

ФАРМАКОЛОГИЯ ДЫХАТЕЛЬНОЙ СИСТЕМЫ

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА — ИНГАМИНА™ НА МОДЕЛИ НЕИНФЕКЦИОННОГО ВОСПАЛЕНИЯ ЛЕГКИХ

В. Л. Ковалева¹, В. Е. Небольсин³, О. В. Макарова², Е. М. Носейкина¹,
Л. П. Михайлова²

На моделях острого воспаления и воспалительного процесса легких в фазе хронизации у крыс линии Вистар, индуцированных однократной инстилляцией сефадекса в дозе 5 мг/кг, продемонстрирована выраженная противовоспалительная активность потенциального лекарственного средства — ингамина™ (глутарилгистамина). Курсовое (6-дневное) лечение крыс ингамином™ в дозах 50 – 500 мкг/кг при ингаляционном, внутрижелудочном, внутрибрюшинном путях введения вызывает выраженный в разной степени противовоспалительный эффект, проявляющийся в уменьшении явлений альвеолита, бронхита, обструктивной эмфиземы, лимфоцитарно-нейтрофильной инфильтрации межальвеолярных перегородок, а также цитоза, нейтрофильного компонента бронхоальвеолярного смыва, и нормализацией цитограммы. Наиболее значительный эффект был достигнут при ингаляционном пути введения вещества в дозе 500 мкг/кг. В фазе хронизации воспалительного процесса в легком ингаляционное введение ингамина™ 500 мкг/кг оказало значительное противовоспалительное действие независимо от длительности курса (10 или 20-дневного), которое по степени выраженности было сопоставимо с эффектом ингаляционного кортикостероида будесонида.

Ключевые слова: воспаление, сефадекс-индуцированное воспаление легких у крыс Вистар, модель воспаления легких, псевдопептиды

ВВЕДЕНИЕ

Ранее показано, что некоторые низкомолекулярные эндогенные псевдопептиды и их аналоги, являющиеся производными биогенных аминов, обладают высокой фармакологической активностью, которая заключается в способности регулировать метаболизм арахидоновой кислоты, синтез цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6), содержание кортикостероидных гормонов [4 – 6]. Указанные факторы играют ключевую роль в генезе различных патологических процессов, в том числе в развитии воспаления. Целью данной работы явилось исследование на модели неинфекционного воспаления легких активности потенциального лекарственного средства ингамина™, представляющего по химической структуре 4- $\{N-[2-(\text{имидазол-4-ил})\text{этил}]\text{карбамоил}\}$ масляную кислоту.

Изучали влияние ингамина™ на развитие острого и хронического воспаления легких, индуцированного сефадексом, у крыс Вистар; на изучение зависимости доза-эффект и сравнение эффективности разных способов введения ингамина™ в условиях указанной модели.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В опытах использованы крысы-самцы породы Вистар с массой тела 250 – 300 г. Воспаление легких крыс индуцировали ингаляционным введением сефадекса А-25 (гидрофильного порошка с преобладанием частиц с диаметром 20 – 40 мкм). В предыдущих исследованиях показано, что инстилляцией порошка сефадекса (высокомолекулярного полимера — декстрана, обладающего адьювантными свойствами) в дыхательные пути крыс Вистар вызывает в легких динамически развивающийся неинфекционный воспалительный процесс [3, 8].

Методика ингаляционного введения сефадекса и фармакологических веществ

Крысам (8 – 10 в группе) с помощью дозирующего устройства, являющегося лабораторным аналогом ингалятора Циклохалера (НИИ пульмонологии РФ), под легким эфирным наркозом однократно вводили сефадекс А-25 в дозе 5 мг на 1 кг массы тела. Через 1 ч на-

¹ Сектор бронхолитических средств (руководитель — проф. В. Л. Ковалева) Всероссийского научного центра по безопасности биологически активных веществ, п/о Старая Купавна Ногинского района Московской области, 142450, ул. Кирова, 23.

