

Российская академия медицинских наук

НАПРАВЛЕННАЯ ИММУНОКОРРЕКЦИЯ: ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

Под редакцией
доктора медицинских наук профессора
М.Т.АБИДОВА

*Приложение 3 к журналу
“Бюллетень экспериментальной биологии и медицины”
за 2000 год*

Москва “Издательство РАМН” 2000

ISBN 5-7901-0020-1

ББК 52.54

H277

ББК 52.54

H277

Направленная иммунокоррекция: проблемы, перспективы / Под ред. докт. мед. наук проф. М.Т.Абидова (Приложение 3 к журналу “Бюллетень экспериментальной биологии и медицины за 2000 г.). М.: Издательство РАМН, 2000. 104 с.

ISBN 5-7901-0020-1

БЮЛЛЕТЕНЬ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

2000

Приложение 3

СОДЕРЖАНИЕ

О новых деталях патогенеза токсико-септических состояний <i>М.Т.Абидов, А.В.Караулов</i>	7
Иммунотропная активность тамерита <i>М.Т.Абидов</i>	11
Роль макрофагов в патогенезе токсического синдрома, вызванного введением эндотоксина. Значение фактора некроза опухоли, оксидов азота и цГМФ-синтетазной реакции <i>М.Т.Абидов, М.В.Нелюбов, А.П.Хохлов, В.П.Фисенко, Л.И.Винницкий, А.Ф.Баштаненко, С.В.Ведищев, А.П.Дрожжин</i>	20
Регуляция метаболической активности клеток крови <i>in vivo</i> и <i>in vitro</i> <i>М.Т.Абидов, А.П.Хохлов, В.П.Фисенко, А.В.Караулов, А.П.Дрожжин, А.В.Чубенко, М.Х.Кушхова, А.П.Петько, Ж.Б.Панежева</i>	22
Изучение антиоксидантной активности тамерита <i>А.П.Хохлов, М.Т.Абидов, А.П.Дрожжин, В.П.Фисенко, Ж.Б.Панежева, А.П.Петько, В.И.Егоров, М.Х.Кушхова</i>	24
Влияние тамерита на секреторную активность макрофагов при экспериментальной сальмонеллезной эндотоксинемии <i>М.Т.Абидов, А.П.Хохлов, А.Ф.Баштаненко, А.П.Дрожжин, В.И.Егоров, А.П.Петько</i>	26
Активность гранулоцитов при экспериментальных эндотоксинемиях <i>Б.С.Нагоев, А.П.Хохлов, М.Х.Турьянов, А.П.Дрожжин, А.П.Петько, В.И.Егоров, С.В.Ведищев, М.В.Нелюбов, М.Т.Абидов</i>	27
Сравнительное изучение эффективности препаратов при экспериментальной сальмонеллезной эндотоксинемии <i>М.Т.Абидов, А.П.Хохлов, А.В.Караулов, Б.С.Ногоев, В.П.Фисенко, А.П.Дрожжин, М.В.Нелюбов, А.Ф.Баштаненко</i>	30
Устранение синдрома интоксикации у животных разных видов под действием тамерита <i>А.П.Хохлов, М.Т.Абидов, С.Г.Пак, А.П.Дрожжин, А.П.Петько, А.Ф.Баштаненко, М.Х.Кушхова</i>	32
Патоморфологические параллели изменений печени при экспериментальной инфекции, вызываемой риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки, на фоне применения иммуномодулятора тамерита <i>М.Т.Абидов, М.Х.Турьянов, М.В.Нелюбов, И.В.Тарасевич, А.В.Караулов, А.П.Милованов, А.П.Петько, А.П.Дрожжин, В.И.Егоров, В.А.Макарова, М.Х.Кушхова</i>	34

Гистоморфологические параллели изменений селезенки при экспериментальной инфекции, вызываемой риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки, на фоне применения иммуномодулятора тамерита <i>М.В. Нелюбов, М.Х. Турьянов, А.П. Дрожжин, И.В. Тарасевич, В.И. Егоров, А.П. Милованов, А.П. Петько, М.Т. Абидов</i>	43
Сравнительная гистоморфологическая характеристика изменений в брюшине при экспериментальном риккетсиозе <i>М.В. Нелюбов, И.В. Тарасевич, А.П. Милованов, А.П. Петько, В.И. Егоров, А.П. Дрожжин, В.А. Макарова, М.Т. Абидов</i>	46
Использование тамерита в коррекции сосудистых нарушений и изменений головного мозга при экспериментальном риккетсиозе <i>М.В. Нелюбов, М.Х. Турьянов, И.В. Тарасевич, А.П. Милованов, А.В. Караулов, А.П. Дрожжин, А.П. Петько, М.Т. Абидов, В.А. Макарова</i>	48
Изменения репродуктивной системы при экспериментальных инфекциях, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки <i>М.В. Нелюбов, М.Х. Турьянов, А.П. Милованов, И.В. Тарасевич, А.П. Дрожжин, А.В. Караулов, В.А. Макарова, М.Т. Абидов</i>	54
Использование тамерита в комплексном лечении гиперпластических процессов эндометрия <i>Н.В. Стрижова, А.П. Дрожжин, М.З. Дугиева, М.М. Сонова, Н.М. Абрамова, А.И. Ибрагимов, А.Н. Кутеко, М.В. Нелюбов, М.Т. Абидов</i>	61
Тамерит как средство коррекции вторичных иммунных нарушений у больных хроническим бронхитом <i>М.Т. Абидов, В.П. Фисенко, С.Х. Хутуева, А.П. Дрожжин, А.П. Петько, Ж.Б. Панежева, А.Х. Хамуков</i>	63
Изучение лечебного эффекта нового лекарственного препарата “тамерит” на модели туберкулезного воспаления в эксперименте <i>М.Т. Абидов, В.П. Фисенко, Г.Б. Соколова, А.В. Караулов, Г.Н. Можожкина, М.В. Нелюбов, А.П. Дрожжин,</i>	65
Туберкулоостатическая активность тамерита <i>М.Т. Абидов, А.П. Дрожжин, Г.Б. Соколова, А.В. Караулов, А.Д. Куничан, С.Х. Хутуева, Н.А. Елистратова, М.В. Нелюбов</i>	69
Опыт местного применения тамерита при лечении гнойных средних отитов <i>Ю.К. Янов, М.Т. Абидов, В.И. Егоров, А.В. Козаренко</i>	71
Тамерит в реабилитации больных, оперированных по поводу рака молочной железы <i>М.Т. Абидов, М.В. Нелюбов, А.Ф. Баштаненко, О.В. Калюжин, В.П. Ланшаков, М.В. Катушев, А.П. Дрожжин, М.М. Кунашева</i>	73
Использование тамерита в терапии доброкачественной гиперплазии предстательной железы <i>А.Ф. Баштаненко, Д.А. Дрожжин, М.В. Нелюбов, А.П. Дрожжин, А.П. Петько, М.М. Кунашева, М.Т. Абидов</i>	75
Использование тамерита в ортопедии <i>А.П. Николаев, А.Ф. Лазарев, А.Н. Минаев, В.И. Ульянов, М.В. Кутушов, А.П. Дрожжин, М.Т. Абидов</i>	77

Влияние иммуномодулятора тамерита на инволюцию матки после кесарева сечения <i>Н.В. Стрижова, М.Т. Абидов, А.П. Дрожжин, Х.З. Асланова, А.С. Гавриленко, И.Б. Балабанова, Н.М. Абрамова</i>	79
Тамерит в комплексной профилактике гнойно-септических заболеваний после операции кесарева сечения <i>Н.В. Стрижова, М.Т. Абидов, Х.З. Асланова, А.С. Гавриленко, А.А. Ибрагимов, М.В. Нелюбов, А.П. Дрожжин, А.А. Чарчоглян, Г.Н. Чувиров, Н.М. Абрамова</i>	80
Некоторые показатели микробицидной системы нейтрофилов у больных кишечными инфекциями <i>Б.С. Нагоев, М.Х. Турьянов, М.В. Нелюбов, А.П. Дрожжин, М.Т. Абидов</i>	83
Использование тамерита для лечения неспецифического язвенного колита <i>М.Т. Абидов, Б.С. Нагоев, А.П. Хохлов, А.П. Дрожжин, А.Х. Хамуков, В.М. Маремкулов, А.Ф. Баштаненко, М.В. Нелюбов, М.В. Кутушов, А.П. Петько</i>	85
Эффективность тамерита в лечении вирусных гепатитов <i>М.Т. Абидов, Б.С. Нагоев, А.П. Дрожжин, М.В. Нелюбов, М.Х. Кушхова, А.П. Петько, С.В. Какунин, А.Х. Хамуков, А.Ф. Баштаненко</i>	87
Тамерит в терапии брюшного тифа у детей <i>Н.Ф. Файзулов, М.Т. Абидов, Н.М. Ходжаева, М.В. Нелюбов, А.П. Петько, М.В. Кутушов, А.Ф. Баштаненко</i>	89
Применение тамерита в терапии тяжёлых форм лептоспероза <i>В.В. Лебедев, М.Х. Турьянов, О.К. Александрова, В.Н. Городин, С.В. Зотов, В.В. Кулагина, М.Т. Абидов</i>	91
Применение 1% мази “Галавтилин” в комплексном лечении рожи <i>Б.С. Нагоев, М.В. Нелюбов, А.П. Дрожжин, М.Ю. Моржохова, С.Н. Киппер, А.П. Петько, М.П. Королев, Ю.А. Спесивцев</i>	93
Фармакотерапевтическая эффективность и переносимость ректальных суппозиторий с тамеритом <i>М.Т. Абидов, А.П. Хохлов, А.П. Дрожжин, А.В. Чубенко, М.В. Кутушов, А.П. Петько, Д.Б. Чогаева</i>	95
Биологическая доступность ректальных суппозиторий с тамеритом <i>А.П. Хохлов, М.Т. Абидов, А.П. Дрожжин, А.В. Чубенко, М.В. Кутушов</i>	97
Стабильность ректальных суппозиторий с тамеритом в процессе длительного хранения <i>М.Т. Абидов, А.П. Хохлов, А.П. Дрожжин, А.В. Чубенко, Д.Б. Чогаева, М.В. Кутушов</i>	99
Технология изготовления и фармакологические характеристики ректальных суппозиторий с тамеритом <i>А.П. Хохлов, А.П. Дрожжин, М.Т. Абидов, А.Х. Хамуков, М.В. Кутушов</i>	100
Методы стандартизации нового препарата “тамерит” <i>М.Т. Абидов, А.П. Дрожжин, Т.Н. Боковикова, В.Л. Багирова, Е.П. Герникова, Л.Н. Буланова, О.А. Ваганова, В.Е. Чичиро</i>	103

О НОВЫХ ДЕТАЛЯХ ПАТОГЕНЕЗА ТОКСИКО-СЕПТИЧЕСКИХ СОСТОЯНИЙ

М.Т.Абидов, А.В.Караулов

НИИ иммунопатологии РАЕН, Москва

Несмотря на успехи теоретической медицины, точки приложения токсинов бактерий при развитии токсико-септического состояния (ТСС) до конца не установлены, и этот вопрос продолжает обсуждаться в научной литературе. Токсины оказывают многогранное воздействие на организм, активируя систему полиморфно-ядерных лейкоцитов (ПЯЛ), кинин-калликреиновую систему, систему простагландинов (ПГ) и др.

