

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
Иркутский институт химии им. А. Е. Фаворского СО РАН

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
НИИ клинической иммунологии СО РАМН

Новокузнецкий научно-исследовательский
химико-фармацевтический институт

ВИЛИМ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Новосибирск
2008

**К.В. Гайдунь, О.П. Колесникова, О.Т. Кудасова, Б.В. Гойман,
Е.Д. Гаврилова, *В.Ф. Демчук, В.А. Козлов**
НИИ клинической иммунологии СО РАМН,

***Новокузнецкий научно-исследовательский химико-
фармацевтический институт**

ВИЛИМ : ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

В Новокузнецком научно-исследовательском химико-фармацевтическом институте разработана готовая лекарственная форма ВМ-7-02 (ВИЛИМ) в виде капсул следующего состава:

ВМ-7-02	- 0,1000 г
Крахмал картофельный	- 0,0500 г
Лактоза	- 0,0963 г
Магния стеарат	- 0,0025 г
Метилцеллюлоза	- 0,0012 г
Всего:	0,250 г

Содержимое капсулы растворяли в среде RPMI 1640 и вводили мышам внутрижелудочно.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Животные

В работе использовали здоровых половозрелых животных – мышей линии СВА, DBA/2, C57Bl/6, мышей-гибридов (CBAxС57BL/6)F1 (CBF1), мышей-гибридов (C57BL/6xDBA/2)F1 (B6D2F1) обоего пола, 8-10-недельного возраста, массой тела 18–20 г. Разброс в группах по исходной массе тела не превышает $\pm 10\%$. Контрольные и опытные животные одного возраста получены одновременно из одного питомника (“Рассвет”, г. Томск). До и в период экспериментов контрольные и опытные животные содержались в виварии в одинаковых условиях: стандартных пластиковых клетках с мелкой древесной стружкой (не более 10 особей) на стандартном рационе. Все исследования проводились в одно и то же время суток (утром). Опыты проводили в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите животных (Страсбург, 1986), и одобренных комитетом по биомедицинской этике НИИ клинической иммунологии СО РАМН. Исследование готовой лекарственной формы ВМ-7-02 проводили в несколько серий опытов, соответственно каждая серия опытов имела свой контроль. В каждой группе было не менее 10 мышей.

Определение количества IgM антителообразующих клеток *in vivo*

Готовую лекарственную форму ВМ-7-02 (содержимое капсул) в дозе 25 мг/кг (что соответствует дозе 10 мг/кг чистой субстанции) в объеме 0,5 мл вводили внутривенно ежедневно один раз в сутки одновременно с иммунизацией и в последующие 4-5 дней (индуктивная/продуктивная фазы формирования гуморального иммунного ответа). Контрольным животным в таком же объеме и режиме вводили растворитель соединений (культуральная среда RPMI 1640). Животных иммунизировали внутривенно эритроцитами барана (ЭБ) в дозе 10^7 /мышь. Количество IgM АОК в селезенке мышей оценивали на пике иммунного ответа (4-е или 5-е сутки после иммунизации в зависимости от линии мышей) по количеству зон локального гемолиза в полужидкой среде модифицированным методом Cunningham (1968). Результаты выражали в абсолютном количестве IgM АОК в селезенке.

