

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛЕРГЕННОСТИ И ИММУНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПОТЕНЦИАЛЬНОГО ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПЕПТИДЭРГИЧЕСКОГО НЕЙРО- И СТРЕСС-ПРОТЕКТОРА**

**Колобов А.А., Смирнова М.П., Кампе-Немм Е.А., Шпень В.М., Вирцев А.А., Варюшина Е.А., Александров Г.В., Захаров М.С., Кирьянова А.С., Хуттунен О.Э., Румянцева А.Б., Митрофанов И.Д., Бендт И.В., Крылова А.Э., Чистякова А.Б.**

*ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, e-mail: a.a.kolobov@hpb.spb.ru*

Целью данной работы являлось доклиническое исследование аллергенности и иммунотоксичности потенциального лекарственного средства (ЛС) «Лизаргам, спрей назальный, дозированный». Ранее проведенные исследования показали, что потенциальное ЛС обладает высокой нейропротекторной эффективностью *in vivo* за счет своих антиишемической, антигипоксической, ноотропной и актопротекторной активностей. В данной статье приведены результаты экспериментов, выполненные в системе *in vivo*, по изучению иммунотоксичности и аллергенности ЛС «Лизаргам». Нами показано, что потенциальное ЛС не обладает анафилактикогенной активностью и не вызывает гиперчувствительность немедленного типа в реакциях общей анафилаксии на морских свинках и активной кожной анафилаксии на мышах. Также введение ЛС «Лизаргам» не вызывает гиперчувствительности замедленного типа в экспериментах на мышах. Введение потенциального ЛС в дозах, превышающих предполагаемую человеческую терапевтическую дозу, не оказывает негативного воздействия на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа, а также не подавляет фагоцитарную функцию макрофагов. Полученные данные доказывают отсутствие иммунотоксического действия ЛС «Лизаргам». Результаты проведенной работы могут быть использованы в дальнейшем при изучении клинической безопасности потенциального ЛС «Лизаргам».

Ключевые слова: доклинические исследования, аллергенность, иммунотоксичность, пептидэргический нейро- и стресс-протектор, лечение нарушений мозгового кровообращения.

**PRECLINICAL STUDIES OF ALLERGENICITY AND IMMUNOTOXIC EFFECT OF A POTENTIAL DRUG BASED ON PEPTIDERGIC NEURO AND STRESS PROTECTOR**

**Kolobov A.A., Smirnova M.P., Kampe-Nemm E.A., Shpen V.M., Virtsev A.A., Varyushina E.A., Alexandrov G.V., Zakharov M.S., Kiryanova A.S., Khuttunen O.E., Rumyantseva A.B., Mitrofanov I.D., Bendt I.V., Krylova A.E., Chistyakova A.B.**

*State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Saint Petersburg, e-mail: a.a.kolobov@hpb.spb.ru*

The aim of this work was preclinical studies of allergenicity and immunotoxicity of a potential drug "Lizargam, nasal spray, dosed". Previous studies have shown that potential drug has neuroprotective efficacy due to its anti-ischemic, anti-hypoxic, nootropic and actoprotective activities *in vivo*. This article presents the results of experiments carried out in an *in vivo* system to study the immunotoxicity and allergenicity of the "Lizargam". We have shown that the potential drug does not have any anaphylactogenic activity and does not cause immediate hypersensitivity in tests of general anaphylaxis in guinea pigs and active cutaneous anaphylaxis in mice. Also, the introduction of the "Lizargam" does not cause delayed hypersensitivity in experiments on mice. The introduction of a potential drug in doses exceeding the expected human therapeutic dose does not adversely affect the development of a humoral and cellular immune response, nor does it inhibit the phagocytic function of macrophages. The data obtained prove the absence of an immunotoxic effect in potential drugs. The results of this work could be used in further study of the clinical drug safety.

Keywords: preclinical studies, allergenicity, immunotoxicity, peptidergic neuro- and stress protector, therapy of cerebrovascular disorders.

Целью работы являлись доклинические исследования аллергенности и иммунотоксичности потенциального ЛС на основе пептидэргического нейро- и стресс-

протектора для лечения нарушений мозгового кровообращения - «Лизаргам, спрей назальный дозированный» (далее препарат «Лизаргам»).

