

глибленого вивчення і розробки на їх основі ефективних протимікробних та профілактичних засобів.

УДК: 615.28: 616. 155. 36

*Киричек Л.Т., Соколова И.И., Ананько С.Я., Миронченко С.И., Стороженко Е.В.*

## **СТЕПЕНЬ ДЕГРАДУЛЯЦИИ ТУЧНЫХ КЛЕТОК КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ПРОТИВОАЛЛЕРГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Харьковский национальный медицинский университет, г. Харьков, Украина

Тема: " Створення та дослідження нових лікарських засобів для лікування бронхо-легеневої патології у дітей різного віку", № держреєстрації 01084005246

Повсеместный рост числа заболеваний аллергической природы, регистрируемый мировой статистикой как у взрослых, так и у детей, привлекает к себе постоянное внимание специалистов – медиков [1]. Аллергические реакции могут стать патогенетической основой самых разных заболеваний, при этом они всегда возможны при респираторной патологии. Органы дыхания являются одной из наиболее частых локализаций аллергических процессов, а дыхательная система занимает одно из первых мест среди органов, отвечающих функциональными расстройствами на аллергическую перестройку организма [2]. Начало этих изменений можно наблюдать у детей, начиная с раннего возраста, где отчетливо проявляются как наследственные изменения, так и формирование аллергических признаков на фоне недостаточной зрелости нейро-гуморальной регуляции. В связи с этим при исследовании любых проблем бронхо-легочной патологии, особенно у детей, важное значение имеет изучение роли ее аллергического компонента, разработка рациональных подходов к созданию схем комплексной терапии, разработки рецептур новых комбинированных препаратов и оценка их противоаллергического эффекта. Решение этих задач во многом обеспечивается адекватным моделированием изучаемой патологии, позволяющим установить закономерности в развитии заболеваний, в процессе выздоровления и изыскания эффективных средств лечения [3].

Аллергические болезни как таковые встречаются только у человека, поэтому моделирование этих состояний у животных должно быть направлено не на все проявления к особенности органолокализации, а на воспроизведение отдельных аллергических реакций, особенно таких, которые составляют патогенетическую основу различных аллергических проявлений [4].

Методические вопросы экспериментальной аллергии на современном этапе характеризуются интенсивным и разносторонним исследованием тканевых аллергических реакций. Это многочисленные гистаминовые пробы и так называемая клеточная анафилаксия, изучающая на фоне сенсibilизации состояние тучных клеток соединительной ткани, лейкоцитов и базофилов крови.

Учитывая все изложенное, целью нашего исследования было изучить возможности использования метода дегрануляции тучных клеток для оценки противоаллергического действия нового комбинированного препарата амкесол у животных разного возраста.

Тучные клетки (мастоциты, лаброциты) занимают одно из центральных мест в аллергической реакции. Это – клетки соединительной ткани позвоночных животных с метакроматической зернистостью протоплазмы, способные вырабатывать, сохранять и выделять биологически активные вещества, такие как гепарин, гистамин, серотонин, интерлейкины, нейтральные протеазы. При активации во время аллергической реакции тучные клетки рецепторным путем изменяют свою поверхность и освобождают содержимое гранул в окружающую ткань, т.е. происходит дегрануляция. Биологическая активность названных выше соединений проявляется их влиянием на другие клетки и ткани органов-мишеней, что вызывает внешние признаки гиперчувствительности [5]. Поэтому количество дегранулированных тучных клеток является показателем состояния сенсibilизации организма, на фоне которой проявляется и противоаллергическое действие лекарств [6].

### **Материалы и методы исследования**

Амкесол (АКС), состоящий из амброксола, кетотифена, экстракта корня солодки и теобромина, изучался в виде сиропа (С-АКС) и порошка (П-АКС) соответственно методическим указаниям [7] на крысах разного возраста (1, 2, 3 месяца), которых сенсibilизировали подкожным введением лошадиной сыворотки и вакцины АКДС из расчета 1 мл/200г массы ежедневно на протяжении 7 дней. С 8 по 14 день крысам ежедневно вводили внутрижелудочно С-АКС (0,9 мл/кг) или П-АКС (8 мг/кг). Препарат сравнения сироп кетотифена (С-КТФ) 0,5 мл/100г (0,02% водный р-р) и таблетки кетотифена (Т-КТФ) 0,1 мг/кг (0,001% взвесь в 3% крахмальной слизи) применялись в тех же условиях у отдельных групп животных. На 14 день крыс выводили из опыта в соответствии с требованиями общих правил биоэтики, руководствуясь положениями «Общих этических принципов экспериментов на животных» (Украина, 2001), «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986), а также Хельсинской декларации, принятой Генеральной ассамблеей Всемирной медицинской ассоциации (1964-2000 г.), Статусом Украинской ассоциации по биоэтике и нормам GLP, и готовили взвесь тучных клеток, для чего внутрибрюшинно им вводили 8 мл изотонического раствора натрия хлорида и после легкого массажа брюшной стенки через небольшой разрез собирали экссудат, который стекал с петель кишечника.

