

ФАРМАКОЛОГИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ОРИГИНАЛЬНОГО ВЕЩЕСТВА ПСЕВДОПЕПТИДНОЙ ПРИРОДЫ ИНГАМИНА НА МОДЕЛЯХ БРОНХОСПАЗМА

В. Л. Ковалева¹, В. Е. Небольсин³, А. А. Карабиненко²,
Г. А. Желтухина³, Д. Б. Утешев²

На традиционных моделях антиген-индуцированного бронхоспазма у активно сенсибилизированных морских свинок изучали протекторный эффект оригинального вещества из класса псевдопептидов ингамина (4- {N-[2-(имидазол-4-ил)этил]-карбамоил}масляная кислота) при различных способах введения (ингаляционно, внутривнутрибрюшинно, внутривнутрижелудочно) в широком диапазоне разовых доз (20 – 50 – 150 – 500 мкг/кг). Результаты экспериментов продемонстрировали выраженную протекторную активность оригинального псевдопептида. Следует подчеркнуть, что хотя ингамин обнаружил дозозависимый эффект при всех способах введения, но оказался наиболее эффективным при ингаляционном пути введения (торможение бронхоспазма составило более 80 %). При сравнении в эквимольных дозах ингамин проявлял более высокую активность, чем препарат сравнения кромогликат натрия, также оказывающий протекторное действие в отношении антиген-зависимых бронхоспастических реакций. Полученные данные позволяют прогнозировать эффективность ингамина в отношении бронхообструкции в условиях клиники.

Ключевые слова: модели бронхоспазма, антиген-зависимый бронхоспазм у морских свинок, псевдопептиды, биогенные амины

ВВЕДЕНИЕ

Бронхообструктивный синдром и связанные с ним нарушения бронхокинетической функции дыхательных путей представляют наиболее существенный признак бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Для успешной терапии бронхообструкции используют препараты бронхолитического действия, среди которых доминируют ингаляционные β_2 -адреномиметики и холиноблокаторы, быстро купирующие бронхоспазм. Но не менее важное значение для исхода заболевания, чем бронхолитики, имеют лекарственные средства, способные предупредить развитие бронхоспастической реакции в ответ на различные специфические (антигены) и неспецифические стимулы [1, 7, 9, 13].

В связи с этим представляют интерес γ -глутамильные производные биогенных аминов, в частности, γ -L-глутамилгистамин и его оригинальные синтетические аналоги из класса низкомолекулярных псевдопептидов. Ранее было показано, что указанные соединения проявляют различные виды фармакологической

активности, модулируют метаболизм арахидоновой кислоты, биосинтез цитокинов, регулируют содержание кортикостероидных гормонов, то есть оказывают воздействие на факторы, играющие решающую роль в генезе бронхоспазма [3 – 6].

Исходя из полученных данных, мы предположили возможность подавления интенсивности развития бронхоспастической реакции *in vivo* указанными веществами при условии их превентивного введения.

Целью данной работы явилось исследование на моделях бронхоспазма *in vivo* одного из синтетических аналогов эндогенного псевдопептида — ингамина, являющегося по химической структуре 4- {N-[2-(имидазол-4-ил)этил]- карбамоил}масляной кислотой. Синтез ингамина был осуществлен на кафедре химии и технологии тонких химических соединений Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В экспериментах были использованы морские свинки самцы и самки с массой 300 – 450 г, которые содержались в стандартных условиях вивария ВНИЦ БАВ.

1. Модель антиген-индуцированного бронхоспазма у активно сенсибилизированных наркотизированных морских свинок [2].

Морских свинок активно сенсибилизировали по методу [8] однократным внутримышечным введением смеси (0,5 мл) овальбумина (III Grade, “Sigma”) в количестве 20 мкг и гидроокиси алюминия (адьювант) в количестве 100 мг на свинку. Через 21 – 28 сут после начала сенсибилизации начинали экспери-

¹ Лаборатория бронхолитических средств (руководитель — проф. В. Л. Ковалева) Всероссийского научного центра по безопасности биологически активных веществ (ГУП “ВНИЦ БАВ”); Старая Купавна, Ногинского района Московской обл., 142450, ул. Кирова, 23.

² Российский медицинский университет, Москва

³ ООО “Фарминтерпрайвез”, Москва.