Новые методологические подходы на молекулярном уровне в этой области способствовали не только уточнению патогенеза ТСС, но и выдвиганию новых концепций о ведущей роли ПГ и их метаболитов в развитии основных клинических симптомов интоксикации. Под действием токсинов в организме происходит активация фосфолипидов с последующим высвобождением арахидоновой кислоты. Дальнейшая стимуляция токсинами системы простагландинобразования и, в частности, увеличение активности циклооксигеназы приводят к образованию ПГ группы Е и их метаболитов. Другой точкой приложения действия токсинов, согласно данной концепции, являются тромбоциты. Увеличение степени их агрегации и разнонаправленные коагуляционные сдвиги приводят к развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС-синдрома). Лекарственные препараты (в частности, нестероидные противовоспалительные средства), ингибирующие синтез ПГ на разных уровнях, способствуют ослаблению симптомов интоксикации. Несмотря на логичность предложенной гипотезы развития ТСС при микробном заражении, она позволяет обосновать изменения функционального состояния организма только на стадии развернутого инфекционного процесса. Данная гипотеза не учитывает биологическую активность интерлейкина-1 (ИЛ-1), поскольку данный полипептид опосредует не только некоторые виды системного ответа организма на острую фазу воспаления, но и местные изменения воспалительных и иммунных реакций. Локальные эффекты ИЛ-1 выражаются в усилении

воспалительной реакции: на поздних стадиях воспаления он вызывает образование ПГЕ₂ и коллагеназа, увеличивает дегрануляцию клеток, вызывает адгезию лейкоцитов, повышает прокоагулянтную активность поверхностей, способствует выделению фактора активации тромбоцитов, ослабляет действие активатора плазминогена и т.д. Нестероидные противовоспалительные средства не подавляют синтез и выделение ИЛ-1. Более того, сам ИЛ-1 индуцирует выработку ПГЕ₂. По-видимому, на определенном этапе патологического процесса функции ИЛ-1 в целом направлены на усиление попыток организма локализовать и разрешить тканевые повреждения, однако персистирование заболевания приводит к хронической продукции местного ИЛ-1, что впоследствии обуславливает возникновение патологических процессов, сопровождающихся деструкцией органов и тканей и нарушением их функций.

Неизученным аспектом влияния ингибиторов циклооксигеназы в рамках данной гипотезы остается функция нейтрофильных лейкоцитов (НЛ). Получены весомые доказательства важной роли НЛ на начальных этапах острого воспаления. В литературе имеются сведения о возможности фармакологической регуляции функций НЛ. Так, препараты, повышающие уровень цАМФ в НЛ (теофиллин, гистамин, ПГЕ₁, ПГЕ₂, ПГ₁₂, а также адrenomиметики) угнетают различные функции НЛ, включая хемотаксис, антителозависимую цитотоксичность, экзоцитоз и т.д. Исходя из патогенеза острой фазы воспалительного процесса, на наш взгляд, при лечении ТСС целесообразна стимуляция микробицидной активности гранулоцитов, в том числе НЛ.

В последние годы большое внимание уделяется не только кооперативному взаимодействию клеток крови, но и функциональному состоянию интралейкоцитарных компонентов при ТСС. Показано, что под действием микробных эндотоксинов происходит угнетение всех компонентов микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов. Эндоток-

сины, поступающие в кровяное русло, вступают в контакт с ПЯЛ, активируя их биохимические системы. Важнейшим звеном, непосредственно участвующим в формировании гуморального и клеточного иммунных ответов организма при микробной токсемии, являются макрофаги, которые, во-первых, определяют базальный уровень резистентности организма и, во-вторых, опосредуют активность других эффекторов системы иммунитета, в частности, антител и сенсibilизированных лимфоцитов. Будучи “клетками тревоги”, макрофаги вовлекаются в процесс развития интоксикации на раннем этапе ТСС. Показано, что под влиянием эндотоксинов бактерий, особенно грамотрицательных, макрофаги высвобождают фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкины, в частности ИЛ-1, и другие факторы, ответственные за клинические симптомы интоксикации.

Установлено, что ФНО ответственен за уровень микробицидной активности гранулоцитов, продукцию H_2O_2 нейтрофилами, хемотаксис нейтрофилов, адгезию гранулоцитов, образование Т-киллеров, пролиферацию тимоцитов, цитотоксичность клеток, усиление синтеза различных белков острой фазы, продукцию ПГ и т.д. Одновременно этот фактор тормозит активность липопротеинлипазы цитохрома Р-450 и некоторых других ферментов, ответственных за элиминацию токсических факторов. Важнейшим эффектом ФНО является повреждение эндотелия капилляров с последующим нарушением процессов микроциркуляции в тканях.

Таким образом, ФНО, в избыточном количестве вырабатываемый макрофагами под действием токсинов, оказывает бифункциональное воздействие на течение патологического процесса. С одной стороны, в небольших количествах он усиливает функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов и макрофагов, являясь важнейшим адаптационным агентом, повышающим резистентность организма к инфекциям. С другой стороны, в избыточном количестве ФНО нарушает липидный и энергетический обмен в тканях, вызывает микроциркуляторные расстройства в области воспаления и оказывает прямое цитотоксическое действие на клетки.

Другой важнейший показатель гиперактивности макрофагов — увеличение выработки NO , который снижает тонус сосудов, запускает цГМФ-синтезную систему, меняя соотношение в тканях двух важнейших систем — цАМФ и цГМФ, обеспечивающих функциональную стабильность клетки, инактивирует систему цитохромов клетки, снижая таким образом ее энергетический потенциал за счет нарушения образования АТФ.

Итак, можно сделать вывод, что основные клинические симптомы ТСС обусловлены избыточным высвобождением высокоагрессивных соединений гиперактивированными макрофагами на начальных этапах воспалительного процесса. Для устранения симптомов патологического процесса целесообразно снизить уровень этих соединений. Однако классические препараты, ингибирующие активность макрофагов, например, препараты золота, не имеет смысла использовать для снятия симптомов острой интоксикации из-за отсроченного эффекта. Подобная терапия целесообразна и широко применяется при аутоиммунных заболеваниях, однако при острых воспалительных процессах такой подход неприемлем.

За последние годы в медицинскую практику внедрен ряд эффективных иммуномодуляторов, таких как имунофан, полиоксидоний и др. В механизме их действия ведущая роль принадлежит модуляции почти всех звеньев иммунного ответа. Однако научные данные, полученные при изучении патогенеза воспаления и изменений иммунного гомеостаза на различных стадиях патологического процесса, свидетельствуют о необходимости разработки терапевтических подходов и, соответственно, создания лекарственных средств, позволяющих проводить иммунокоррекцию на отдельных стадиях развития воспалительного процесса, воздействуя на отдельные звенья иммунной системы, т.е. проводить направленную иммунокоррекцию.

При изучении влияния производных аминокислот на функцию фагоцитарной системы организма нами обнаружено бифункциональное действие на макрофагально-гранулоцитарное звено иммунитета производных группы аминокислоты тамерит. Это позволило нам разработать препарат нового поколения — тамерит (название утверждено номенклатурной комиссией Фармакологического государственного комитета), предназначенный для лечения ТСС. Препарат временно подавляет выработку макрофагами ФНО, ИЛ-1 и других факторов, ответственных за продукцию белков острой фазы воспаления, предотвращая развитие патологического процесса. При этом он ингибирует активность только гиперактивированных макрофагов, не влияя на резидентные. В результате разрывается патогенетическая цепь токсического воспаления на первом уровне кооперативного процесса и передачи информации от гиперактивированных макрофагов другим клеткам иммунной системы. Кроме того, тамерит значительно усиливает микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов и естественных киллеров, ускоряя таким образом естественную элиминацию из организма как самих микроорганизмов и продуктов

их метаболизма, так и циркулирующих иммунных комплексов. Тамерит препятствует также образованию гранул в стенках сосудов, что предотвращает нарушение микроциркуляции в органах и тканях.

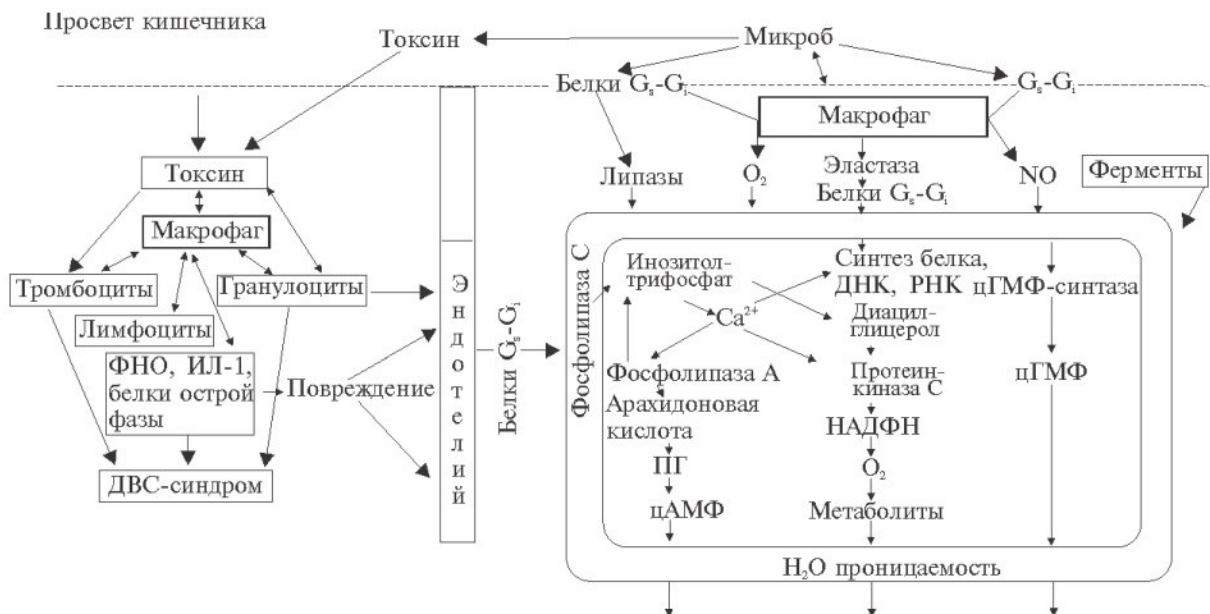
Патогенез ТСС можно схематически представить следующим образом (рисунок). Например, при энтеральном заражении микробы, пройдя через эпителий кишечника и внедрившись в местные макрофаги, проникают дальше, распространяясь по лимфатическим путям в кровяное русло. При этом возникают очаговые поражения пейеровых бляшек, лимфатических узлов брыжейки, в которых микробы либо погибают, либо размножаются, вызывая местное воспаление. И в том, и в другом случае это способствует миграции НЛ в зону воспаления. Взаимодействие между патогенными микроорганизмами и ПЯЛ обычно заканчивается гибелью первых или вторых. Фагоцитированные микробы выделяют эндотоксины, вызывающие повторную стимуляцию лейкоцитов, т.е. стимулируют цепь биохимических процессов, ведущих к накоплению супероксидных анион-радикалов, высвобождению лизосомальных ферментов и инициированию активности арахидоновой кислоты.