² Лаборатория иммуноморфологии воспаления (руководитель — проф. О. В. Макарова) НИИ морфологии человека РАМН; Москва.

³ ООО “Фарминтерпрайсеиз”, Москва.

чинали введение изучаемых веществ в дозах 50 и 500 мкг/кг внутрибрюшинно, внутрижелудочно в 0,5 мл 0,9 % физиологического раствора либо аэрозольным путем с помощью того же лабораторного ингалятора (инстиляция сухого порошка, представляющего смесь с лактозой). Основанием для выбора доз послужили данные экспериментов, проведенных на моделях бронхоспазма [6].

Вещества вводили одним из трех указанных выше способов ежедневно 1 раз в сутки в одни и те же утренние часы. Курс введения веществ продолжался в течение 6 дней в остром и 10 – 20 дней в хроническом вариантах эксперимента.

В качестве референтного препарата использовали будесонид (отечественный ингаляционный кортикостероид). Контроль был представлен 2 группами: группой интактных животных (негативный контроль) и группой крыс, которым ингаляционно вводился сефадекс (позитивный контроль).

В одном варианте опыта действие ингamina™ на развитие воспалительного процесса в легких исследовали через 7 сут после аэрозольного воздействия сефадекса, так как в предыдущих работах было показано, что острое экссудативное сефадекс-индуцированное воспаление при своем спонтанном развитии достигает максимума на 7 – 14 сутки наблюдения. Влияние ингamina™ на продуктивную фазу воспаления оценивали через 30 сут после введения сефадекса, когда выявляется хронизация воспалительного процесса.

Оценку терапевтического действия ингamina™ производили с помощью гистологических, морфометрических методов, а также данных цитологического исследования бронхоальвеолярного смыва (БАС). Реакцию иммунной системы легких на ингаляцию сефадекса и терапевтическое воздействие веществ определяли морфометрически по степени выраженности гиперплазии бронхоассоциированной лимфоидной ткани [5].

В гистологических срезах легких толщиной 4 – 5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином подсчитывали число нейтрофилов в межальвеолярных перегородках в поле зрения при увеличении $\times 400$. Методом точечного счета с помощью сетки Автандилова определяли объемную плотность альвеолита и эмфиземы [1]. Морфометрическое исследование бронхоассоциированной лимфоидной ткани легких проводили под лупой ($\times 7$) в макропрепаратах легких, фиксированных по методу J. Weinstock и соавт. [7].

Бронхоальвеолярный смыв получали под гексеновым наркозом путем двукратного промывания легких через трахею 5 мл 0,9 % физиологического раствора при 37 °С. Жизнеспособность клеток оценивали в тесте с трипановым синим. В камере Горяева определяли абсолютное число клеток (цитоз) в 1 мкл бронхоальвеолярного смыва. В мазках из осадка жидкости БАС, окрашенных по Романовскому-Гимзе, подсчитывали

вали эндопульмональную цитограмму, а затем абсолютное количество клеточных популяций в 1 мкл БАС [2].

Результаты исследований обработаны методами вариационной статистики с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

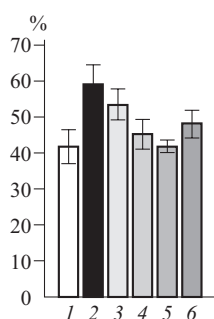
1. *Исследование влияния ингamina™ при различных способах введения на острое сефадекс-индуцированное воспаление легких крыс.*

Аэрозольное введение сефадекса приводило к развитию выраженных воспалительных изменений в легких крыс: через 7 сут после ингаляции порошка (модель) в легких выявлялись острый бронхит, нейтрофильный альвеолит, множественные мелкие очаги дистелектазов, эмфизема, гиперплазия бронхоассоциированной лимфоидной ткани.