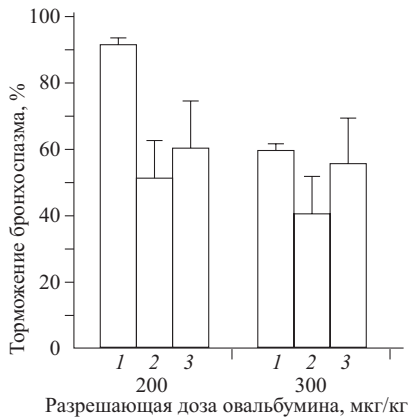


Рис. 1. Торможение антиген-индуцированного бронхоспазма у морских свинок под воздействием ингamina в дозах 50 (1), 150 (2) и 500 (3) мкг/кг внутрь.

мент: к этому сроку образуются IgE, антитела в высоком титре и после введения разрешающей дозы антигена у морских свинок развивается сильная бронхоспастическая реакция [8, 11].

У наркотизированной морской свинки (этамилал-натрий 70 мг/кг, внутрибрюшинно) выделяли трахею, вставляли в нее канюлю, которую подсоединяли с помощью системы полихлорвиниловых трубок к датчику бронхоспазма и аппарату искусственной вентиляции легких (Ugo Basile). В течение эксперимента поддерживали определенный режим дыхания: V дыхания — 6–8 мл, частота — 70 в мин. Разрешающую дозу овальбумина 200–300–400 мкг/кг вводили в *v. jugularis*.

Изменение сопротивления дыхательных путей воздушному потоку регистрировали по [12] с помощью самописца, присоединенного к датчику бронхоспазма (Ugo Basile). Величину бронхоспазма, индуцированного антигеном, измеряли по степени увеличения сопротивления дыхательных путей. Ответ бронхов на антиген мониторировали в течение 20–30 мин.

Эффект исследуемого соединения оценивали по степени торможения бронхоспазма, выраженного в процентах по отношению к максимальной бронхоконстрикторной реакции, которую принимали за 100%. Исследуемое вещество (ингaмин) вводили внутривентриально, внутривентриально или ингаляционно за 72, 48 и 18 ч до разрешающей дозы овальбумина.

Для изучения эффектов ингaмина при ингаляционном воздействии были использованы 2 лекарственных формы: 1) в виде водного раствора, вводимого животным с помощью компрессорного небулайзера; 2) сухого порошка с лактозой. Во втором случае диаметр основной массы частиц изучаемого вещества составлял не более 10 мкм, а диаметр частиц лактозы в среднем составлял около 250 мкм (определение микроскопически с помощью микрометра). Введение порошка морским свинкам осуществляли с помощью дозирующего устройства — лабораторного аналога циклохалера.

2. Модель анафилактического бронхоспазма у ненаркотизированных морских свинок при аэрозольном воздействии антигена [2].

Таблица 1. Зависимость протекторного эффекта ингaмина от величины разовой дозы при внутривентриальном введении (разрешающая доза ОА 200 мкг/кг)

Группа животных (n = 6–9)	Величина бронхоспазма (% от максимального, M ± m)
Контроль	78,0 ± 8,84
IG 20 мкг/кг	38,3 ± 11,9*
IG 50 мкг/кг	9,71 ± 3,6**
IG 150 мкг/кг	47 ± 14,5*

* p < 0,05;

** p < 0,01 к контролю.

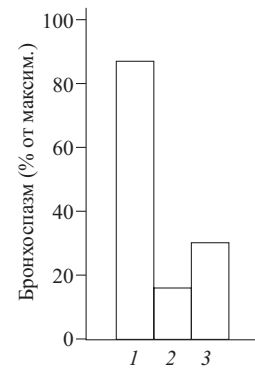


Рис. 2. Сравнение протективных эффектов ингaмина в дозе 50 мкг/кг на модели антиген-индуцированного бронхоспазма у морских свинок при внутривентриальном (2) и внутрибрюшинном (3) способах введения.

1 — контроль.

Морских свинок активно сенсибилизировали способом, описанным выше. Через 3–4 нед после сенсибилизации анафилактическую реакцию у животных (в специальной камере из плексиглаза) вызывали разрешающей дозой овальбумина, который вводили в виде аэрозоля (0,5% в 0,9% растворе NaCl) с помощью небулайзера. Ингаляцию ингaмина (раствор субстанции в дистиллированной воде в объеме 1 мл/животное) осуществляли за 72, 48 и 18 ч и 15 мин до разрешающей дозы овальбумина, который вводили тем же способом. Контрольные животные получали по 1 мл дистиллированной воды. В ряде экспериментов в качестве препарата сравнения использовали кромогликат натрия (ЛЕК, Словения), который ингалировали аналогичным образом. Эффект вещества оценивали по длительности латентного периода (сек) между началом ингаляции и выраженными признаками бронхоспастической реакции (характерная поза, тахипное, сокращение абдоминальных мышц).

