аварий. Наиболее часто химические аварии случаются на транспорте – 51%, в химической и нефтехимической промышленности – 17,5%, на объектах бытового обслуживания – 15% [1]. Аварии на промышленных объектах и техногенные катастрофы могут сопровождаться выбросом в окружающую среду высокотоксичных пульмонотоксикантов (фосгена, аммиака, диоксида серы, хлора и др.). Лёгкие постоянно подвергаются воздействию различных ксенобиотиков, содержащихся во вдыхаемом воздухе. При высоком уровне воздействия формируется токсический процесс, тяжесть которого колеблется от незначительных транзиторных явлений, например, раздражения, до тяжелых расстройств со стороны органов и систем. Для оказания неотложной помощи при острых патологических процессах используют этиотропные, патогенетические и симптоматические лекарственные средства [2, 3]. Однако ведущая роль в лечении острых отравлений принадлежит антидотам, которые необходимы, прежде всего, в тех случаях, когда помощь должна быть оказана быстро, большому количеству пострадавших и нет возможности сделать это в условиях специализированной клиники [4-6]. В настоящее время антидоты разработаны для ограниченного числа токсикантов, представляющих опасность при массовых отравлениях [4, 5]. Работы по созданию новых антидотов и расширению показаний к применению уже существующих уже несколько десятилетий продолжаются во многих странах [6-9].

В качестве антидотной терапии токсического отека легких в ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России была разработана новая лекарственная форма (раствор для ингаляций) препарата Педифен, зарегистрированного и выпускаемого ФГУП НПЦ

«Фармзащита» ФМБА России. В предварительных экспериментах была доказана ее эффективность на модели токсического отека легких (ТОЛ) при воздействии диоксидом азота (NO_2). Успешное внедрение в практическое здравоохранение новых лекарственных средств является наличие не только их эффективности, но и безопасности.

Цель данной работы явилось изучение влияния новой лекарственной формы препарата Педифен для терапии токсического отека легких на иммунологические показатели и интегральные гематологические индексы.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали раствор для ингаляций лекарственного средства на основе субстанции н-холинолитика Педифен (N,N-диэтил-5,5-дифенил-2-пентиламина гидрохлорид).

Экспериментальное исследование проведено на 3 видах животных: на 86 мышах самцах линии СВА с массой тела 18 – 20 г, 15 морских свинках самцах с массой тела 250-300 г, 30 беспородных крысах самцах с массой тела 160 – 190 г, полученных из НИЦ «Курчатовский институт» – «ПЛЖ» Рапполово. Животные содержались в условиях фотопериода: 12 часов ночь – 12 часов день при искусственном освещении, температуре 20–22⁰ С и влажности 40-60%. Исследование проведено в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. Протокол исследования был одобрен биоэтической комиссией ФГБУ НКЦТ им. С.Н. Голикова ФМБА России.

Животные были разделены на 3 группы: №1 – особи, которым вводили воду для инъекций (плацебо), №2 – особи, которые получали препарат в дозе 3,4 мг/кг (мыши) или 1,3 мг/кг (морские свинки) или 2 мг/кг (крысы), №3 – особи, которые получали препарат в дозе 10,2 мг/кг (мыши) или 3,9 мг/кг (морские свинки) или 6 мг/кг (крысы). Каждая группа содержала по 8 мышей, 5 морских свинок или 10 крыс. В качестве контроля (плацебо) использовали воду для инъекций, которую вводили в эквивалентном объеме. Ингаляцию лекарственного средства и плацебо осуществляли в течение 14 дней с помощью компрессорного ингалятора (небулайзера) OMRON NE – C28 PLUS 0,5 мл/мин (Китай). Объем препарата для его введения животным рассчитывали с учетом потерь, регистрируемых при ингаляции (в легкие при данном пути введения попадает 5–10% лекарственного средства).

Иммунотоксическое действия препарата Педифен оценивали в реакциях гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), гемагглютинации (РГА) в ответ на иммунизацию эритроцитами барана, изучали фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов в присутствии зимозана, также учитывали массовые коэффициенты тимуса и

селезенки [10, 11]. Аллергизирующие свойства изучали в реакции ГЗТ и методом конъюнктивальной пробы [10]. Для сенсibilизации мышей при проведении реакции ГЗТ препарат вводили однократно в основание хвоста в эмульсии с полным адъювантом Фрейнда, а затем через 5 суток в подушечку задней лапы в концентрации 2,5 мг/мл (по активному компоненту).