При морфометрической оценке показатель объемной плотности эмфиземы (острой обструктивной) был в 4,3 раза выше, чем у интактных животных. Относительная объемная плотность альвеолита составила через 7 сут — $14,6 \pm 3,7$ % от общей площади легкого (табл. 1). Количество нейтрофилов в межальвеолярных перегородках было в 9,6 раза выше, чем в интактном контроле ($p < 0,01$). При цитологическом исследовании бронхоальвеолярного смыва отмечены достоверное увеличение показателей цитоза, относительного содержания лимфоцитов и нейтрофилов (табл. 2). Реакция бронхоассоциированной лимфоидной ткани на введение сефадекса выражалась в увеличении объемной плотности лимфоидных фолликулов (рисунок).

Как видно из данных табл. 1 и 2, ингamin™ при ингаляционном способе введения в обеих исследованных дозах 50 и 500 мкг/кг вызывал значительное дозозависимое уменьшение распространенности альвеолита (в 1,7 и 2,5 раз соответственно) и эмфиземы (в 4,5 и 8 раз соответственно) по сравнению с нелечеными животными (табл. 1). Однако существенное снижение абсолютного ($12,6 \pm 2,4$ и $11,6 \pm 2,0$ против $26,4 \pm 1,9$ и $31,6 \pm 3,5$ в группе “модель”, $p < 0,05$) и процентного содержания нейтрофилов и лимфоцитов в БАС по сравнению с нелеченым контролем выявлено лишь при использовании дозы 500 мкг/кг (табл. 2). Кроме того, ингamin™ в этой же дозе достоверно уменьшал количество нейтрофилов в паренхиме легкого и подавлял гиперплазию бронхоассоциированной лимфоидной ткани, вызванную сефадексом (рисунок).

Ингamin™ (50 и 500 мкг/кг) при внутрижелудочном способе введения так же дозозависимо снижал показатель объемной плотности альвеолита (в 1,7 и 2 соответственно). Однако показатель объемной плотности эмфиземы был ниже по сравнению с нелеченым контролем только при использовании более низкой дозы — 50 мкг/кг (табл. 1). В отличие от ингаляционного внутрижелудочное введение ингamina™ не уме-



Объемная плотность (в %) бронхоассоциированной лимфоидной ткани у крыс Вистар после аэрозольного воздействия сефадекса А-25 и лечения ингamiном™.

1 — интактный контроль, 2 — сефадекс А-25; ингамин™ ингаляционно: 3 — 50 мкг/кг, 4 — 500 мкг/кг; внутрижелудочно: 5 — 50 мкг/кг, 6 — 500 мкг/кг.

нышало содержания нейтрофилов в БАС; снижалось лишь количество лимфоцитов (табл. 2). Показатель объемной плотности бронхоассоциированной лимфоидной ткани достоверно уменьшался при использовании обеих доз (рисунок).

В другом эксперименте при сравнении эффективности трех путей введения ингамина™ (ингаляционного, внутрижелудочного и внутрибрюшинного) с помощью цитологического анализа БАС показано, что наиболее выраженное подавление нейтрофильного компонента воспаления в легких крыс по сравнению с моделью также достигается при курсовом ингаляционном введении исследуемого вещества в разовой дозе 500 мкг/кг (табл. 3). Это подтверждается в первую очередь значительным снижением содержания нейтрофилов в БАС — в 9–10 раз по сравнению с позитивным контролем и, кроме того, уменьшением цитоза и абсолютного количества лимфоцитов в БАС в группе животных, получавших ингамин™ ингаляционным путем.

Таким образом, ингамин™ в диапазоне доз 50–500 мкг/кг подавляет экссудативный компонент сефадекс-индуцированного воспаления в легких крыс при трех способах курсового (в течение 6 дней) введения вещества, но более всего эта активность выражена

Таблица 1. Морфометрические показатели альвеолита и эмфиземы в легких крыс до и после лечения ингamiном™ ($M \pm m$)

Группа животных ($n = 10$)	Объемная плотность, %	
	Альвеолит	Эмфизема
Контроль интактный		3,3 ± 0,7
Модель(сефадекс А-25)	14,6 ± 3,7	16,9 ± 3,0
Инг 50 мкг/кг ингаляционно	7,9 ± 2,4*	3,7 ± 0,8*
Инг 500 мкг/кг ингаляционно	5,7 ± 1,5*	2,3 ± 0,8*
Инг 50 мкг/кг внутрижелудочно	7,8 ± 2,8*	9,3 ± 2,6*
Инг 500 мкг/кг внутрижелудочно	5,4 ± 1,4*	12,6 ± 5,0

* $p < 0,05$ по отношению к модели.