Полученные данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния ингaмина (IG) на антиген-индуцированный бронхоспазм у активно сенсибилизированных морских свинок в зависимости от дозы и способа введения.

В этой серии экспериментов исследовали зависимость протекторного эффекта ингaмина от дозы изучаемого вещества в условиях предварительного (за 72, 48 и 24 ч до разрешения антигеном) введения.

Результаты, представленные в табл. 1 и на рис. 1, показывают, что ингaмин в условиях предварительного внутривентриального введения за 72, 48 и 18 ч до разрешения в диапазоне разовых доз 20–50–150–500 мкг/кг существенно снижает интенсивность бронхоспастической реакции у иммунизированных морских свинок, причем выраженность эффекта находилась в зависимости от используемой дозы вещества и разрешающей дозы овальбумина. Наиболее значительное торможение бронхоспазма наблюдалось при использовании дозы ингaмина, равной 50 мкг/кг и ОА, равной 200 мкг/кг (торможение бронхоспазма составило 88–90%, то есть бронхоспазм практически не развивался). Вещество в более высоких дозах — 150 и 500 мкг/кг вызывало не усиление, а наоборот, снижение

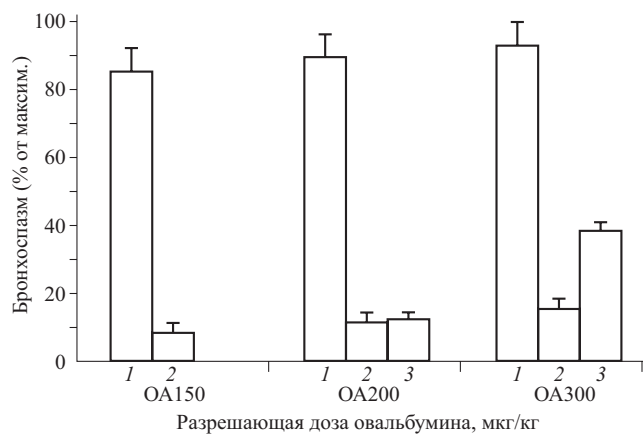


Рис. 3. Сравнительная оценка протективного внутрижелудочного (3) и ингаляционного (2) воздействия ингамина на развитие антиген-индуцированного бронхоспазма у морских свинок.

1 — контроль.

эффекта, причем различие в эффектах от применения указанных доз, не было выявлено.

Этот эффект был менее выражен в случае использования более высоких разрешающих доз ОА (300 и 400 мкг/кг): в первом случае торможение бронхоспазма составило 60–55 %, во втором — 30,5 %. Следует отметить, что даже при использовании большой разрешающей дозы ОА величина бронхоспазма у животных, предварительно леченых ингаминем, была достоверно ниже, чем у контрольных (без лечения) животных.

Результаты другой серии экспериментов показывают, что ингамин при той же схеме введения в дозе 50 мкг/кг — эффективен в снижении бронхоспазма у морских свинок при внутрижелудочном и внутрибрюшинном путях введения (рис. 2).

Полученные данные свидетельствуют о том, что ингамин, вводимый различными способами превентивно за 72, 48 и 18 ч до разрешения овальбумином, в условиях антиген-зависимого бронхоспазма эффективен при использовании в низких дозах (50 мкг/кг) и что кривая “доза — эффект” имеет сложный характер.

Исследование влияния ингамина (IG) на анафилактический бронхоспазм у активно иммунизированных морских свинок при ингаляционном введении.

Показано, что ингамин в дозе 50 мкг/кг, вводимый в виде сухого порошка, вызывает существенное торможение антиген-индуцированной бронхоконстрикции у наркотизированных морских свинок: торможение бронхоспазма составляло $92 \pm 2,2$ %. Важно отметить, что этот эффект ингаляционного воздействия сохранялся и в случае повышения разрешающей дозы антигена до 300 мкг/кг, тогда как при введении внутрь (50 мкг/кг) он достоверно снижался ($p < 0,01$) (рис. 3). Кроме того, сравнение динамики бронхоспазма у животных, получавших ингамин (50 мкг/кг) ингаляционно в виде сухого порошка и препарата сравнения кромогликата натрия (1 мг/кг) выявило более значительный эффект первого по сравнению со вторым, поскольку доза кромогликата натрия превышала дозу