Гематологический анализ крови крыс проводили на автоматическом анализаторе Advia 2120i (Siemens). По данным лейкограммы для оценки неспецифической иммунологической реактивности был проведен расчет интегральных гематологических индексов: индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ), индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов (ИСНМ), индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов (ИСЛМ), индекс сдвига лимфоцитов в крови (ИСЛК), индекс иммунореактивности (ИИР), равный соотношению суммы лимфоцитов и эозинофилов к моноцитам, индекс аллергизации (ИА), равный соотношению суммы лимфоцитов и эозинофилов к нейтрофилам, базофилам и моноцитам.

Обработка данных была выполнена с использованием пакета статистических программ «GraphPad Prism 7.0» (США). Проверку на нормальность распределения проводили методом Шапиро-Уилка. Отличия между выборками оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни и H-критерия Краскел-Уолиса и считали значимыми при уровне $p < 0,05$. Данные представлены в виде среднего (Mean) и его ошибки ($\pm SE$).

Результаты. Ингаляционное ведение мышам препарата Педифен в дозах 3,4 мг/кг и 10,2 мг/кг в течение 14 дней не привело к изменению величин массовых коэффициентов тимуса и селезенки. Макроскопически форма и величина обоих органов не были изменены, их внутреннее строение и внешний вид соответствовали видовой норме здоровых животных. В минимальной используемой для ингаляции дозе 3,4 мг/кг препарат не оказал влияния на функциональную активность клеток иммунной системы мышей (таблица 1). Статистически значимых отличий в величинах индекса реакции ГЗТ, титров антител, фагоцитарной активности гранулоцитов у опытных и контрольных (плацебо) животных не регистрировалось.

Повышение терапевтической дозы препарата в 3 раза (10,2 мг/кг) привело к статистически значимому увеличению практически всех изучаемых показателей: общего титра антител ($p=0,02$), титра IgG ($p=0,049$), индекса реакции ГЗТ ($p=0,015$) и фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов ($p=0,049$). Так, общий титр антител у животных, получавших максимальную дозу препарата, был больше почти на 35%, титр IgG – на 46%,

индекс реакции ГЗТ – на 30%, фагоцитарная активность – на 20%, чем у животных из группы плацебо.

Таблица 1.

Иммунологические показатели у мышей СВА

Показатели	Экспериментальные группы, n=8		
	№1	№2	№3
Общий титр антител, Log ₂	6,6±0,4	7,0±1,0	8,9±0,6*
Титр IgG, Log ₂	3,5±0,5	4,3±1,0	5,1±0,5*
Титр IgM, Log ₂	3,1±0,2	2,8±0,3	3,8±0,3
Индекс реакции ГЗТ, %	55,2±3,0	58,4±6,0	70,4±4,5*
Фагоцитарная активность, оп.пл.	0,36±0,02	0,39±0,02	0,43±0,04*

* – $p < 0,05$ различия значимы по сравнению с контролем

В качестве маркеров иммунологической реактивности были использованы интегральные гематологические индексы: ИСЛМ, ИСНМ, ИСНЛ, ИСЛК, ИИР. Ингаляционное введение препарата в течение 14 дней не привело к изменению ни одного из анализируемых показателей, которые статистически значимо не отличались у животных из всех экспериментальных групп (таблица 2).

Таблица 2.

Гематологические индексы у крыс

Показатели	Экспериментальные группы, n=10		
	№1	№2	№3
ИСЛМ	24,85±2,82	18,94±2,32	21,14±2,39
ИСНМ	8,23±0,85	7,18±0,70	6,82±0,84
ИСНЛ	0,33±0,03	0,43±0,04	0,34±0,03
ИСЛК	0,35±0,03	0,40±0,04	0,34±0,03
ИИР	25,36±2,89	19,24±2,69	21,54±2,42
ИА	2,67±0,21	2,44±0,21	2,78±0,26

Аллергизирующую активность оценивали по способности препарата влиять на реакцию ГЗТ и в тесте конъюнктивальная проба. Введение разрешающей дозы сенсibilизированным мышам не привело к развитию отека конечности. Индекс реакции ГЗТ у животных из опытных групп и группы плацебо статистически значимо не различались. При проведении конъюнктивальной пробы у сенсibilизированных морских свинок на всех

сроках наблюдения (через 15 минут и через 24 часа после инстилляций лекарственного средства) реакция на введение препарата отсутствовала. Покраснения слезного протока, склеры или конъюнктивы не было зарегистрировано.