при ингаляционном введении в дозе 500 мкг/кг. Увеличение дозы в 10 раз не приводило к увеличению эффекта.

2. Исследование влияния ингамина™ на сефадекс-индуцированное воспаление легких у крыс в фазе хронизации.

Учитывая результаты предыдущих экспериментов, в этой серии опытов использовали наиболее эффективный — ингаляционный — путь введения ингамина™ в максимально эффективной дозе, равной 500 мкг/кг. Длительность курса лечения крыс составляла 10 и 20 дней. Аналогично вводили ингаляционный кортикостероид будесонид в качестве референтного препарата.

Как видно из данных, представленных в табл. 4 и 5, и результатов гистологического исследования, продуктивная фаза воспалительного процесса (30 сут после введения сефадекса) в легких крыс контрольной группы характеризуется инфильтрацией стенки бронхов преимущественно лимфоидно-гистиоцитарными элементами, преобладанием лимфоидно-гистиоцитарного альвеолита, очаговым фиброзом межальвеолярных перегородок, очаговой эмфиземой. При морфометрическом исследовании легких показатели объемной плотности альвеолита и эмфиземы в этот срок составили,

Таблица 2. Влияние ингамина™ (Инг) в дозах 50 и 500 мкг/кг на показатели клеточного состава бронхоальвеолярного смыва у крыс при ингаляционном и внутрижелудочном путях введения ($M \pm m$)

Группа животных ($n = 10$)	Эндопульмональная цитогарма, %		
	Макрофаги	Лимфоциты	Нейтрофилы
Контроль (интактные животные)	90,5 ± 1,3	6,1 ± 2,2	3,3 ± 0,6
Сефадекс А-25	64,4 ± 3,5	19,6 ± 2,7	16,4 ± 2,6
Инг 50 мкг/кг ингаляционно	62,6 ± 7,3	20,0 ± 5,7	17,4 ± 3,4
Инг 500 мкг/кг ингаляционно	75,7 ± 4,0	10,5 ± 1,3*	11,4 ± 1,6*
Инг 50 мкг/кг внутрижелудочно	67,4 ± 7,7	12,7 ± 1,1*	22,3 ± 5,4
Инг 500 мкг/кг внутрижелудочно	68,4 ± 6,3	10,4 ± 2,3*	27,0 ± 1,6

* $p < 0,05$ по отношению к модели.

Таблица 3. Абсолютное количество клеток в 1 мкл (цитоз) и клеточных популяций в бронхоальвеолярном смыве крыс при ингаляционном, внутрибрюшинном и внутрижелудочном способах введения ингamina™ 500 мкг/кг ($M \pm m$)

Клетки БАС	Контроль	Модель (сефадекс)	Ингамин™		
			ингаляционно	внутрижелудочно	внутрибрюшинно
Число животных	3	8	8	7	6
Цитоз	158,3 ± 15,20	224,3 ± 14,23	160,0 ± 18,86*	197,1 ± 20,58	224,0 ± 12,25
Макрофаги	143,4 ± 10,29	226,2 ± 15,73	125,7 ± 13,48*	126,1 ± 8,10*	154,7 ± 10,99
Лимфоциты	12,5 ± 3,21	68,1 ± 6,0	32,2 ± 6,82**	53,9 ± 11,95	65,6 ± 6,79
Нейтрофилы	0	20,6 ± 3,43	1,3 ± 0,64**	2,3 ± 0,72**	2,6 ± 0,72**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ по отношению к модели.