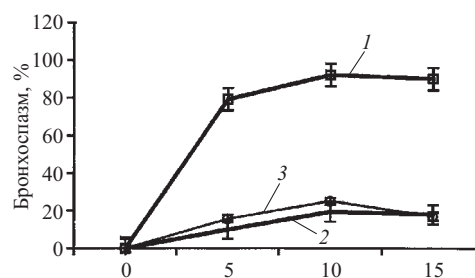


Рис. 4. Сравнительная оценка протективного ингаляционного воздействия ингамина и кромогликата натрия на антиген-индуцированный бронхоспазм у морских свинок.

1 — контроль, 2 — ингамин 0,05 мг/кг, 3 — кромогликат натрия 1 мг/кг. По оси абсцисс — время развития бронхоспазма после разрешающей дозы ОА 200 мкг/кг.

ингамина в 20 раз (рис. 4). Кроме того, через 20–30 мин после введения разрешающей дозы овальбумина у леченых животных в отличие от контроля восстанавливается нормальное дыхание. В других экспериментах изучали эффект ингаляционного введения водного раствора ингамина с помощью небулайзера в сравнении с кромогликатом натрия на модели антиген-индуцированного бронхоспазма у морских свинок с ингаляционным введением разрешающей дозы ОА. Ингамин вводили в дозах 125 и 500 мкг/мл (доза 125 мкг/кг IG эквивалентна использованной дозе кромогликата натрия, равной 50 мкг/мл).

Из данных, представленных в табл. 2, следует, что ингамин при ингаляционном введении с помощью небулайзера в использованных дозах также вызывает протекторный эффект. Этот эффект отчетливо продемонстрирован в экспериментах, отличающихся величиной разрешающей дозы антигена: в первом случае длительность острой фазы бронхоконстрикторной реакции у леченых животных в 2 раза, а во втором случае — в 3 раза короче, чем в контроле. В первом эксперименте различие с контролем статистически недостоверно из-за большой ошибки средней. Очевидно, что при этом способе введения повышение дозы ингамина до 500 мкг/мл существенно усилило его протекторное действие. Следует отметить, что препарат сравнения — кромогликат натрия — в эквивалентной дозе не уменьшал выраженности бронхоспастической реакции.

Итак, для изучения протекторного эффекта ингамина использовали традиционные экспериментальные модели, наиболее адекватно воспроизводящие патологические изменения функции дыхательных путей, характерные для нарушений бронхокинетики при бронхиальной астме. Эти изменения выражаются, как было показано ранее [10, 11], в гиперреактивной реакции бронхов на антигенный и неспецифические стимулы, острой обструкции бронхов и катаральных изменениях слизистой бронхов сенсibilизированных животных. Эффективность ингамина выявили при его использовании в интервале доз от 20 мкг/кг до 500 мкг/кг и при разных способах введения: ингаляционном, внутрибрюшинном, внутрижелудочном. Результаты

Таблица 2. Протекторный эффект ингamina при ингаляционном введении с помощью небулайзера на модели антиген-индуцированного бронхоспазма у ненаркотизированных морских свинок в сравнении с кромогликатом натрия

Группы животных, (n = 6)	Длительность острой фазы бронхоконстрикции, с (M ± m)
Контроль-1 Овальбумин, 2,5 мг/мл	420 ± 109
IG, 125 мкг/мл	266 ± 93
Кромогликат натрия, 50 мкг/мл	486 ± 96
Контроль-2 Овальбумин, 5 мг/кг	255 ± 39
IG, 500 мкг/мл	83 ± 39*

Примечание. Во всех трех группах длительность времени ингаляции разрешающей дозы ОА — 180 с. * — $p < 0,01$.

экспериментов продемонстрировали выраженную протекторную активность оригинального псевдопептида. Следует подчеркнуть, что хотя ингaмин обнаружил дозозависимый эффект при всех способах введения — ингаляционном, внутрижелудочном, внутрибрюшинном, но оказался, во-первых, наиболее эффективным при ингаляционном пути введения (торможение бронхоспазма составило более 80 %); во-вторых, более активным (в одних экспериментах при сравнении в эквимолярных дозах, в других — в меньших дозах), чем кромогликат натрия, также оказывающий протекторное действие в отношении анафилактических реакций. Полученные данные позволяют прогнозировать эффективность ингaмина в отношении бронхообструкции в условиях клиники.