Обсуждение. Проведенное нами исследование по оценке иммунологической безопасности новой лекарственной формы (раствора для ингаляций) препарата Педифен, предназначенного для антидотной терапии ТОЛ, на мышах СВА показало, что ее ингаляционное введение в терапевтической дозе в течение 14-ти дней не влияло на врожденный и адаптивный иммунитет, на массовые коэффициенты иммунокомпетентных органов.

В тоже время, у мышей при применении препарата в дозе, превышающей терапевтическую в 3 раза, наблюдалось увеличение функциональной активности иммуноцитов в ответ на иммунизацию Т-зависимым антигеном (эритроцитами барана), а также в присутствии объекта фагоцитирования зимозана (нерастворимого полисахарида клеточной стенки грибов *Saccharomyces cerevisiae*). Похожий эффект был выявлен в экспериментах на самцах мышей-гибридов линии (СВА×С57BL/6)F1 [12]. Введение животным холина альфосцерата (130 мг/кг), атропина (0,13 мг/кг), галантамина (0,65 мг/кг) усиливало антителогенез в течение 28 и более суток, а также приводило к увеличению отека лапы не только на сроках развития ГЗТ, но и спустя 24 часа. Выявленная стимулирующая активность выше перечисленных лекарственных средств может быть объяснена тем, что они, как холинергические препараты, обладают иммуотропной активностью [13].

Холинергическая система играет значительную роль в нейроиммунной коммуникации организма. Она представляет собой совокупность нейронов, секретирующих ацетилхолин (ACh) в качестве трансммиттера, холинергические рецепторы (AChRs), ферменты холинацетилтрансферазу (ChAT) и ацетилхолинэстеразу (AChE). Большинство врожденных и адаптивных иммунных клеток отвечают на входные сигналы нейронов, высвобождая или экспрессируя эти молекулы на своей поверхности. Дисрегуляция этой нейроиммунной коммуникации может привести к ряду воспалительных и аутоиммунных заболеваний [14].

Ацетилхолин (ACh) не только играет роль медиатора в нервно-мышечных синапсах и ЦНС, но и выступает в качестве сигнальной молекулы в не-нейрональных тканях млекопитающих [15]. Иммунные клетки обладают механизмами синтезировать ACh и непосредственно выделять его в кровь [14]. Основными источниками этого нейромедиатора являются Т-, В-лимфоциты и макрофаги фолликулярной и маргинальной зон селезенки [16]. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) экспрессируются в клетках иммунной системы и участвуют в регуляции воспалительных процессов [17]. Молекулярные

механизмы функционирования не-нейрональных nAChR отличаются от таковых для nAChR в нервной системе. Передача сигнала в этом случае может осуществляться посредством активации G-белков, связанных с внутриклеточным доменом рецептора, и других внутриклеточных мессенджеров [18].

В финальной стадии воспалительного рефлекса афферентные нейроны, активируемые продуктами воспаления, приводят к передаче эфферентных сигналов через блуждающий нерв в селезенку, где адренергические нейроны стимулируют Т-лимфоциты, которые секретируют ACh [15]. Учитывая важность холинергической сигнализации в воспалительных процессах, можно предположить, что Педифен модулирует адаптивный и врожденный иммунный ответ, стимулируя Т-, В-лимфоциты и макрофаги.

В данной работе нами был использован ряд гематологических индексов, позволяющих охарактеризовать баланс между лимфоцитами и моноцитами, взаимоотношения аффлекторного и эффекторного звеньев иммунологического процесса (ИСЛМ), лимфокинов и монокинов (ИИР), соотношение клеток специфической и неспецифической защиты (ИСНЛ), гранулоцитов и агранулоцитов (ИСЛК), микрофагально-макрофагальной системы (ИСНМ). Отсутствие статистически значимых изменений всех вышеперечисленных показателей позволило заключить, что препарат Педифен в обеих изученных нами дозах не нарушал иммунологическую реактивность организма.

Холинергические препараты обладают десенсибилизирующим эффектом [19]. В связи с этим при оценке аллегизирующих свойств было ожидаемо, что введение Педифена экспериментальным животным (мышам и морским свинкам) не приведет к развитию гиперчувствительности немедленного и замедленного типа.