Модель иммунокомплексного гломерулонефрита – люпус-подобного иммунокомплексного гломерулонефрита у мышей осуществлялась путём индукции хронической РТПХ-переноса самкам B6D2F1 лимфоидных клеток родительской линии DBA/2 (3). Вводили клетки лимфатических узлов, тимуса и селезёнки в соотношении 1:3:6 (соответственно по 5×10^6 клеток лимфатических узлов, 15×10^6 клеток тимуса, 30×10^6 клеток селезёнки), выделенных ex tempore, в стерильной среде RPMI-1640. Каждая мышь-реципиент получала по 50×10^6 клеток путём внутривенной инъекции в хвостовую вену в объёме 0,5 мл среды двукратно с интервалом в пять дней. Для контроля использовались интактные животные того же генотипа, пола, возраста, что и в опыте. При этом у мышей-реципиентов к 3-му месяцу развивается люпус-подобное поражение почек аутоиммунного генеза. Поражение почек тестировали по уровню белка в моче. Содержание белка в моче определяли калориметрически с красителем Kumsai brilliant blue (Loba Feinchemie) с помощью Titertec Multiskan, длина волны λ 570 nm. Реактив готовили следующим образом: 10 мг Кумасси растворяли в 5 мл C_2H_5OH . После полного растворения красителя добавляли 11,2 мл 70% H_3PO_4 . Общий объём доводили до 100 мл, фильтровали. К 5 мкл мочи, разведённой в 5 раз в ЗФР, добавляли 150 мкл красителя Кумасси. Калибровочную кривую строили по BSA (100–1000 мкг/мл). Определение уровня IgE в сыворотке животных проводили согласно рекомендациям производителя (Mouse IgE ELISA Set BD Biosciences).

Модель острой РТПХ осуществляли путем внутривенного переноса самкам B6D2F1 100×10^6 клеток селезенки родительской линии C57BL/6

(C57BL/6→B6D2F1). Выраженность острой РТПХ оценивали по количеству живых мышей на сроке 21 день после индукции реакции.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Изучение иммунодепрессивных свойств готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02 (капсулы) в модели первичного гуморального иммунного ответа.

Изучали влияние готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02 на индуктивную/продуктивную фазы первичного гуморального иммунного ответа: содержимое капсул в дозе 10 мг/кг вводили одновременно с антигеном и далее в течение 3-х суток ежедневно (в зависимости от вида мышей-гибридов). Проведено несколько серий опытов. Результаты каждой отдельной серии представлены в табл. 1, 2, 3, 4.

Таблица 1

Влияние готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02 на индуктивную/продуктивную фазы первичного гуморального иммунного ответа у мышей ♂ CBF1 (внутрижелудочное введение)

Группы	IgM АОК/селезенку
Контроль	25578
ГЛФ ВМ-7-02	18702 (-27%)*

Таблица 2

Влияние готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02 на индуктивную/продуктивную фазы первичного гуморального иммунного ответа у мышей ♀ BDF1 (внутрижелудочное введение)

Группы	IgM АОК/селезенку
Контроль	26292
ГЛФ ВМ-7-02	16697 (-37%)*

Таблица 3

Влияние готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02 на индуктивную/продуктивную фазы первичного гуморального иммунного ответа у мышей ♀ BDF1 (внутрижелудочное введение)

Группы	IgM АОК/селезенку
Контроль	22484
Субстанция ВМ-7-02 (10 мг/кг)	14521 (-36%)*
ГЛФ ВМ-7-02 (25 мг/кг)	15133 (-33%)*

**Влияние готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02
на индуктивную/продуктивную фазы первичного гуморального иммунного ответа
у мышей ♀BDF1 (внутрижелудочное введение)**

Группы	IgM АОК/селезенку
Контроль	15562
Субстанция ВМ-7-02 (10 мг/кг)	9897 (- 37%)*
ГЛФ ВМ-7-02 (25 мг/кг)	10216 (-35%)*

Таким образом, полученные результаты говорят о том, что ГЛФ ВМ-7-02 отличается выраженным иммунодепрессивным эффектом в отношении формирования гуморального иммунного ответа (уровень достоверного* подавления числа формирующихся АОК наблюдался в диапазоне от 27 до 37%), т.е. сравнимым с чистой субстанцией (при одинаковой дозе содержания действующего вещества).

2. Изучение противоопухолевых свойств готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02 в модели метастазирования клеток гепатомы Г27.

Мышам линии СВА внутривенно вводили клетки гепатомы Г27 в дозе 100×10^3 /мл. Учет метастазов в легких проводили на 15 день после перевивки опухоли. Готовую лекарственную форму ВМ-7-02 в различных дозах вводили внутрижелудочно (14 введений по одному разу в день).