ВЫВОДЫ

1. Оригинальное вещество из класса низкомолекулярных псевдопептидов ингaмин оказывает выраженное протекторное действие в отношении антиген-индуцированной бронхоконстрикции у морских свинок *in vivo*.

2. Ингaмин проявляет фармакологическую активность при курсовом введении внутрь (за 72, 48 и 24 ч до разрешения антигеном) в диапазоне низких доз (20-50-150-500 мкг/кг), достигая максимального эффекта в дозе 50 мкг/кг (торможение бронхоспазма составляет 80–92 %). С повышением дозы до

150–500 мкг/кг протекторный эффект псевдопептида, наоборот, снижается.

3. Ингaмин предупреждает развитие бронхоконстрикторной реакции при всех способах введения — ингаляционном, внутрижелудочном, внутрибрюшинном, но наибольший эффект (в случае использования одной и той же дозы — 50 мкг/кг) проявляет при ингаляционном введении.

4. Ингаляции иммунизированным морским свинкам ингaмина в виде сухого порошка (через циклохалер), и виде водного раствора (через небулайзер) практически полностью блокирует развитие бронхоспазма.

5. По степени выраженности протекторного действия при ингаляционном введении ингaмин превосходит кромогликат натрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. И. С. Гушин, *Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль*, Фармарус Принт, Москва (1998).
2. В. Л. Ковалева, *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000).
3. В. Л. Ковалева, В. Е. Небольсин, А. Г. Чучалин и др., *9 Национальный конгресс по болезням органов дыхания. Тез. доклада*, Москва (1999), с. 254.
4. В. Л. Ковалева, В. Е. Небольсин, А. Г. Чучалин и др., *10 Национальный конгресс по болезням органов дыхания*, С. Петербург (2000), с. 197.
5. В. Е. Небольсин, *Автореферат дисс. канд. хим. наук*, Москва (1999).
6. В. Е. Небольсин, Г. А. Желтухина, В. В. Кржечковская, В. Л. Ковалева, *Вопр. мед. химии*, с. 45–49 (2000).
7. А. Г. Чучалин, *Хронические обструктивные болезни легких*, “Издательство Бином”, Москва; “Невский диалект”, С.-Петербург (1998).
8. P. Anderson, *Allergy*, **35**, 63–71 (1980).
9. P. J. Barnes, *Curr Opin Pharmacol.*, **1**, 217–222 (2001).
10. P. A. Hutson, M. K. Church, T. P. O. Clay, et al., *Am Rev. Respir. Dis.*, **137**, 548–557 (1988).
11. P. Kallos and L. Kallos., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **73**, 77–85 (1984).
12. H. Konzett and R. Rossler, *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharm.*, **195**, 71–74 (1940).
13. R. A. Pauwels, A. S. Buist, P. Ma, et al., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **163**, 1256–1276 (2001).

Поступила 05.04.04

THE PROTECTOR PROPERTIES OF A PSEUDOPEPTIDE DRUG INGAMINE STUDIED ON A MODEL OF BRONCHOSPASM IN GUINEA PIGS

V. L. Kovaleva¹, V. E. Nebol'sin², A. A. Karabinenko³, G. A. Zheltukhina², and D. B. Uteshev³

¹ Department of Broncholytic Drugs, All-Russia Center for Safety Testing of Biologically Active Compound, p/o Staraya Kupavna, Moscow oblast, 142450 Russia

² Pharmenterprises Ltd., Moscow, Russia

³ Department of Pharmacology, State Medical University, ul. Ostrovityanova 1, Moscow, 117487 Russia

The original pseudopeptide drug ingamine (4-{N-[2-(imidazol-4-yl)ethyl]-carbomoyl}butyric acid) was studied on the traditional model of antigen-induced bronchospasm in actively sensitized guinea pigs. The drug was introduced using various methods (by inhalation, via intragastric tube, and by intraperitoneal injections) in a range of doses (20, 50, 150, or 500 mg/kg). The new drug exhibited a pronounced dose-dependent protector action for all ways of introduction, but the most significant effect was observed upon inhalation, whereby the degree of bronchospasm inhibition exceeded 80 %. In comparison to the reference drug sodium cromoglycate, ingamine (in equimolar doses) showed a higher activity with respect to the antigen-dependent bronchospastic reactions. It can be expected that ingamine will provide for the effective treatment of bronchial obstruction under clinical conditions.