Заключение

Результаты, полученные в экспериментах на лабораторных животных, позволяют заключить, что новая лекарственная форма (раствор для ингаляций) препарата Педифен в терапевтической дозе не обладает иммунотоксическим потенциалом. В дозе, превышающей терапевтическую в 3 раза, наблюдается активация функциональной активности клеток адаптивного и врожденного иммунитета. У препарата не выявлены аллегизирующие свойства.

Литература

1. Белых В.Г., Тимошевский В.А. *Медико-санитарное обеспечение населения при ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций химической природы: учебно-методическое пособие для обучающихся по всем направлениям высшего образования*. 2022. Available at: <https://niioz.ru/upload/iblock/8da/8da587613c1db1e7b2af7ddec8a9887f.pdf>
2. Куценко С.А. *Основы токсикологии*. СПб.: Фолиант, 2004. 720 с.
3. Нечипоренко С.П., Баринев В.А., Петров А.Н. Роль антидотов в лечении острых отравлений (прошлое и настоящее). *Токсикологический вестник*. 2011; 6(111): 38–42.
4. Чепур С.В., Юдин М.А., Драчев И.С. и др. Синдромосходные патологические процессы при токсических и радиационных поражениях: оценка механизмов и поиск подходов к фармакологической коррекции. *Военно-медицинский журнал*. 2021; 342 (4): 26-30.
5. Flanagan R.J., Jones A.L. *Antidotes*. London & New York: Taylor and Francis, 2002. 317 p.
6. Lawrence D.T., Kirk M.A. Chemical terrorism attacks: update on antidotes. *Emerg Med Clin N Am*. 2007; 25: 567–595.
7. Гребенюк А.Н., Минаев Д.Ю. Современное состояние антидотной терапии острых отравлений химической этиологии в зарубежных странах. *Военно-медицинский журнал*. 2010; 331(1): 49–52.
8. Назаров В.Б., Гладких В.Д., Бояринцев В.В. и др. Актуальные проблемы формирования резервов средств антидотной терапии для ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайных ситуаций. *Токсикологический вестник*. 2011; 6(111): 33–37.
9. Szinicz L., Worek F., Thiermann H., et al. Development of antidotes: problems and strategies. *Toxicology*. 2007; 233: 23–30.
10. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д. и др. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая*. М.: Гриф и К. 2012. 944 с.
11. Chereshev V.A., Shilov Y.I., Cheresheva M.V., et al. Effect of polyoxidonium on phagocytic cell function. Experimental and clinical estimation of potential inclusion of polyoxidonium in complex therapy in penetrating eye injury. *Russian journal of Immunology*. 2000; 5(1): 40–52.
12. Владыкин А.Л. *Роль холинергической и иммунной систем в регуляции воспаления при анафилактическом и эндотоксическом шоке* / автореф. дис. к.б.н., СПб, 2009.
13. Парахонский А.П., Егорова С.В. Холинергические механизмы регуляции иммунного ответа. *Современные проблемы науки и образования*. 2008; 4. Available at: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=2859>

14. Halder N., Lal G. Cholinergic system and its therapeutic importance in inflammation and autoimmunity. *Frontiers in Immunology*. 2021; 12: 660342 [https://doi: 10.3389/fimmu.2021.660342](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.660342)
15. Шулепко М.А., Бычков М.Л., Кульбацкий Д.С., Люкманова Е.Н. Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы человека. Часть II: не-нейрональная холинергическая система. *Биоорганическая химия*. 2019; 45(3): 227–237. [https://doi: 10.1134/S0132342319020131](https://doi.org/10.1134/S0132342319020131)
16. Papatriantafyllou M. Neuroimmunology: ChAT⁺ B cells. *Nat Rev Immunol*. 2013; 13(2): 70. [https://doi: 10.1038/nri3396](https://doi.org/10.1038/nri3396)
17. Andersson U., Tracey K.J. Neural reflexes in inflammation and immunity. *J Exp Med*. 2012; 209: 1057–1068. [https://doi: 10.1084/jem.20120571](https://doi.org/10.1084/jem.20120571)
18. Corradi J., Bouzat C. Understanding the Bases of Function and Modulation of $\alpha 7$ Nicotinic Receptors: Implications for Drug Discovery. *Mol. Pharmacol*. 2016; 90: 288–299.
19. Нежинская Г.И., Назаров П.Г., Евдокимова Н.Р., и др. Холинергическая регуляция анафилактического шока: влияние С-реактивного белка. *Цитокины и воспаление*. 2004; 3(1): 44–48.