21,6 ± 1,8 и 21,1 ± 3,5 об. % соответственно. Эти данные в совокупности с результатами исследования БАС (цитоз, увеличенное по сравнению с интактными животными в 4 и 2 раза содержание, нейтрофилов и лимфоцитов соответственно) свидетельствуют о хронизации воспаления.

Ингаляционное воздействие ингamina™ в течение 10 дней оказало выраженное противовоспалительное действие: распространенность альвеолита была значительно ниже по сравнению с контролем, однако распространенность эмфиземы существенно не отличалась от нелеченых животных (табл. 4). По уровню таких показателей, как цитоз, количество нейтрофилов и лимфоцитов в БАС, воспалительный процесс также существенно менее выражен, чем в контроле (табл. 5).

Ингаляционное воздействие ингamina™ в течение 20 дней также приводит к значительному подавлению воспалительного процесса в легких крыс, которое, выражается в существенном уменьшении количества нейтрофилов в БАС (в 13 раз по сравнению с нелеченым контролем) и межальвеолярных перегородках, в снижении количества лимфоцитов в БАС. Следует подчеркнуть, что в условиях хронизации воспаления легких нами не выявлена зависимость активности ингamina™ от длительности его введения (10 или 20 дней). По выраженности противовоспалительного эффекта ингamina™ и в том и в другом случае сопоставим с референтным препаратом будесонидом (табл. 4 и 5).

Таким образом, по данным морфологического, морфометрического и цитологического исследования, но-

Таблица 4. Морфометрические показатели альвеолита и эмфиземы у крыс до и после ингаляционного воздействия ингamina™ 500 мкг/кг и будесонида 500 мкг/кг ($M \pm m$)

Группы животных ($n = 8$)	Альвеолит (об %)		Эмфизема (об %)
	Альвеолит (об %)	Эмфизема (об %)	
Интактный контроль	0	5,1 ± 0,7	
Модель (сефадекс А-25)	21,6 ± 1,8	21,1 ± 3,5	
Ингамин™ 10 дн.	8,3 ± 2,8*	25,0 ± 3,1	
Ингамин™ 20 дн.	6,9 ± 0,9*	22,6 ± 3,0	
Будесонид 10 дн.	17,2 ± 2,5	14,3 ± 3,5	
Будесонид 20 дн.	8,8 ± 1,5**	14,4 ± 3,2	

* $p < 0,01$ по отношению к модели (сефадекс А-25).

вое соединение псевдопептидной природы ингamina™ при ингаляционном курсовом введении в низких дозах проявляет выраженное противовоспалительное действие в отношении как острого, так и хронического сефадекс-индуцированного воспаления легких крыс Вистар, что доказывается значительным снижением содержания нейтрофилов как в БАС, так и в легком, уменьшением цитоза, нормализацией эндопульмональной цитограммы, существенным уменьшением объемной плотности альвеолита и эмфиземы, нормализацией морфологической картины легкого крыс по сравнению с нелечеными животными. В условиях данной модели по степени выраженности противовоспалительной активности ингamina™ сопоставим с ингаляционным кортикостероидом будесонидом.

ВЫВОДЫ

1. Ингамин™ при ингаляционном, внутрижелудочном и внутрибрюшинном способах введения в низких дозах (50 – 500 мкг/кг) оказывает противовоспалительное действие в отношении сефадекс-индуцированного воспаления легких у крыс Вистар.

2. Противовоспалительный эффект ингamina™ особенно отчетливо проявился при курсовом ингаляционном введении в виде сухого порошка в разовой дозе 500 мкг/кг.