Мишенью для липополисахаридного комплекса и реакционно-активных метаболитов кислорода являются клетки крови. Вполне вероятно, что продукты ПОЛ, обнаруживаемые в плазме крови, являются следствием нарушения связей между белками и фосфолипидами в результате быстрого

окисления липидов. В поврежденную мембрану устремляются высокорекреационные метаболиты НЛ и эндотоксины лизированных микробов, вызывающие функциональные нарушения клеток. Процесс принимает каскадный характер, течение патологического процесса становится затяжным.

Можно предположить, что, например, первичное повреждение эндотелиоцитов тонкой кишки при острых инфекциях вызывают не столько эндотоксины грамотрицательных бактерий, сколько вторичные метаболиты O_2 и ферменты лизосом гранулоцитов. На основании полученных данных можно предположить, что инкубационный период и степень тяжести в остром периоде зависят не столько от концентрации в организме эндотоксина, сколько от активности и количества клеток крови в очаге воспаления.

От способности мононуклеарных фагоцитов влиять на патогенез воспаления зависит исход патологического процесса — его разрешение или прогрессирование. Многогранное участие макрофагов в поддержании резистентности организма и в воспалительном процессе требует от них, наряду с другими функциями, высокоактивной секреции медиаторов, участвующих в формировании иммунного ответа. Выделение подобных медиаторов происходит не одновременно: они секретируются по мере выполнения тех функций, которые необходимы макрофагам на данной стадии воспалительного процесса, т.е. выделяются лишь при воздействии на макрофаги воспалительных стимулов или



Роль клеток в возникновении токсического синдрома при острой кишечной инфекции.

продуктов иммунных реакций. Если подавить секреторную активность макрофагов на начальных этапах воспалительного процесса, снизится синтез ФНО, ИЛ-1, белков острой фазы и других медиаторов воспаления. Таким образом, появляется возможность разорвать патогенетическую цепочку формирования ТСС.

Итак, в развитии ТСС можно выделить 4 фазы. Первая — активация макрофагов и гранулоцитов под действием микробных эндотоксинов и выработка активированными клетками биологически активных соединений и хемоаттрактантов, что определяет массивную миграцию в очаг воспаления лейкоцитов, несущих многочисленные цитотоксические факторы. Дальнейшая гиперстимуляция макрофагов способствует быстрому нарастанию деструктивного потенциала клетки. Для купирования или ослабления симптомов данной фазы воспаления целесообразно, на наш взгляд, использование иммунокорректоров, целенаправленно воздействующих на определенные звенья иммунного ответа. Разработанный новый отечественный оригинальный препарат тамерит позволяет селективно дозозависимо ингибировать активность гиперчувствительных (сенсibilизированных) макрофагов, одновременно повышая микробцидную активность гранулоцитов. Результаты доклинических исследований и клинических испытаний тамерита подтверждают возможность избирательной иммунокоррекции на ранних стадиях воспалительного процесса.

Вторая фаза воспаления — повреждение мембран клеток медиаторами воспаления, инициация активности ПЯЛ, каскада арахидоновой кислоты, высвобождение ПГ, цито- и лимфокинов, других биологически активных соединений, способствующих развитию микроциркуляторных, биохимических, обменных нарушений в органах и тканях. На данном этапе воспалительного процесса

необходимо использование ингибиторов биосинтеза ПГ (нестероидных противовоспалительных средств), протеаз, антиоксидантов.

Третья фаза — выраженное угнетение всех систем неспецифической и специфической защиты организма, недостаточность функциональных систем, микроциркуляторные и циркуляторные нарушения, гипоксия тканей и развитие ДВС-синдрома. Коррекция этих нарушений гемостаза требует многоплановой симптоматической медикаментозной терапии.

Четвертая фаза — шок (токсический, инфекционно-токсический, токсико-септический). Для купирования симптомов этой фазы необходим широкий спектр противошоковых мероприятий и лекарственных средств, в том числе антиоксидантов, антипротеазных, антигипоксических, антигистаминных средств, а также препаратов, влияющих на функцию сердечно-сосудистой и дыхательной систем, печени и почек.

Использование тамерита, бифункционального иммунокорректора, на ранних стадиях воспалительного процесса, в том числе ТСС, не только открывает перспективы создания новых лекарственных средств направленного действия, но и позволяет получить сведения, уточняющие патогенез воспалительного процесса, а также разработать фармакотерапевтические подходы к купированию патологического процесса на разных стадиях его развития.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беклемишев Н.Д. Иммунология иммунореакций. - М., 1982. - С. 90-91.
2. Маянский А.Н. Очерки о нейтрофиле и макрофаге. - Новосибирск, 1983.
3. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногенетика и искусственные антигены. - М., 1983.

ИММУНОТРОПНАЯ АКТИВНОСТЬ ТАМЕРИТА

М.Т.Абидов

НИИ иммунопатологии, Москва

В настоящее время большое внимание уделяется созданию иммулотропных препаратов и разработке методов направленной иммунокоррекции. Иммуные реакции лежат в основе огромного числа биологических процессов. Различные компоненты системы иммунитета участвуют в реакциях организма на внедрение чужеродных агентов и повреждение тканей, в репаративных процессах, предотвращении опухолевого роста и элиминации трансформированных клеток, в кроветворении. При этом действие иммунокомпетентных клеток может быть направлено на защиту организма от внешних и внутренних патогенных факторов и в то же время являться ключевым звеном развития некоторых заболеваний.

При изучении патогенеза различных по этиологии инфекционных воспалительных заболеваний выявлены некоторые наиболее общие и обязательные звенья развития воспалительных реакций. Первыми клеточными элементами, которые сталкиваются с инфекционным агентом после его проникновения через эпителий слизистых и кожных покровов, являются макрофаги. Именно от их дальнейшего "поведения" зависят выраженность и характер ответных реакций организма на внедрение возбудителя.

Избыточная активность моноцитов/макрофагов приводит к выбросу большого количества провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли (ФНО), интерлейкин-1 (ИЛ-1), ИЛ-6, а также нитросоединений, простагландинов и реакционноспособных радикалов. Эти вещества дают пара- и эндокринные эффекты, вызывая местные и общие воспалительные реакции.

Вовлечение в патологический процесс клеток моноцитарно-макрофагального ряда с последующей активацией выработки ими целого комплекса биологически активных веществ, усугубляющих клеточные и сосудистые нарушения, представляет собой одно из наиболее универсальных звеньев развития воспаления. Поэтому логичной стратегией в патогенетической терапии воспалительных заболеваний вне зависимости от этиологии представляется воздействие на это ключевое звено с це-

лю обратимого подавления избыточной активности моноцитов/макрофагов в острый период болезни.

В результате скрининга нескольких групп химических веществ, изменяющих функциональную активность макрофагов, нами обнаружено, что одними из наиболее биологически активных в отношении регуляции функции моноцитов/макрофагов являются аминоталгидрозиды. Дальнейший поиск высокоактивных веществ из этой химической группы привел к созданию препарата галавит, представляющего собой 5-аминофталгидрозид и обладающего выраженными противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами.

Действие галавита обратимо и вызывает кратковременное (на 6-8 ч) снижение избыточной активности макрофагов. Стойкой супрессии функции макрофагов в результате применения галавита не отмечается. Более того, в случае исходного угнетения активности клеток моноцитарно-макрофагального ряда галавит способен восстанавливать их цитокинпродуцирующую и антигенпрезентирующую функцию. Таким образом, галавит по своей биологической активности является не супрессором макрофагов, а модулятором, или регулятором, их функции, и направленность его действия определяется исходным состоянием клеток-мишеней, а также дозой и режимом введения препарата.

Эффективность галавита при инфекционных заболеваниях также связана с его способностью активировать микробицидную систему нейтрофильных гранулоцитов и фагоцитоз чужеродных агентов.

Комбинация в одном препарате двух высокоактивных аминоталгидрозидов привела к созданию другого лекарственного средства из этой химической группы — тамерита (утвержден Госфармкомитетом 03.04.2000, регистрационное удостоверение № 2000/113/5). Важным качеством тамерита, отличающим его от галавита, является более выраженное и продолжительное биологическое действие (10-12 ч).

Как и другие биологически активные аминифталгидрозида, тамерит обладает противовоспалительными, иммуномодулирующими и антиоксидантными свойствами. Его основные фармакологические эффекты обусловлены способностью воздействовать на функционально-метаболическую активность макрофагов и нейтрофильных гранулоцитов.

Противовоспалительное действие препарата обусловлено его способностью обратимо ингибировать избыточную продукцию гиперактивированными макрофагами ФНО, ИЛ-1, ИЛ-6, нитросоединений, активных форм кислорода и других провоспалительных факторов. Антиоксидантное действие реализуется за счет уменьшения потребления кислорода гиперактивированными макрофагами с последующим снижением генерации кислородных радикалов.

Имуномодулирующие свойства проявляются в восстановлении нормальной антигенпрезентирующей и секреторной функции клеток моноцитарно-макрофагального ряда, стимуляции микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов и цитотоксической активности естественных киллеров, иммунокорригирующем действии в отношении клеточного и гуморального иммунитета. В результате препарат повышает резистентность организма к инфекционным заболеваниям и опухолевому росту.