Реакцію дегрануляції тучних кліток вивчали по методу Шварца шляхом мікроскопії виготовлених і окрашених 0,3% нейтральним червоним (0,05 мл) препаратів з інтактних тварин, після сенсибілізації і після введення на її фоні досліджуваних препаратів. В мазках підраховували 100 тучних кліток, в тому числі дегранульованих (реакція на алерген в формі розташування гранул по краю цитоплазми).

Тести вважаються негативними, якщо відсоток кліток з такою реакцією не перевищує 10. Крім абсолютного числа інтактних (гранульованих) і дегранульованих тучних кліток, розраховували їх співвідношення, відсоток, індекс дегрануляції (відношення кількості дегранульованих кліток до загальної кількості аналізованих кліток).

Кількісний аналіз функціонального стану тучних кліток доповнювали візуальними спостереженнями за станом тварин (зовнішній вигляд, поведінка, їдальня і питтєва активність) і визначенням маси тіла в динаміці (початкова, на 7 і 14 день досліду). Експеримент виконано на білих мишах лінії Вистар різного статі 1-, 2- і 3-місячного віку з початковою масою тіла відповідно 30-50г, 60-70г, 75-80г. Тварин кожної серії по 6 голів об'єднували в 4 групи: інтактний контроль (1), модель патології – сенсибілізація (2), досліду з АКС (3) і група порівняння з КТФ (4). З урахування двох лікарських форм АКС (сіроп і порошок) всього використано 144 миші.

Достовірність отриманих даних оцінювали з допомогою сучасних статистичних методів [8].

### Результати і їх обговорення

Спостереження за тваринами всіх серій досліду показали, що протягом всього періоду дослідження загальний стан їх зберігався задовільним, про що свідчать збереження їх зовнішнього вигляду, поведінки, нормальної їдальної і питтєвої активності. При цьому динаміка маси тіла відображає збільшення в межах вікової норми, трохи менше виражене у сенсибілізованих мишах (табл. 1).

Таблиця 1.  
Приріст маси тіла (г) в досліджуваних групах тварин

Умовля досліду	С-АКС			П-АКС		
	1 міс.	2 міс.	3 міс.	1 міс.	2 міс.	3 міс.
Контроль	19,3	40,0	30,0	18,7	22,0	25,0
Сенсибілізація	15,3	35,0	20,0	14,9	19,0	23,5
Сенсибілізація+АКС	17,1	40,0	33,0	17,3	23,3	29,0
Сенсибілізація+КТФ	19,5	40,0	35,0	16,1	22,5	32,4

Підрахунок тучних кліток в брюшному ексудаті мишах показав, що на фоні сенсибілізації у них різко зменшується кількість інтактних тучних кліток (ІТК) і збільшується число дегранульованих (ДТК) порівняно з контролем ( $P < 0,05$ ). АКС відновлює початкове співвідношення (ІТК > ДТК), але рівень останніх зберігається ще вище контролю (табл. 2). Ще більш чітко нормалізуючий ефект АКС проявляється при перерахунок його в відсотках, що підтверджується величиною індексу дегрануляції (ІД). Відзначені зміни в стані ТК у сенсибілізованих мишах і під впливом С-АКС свідчать про наявність у препарату протиалергічних властивостей, не поступають препарату порівняння С-КТФ. Ефект АКС во всіх вікових групах тварин був практично однозначним, вказуючи на відсутність вікової залежності в межах досліджуваного віку мишах. Аналогічні результати були отримані і в дослідах з порошком амкесола (таблиця 3), т.е. лікарська форма теж не викликає суттєвого впливу на вираженість досліджуваного дії амкесола. Во всіх спостереженнях руйнування ТК переважувало над вираженістю проявленої метакромазії.

Таким чином, використаний в роботі метод дегрануляції ТК на фоні класичкої сенсибілізації тварин відображає морфометричну перебудову кількості інтактних і дегранульованих ТК з помітним переобладанням останніх. Таке порушення початкового стану ТК є патогенетичною основою початкової стадії алергії без зовнішніх проявів, що властиво дитячому віку [9]. В умовах проведених досліджень у мишах різного віку процеси дегрануляції ТК з виходом гранул в оточуючу тканину переважають над якісними змінами типу метакромазії.