Таблица 5. Абсолютные показатели клеточного состава бронхоальвеолярного смыва у крыс Вистар до и после ингаляционного воздействия ингamina™ 500 мкг/кг и будесонида 500 мкг/кг ($M \pm m$)

Группы животных ($n = 8$)	Абсолютное количество клеток в 1 мкл БАС		
	Макрофаги	Лимфоциты	Нейтрофилы
Интактные животные	89,0 ± 4,5	9,5 ± 2,1	2,53 ± 1,2
Модель (сефадекс А-25)	143,0 ± 9,0°	65,8 ± 7,5°	17 ± 8,23°
Ингамин™ 10 дн.	98,0 ± 7,0*	31,0 ± 3,2*	0,35 ± 0,0**
Ингамин™ 20 дн.	90,0 ± 4,6*	44,0 ± 6,5*	1,32 ± 0,75**
Будесонид 20 дн.	74,0 ± 11,0*	45,0 ± 10,0*	2,5 ± 0,37**

° $p < 0,01$ по отношению к негативному (интактному) контролю;

* $p < 0,01$ по отношению к позитивному контролю (модель);

** $p < 0,001$ по отношению к позитивному контролю (модель).

3. Ингамин™ эффективен как в фазе острого (7-дневном), так и в фазе хронизации (30-дневного) сефадекс-индуцированного воспалительного процесса в легких, причем в последнем случае эффект вещества не усиливался с увеличением в 2 раза длительности его введения.

4. В условиях использованной модели по степени выраженности влияния на течение воспалительного процесса в легких ингамин™ сопоставим с ингаляционным кортикостероидом будесонидом.

5. Представленные результаты свидетельствуют о перспективности изучения ингамина™ в качестве ингаляционного лекарственного средства для лечения хронических обструктивных болезней легких.

2. А. П. Авцын, Г. И. Лукомский, Л. К. Романова, *Сов. медицина*, № 7, 8 – 14 (1982).
3. О. В. Макарова, В. Л. Ковалева, А. С. Сладкопечевцев и др., *Пульмонология*, № 1, 76 – 79 (1996).
4. В. Е. Небольсин, *Автореф. дис. канд. хим. наук*, Москва (1999).
5. В. Л. Ковалева, В. Е. Небольсин, Г. А. Желтухина, и др., *VI Нац. конгресс “Человек и лекарство”*, Москва (1999), с. 54.
6. В. Е. Небольсин, В. В. Кржечковская, Г. А. Желтухина, и др., *Вопр. мед. хим.*, 47, вып. 3, 301 – 307 (2001).
7. J. Bienenstock, N. Johnson, and D. Y. E. Perey, *Lab. Invest*, **28**, 693 – 698 (1973).
8. V. L. Kovaleva, O. V. Makarova, and N. I. Veselova, *Pharmacol. Res.* 31, Suppl., 377 (1995).

Поступила 17.03.03

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Автандилов, *Введение в количественную патологическую морфологию*, Наука, Москва (1980).

THE EFFECT OF A POTENTIAL DRUG INGAMINE ON A MODEL OF NONINFECTIOUS PNEUMONIA

V. L. Kovaleva¹, V. E. Nebol'sin³, O. V. Makarova³, E. M. Noseikina¹, and L. P. Mikhailova²

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

² Department of Inflammation Immunomorphology, Institute of Human Morphology, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

³ Pharmenterprises Ltd., Moscow, Russia

The potential drug ingamine (glutarylhistamine) showed pronounced anti-inflammatory activity on a model of acute noninfectious pneumonia and in the stage of chronic inflammation induced by single instillation of Sephadex (5 mg/kg) in Wistar rats. A 6-day treatment with ingamine (50 – 500 µg/kg) by inhalation, intragastric, and intraperitoneal administration produced an anti-inflammatory effect (expressed to various degrees), which was manifested by a decrease in alveolitis, bronchitis, obstructive emphysema, lymphocyte-neutrophile infiltration of interalveolar septa, cytolysis, and neutrophile component of bronchoalveolar lavage and by normalization of the cytogram. The most pronounced effect was observed upon inhalation in a dose of 500 µg/kg. In the stage of chronic inflammation, the inhalation of ingamine in a dose of 500 µg/kg produced a significant antiinflammatory action for both 10- and 20-day treatment. The effect was comparable with that of the inhaled glucocorticoid budesonide.