Обнаружена способность тамерита стимулировать репарацию тканей, активировать рост грануляций и эпителия, ускорять очищение и эпителизацию инфицированных ран, заживление язвенных дефектов кожи и слизистых.

При сосудистых нарушениях препарат стимулирует синтез нитросоединений, снижая тем самым тонус сосудов.

Кроме того, было продемонстрировано умеренное бактериостатическое действие тамерита в отношении ряда возбудителей, в том числе *M. tuberculosis*.

Использование комбинации легкорастворимой натриевой соли 5-аминофталгидрозида и гидрофобного 5-аминофталгидрозида в соотношениях 1:1 и 1:0.5 продлевает терапевтический эффект препарата.

Результаты изучения общетоксических свойств тамерита на мышах, крысах, собаках свидетельствуют о его малотоксичности (IV класс токсичности). Препарат не оказывает токсического воздействия на организм животных при длительном введении в дозах, превышающих рекомендуемые в клинике в 10–15 раз.

В ходе доклинических испытаний показано, что в терапевтических дозах тамерит не обладает

мутагенностью в тесте Эймса, не вызывает хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих, доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей и не повреждает ДНК. Препарат также не обладает тератогенными свойствами и не влияет на репродуктивную функцию и постнатальное развитие потомства. Продемонстрировано отсутствие у тамерита аллергизирующих и иммунотоксических свойств.

Поскольку противовоспалительные свойства тамерита обусловлены воздействием на моноциты/макрофаги, представляющие собой ключевое звено иммунной системы, мы изучили иммунотропную активность препарата.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования проведены в основном в соответствии с методическими рекомендациями по изучению иммунотропной активности фармакологических препаратов, одобренными Госфармкомитетом МЗ РФ (протокол № 10 от 10.12.98). Дополнительно изучали влияние препарата на экспрессию некоторых рецепторов на поверхности иммунокомпетентных клеток, его способность изменять количество нейтрофилов в периферической крови экспериментальных животных, а также оценивали потенциальную возможность усиливать противопухольный иммунный ответ и повышать эффективность химиотерапии опухолей с помощью тамерита.

Клеточные культуры поддерживали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂ в среде RPMI - 1640 ("Flow Lab.") с добавлением 5% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки ("Flow Lab."), 2 мМ L-глутамин, 5×10⁻⁵ М 2-меркаптоэтанол ("Serva"), 10 мМ буфера HEPES ("Flow Lab.") и 50 мкг/мл гентамицина.

В опытах *in vitro* были использованы лимфоциты и сегментоядерные лейкоциты периферической венозной крови взрослых доноров в возрасте 25–40 лет (*n*=5), а также спленоциты и клетки перитонеального экссудата мышей линий BALB/c и C57Bl/6 (питомник "Столбовая" РАМН).

Влияние препарата на лейкоцитарную формулу изучали *in vivo* на годовалых кроликах-самцах породы "шиншилла" (питомник "Столбовая" РАМН). Доза препарата составляла 2 мг/кг массы животного.

Лимфоциты получали из гепаринизированной периферической венозной крови взрослых доноров с помощью градиента плотности фикоколл-верографин по общепринятой методике [12]. Интерфазные клетки отмывали 3 раза холодной средой 199 и доводили до концентрации 10⁶ кле-

ток/мл. Количество живых клеток составляло не менее 95%. Живые и мертвые клетки определяли с помощью окраски акридиновым оранжевым и этидиумом бромидом, после чего тестировали в люминесцентном микроскопе “ЛЮМАМ-Р-3” [5]. Т-лимфоциты человека определяли методом [13], В-лимфоциты человека определяли как клетки, имеющие на своей поверхности рецепторы к третьему компоненту комплемента (ЕАС-РОК), по методу [10]. Розеткообразующие клетки обнаруживали с помощью люминесцентного микроскопа с использованием смеси акридинового оранжевого и этидиума бромида [5]. Большинство реагентов получали самостоятельно.

Реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТ) ставили по методу [6]. При постановке РБТ в лунки 96-луночного плоскодонного планшета (“Nunc”) вносили по 5×10^5 лимфоидных клеток и инкубировали в течение 65 ч. В качестве неспецифических митогенных препаратов использовали конканавалин А (Кон А) в дозе 2 мкг/мл (“Fag-macia”) и липополисахарид (ЛПС) *E. coli* 0III:B4 в дозе 100 мкг/мл (“Difco”).

Цитотоксическую активность лимфоцитов как показатель активности естественных киллеров (ЕК) определяли по методу [9], используя в качестве мишеней клетки эритролейкемии человека линии K562. Реакцию фагоцитоза нейтрофильных лейкоцитов с частицами латекса ставили по методике [6]. Клетки периферической крови высушивали, фиксировали метанолом, окрашивали по Романовскому—Гимзе [8]. Лейкоцитарную формулу подсчитывали общепринятым методом [4], используя в качестве контрольных показателей данные литературы [2].

В модельных тест-системах по изучению влияния тамерита на гуморальное и клеточное звенья иммунитета *in vivo* использовали 6-8-недельных мышей линий СВА и С57В1/6 (питомник “Столбовая” РАМН). Действие препарата на образование антител к эритроцитам барана исследовали по методу [7]. Для этого мышам внутрибрюшинно вводили по 10^7 эритроцитов в 0,5 мл физиологического раствора. Тамерит вводили однократно внутримышечно в дозах 0,2, 2, 20, 200 и 2000 мкг/мышь в 100 мкл 0,9% NaCl одновременно с эритроцитами барана либо на 5-е сутки после их введения. Мыши контрольных групп получали внутримышечно по 100 мкл 0,9% NaCl. Титр антител (гемагглютининов) определяли на 7, 14 и 21-е сутки после иммунизации.

Влияние препарата на клеточное звено иммунитета определяли в реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана, вводимым мышам подкожно в дозе 10^6 кле-

ток в 0,5 мл 0,9% NaCl. Тамерит вводили внутримышечно в дозах 2, 20, 200 мкг/мышь. На 5-е сутки всем мышам в подушечку правой задней лапы вводили 10^8 эритроцитов барана в 0,02 мл физраствора, в левую заднюю лапу — эквивалентное количество 0,9% NaCl. Местную воспалительную реакцию оценивали через 18 ч путем определения массы опытной и контрольной лап и вычисления индекса реакции.

В качестве клеток-продуцентов ИЛ-1 и ФНО использовали спленоциты и активированные пептоном перитонеальные макрофаги мышей линии С57В1/6 [14]. По 1 мл суспензии спленоцитов или индуцированных пептоном клеток перитонеального экссудата вносили в лунки 24-луночного плоскодонного планшета (“Linbro”). Через 2 ч инкубации из лунок с клетками перитонеального экссудата удаляли неприлипающие клетки трехкратным промыванием теплой средой RPMI-1640 и добавляли по 2 мл культуральной среды, содержащей тамерит в концентрациях 0,1, 1, 10 и 100 мкг/мл. В лунки со спленоцитами добавляли по 1 мл раствора тамерита в тех же конечных концентрациях сразу после внесения клеточной суспензии. Тамерит растворяли в культуральной среде непосредственно перед использованием. Через 24 ч инкубации из лунок собирали супернатанты и тестировали их на содержание ИЛ-1, используя тимоциты мышей линии С57В1/6 как индикаторные клетки по методу [15], и ФНО в цитотоксическом тесте с ФНО-чувствительными трансформированными фибробластами L929 по методу [11].

Для оценки стимуляции неспецифической резистентности тамерит вводили внутрибрюшинно мышам линии С57В1/6 в дозах 0,2, 2, 20, 200 и 2000 мкг/мышь за 2 ч до заражения *S. typhi* и *E. coli* в ЛД₁₀₀. Способность препарата стимулировать противоопухолевый иммунный ответ и потенцировать действие цитостатиков изучали на моделях меланомы В16 и карциномы Льюиса у 2-4-месячных мышей-самцов линии С57В1/6 (Центральный питомник экспериментальных животных, отделение “Крюково”).

Меланому В16 перевивали путем подкожной инъекции 2×10^5 жизнеспособных опухолевых клеток в пяточку задней лапы мыши. Лечение тамеритом начинали на следующий день после инокуляции опухоли. Препарат вводили внутримышечно по 50 мкг в 50 мкл воды для инъекций, растворяя непосредственно перед использованием, каждый день или 1 раз в 3 дня в течение 4 нед. Мышам контрольных групп внутримышечно вводили 50 мкл воды. Животных опытных и контрольных групп забивали на 28-е сутки экспери-

мента, выделяли легкие и тщательно подсчитывали макроскопические метастазы меланомы.

Суспензию опухолевых клеток легочной карциномы Льюиса в концентрации $1.5-2.0 \times 10^6$ в 0.05 мл среды 199 перевивали внутримышечно в область голени. Через 21 сут после инокуляции общепринятыми методами определяли объем первичного очага опухоли, подсчитывали количество метастазов на поверхности легких; в отдельной серии опытов оценивали влияние изучаемого препарата на среднюю продолжительность жизни мышей с карциномой Льюиса.

Тамерит и циклофосфан вводили 2 раза в неделю, начиная со 2-х суток после перевивки опухолевых клеток (5 инъекций в серии опытов по оценке показателей опухолевого роста и метастазирования, 8 инъекций в серии опытов по оценке продолжительности жизни мышей-опухолоносителей). Циклофосфан вводили внутривентрально в дозе 25 мг/кг, тамерит — внутримышечно в дозах 50 или 500 мкг/мышь. Животным контрольной группы вводили 0.9% NaCl.

Для определения влияния тамерита на продукцию ИЛ-2 в качестве тест-системы использовали Кон А-бласты. Спленоциты мышей линии BALB/c стимулировали тамеритом в течение 40 ч, после чего определяли активность ИЛ-2 в культуральном супернатанте. Для получения Кон А-бластов спленоциты мышей линии C57Bl/6 стимулировали в течение 3-4 сут Кон А. Культивирование осуществляли в пластиковых флаконах ("Nunc"), в которые вносили 5 мл клеточной суспензии (5×10^7 клеток), содержащей 2 мкг/мл Кон А. По окончании инкубации клетки отмывали от митогена и вносили в лунку 96-луночного планшета по 4×10^4 клеток на лунку и добавляли тестируемый супернатант и 0.1 М α -метилманозид (для блокирования активности оставшегося Кон А). Культуру Кон А-бластов инкубировали в течение 24 ч. О содержании ИЛ-2 судили по пролиферации Кон А-бластов (включению меченого тимидина).