Проведенные ранее доклинические исследования специфической фармакологической активности препарата «Лизаргам» показали его высокую нейропротекторную эффективность *in vivo* [1]. Было показано, что данный препарат обладает антиишемической, антигипоксической, ноотропной и актопротекторной активностями [2].

### **Материалы и методы исследования**

В исследовании использовали готовую лекарственную форму (ГЛФ) препарата «Лизаргам, спрей назальный дозированный 0,5% и 1,0%». Активный фармацевтический ингредиент - «D-лизаргам, ацетат» представляет собой синтетический тетрапептид последовательности N $\alpha$ -ацетил-D-лизил-лизил-аргинил-аргинил-амид в виде ацетатной соли. Один флакон ГЛФ содержит 15 или 30 мг «D-лизаргам, ацетата» для 0,5% и 1,0% растворов соответственно, D-маннит - 30 мг и физиологический раствор (ФР) - 3,0 мл. Терапевтическую дозу препарата для человека (20 мкг/кг) высчитывали на основании данных по изучению специфической активности препарата «Лизаргам» на экспериментальных животных и коэффициента экстраполяции доз мышей и крыс на человека в соответствии с руководством Т.А. Гуськовой [3].

Основные правила содержания и ухода за животными в виварии соответствовали «Санитарно-эпидемиологическим требованиям к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным Постановлением Главного санитарного врача РФ от 29.08.2014 г., а также правилам, принятым Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986 г.). Объем работ и перечень процедур был одобрен биоэтической комиссией института. Доклинические исследования проводили на основе рекомендаций действующих методических документов [4-6].

Реакцию общей анафилаксии (анафилактический шок) проводили на морских свинках обоего пола (200-250 г, 5-6 недель), разделенных на 3 группы (по 5 самок и 5 самцов). Контрольная группа получала ФР - первая инъекция - подкожно (п/к), две последующие – внутримышечно (в/м) через день. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали препарат «Лизаргам» в дозах 0,1 мг/кг и 1 мг/кг соответственно. Через 21 день всем животным внутрисердечно вводили разрешающую дозу препарата, которая составила суммарную сенсibiliзирующую дозу для каждой группы соответственно. В контрольной группе вводили разрешающую дозу, рассчитанную для 2 группы. Учет интенсивности анафилактического шока проводили в индексах по Weigle [5].

Реакцию активной кожной анафилаксии проводили на белых беспородных мышях обоего пола (19–21 г, 9–10 недель), разделенных на 3 группы (по 5 самок и 5 самцов). В

контрольной группе вводили ФР: первая инъекция - п/к, две последующие – в/м через день. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали препарат «Лизаргам» в дозах 2,4 мг/кг и 5 мг/кг, соответственно. Через 21 день всем мышам вводили препарат «Лизаргам» внутривожно (в/к) в двукратных разведениях в концентрациях, не вызывающих кожно-раздражающего действия. Через 20 минут вводили внутривенно (в/в) по 0,5 мл 1% раствора красителя синего Эванса. Через 30 мин. мышей умерщвляли и определяли размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в месте введения.

Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) проводили на мышах-гибридах F1 (СВА х С57В1/6) обоего пола (19–21 г, 9–10 недель), разделенных на 2 группы (по 10 самок и 10 самцов). Контрольную группу животных сенсibilизировали однократным в/к введением 60 мкл эмульсии полного адьюванта Фрейнда с раствором Хенкса 1:1. Опытной группе по той же схеме вводили 60 мкл эмульсии полного адьюванта Фрейнда, содержащей 100 мкг препарата. Через 5 суток после сенсibilизации всем животным в подушечку одной задней лапы вводили 40 мкл раствора Хенкса, содержащего 100 мкг препарата «Лизаргам», в контралатеральную лапу вводили ФР. Через 24 часа, после эвтаназии всех животных, обе лапы отрезали выше пяточного сустава и взвешивали. Индекс реакции подсчитывали в процентах прироста массы лапы, в которую вводили препарат ( $M_o$ ), по отношению к массе контрольной лапы ( $M_k$ ) по формуле  $[(M_o - M_k) / M_k] * 100$ .