Виходячи з одностороннього впливу АКС на ТК в організмі сенсибілізованих мишах різного віку, препарат проявляє протиалергічний ефект, незалежно від лікарської форми. Встановлений ефект грає важливу патогенетичну роль при бронхо-легочній патології, оскільки серед різних кліток, активуваних антитілами і цитокінами, ТК належить ключова роль в реалізації алергічної реакції. Разом з базофілами вони складають 0,5% всіх кліток бронхіальної слизи і завдяки великій кількості рецепторів взаємодіють з різними медіаторами, в тому числі і з гістаміновими, і імунними білками, які забезпечують в подальшому клінічні прояви алергії і гіперчутливість бронхів [6]. В той же час в межах 1-3 місяців віку у мишах і відповідно 4-14 років у людини вікова залежність проявляється дуже слабо: інтегральні показники (ІД, ІТК/ДТК) змінюються несуттєво і коливаються в межах величин одного порядку. Цей факт має практичне значення для клінічної педіатрії.

Таблица 2.  
Влияние сиропа амкесола на состояние тучных клеток у сенсibilизированных крыс разного возраста

Условия опыта	Возраст крыс											
	1 мес.				2 мес.				3 мес.			
	ИТК	ДТК	ИТК/ДТК	ИД	ИТК	ДТК	ИТК/ДТК	ИД	ИТК	ДТК	ИТК/ДТК	ИД
Контроль	75,8±4,4	0,7±0,08	108,3	0,08	79,8±0,4	3,0±1,4	26,6	0,04	88,2±5,8	2,5±1,0	35,3	0,03
Сенсibilизация	2,3±1,2	86,8±3,5	0,03	0,97	6,5±2,4	88,0±4,7	0,07	0,92	6,0±2,6	92,1±5,0	0,07	0,94
Сенсibilизация +С-АКС	63,3±1,2**	9,8±0,7***	6,5***	0,04***	68,2±2,1**	9,3±1,6**	7,3***	0,07	64,7±3,7***	8,7±1,4***	7,5***	0,09***
Сенсibilизация +С-КТФ	60,3±6,8**	10,2±1,5***	5,9***	0,06***	62,5±2,4**	13,0±1,4**	14,8**	0,08**	60,5±1,0***	10,0±1,4**	6,3***	0,10***

Примечание: \* -  $P < 0,05$  сравнительно с контролем

\*\*\* -  $P < 0,05$  сравнительно с сенсibilизацией

Таблица 3.  
Влияние порошка амкесола на состояние тучных клеток у сенсibilизированных крыс разного возраста

Условия опыта	Возраст крыс											
	1 мес.				2 мес.				3 мес.			
	ИТК	ДТК	ИТК/ДТК	ИД	ИТК	ДТК	ИТК/ДТК	ИД	ИТК	ДТК	ИТК/ДТК	ИД
Контроль	79,5±5,1	0,8±0,08	99,4	0,01	87,8±4,7	1,2±1,0	51,7	0,01	94,7±8,2	1,2±0,03	78,9	0,01
Сенсibilизация	8,3±1,4	73,2±5,3	0,1	0,90	7,0±2,6	81,5±3,4	0,09	0,92	3,8±1,5	91,0±4,7	0,04	0,96
Сенсibilизация +П-АКС	68,8±3,7**	8,7±1,0***	7,6**	0,12**	71,7±3,9**	8,5±1,0**	8,4**	0,11***	67,0±4,1***	7,8±1,5***	8,6**	0,1**
Сенсibilизация +П-КТФ	60,3±1,5***	10,2±1,5***	5,9**	0,14**	76,5±4,0**	9,0±1,4**	8,5**	0,17**	60,5±4,1***	10,0±1,4***	6,1**	0,14***

Примечание: см. к табл. 2

### Выводы

1. Дегрануляция тучных клеток на фоне классической сенсibilизации является показательным методом для выявления противоаллергического действия лекарственных средств.
2. Амкесол в виде сиропа (0,9 мл/кг) и порошка (8 мг/кг) проявляет противоаллергическое действие, предупреждая дегрануляцию тучных клеток у сенсibilизированных крыс, не уступая эффекту кетотифена.
3. Противоаллергическое действие амкесола не зависит от примененной лекарственной формы (сироп, порошок) и возраста животных (1-3 месяца).