Достоверность различий оценивали с помощью *t* критерия Стьюдента [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние тамерита на клеточное звено иммунитета

Тамерит усиливал экспрессию высокоафинных рецепторов к эритроцитам барана на лимфоцитах человека. После предварительного инкубирования лимфоцитов с тамеритом в дозах 1 и 10 мкг на 10^6 лимфоцитов в течение 1 ч при 37°C количество А-РОК увеличивалось до $51.4 \pm 4.0\%$ против $30 \pm 5\%$

в контроле ($p < 0.05$). В дозе 100 мкг/ 10^6 клеток препарат угнетал процесс розеткообразования: количество А-РОК составило $8.4 \pm 1.5\%$ ($p < 0.05$). В этой же концентрации он блокировал процесс образования "поздних" розеток между лимфоцитами человека и эритроцитами барана, что отражает суммарную популяцию Т-лимфоцитов человека. Так, количество Е-РОК составило в контроле $60.5 \pm 6.4\%$, в опыте — $36.7 \pm 4.8\%$ ($p < 0.05$). Учитывая данные литературы о механизме розеткообразования между лимфоцитами человека и эритроцитами барана, можно предположить активное действие препарата в вышеуказанных дозах на сложную систему аденилатциклазы.

В дозах 25, 50 и 100 мкг на 10^6 лимфоцитов препарат достоверно увеличивал число ЕАС-РОК: в контроле оно составило $8.3 \pm 1.1\%$, в опыте — $14.6 \pm 1.3\%$ ($p < 0.05$). В дозах 1-10 мкг/ 10^6 лимфоцитов тамерит существенно не влиял на экспрессию этого вида рецепторов. В дозах 1-100 мкг/ 10^5 лимфоцитов (препарат находился в лунке — 16 ч) тамерит не влиял на цитотоксичность, опосредованную ЕК: индекс цитотоксичности в контроле составил $37.5 \pm 4.7\%$, в опыте — $38.3 \pm 5.4\%$ ($p > 0.05$).

В дозах 1-10 мкг/ 10^5 лимфоцитов тамерит заметно стимулировал спонтанную пролиферацию лимфоидных клеток (табл. 1). В этих же концентрациях препарат стимулировал и ЛПС-индуцированную пролиферацию. В высоких концентрациях (500 мкг/ 10^5 клеток) тамерит препятствовал спонтанной и митогенстимулированной пролиферации клеток. Во всех испытанных дозах препарат снижал Кон А-индуцированную пролиферацию (табл. 1).

Стимуляция клеточной пролиферации в низких концентрациях связана, по-видимому, со способностью тамерита активировать продукцию ИЛ-2. В дозах 25 и 50 мкг/мл тамерит стимулировал пролиферацию Кон А-бластов (табл. 1), а супернатанты спленоцитов, культивированных с тамеритом в концентрации 50 мкг/мл, проявляли выраженную ИЛ-2-подобную активность (табл. 2), причем тамерит индуцировал продукцию ИЛ-2 спленоцитами сильнее, чем Кон А.

После внутривенного введения тамерита (2 мг/кг) в течение 1-го часа в периферической крови наблюдалось достоверное уменьшение количества лейкоцитов за счет снижения числа сегментоядерных нейтрофилов, которое возвращалось к норме в течение последующих 3 ч (табл. 3). Процентное содержание лимфоцитов при этом оставалось в пределах нормы.

В дозах 1-10 мкг/ 10^7 сегментоядерных нейтрофилов тамерит заметно увеличивал количество

Таблица 1. Влияние тамерита на пролиферацию лимфоидных клеток и Кон А-бластов ($M \pm m$)

Показатель	Контроль (без тамерита)	Тамерит, мкг/мл					
		1	10	25	50	100	500
Пролиферация лимфоидных клеток спонтанная	828±83	1449±308	1230±56	—	—	942±208	—
Кон А-стимулированная	103 797±23 210	43 819±9583	67 394±8931	—	—	57 932±3645	—
ЛПС-стимулированная	3323±763	6337±803	—	—	3366±956	—	—
Пролиферация Кон А-бластов без ИЛ-2	174±56	—	—	982±52	608±163	—	342±81
с ИЛ-2,5 ед/мл	3474±291	—	—	2384±276	4139±371	—	418±25

Таблица 2. Влияние тамерита на продукцию ИЛ-2-подобного фактора ($M \pm m$)

Разведение супернатанта	Контроль	Кон А	Тамерит	Кон А+тамерит
1:4	870±68	2270±424	2376±378	2240±318
1:40	674±73	973±87	1878±311	1089±77

этих клеток; процент фагоцитоза составил в контроле 55.5, в опыте — 75.

При профилактическом введении низких доз препарата (0.2 мкг на мышшь) отмечено 2-3-кратное увеличение продолжительности жизни мышшей, зараженных внутрибрюшинно *E. coli* и *S. typhi* в ЛД₁₀₀.

Влияние тамерита на гуморальное звено иммунитета

Иммунизация мышшей контрольной группы эритроцитами барана приводила к повышению сывороточных титров антител, начиная с 7-х суток эксперимента с пиком на 14-е сутки и постепенным снижением к 21-м (табл. 4). При этом у сильнореагирующих мышшей линии СВА титр антител на 14-е сутки был вдвое выше, чем у слабореагирующих мышшей линии С57В1/6.

При введении тамерита в индуктивную фазу иммунного ответа (совместно с эритроцитами барана) у животных обеих линий существенных различий с контролем в титрах гемагглютининов на 7-е сутки эксперимента не обнаружено. На 14-е сутки у мышшей линии СВА, получавших тамерит в дозах 0.2-200 мкг/мышшь, концентрация антител в сыровотке крови была несколько ниже, чем в контрольной группе, тогда как у мышшей линии С57В1/6 препарат в дозах 20 и 2000 мкг/мышшь вызывал увеличение титра гемагглютининов. К 21-м суткам эксперимента у слабореагирующих мышшей, получавших тамерит, уровень антител был также выше контрольного. К этому моменту сывороточные титры гемагглютининов в контрольных и опытных группах мышшей линии СВА не различались.

При введении тамерита в продуктивную фазу иммунного ответа (на 5-е сутки после иммунизации) он во всех исследуемых дозах оказывал супрессивное действие на продукцию антител на 7-е и 14-е сутки после иммунизации у мышшей линии СВА (табл. 4). Напротив, у мышшей линии С57В1/6 к 21-м суткам эксперимента наблюдалась выраженная тенденция к усилению продукции агглютининов при применении тамерита в дозах 2-2000 мкг/мл.

Таблица 3. Влияние тамерита (2-3 мг/кг внутривенно) на количество нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови кроликов ($M \pm m$, $n=3$)

Клетки	Контроль	Срок после введения тамерита, мин					
		15	30	60	90	150	190
Лейкоциты, $10^3/\text{л}$	7666±449	5000±118*	3833±449*	3100±212*	3566±238*	5000±294*	666±449
Сегментоядерные нейтрофилы, %	32.7±3.0	25.0±1.6	17.6±1.5*	10.0±1.2*	13.6±0.9*	22.3±1.5*	26.3±1.9

Примечание. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

Таблица 4. Влияние тамерита на индуктивную и продуктивную фазу антителообразования и реакцию ГЗТ ($M \pm m$, $n=5$)

Показатель	Интактные	Контроль	Тамерит, мкг/мышь			
			2	20	200	2000
Титр гемагглютининов						
Индуктивная фаза						
СВА	4±0	512±0	154±97	256±0	—	512±0
С57В1/6	4±0	256±0	256±0	512±0	—	512±0
Продуктивная фаза						
СВА	4±0	512±0	173±110	256±0	158±120	—
С57В1/6	0	27±15	256±201	304±105	120±95	—
Индекс реакции ГЗТ						
СВА	—	6.0±3.5	11±8	10±5	2.0±1.5	—
С57В1/6	—	12±7	19±9	16±9	15±6	—

Выявлена тенденция к увеличению индекса реакции ГЗТ при использовании низких доз тамерита у мышей обеих линий (табл. 4). В высоких дозах препарат проявлял тенденцию к угнетению реакции у мышей линии СВА.

При исследовании содержания ИЛ-1 в культуральных супернатантах активированных пептоном перитонеальных макрофагов, инкубированных в среде с тамеритом, обнаружено, что исследуемый препарат оказывает дозозависимое влияние на продукцию этого монокина (табл. 5). В концентрациях, близких к 1 мкг/мл, тамерит вызывал существенную активацию выработки ИЛ-1 ($p < 0.05$). При дозе 100 мкг/мл отмечена тенденция к снижению продукции цитокина пептон-активированными макрофагами.

Пик стимулирующей активности тамерита в отношении продукции ИЛ-1 мышинными спленоцитами отмечен при концентрации 10 мкг/мл ($p < 0.05$). Некоторое активирующее действие проявлялось и в концентрации 1 мкг/мл, хотя различие с контролем было статистически недостоверным. В меньших и больших дозах препарат практически не оказывал влияния на продукцию ИЛ-1.

Сходная картина наблюдалась при изучении действия тамерита на выработку ФНО (табл. 5). Препарат стимулировал продукцию цитокина спленоцитами в концентрациях 1 и 10 мкг/мл, а перитонеальными макрофагами — в дозе 1 мкг/мл ($p < 0.05$). Следует отметить выраженную тенденцию к угнетению выработки ФНО спленоцитами

Таблица 5. Влияние тамерита на продукцию ИЛ-1 и ФНО перитонеальными макрофагами и неразделенными клетками селезенки мышей линии С57В1/6 ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	Тамерит, мкг/мл			
		0.1	1	10	100
Индекс пролиферации тимоцитов					
макрофаги	1.6±0.3	1.7±0.2	3.4±0.6	2.1±0.4	1.0±0.4
спленоциты	1.2±0.2	1.1±0.3	1.5±0.3	2.4±0.4	1.1±0.3
Цитотоксический индекс, %					
макрофаги	15±4	19±6	31±5	21±7	5±3
спленоциты	5±3	7±5	14±4	16±5	0±4

Таблица 6. Влияние тамерита на рост и метастазирование меланомы В16 у мышей линии С57В1/6 ($M\pm m$)

Показатель	Контроль (вода)		Тамерит	
	каждый день	1 раз в 3 дня	каждый день	1 раз в 3 дня
Продолжительность жизни, сут	32±2	33±3	34±3	38±4
Увеличение продолжительности жизни, %	—	—	6	15
Объем опухолевого узла, мм ³	678±51	653±66	645±81	597±71
Замедление опухолевого роста, %	—	—	5	9
Количество метастазов на 28-е сутки	10±2	9±2	7±1	5±2
Уменьшение метастазирования, %	—	—	30	44

Таблица 7. Влияние тамерита на рост и метастазирование карциномы Льюиса ($M\pm m$)

Показатель	Контроль (n=11)	Тамерит, мкг/мышь		Циклофосфан (n=15)	Циклофосфан+тамерит, мкг/мышь	
		50 (n=12)	500 (n=18)		50 (n=12)	500 (n=14)
Объем опухоли, см ³	3.76±0.26	2.73±0.21	2.93±0.19	2.87±0.22	2.74±0.24	2.550±0.202
Количество метастазов	19.0±1.8	13.9±1.2	13.8±1.0	6.1±0.7	1.6±0.4	4.4±0.8
Число животных без метастазов	0	0	0	0	4	1
Продолжительность жизни, сут	27.4±1.3	29.7±1.1	29.3±1.2	34.6±2.0	34.0±1.5	35.0±1.9

и статистически достоверную ($p<0.05$) ингибицию его продукции перитонеальными макрофагами при концентрации тамерита 100 мкг/мл.