Иммунотоксичность изучали на мышах-гибридах F1 (СВАхС57В1/6). Были изучены 2 дозы препарата: первая доза, 10-кратная терапевтическая для мышей, составила 2,4 мг/кг (одна терапевтическая доза для мыши составляет 0,24 мг/кг и получена из предполагаемой терапевтической дозы для человека, составляющей 0,02 мг/кг с учетом межвидового коэффициента пересчета 11,8); вторая доза - 5 мг/кг. Для определения числа антителообразующих клеток (АОК) к эритроцитам барана (ЭБ) в селезенке мыши были разделены на 3 группы (по 6 самок и 6 самцов). Контрольная группа ежедневно в течение 14 дней интраназально получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали препарат «Лизаргам» в дозах 2,4 мг/кг и 5 мг/кг соответственно. На 14-й день все мыши были иммунизированы внутрибрюшинной (в/б) инъекцией ЭБ в субоптимальной дозе  $5 \times 10^7$  эритроцитов на животное. Подсчет числа АОК в селезенке мышей проводили на 5-е сутки после иммунизации. Реакцию ставили на предметных стеклах без поддерживающей среды по Cunningham [7]. По количеству зон гемолиза эритроцитов вокруг отдельных АОК, определяемых под микроскопом, подсчитывали число клеток-продуцентов антител в расчете на  $10^6$  спленоцитов.

Для постановки реакции ГЗТ против ЭБ мыши были разделены на 3 группы (по 10 самок и 10 самцов). Контрольная группа ежедневно в течение 14 дней интраназально (и/н)

получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали препарат «Лизаргам» в дозах 2,4 мг/кг и 5 мг/кг соответственно. На 14-й день все мыши были сенсibilизированы однократно п/к введением раствора, содержащего  $2 \times 10^5$  ЭБ. Для выявления гиперчувствительности на 5-е сутки после сенсibilизации всем мышам в подушечку задней лапы вводили  $10^8$  ЭБ в 0,05 мл ФР (разрешающая инъекция). В противоположную лапу вводили равный объём ФР. Через 24 часа проводили оценку реакции и подсчитывали индекс, как описано выше.

Для оценки фагоцитарной функции перитонеальных макрофагов (Мф) мышей разделяли на 3 группы (по 10 самок и 10 самцов). Контрольная группа ежедневно в течение 14 дней и/н получала ФР. Опытные группы 1 и 2 по той же схеме получали препарат «Лизаргам» в дозах 2,4 мг/кг и 5 мг/кг соответственно. На следующий день после последнего введения препарата всех мышей забивали и промывали брюшную полость культуральной средой для получения клеточной взвеси. Ставили реакцию фагоцитоза с опсонизированными дрожжами на чашках Петри по стандартной методике. Чашки фиксировали и окрашивали по Романовскому-Гимзе. Под микроскопом подсчитывали процент фагоцитировавших Мф – фагоцитарный индекс (ФИ), и среднее количество поглощенных дрожжей – фагоцитарное число (ФЧ) в условных единицах (у.е.).

Статистический анализ проводили с помощью программы Microsoft Excel-2007 (Microsoft Corporation). Результаты представляли в виде средних значений и ошибок среднего ( $M \pm m$ ) или стандартных отклонений ( $M \pm \sigma$ ). Сравнение показателей между группами проводили с помощью непарного Т-критерия Стьюдента с неравными отклонениями, а также по U-критерию Манна-Уитни. Отличия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## **Результаты исследования и их обсуждение**

### *1. Оценка возможного алергизирующего действия*

#### *1.1. Анафилактическая реакция на морских свинок*

При оценке реакции гиперчувствительности немедленного типа (анафилактическая реакция) у морских свинок в опытных группах, сенсibilизированных введением препарата «Лизаргам», не было выявлено никаких проявлений анафилактического шока.

Индексы по Weigle у морских свинок после сенсibilизации препаратом в дозах 0,1 мг/кг и 1 мг/кг, а также в контрольной группе были равны нулю.

#### *1.2. Реакция активной кожной анафилаксии на мышях*

При оценке реакции активной кожной анафилаксии результаты измерения диаметров цветных пятен, образовавшихся на месте введения разрешающей дозы препарата «Лизаргам», показали, что размеры пятен составили от 1 до 2 мм (таблица 1).