Таблица 5

**Влияние готовой лекарственной формы препарата ВМ-7-02
на метастазирование клеток гепатомы Г27 в легкие**

Группы	Mts*	Частота метастазирования К-во мышей с метастазами/ общее к-во мышей (Г27)	% ингибиции
Контроль	5,4	4/5	
ГЛФ ВМ-7-02 25 мг/кг	1,6	3/5	в 3,4 раза
50 мг/кг	2,6	3/5	в 2,0 раза

Mts* – среднее число метастазов в легких.

Как видно из данных табл. 5, готовая лекарственная форма препарата ВМ-7-02 (содержимое капсул) эффективно ингибирует процесс метастазирования клеток опухоли в легкие.

3. Изучение иммунодепрессивных свойств ГЛФ ВМ-7-02 в модели аутоиммунного заболевания.

3.1. Влияние ГЛФ ВМ-7-02 на уровень белка в моче.

Мышам с иммунокомплексным гломерулонефритом вводили внутривенно готовую лекарственную форму ВМ-7-02 в дозе 25 мг/кг (в дозе 10 мг/кг действующего вещества), курс составил 13 введений. Контрольным мышам в таком же режиме вводили азатиоприн (в дозе 10 мг/кг действующего вещества). Определяли уровень белка в моче до введения препаратов, через 7 дней от начала введения и по окончании курса. Данные представлены в таблице 6, 7.

Таблица 6

Влияние готовой лекарственной формы ВМ-7-02 на уровень белка в моче у мышей с гломерулонефритом в сравнении с азатиоприном

ГЛФ ВМ-7-02		
Белок в моче (мг/мл)		
до лечения	8 день от начала лечения	19 день от начала лечения
5,3	4,8	4,2
6,6	5,9	4,5
5,2	2,5	2,9
4,1	3,8	4,0
5,8	5,8	3,1
6,0	5,2	3,1
6,0	5,2	4,6
6,7	6,1	5,8
3,5	1,5	3,0
3,6	3,2	3,3
M=5,3	M=4,4	M=3,7

Таблица 7

АЗАТИОПРИН		
Белок в моче (мг/мл)		
до лечения	8 день от начала лечения	19 день от начала лечения
4,4	3,8	4,0
5,0	4,5	4,4
5,6	4,5	4,3
5,8	4,7	3,3
M=5,2	M=4,4	M=4,0

Как видно из данных таблиц 6 и 7, ГЛФ ВМ-7-02 оказывает иммунодепрессивный эффект у мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом сравнимый с лекарственным препаратом азатиоприном, но азатиоприн является значительно более токсичным препаратом. При сравнении соединения ВМ-7-02 и азатиоприна по токсичности можно отметить, что соединение вызывает иммунодепрессивный эффект в дозе на порядок ниже относительно LD₅₀, чем азатиоприн. По данным (5) азатиоприн в дозе 10 мг/кг угнетает функцию костного мозга, подавляет пролиферацию гранулоцитов, вызывает лейкопению, тогда как соединение ВМ-7-02 в такой же дозе в опытах при изучении хронической токсичности не вызывает нарушений в составе периферической крови.

3.2. Влияние ГЛФ ВМ-7-02 на уровень IgE в сыворотке крови.

Мышам с иммунокомплексным гломерулонефритом вводили внутривенно готовую лекарственную форму ВМ-7-02 в дозе 25 мг/кг (в дозе 10 мг/кг действующего вещества), курс составил 13 введений. Уровень IgE в сыворотке определяли по окончании курса. Данные представлены в таблице 8.