Большинство фармакологических свойств тамерита обусловлено модуляцией функциональной активности моноцитов/макрофагов и продукции ими некоторых ключевых цитокинов, в частности ИЛ-1 и ФНО, а также NO-соединений и реакционноспособных радикалов. Моноциты и макрофаги представляют собой важнейшее звено противоопухолевого иммунного ответа. Значение этих клеток в резистентности организма к опухолевому росту подтверждается тем, что их ингибция введением каррагенана вызывала ускорение опухолевого роста и метастазирования у животных-опухоленосителей, тогда как стимуляция макрофагов иммуномодуляторами сопровождалась подавлением роста и метастазирования опухолевых клеток. Адоптивный перенос активированных различными способами макрофагов и моноцитов ингибировал метастазирование некоторых опухолей у животных и давал положительный терапевтический эффект у больных перитонеальным карциноматозом при введении в брюшную полость.

Учитывая эти факты, было изучено влияние тамерита на рост и метастазирование опухоли и продолжительность жизни животных-опухоленосителей на моделях мышинных опухолей.

В большинстве экспериментов тамерит в определенной степени угнетал рост подкожного узла меланомы и увеличивал продолжительность жизни мышей-опухоленосителей (табл. 6), но статистически значимых различий с контролем не выявлено. При режиме введения тамерита 1 раз в 3 дня выявлена четкая тенденция к замедлению опухолевого роста (9%) и продлению жизни мышей с меланомой (15%), не столь выраженная при ежедневном применении (5 и 6% соответственно).

Интересные данные получены при изучении антиметастатической активности препарата (табл. 6). При введении 50 мкг тамерита 1 раз в 3 дня отмечено достоверное (на 44%, $p<0.05$) снижение количества легочных метастазов на 28-е сутки эксперимента. Несколько меньший эффект (30%) наблюдался при ежедневном введении тамерита.

Вероятно, вышеописанные противоопухолевые эффекты препарата опосредованы стимуляцией макрофагов, являющихся основной мишенью биологического действия тамерита. Однако конкретные механизмы его антиметастатической активности требуют дальнейшего детального изучения.

При изучении эффекта монотерапии тамеритом и его комбинированного применения с циклофосфаном на модели карциномы Льюиса обнаружено, что применение тамерита во всех вариантах опытов вызывало умеренное уменьшение объема

опухоли (табл. 7). Лечение тамеритом в дозах 50 и 500 мкг/мышь обеспечивало снижение частоты макроскопически видимых легочных метастазов на 27% по сравнению с нелеченным контролем. Применение тамерита в дозе 50 мкг/мышь способствовало статистически достоверному усилению антиметастатического действия циклофосфана — количество легочных метастазов снижалось в 4 раза по сравнению с уровнем метастазирования при применении только циклофосфана. У 4 из 12 мышей, получавших комбинированное лечение (циклофосфан+тамерит в дозе 50 мкг/мышь) макроскопически видимые метастазы отсутствовали вообще.

Анализ выживаемости мышей с карциномой Льюиса не выявил лечебного эффекта тамерита при его применении в качестве монотерапии: средняя продолжительность жизни животных опытных серий не отличалась от таковой в контроле (табл. 7). Лечение циклофосфаном увеличивало продолжительность жизни в среднем на 1 нед, одновременное введение циклофосфана с тамеритом не привело к дополнительному увеличению средней продолжительности жизни мышей-опухоленосителей (табл. 7).

Таким образом, приведенные первые результаты оценки противоопухолевого действия тамерита и его способности повышать эффективность химиотерапии перевиваемой опухоли в опытах *in vivo* позволяют говорить преимущественно об антиметастатической активности препарата. Представляется целесообразным проведение дальнейших исследований как в направлении оптимизации схемы применения тамерита в комплексном лечении злокачественных опухолей, так и по изучению механизмов реализации антиметастатического действия.

Итак, тамерит в дозах 1-10 мкг/10⁵ клеток стимулирует спонтанную и ЛПС-стимулированную бласттрансформацию лимфоцитов человека. В более высоких концентрациях (50-100 мкг/10⁵ клеток) препарат угнетает спонтанную и митогениндуцированную пролиферацию. Тамерит в дозе 1-10 мкг/10⁶ лимфоцитов усиливает экспрессию высокоаффинных рецепторов к эритроцитам барана на Т-лимфоцитах человека. В высоких дозах (100 мкг/10⁶ лимфоцитов) он блокирует процесс экспрессии рецепторов этого типа. В дозе 25-100 мкг/10⁶ лимфоцитов препарат достоверно увеличивает число клеток, имеющих на своей поверхности рецепторы к третьему компоненту комплекса. В дозе 1-10 мкг/10⁶ лимфоцитов препарат существенно не влияет на экспрессию этого вида рецепторов.

В дозе 2-3 мг/кг тамерит вызывает транзиторное снижение количества нейтрофильных лей-

коцитов в периферической венозной крови, не влияя на процентное содержание лимфоцитов. В дозе 1-10 мкг/10⁶ клеток *in vitro* препарат увеличивает фагоцитарную активность нейтрофильных лейкоцитов, в низких дозах (до 50 мкг/мл) активирует продукцию ИЛ-2.

Выявлена способность препарата изменять антителообразование в зависимости от дозы и исходной иммунореактивности организма. При введении тамерита в широком диапазоне доз в продуктивную фазу, т.е. на 5-е сутки после введения антигена (эритроцитов барана), он угнетает антителообразование на 7-е и 14-е сутки после иммунизации у мышей линии СВА, генетически высокочувствительных к эритроцитам барана. У низкочувствительных мышей линии С57В1/6 препарат вызывает существенное повышение титров геммаглобулинов на 21-е сутки эксперимента.

При дозах тамерита 2 и 20 мкг/мл отмечена тенденция к усилению реакции ГЗТ у оппозитно реагирующих мышей, при дозе 200 мкг/мл — угнетение реакции у мышей линии СВА.

В концентрации 1-10 мкг/мл тамерит вызывает существенную активацию выработки ИЛ-1 и ФНО перитонеальными макрофагами и спленоцитами, в дозе 100 мкг/мл — снижает продукцию указанных цитокинов.

В дозе 0.2 мкг/мышь препарат способствует усилению неспецифической резистентности мышей к бактериальным инфекциям.

Результаты исследования способности препарата стимулировать противоопухолевый иммунный ответ и повышать эффективность химиотерапии перевиваемых опухолей в опытах *in vivo* позволяют говорить о наличии у тамерита антиметастатической активности. Препарат в терапевтических дозах не обладает анафилактическими свойствами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абидов М.Т. Токсический синдром при инфекционном воспалении. Патогенез, обоснование методов коррекции. Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — СПб., 1994.
2. Никитин В.Н. Атлас клеток сельскохозяйственных и лабораторных животных. — М., 1949.
3. Плохинский Н.А. Алгоритмы биометрии. — М., 1980.
4. Иммунологические методы / Под ред. Г.Фриммеля. — М., 1987.
5. Ромейс Б. Микроскопическая техника. — М., 1954.
6. Фримель Х., Ширгель Б., Белл Э. Иммунологические методы. — М., 1979.
7. Abo T., Miller C. // J. Exp. Med. — 1983. — Vol. 157. — P. 273-284.
8. Bianco C., Patrick R., Nussenzweig A. // J. Exp. Med. — 1970. — Vol. 132. — P. 702-720.

9. *Boym A.* // Scand. J. Clin. Lab. Invest. - 1968. - Vol. 21, Suppl. 97. - P. 77-91.
 10. *Fish H., Gifford G.E.* // Int. J. Cancer. - 1983. - Vol. 32. - P. 105-112.
 11. *Hokland P., Heron J.* // Scand. J. Immunol. - 1979. - Vol. 19, N 4. - P. 333-342.
 12. *Jordal M., Holm G., Wigzell H.* // J. Exp. Med. - 1972. - Vol. 136. - P. 207-215.
 13. *Lovett D., Kozan B., Hadam M. et al.* // J. Immunol. - 1986. - Vol. 136. - P. 340-347.
 14. *Uede T., Kochda Y., Ibayachi Y. et al.* // Ibid. - Vol. 135. - P. 3243-3251.
-

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ТОКСИЧЕСКОГО СИНДРОМА, ВЫЗВАННОГО ВВЕДЕНИЕМ ЭНДОТОКСИНА. ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ, ОКСИДОВ АЗОТА И цГМФ-СИНТЕТАЗНОЙ РЕАКЦИИ

М.Т.Абидов, М.В.Нелюбов, А.П.Хохлов, В.П.Фисенко, Л.И.Винницкий, А.Ф.Баштаненко, С.В.Ведищев, А.П.Дрожжин.

ММА им. И.М.Сеченова; НИИ иммунопатологии РАЕН, Москва

Согласно современным представлениям, макрофаги являются важным звеном естественной резистентности и иммунорегуляции организма. Такая роль макрофагов закреплена функционально и эволюционно. Однако основной причиной, определяющей фундаментальную роль макрофагов в защитной системе организма, является их ключевая роль в тканевом гомеостазе. Макрофаг первым из защитных элементов сталкивается с трансформированной клеткой, нарушающей нормальные межклеточные связи.

Эндоотоксины являются классическими стимуляторами функции макрофагов. В результате ответной реакции клетки крови выделяют десятки биологически активных соединений, существенно влияющих на течение физиологических процессов. До 1% белка, выделяемого макрофагами, приходится на фактор некроза опухоли (ФНО), который в настоящее время рассматривается как центральный медиатор действия бактериального липополисахарида (ЛПС). Изменения, вызываемые ЛПС, снимаются анти-ФНО моноклональными антителами.