### Литература

1. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика», М., 2006, С. 57-63.
2. Середа Е.В. Роль аллергического компонента в механизме бронхо-легочной обструкции при хронических бронхолегочных заболеваниях у детей / Середа Е.В., Лукина О.Ф., Катасонова Л.К., Платонова М.М. // Сб. резюме 11 Нац. конгресса по болезням органов дыхания, М., 2001, т. II, С. 318.
3. Доклінічні дослідження лікарських засобів. Методичні рекомендації / За редакцією О.В. Стефанова. – Київ «Авіцена», 2001, - 528 с.
4. Моделирование заболеваний / Под редакцией С.В. Андреева. – М.: Медицина, 1973. – С. 14-35.
5. Тучные клетки / БМЭ, 1989. – С. 1415-1421.
6. Арташанян О.С. Система тучных клеток при действии на организм экстремальных факторов /автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. биол. н. / О.С. Арташанян. – Екатеринбург, 2006. – 21 с.
7. Алексеева О.Г. Непрямой тест Шелли и реакция дегрануляции тучных клеток по Шварцу (РДТК) / О.Г. Алексеева, Л.А. Дуева // Аллергия к промышленным химическим соединениям. М.: Медицина, 1978. – С. 235-240.
8. Гланц С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц // перевод с англ. М.: Практика, 1998. – 459 с.
9. Зеленский А.Ф. К вопросу об аллергии в респираторной патологии у детей раннего возраста / А.Ф. Зеленский, О.Л. Переладова // Аллергия в патологии детства, М.: Медицина, 1969. – С. 78-81.

УДК 611-018.5:616-018:54:616.36:591.4:616.36-002:615.838/849

*Кисельова Т.М., Шаповалова О.Ю., Пушкар М.С., Соловйова Л.О., Тереховська О. І., Харковенко Р. В.*

## **ЗАКОНОМІРНОСТІ ЗВ'ЯЗУВАННЯ ЛЕКТИНА АРАХІСА (PNA) СТРУКТУРАМИ ПЕЧІНКИ ЩУРІВ З МОДЕЛЬОВАНИМ АУТОІМУННИМ ГЕПАТИТОМ ТА ПРИ ДІЇ ВОДНИМИ ТА РАДОНОВИМИ ВАННАМИ.**

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Кримський Національний медичний університет ім. Георгієвського М.І.,

*При определении PNA-положительных соединений выявлены до этого неизвестные периоды перестроения структурных компонентов печени крыс в норме, при АИГ, а также АИГ после двух курсов водных и радоновых ванн: обнаружены изменения гликоконъюгатов на поверхности и в цитоплазме клеток паренхимы и стромы печени под воздействием патологического процесса – гепатита и гепатита в условиях воздействия на организм радоновых процедур - отображают определенную последовательность включения разных механизмов патоморфогенеза и адаптации.*

Ключевые слова: гликополимеры, гликоконъюгаты, лектин арахиса (PNA), бензидиновая метка, аутоиммунный гепатит (АИГ), структуры долек и триад, радон.

Найсучаснішим методом вивчення глікополімерів, якими є глікопротеїни та гліколіпіди в клітинах і тканинних екстрацелюлярних структурах, зокрема в процесі морфогенезу, патогенезу захворювань і канцерогенезу, стала лектиногістохімія (Волошин Н.А., 2004, 2005). Глікополімерні сполуки складають структурну і функціональну основу клітин і тканин, входять до складу плазматичних мембран, глікокаліксу, цитоплазматичних включень, сполучнотканинних волокон і аморфної речовини. Вони фактично є сигнальними і рецепторними молекулами.

Лектин (Lectin) – представник групи білків, що має здатність специфічно сполучатись з розгалуженими вуглеводними молекулами глікопротеїнів і гліколіпідів. Існують чисельні ендогенні лектини. Синтез і послідовність появи глікокон'югатів на поверхні клітин генетично детерміновані, отже й змінюються в умовах патологічних процесів (Ponder V.A., 2005; Чемоданова О.І., 2003; Ушаков А.В., 2005; Чайковський Ю.Б., 2006; Brooks S.A., 2000) - так само, як детерміновані синтез і послідовність включення в плазмолему (або вихід з неї) ендогенних лектинів. Існування в організмі в онтогенезі розпізнавання й зв'язування таких глікополімерів ендогенними лектинами, що має назву «лектин-рецепторні взаємодії», може запускати лектинозалежні регуляції клітинних функцій і клітинно-взаємодії, що обумовлюють диференціювання, адаптацію тканин. В наукових морфологічних дослідженнях використовуються численні екзогенні лектини, які отримують переважно з насіння різних рослин. Лектини застосовуються в якості селективних та чуттєвих зондів, що дозволяють вивчати розподілення вуглевод утримуючих молекул - глікокон'югатів – у тканинних та клітинних структурах (Луцик А. Д. та ін., 1989; Franceschini V. та ін., 1994).

В основі властивості лектинів вибірково зв'язуватись з окремими типами клітин, а у ряді випадків із окремими субпопуляціями у складі нерозпізнаних за іншими морфо- і гістогенетичними ознаками клітинних елементів лежить їхня властивість проявляти максимальну спорідненість до олігосахаридів строго визначеної структури.