Таблица 8

Влияние готовой лекарственной формы ВМ-7-02 на уровень IgE в сыворотке у мышей с гломерулонефритом

Группы	IgE (мкг/мл)
Интактные	26,5
Гломерулонефрит	156,8
Гломерулонефрит + ВМ-7-02	56,0

Как видно из данных таблицы 8, ГЛФ ВМ-7-02 эффективно снижает уровень IgE в крови мышей с иммунокомплексным гломерулонефритом. Известно, что хроническая РТПХ развивается при доминирующей активации Th2-клеток, что сопровождается повышенной продукцией IL-4 и, как следствие, возрастанием уровня IgE. При хронической РТПХ (DBA→B6D2F1) наблюдается повышение уровня IgE уже через неделю, через 6 недель уровень повышается в 200 раз (2). Показано, что введение антагонистов IL-4, иммуносупрессивных препаратов (рапамицина, FK 506, циклоспорина А) снижают выраженность проявлений хронической РТПХ и приводят и к снижению уровня IgE (4, 1).

4. Влияние ГЛФ ВМ-7-02 на развитие острой РТПХ. Мышам-реципиентам B6D2F1 в день переноса клеток селезенки от родителя C57BL/6 (C57BL/6→B6D2F1) вводили внутривенно готовую лекарственную форму ВМ-7-02 в дозе 25 мг/кг (в дозе 10 мг/кг действующего вещества), курс составил 12 введений. Учет количества живых мышей

проводили на 3-й и 4-й недели от момента индукции РТПХ. Данные представлены в таблице 9.

Таблица 9

**Влияние готовой лекарственной формы ВМ-7-02
развитие острой РТПХ**

	21 день	28 день
РТПХ	5/17*	4/17
РТПХ+ВМ-7-02	11/16	10/16

* в числителе – кол-во живых мышей, в знаменателе – кол-во мышей в опыте.

Как видно из данных, готовая лекарственная форма ВМ-7-02 существенно тормозит острую РТПХ, характеризующуюся развитием цитотоксических реакций и приводящих к гибели подавляющего числа животных к 21 дню. К 5 неделе в контроле осталось 2 живых мыши из 17, в опыте — 9 из 16.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В опытах на мышах изучены иммунодепрессивные и противоопухолевые свойства ВИЛИМА (готовой лекарственной формы химического соединения ВМ-7-02), а также его влияние на уровень IgE и развитие острой РТПХ. Показано, что ВИЛИМ проявляет иммунодепрессивные свойства у мышей-гибридов разных линий в модели формирования гуморального иммунного ответа, а также оказывает выраженный антиметастатический эффект в отношении клеток гепатомы Г27. В модели аутоиммунного заболевания (иммунокомплексный гломерулонефрит) иммунодепрессивный эффект ВИЛИМА сравним с азатиоприном, который нередко вызывает серьёзные побочные реакции и имеет ряд противопоказаний к применению. ВИЛИМ существенно подавляет выработку IgE у мышей с гломерулонефритом в модели хронической РТПХ (DBA→B6D2F1) и индукцию ЦТЛ у мышей в модели острой РТПХ (C57BL/6→B6D2F1).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bundick R.V., Craggs R.I., Holness E. The effect of cyclosporin A, FK 506 and rapamycin on the murine chronic graft-versus-host response – an in vivo model of Th2-like activity. // Clin. Exp. Immunol. – 1995. – V. 99. – P. 467–472.
2. Doutrelepont J.M., Moser M., Leo O., Abramowicz D., Vanderhaegen M.L., Urbain J., Goldman M. Hyper IgE in stimulatory graft-versus-host disease: role of interleukin-4. // Clin Exp Immunol. – 1991. – V. 83. – P. 133–136.

3. Kimura M., Gleichmann E. Depressed antibody responses to exogenous antigens in mice with lupus-like graft-versus-host diseases. //Clin. Immunol. and Immunopathol. – 1987. – V. 43. – №. 1. – P. 97–109.
4. Umland S.P., Razac S., Nahrebne D.K., Seymour B.W. Effects of in vivo administration of interferon (IFN)-gamma, anti-IFN-gamma, or anti-interleukin-4 monoclonal antibodies in chronic autoimmune graft-versus-host disease. // Immunol Immunopathol. – 1992. – V. 63. – P. 66–73.
5. Машковский М.Д. //Лекарственные средства. – 2001. – С. 197–200.