Другим важнейшим биологически активным метаболитом, выделяемым активированными макрофагами, является NO, посредством секреции которого макрофаги регулируют содержание ЦН в тканях. В последние годы появились данные, раскрывающие механизм высвобождения ЦН под влиянием макрофагов. Активация последних приводит к усилению выработки оксидов азота (NO, NO₂, NO₃), образующихся путем окисления гуанидиновой группы, аргинина. Оксиды азота активируют тканевую цГМФ-синтетазу. Этот процесс настолько специфичен, что в настоящее время о накоплении NO в биологических жидкостях судят по образованию цГМФ. NO является по су-

шеству свободным радикалом и обладает высокой реакционной способностью, взаимодействует с ионами железа и другими металлами с переменной валентностью, что приводит к нарушению функции цитохромов и энергетическим нарушениям в клетках. В физиологических экспериментах показана способность NO снижать тонус сосудов, вследствие чего он получил название фактора расслабления сосудов (ФРС). Доказано, что при введении токсинов образование оксидов азота, помимо макрофагов, осуществляется эндотелиальными клетками. Потеря тонуса артериол под действием ФРС приводит к нарушениям микроциркуляции с изменением проницаемости стенки сосудов и стазом, а также к гипоксии и развитию синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания. Одновременное повреждение эндотелиальных клеток под действием ФНО крови, в свою очередь, возможно, будет способствовать усилению образования ФРС и гиперактивации макрофагального звена с формированием порочного круга.

Целью настоящей работы было установление зависимости между выраженностью клинических симптомов интоксикации и уровнем ФНО и ФРС.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Опыты проведены на кроликах породы "шиншилла", у которых моделировали сальмонеллезную инфекцию путем внутривенного введения ЛПС *Salmonella typhimurum* в дозе 1 мг/кг. В течение 1 сут после заражения в крови животных определяли содержание ФНО в крови и уровень цГМФ в слизистой оболочке тонкой кишки как показатель накопления NO. Биоптат тонкой кишки массой 300 мг растирали в жидком азоте, затем взве-

Динамика содержания ФНО и циклических нуклеотидов при острой кишечной инфекции ($M \pm m$, $n=28$)

Показатель	До введения ЛПС	После введения ЛПС		
		30 мин	60 мин	180 мин
ФНО, ед/мл	7.4±2.3	-	14.2±3.3	29.9±8.0
цАМФ, пмоль/г	248.8±24.6	430.2±38.6	286.5±16.1	279.0±25.4
цГМФ, пмоль/г	31.2±5.6	88.1±9.0	122.0±19.0	156.0±16.5
цГМФ/цАМФ	0.13	0.20	0.43	0.56

шивали на торсионных весах и центрифугировали на охлажденной центрифуге. В экстрагированном биоптате определяли содержание циклических нуклеотидов через 30, 60 и 180 мин от начала эксперимента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Через 1 ч после введения ЛПС температура тела животных возрастала в среднем на 1-2°C, появлялись адинамия, анорексия, тахикардия, тахипноэ и диарея. Животные отказывались от воды. Клинические симптомы интоксикации достигали максимума к 3 ч эксперимента. В плазме отмечено 2-кратное повышение уровня ФНО по сравнению с нормой (таблица). Повышение уровня ФНО было максимальным к 3 ч исследования, а затем, параллельно с угасанием клинической симптоматики, его содержание снижалось до 11.9±2.2 ед/мл. Таким образом, динамика содержания ФНО четко коррелировала с выраженностью клинических симптомов интоксикации.

Через 30 мин после введения ЛПС отмечено достоверное увеличение содержание цАМФ в слизистой оболочке тонкой кишки (таблица). Через 60 мин от начала эксперимента уровень цАМФ в биоптате снизился и эта тенденция сохранялась до конца исследования.

Динамика уровня цГМФ во все сроки исследования была иной. Через 30 мин от начала эксперимента этот показатель повышался по сравнению с фоновым и оставался достоверно повышенным в последующие сроки наблюдения (таблица), достигнув максимума к концу 3-го часа. Разнонаправленный характер изменений уровня цАМФ и цГМФ при эндотоксинемии интересен сам по себе. Многие авторы связывают развитие симптомов интоксикации с повышением уровня цАМФ. Однако наши исследования продемонстрировали его снижение в момент максимальной выраженности симптомов интоксикации, из чего можно

заключить, что цАМФ является только “пусковым механизмом”, а цГМФ отвечает за поддержание токсических проявлений и диареи.

Можно предположить, что активация лейкоцитов под действием токсинов приводит к образованию оксидов азота, активизирующих цГМФ-синтетазную реакцию в тканях. Таким образом, основная роль в развитии диарейного синдрома принадлежит не цАМФ, а цГМФ, синтез которого в энтероцитах стимулируется макрофагами, вырабатывающими большое количество NO-соединений. Исключение составляет диарейный синдром при холере.

Итак, удалось установить сходство динамики изменений содержания ФНО и ФРС, причем эти изменения коррелируют с выраженностью клинической симптоматики.

Морфологические исследования четко продемонстрировали появление макрофагов в стенках тонкой кишки на ранних стадиях патологического процесса. Уже к концу 1-го часа после введения ЛПС отмечалось усиление миграции лейкоцитов в ткани. При этом наряду с нейтрофильными гранулоцитами выявлены скопления макрофагов в очаге воспаления. К 3 ч эксперимента количество макрофагов в исследуемом материале заметно увеличилось. Имела место инфильтрация собственной пластинки плазмоцитами, фибробластами и макрофагами. В эпителиальном пласте ворсинок определялись активированные лейкоциты. Все это подтверждает гипотезу о том, что основной причиной появления клинических симптомов при острой кишечной инфекции является накопление в стенках кишечника гиперактивированных макрофагов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Muller U. et al. // Nature. - 1988. - Vol. 225. - P. 265-267.
2. Tracey K., Fono Y. // Ibid. - 1987. - Vol. 330. - P. 662-664.
3. Wathison D., Jacob D. // Immunochemistry. - 1976. - Vol. 13. - P. 813-818.

РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КЛЕТОК КРОВИ *IN VIVO* И *IN VITRO*

М.Т.Абидов, А.П.Хохлов, В.П.Фисенко, А.В.Караулов, А.П.Дрожжин, А.В.Чубенко, М.Х.Кушхова, А.П.Петько, Ж.Б.Панежева

НИИ иммунопатологии РАЕН, Москва; ММА им. И.М.Сеченова

Важная роль клеток крови в патогенезе токсического синдрома диктует необходимость создания нового поколения лекарственных средств, позволяющих осуществлять регуляцию компонентов лейкоцитарного звена при различных патологических состояниях с учетом особенностей течения инфекционного процесса (быстрое развертывание и спад клинических симптомов интоксикации, необходимость сохранения иммунной защиты и активации резистентности).

Используя активность гранулоцитов раневого поля, а также перитонеальных макрофагов в качестве экспериментальной модели, провели скрининг различных лекарственных средств, изменяющих функциональную активность клеток. Затем отобранные эффективные препараты испытывали на острую и хроническую токсичность, эмбриотоксичность, тератогенность, иммунореактивность и т.д. в плане возможности их использования в клинической практике. Наиболее эффективным в этом отношении оказался тамерит.

Проведя широкий спектр биохимических исследований, характеризующих функциональную активность макрофагов — определение скорости синтеза белка, РНК, ДНК, а также степени потребления кислорода клетками крови, — мы уточнили некоторые механизмы действия препарата. Потребление кислорода клетками — особенно важный показатель, т.к. хорошо известно, что энергетические потребности перитонеальных макрофагов обеспечиваются гликолизом и расход кислорода полностью обеспечивается активностью мембранно-связанной NADPH-оксидазы.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В качестве донора макрофагов использовали мышей линии СВА массой 18-20 г. Оценивали синтез белка двумя группами макрофагов: нерекрутированными (внутрибрюшинное введение физраствора) и рекрутированными (инициация 6% пептоном). Жизнеспособность клеток устанавливали

путем окрашивания трипановым синим; во всех случаях она была более 23%. Макрофаги брали в опыт через 24 ч после посадки из расчета 1,52 мг белка на лунку. Опыт проводили в среде 199 с 0.5% эмбриональной телячьей сыворотки. Использовали ^{14}C -пролин, ^{14}C -уридин и ^3H -тимидин, время мечения составляло 4, 2 и 20 ч соответственно; концентрация изотопов: ^{14}C — 1 мкКи/мл, ^3H — 5 мкКи/мл.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

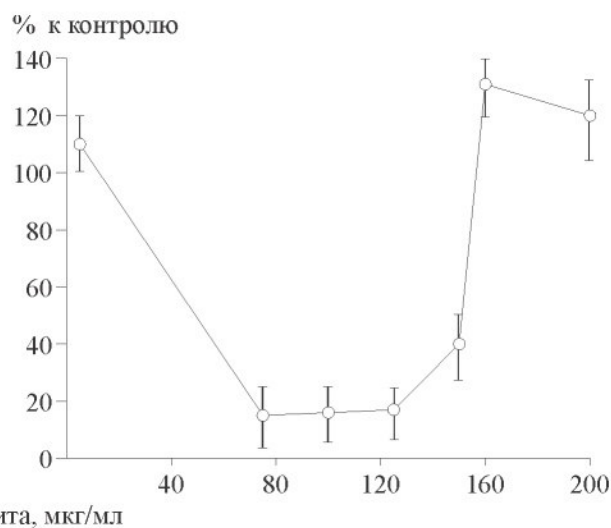
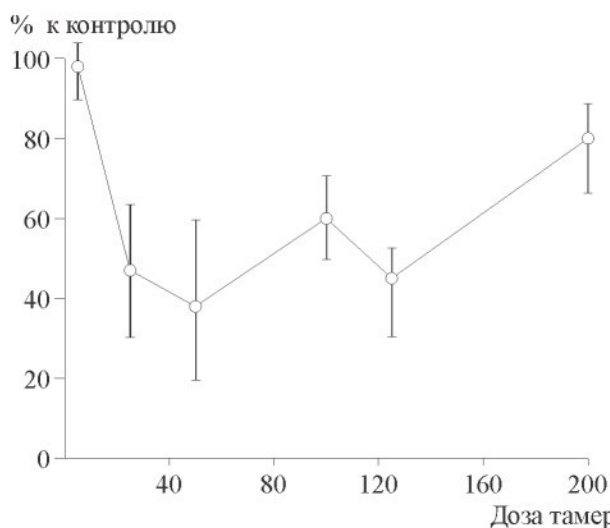
Отмечено торможение синтеза ДНК при концентрации тамерита в пробах в интервале 25-125 мкг/мл (рисунок, *а*). Несмотря на сходные показатели непараметрической статистики для резидентных и рекрутированных макрофагов, торможение синтеза белка более выражено при использовании резидентных (до 89-90% в отдельных случаях).

Схожую тенденцию наблюдали в эксперименте по изучению синтеза РНК (рисунок, *б*). Скорость включения метки в макромолекулах тормозится при содержании тамерита в пробах 25-125 мкг/мл как для резидентных, так и для рекрутированных макрофагов. В отдельных экспериментах степень утилизации ^{14}C -уридина была снижена до 20-25% от уровня контрольной группы. Анализ результатов по включению ^3H -тимидина подтвердил выявленные закономерности. В резидентных и рекрутированных макрофагах этот процесс под влиянием препарата также ингибировался; отличие заключалось в том, что эффект был выражен в более широком диапазоне и проявлялся уже при содержании тамерита в пробах 10 мкг/мл.

Данные о синтезе белка, РНК и ДНК нерекрутированными и обработанными пептоном макрофагами представлены в таблице. Выраженное действие тамерит оказывал также на потребление кислорода. Кратковременная преинкубация МФ с тамеритом в концентрации 1-100 мкг/мл не вызывала изменений спонтанной респираторной активности; при увеличении концентрации препарата

Влияние тамерита на синтез белка (имп/мин на 1 мг белка), РНК и ДНК перитонеальными макрофагами

Показатель	Контроль (без препарата)	Доза препарата, мкг/мл					
		10	25	50	100	200	1000
Синтез белка							
резидентные							
абс.	2767	2725	1244	1079	1722	1083	2153
%	100	98.5	45	39	62	39	78
рекрутированные							
абс.	16 297	2174	1485	1612	1310	14 317	18 212
%	100	13.3	9.1	9.9	8.1	88	112
Синтез РНК							
резидентные							
абс.	9764	1473	1584	1621	3622	11 819	12 598
%	100	16	17	18	39	127	136
рекрутированные							
абс.	10 435	12 572	9002	10 010	10 535	8095	3927
%	100	121	87	86	91	78	37
Синтез ДНК							
резидентные							
абс.	2068	1431	495	1205	1370	646	924
%	100	69	24	58	66	31	45
рекрутированные							
абс.	5524	3625	2539	2659	2101	1520	2444
%	100	66	46	48	38	28	44



Скорость синтеза белка (а) и РНК (б) резидентными макрофагами после инкубации с тамеритом *in vitro* в течение 3 ч.

до 200 мкг/мл зарегистрирован рост потребления кислорода в ответ на респираторный взрыв, индуцированный ФМА или зимозаном.

Таким образом, тамерит ингибирует функциональную активность перитонеальных макрофагов посредством депрессии биосинтетических процессов на 4-6 ч, после чего активность макрофагов постепенно нормализуется.

ЛИТЕРАТУРА

1. Абидов М.Т., Нагоев Б.С., Турьянов М.Х. и др. // Актуальные вопросы инфекционной патологии. - Нальчик, 1993. - С. 53-60.
2. Беклемишев Н.Д. Иммунология и иммунокоррекция. - М., 1982. - С. 90-91.
3. Кокряков В.Н. // Вопр. мед. химии. - 1990. - № 6. - С. 13-16.

ИЗУЧЕНИЕ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ТАМЕРИТА

А.П.Хохлов, М.Т.Абидов, А.П.Дрожжин, В.П.Фисенко, Ж.Б.Панежева,
А.П.Петько, В.И.Егоров, М.Х.Кушхова

ММА им. И.М.Сеченова; НИИ иммунопатологии РАЕН, Москва

Одним из важнейших нарушений гемостаза, приводящих к развитию синдрома эндогенной интоксикации, является гипоксия тканей. Степень выраженности нарушений антиоксидантной защиты коррелирует со стадией воспалительного процесса. Нередко гипоксия не только осложняет течение заболевания, но и определяет его исход, поэтому с патогенетической точки зрения целесообразно включение в схему лечения токсико-септических состояний препаратов с антиоксидантной активностью. Номенклатура лекарственных средств с указанным механизмом действия крайне ограничена, что диктует необходимость поиска новых препаратов, обладающих антиоксидантной активностью.

Механизм действия тамерита, высокоэффективного иммуномодулирующего и противовоспалительного средства, заключается в селективном ингибировании гиперактивированных макрофагов, обратимом снижении продукции ими провоспалительных агентов (фактор некроза опухолей, интерлейкин-1, простагландины и др.) и активации микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов. С нашей точки зрения, целесообразно изучение тамерита и в качестве антиоксидантного средства.

CCl_4 — один из наиболее хорошо изученных гепатотропных ядов. Поступая в организм извне, это соединение в первую очередь вступает в контакт с клетками печени. Даже низкие дозы (1 мкл/100 г) вызывают некроз и жировую дистрофию гепатоцитов, а также биохимические нарушения, снижение функции эндоплазматического ретикулума, белоксинтезирующих систем, накопление триглицеридов и т.д. CCl_4 метаболизируется в мембранах эндоплазматического ретикулума при непосредственном участии цитохрома P-450.

Антиоксидантную активность тамерита оценивали в дозах 5-30 мг/кг массы тела животного на модели повреждения печени CCl_4 с последующим определением продолжительности гексеналового наркоза и на модели острой гипоксической гипоксии по методу Каплан.

Изучаемые дозы были близки к тем, в которых тамерит оказывал иммуностропное и противовоспалительное действие на чистых и гнойных ранах.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

На модели повреждения печени CCl_4 проведено 15 серий экспериментов на мышах (по 10 в каждой серии). CCl_4 вводили подкожно в 50% масляном растворе из расчета 0.15 и 0.2 мл/20 г массы животного. Повреждающее действие CCl_4 на печень оценивали на 4-е сутки в гексеналовой пробе. Доза гексенала во всех опытах составляла 80 мг/кг. Тамерит вводили внутривентриально в дозах 10 и 30 мг/кг за 30 мин и за 1 сут до затравки CCl_4 . Контролем служили интактные мыши и мыши, отравленные CCl_4 и не получавшие тамерита.

При изучении тамерита в качестве средства, способного уменьшить или устранить повреждающее действие CCl_4 на гепатоциты, CCl_4 вводили только в дозе 0.2 мл/20 г. Тамерит вводили в дозах 10 и 30 мг/кг в течение недели до затравки CCl_4 .

Гипоксическую гипоксию моделировали по общепринятой методике. В опытах использовали среднестойчивых нелинейных белых мышей-самцов массой 20 ± 2 г, которые выживали в условиях гипоксии не менее 5 мин. Мышам опытных групп вводили тамерит в дозах 5-30 мг/кг внутривентриально за 40 мин до "подъема на высоту". Контрольным животным в том же режиме вводили эквивалентное количество 0.9% раствора NaCl. Мыши групп сравнения получали антиоксидант дибунол (30 мг/кг) и пираретам (500 мг/кг) за 40 мин до "подъема на высоту". Опыты проводили в специальной барокамере, где с помощью вакуумного насоса моделировали "подъем на высоту" 6000 м над уровнем моря со скоростью 20 м/с. В этих условиях мышей выдерживали 2 мин и затем с той же скоростью "поднимали" до 10 400 м и на данной высоте регистрировали время до наступления судорог и остановки дыхания.

Таблица 1. Продолжительность гексеналового наркоза (мин) на фоне предварительного введения тамерита

Серия опытов	Интактный контроль	Отравление CCl_4	
		0.15 мл/20 г	0.2 мл/20 г
Без тамерита	49.95 (35.37-50.53)	129.72 (88.55-170.12)	276.47 (226.45-326.22)
Тамерит, 10 мг/кг			
за 30 мин	33.00 (19.03-47.37)	59.62 (41.57-77.67)	63.42 (38.33-88.50)
за 1 сут	63.00 (61.25-65.42)	69.23 (62.23-76.78)	90.20 (62.58-118.48)
Тамерит, 30 мг/кг			
за 30 мин	44.33 (18.97-70.47)	64.20 (33.10-95.43)	68.83 (44.83-92.83)
за 1 сут	63.25 (42.52-84.65)	69.23 (62.23-76.78)	106.72 (83.72-129.20)

Таблица 2. Продолжительность гексеналового наркоза (мин) при профилактическом введении тамерита

Серия опытов	Интактный контроль	Отравление CCl_4	
		4-е сутки	8-е сутки
Без тамерита	42.95 (35.37-50.53)	271.80 (214.38-316.17)	279.42 (221.55-331.45)
Тамерит			
10 мг/кг	49.18(32.07-66.30)	60.47 (49.02-72.60)	60.00 (47.07-73.58)
30 мг/кг	57.18 (42,48-72,14)	111.23 (55.47-167.00)	61.00 (43.42-79.23)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

У мышей, отравленных CCl_4 , продолжительность гексеналового наркоза существенно возрастала по сравнению с интактным контролем, введение тамерита в дозах 10 и 30 мг/кг укорачивало продолжительность гексеналового наркоза по сравнению с контролем в 2 и 4.4 раза соответственно (табл. 1). Зависимости антиоксидантного эффекта тамерита от вводимой дозы не отмечено. Полученные результаты свидетельствуют о выраженном гепатотропном действии тамерита, усилении процессов метаболизма, антиоксидантном и мембраностабилизирующем действии препарата.

Профилактическое введение тамерита препятствовало развитию интоксикации продуктами ПОЛ, продолжительность гексеналового наркоза была достоверно (в 5.7 раза) снижена по сравнению с контролем (табл. 2). Введение тамерита на фоне уже развившегося повреждения печени значительно укорачивало продолжительность гексеналового наркоза на 4-е сутки по сравнению с контролем (табл. 2). На 8-е сутки при ежедневном введении тамерита продолжительность гексеналового наркоза приближалась к таковой у интактных мышей (табл. 2).

Тамерит, введенный за 40 мин до “подъема на высоту”, достоверно увеличивал выживаемость мышей в условиях острой гипоксии. Так, при введении тамерита в дозах 10 и 30 мг/кг выживаемость составила 140 и 150% от таковой в контроле, а при введении дибунола и пирасетама — 180 и 170% соответственно.

Результаты опытов свидетельствуют о наличии у тамерита выраженных гепатотропных, антиоксидантных, мембраностабилизирующих и антигипоксических свойств, что позволяет рекомендовать его использование при недостаточности собственной антиоксидантной системы и нарушениях ПОЛ при различных патологических состояниях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Архипенко Ю.В., Каган В.Е., Козлов Ю.П., Ригов В.Б.* // Патология мембранной проницаемости. - М., 1975. - С. 13-15.
2. *Воскресенский О.Н., Шугаев И.А., Бобырев В.И., Безуглый Ю.В.* // Вопр. мед. химии. - 1982. - Т. 28, Вып. 1. - С. 14-28.