Таблица 1

Реакция активной кожной анафилаксии у мышей после сенсibilизации препаратом  
«Лизаргам»

Экспериментальные группы	Пол	Номера животных				
		1	2	3	4	5
		Диаметр пятен, мм				
Контроль	Самцы	2	2	1	2	2
	Самки	2	1	2	1	2
«Лизаргам» 2,4 мг/кг	Самцы	1	1	2	2	1
	Самки	2	1	1	2	2
«Лизаргам» 5 мг/кг	Самцы	1	1	2	1	1
	Самки	1	2	1	2	2

Известно, что при отрицательной реакции на испытуемый препарат в месте внутрикожного введения диаметр окрашенного пятна не должен превышать 2-3 мм, а при положительной – 6 мм. В эксперименте ни у одного животного размер пятна не превысил 3 мм. На основании результатов можно заключить, что у мышей в опытных группах, сенсibilизированных введением препарата в дозах 2,4 мг/кг и 5 мг/кг, не наблюдали развития активной кожной анафилаксии.

*1.3. Реакция гиперчувствительности замедленного типа*

При изучении реакции ГЗТ у мышей после сенсibilизации введением 100 мкг препарата «Лизаргам» были получены результаты, представленные в таблице 2. Как следует из полученных данных, не было выявлено значимых различий между индексами изменения массы лапы у мышей в опытной и контрольной группах, что свидетельствует об отсутствии реакции ГЗТ в ответ на введение препарата.

Таблица 2

Оценка реакции гиперчувствительности замедленного типа у мышей после сенсibilизации препаратом «Лизаргам»

Экспериментальные группы	Пол	Индекс реакции, %
Контроль	Самцы	5,0±1,1
	Самки	5,2±1,3
«Лизаргам» 100 мкг	Самцы	5,1±1,0
	Самки	5,1±1,3

## 2. Изучение возможного иммуотоксического действия

### 2.1. Определение числа АОК в ответ на ЭБ

Результаты определения числа АОК, образующихся в селезенке мышей в ответ на ЭБ после введения 2,4 мг/кг и 5 мг/кг препарата «Лизаргам», представлены в таблице 3. Как следует из результатов эксперимента, применение препарата не приводило к статистически значимым изменениям. Таким образом, показано, что изученные дозы препарата «Лизаргам» не оказывали негативного воздействия на развитие гуморального иммунного ответа.

Таблица 3

Оценка влияния препарата «Лизаргам» на число АОК в селезенке мышей-гибридов (СВА x C57Bl/ 6)F1

Экспериментальные группы	Количество антителообразующих клеток (на 10 <sup>6</sup> спленоцитов), M±m	
	Самцы	Самки
Контроль	40,5±4,9	33,3±3,1
«Лизаргам», 2,4 мг/кг	40,3±4,6	33,7±3,6
«Лизаргам», 5,0 мг/кг	40,7±4,7	33,3±3,6

### 2.2. Оценка развития реакции ГЗТ с использованием ЭБ

Оценку развития реакции ГЗТ с использованием ЭБ в качестве антигена на мышах проводили после 14-дневного и/н введения препарата «Лизаргам» в двух дозах. Результаты, представленные в таблице 4, свидетельствуют о том, что выраженная реакция ГЗТ развивалась во всех экспериментальных группах. Было показано, что изученные дозы препарата не оказывали значимого угнетающего воздействия на развитие клеточного иммунного ответа.

Таблица 4

Оценка влияния препарата «Лизаргам» на развитие реакции ГЗТ у мышей-гибридов (СВА x C57Bl/ 6)F1

Экспериментальные группы	Индекс реакции (%)	
	Самцы	Самки
Контроль	54,5±2,1	56,2±2,7

«Лизаргам», 2,4 мг/кг	54,4±2,2	56,5±2,5
«Лизаргам», 5,0 мг/кг	54,7±2,2	56,4±2,3

### 2.3. Изучение фагоцитарной активности макрофагов

Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов была проведена после 14-дневного и/н введения препарата «Лизаргам» в дозах 2,4 и 5 мг/кг. Данные представлены в таблице 5. По данным таблицы 5, не выявлены различия изученных показателей в контрольной и опытной группах. Таким образом, изученные дозы препарата не оказывали угнетающего воздействия на фагоцитарную активность макрофагов.

Таблица 5

Изучение влияния препарата «Лизаргам» на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов

Экспериментальные группы	Фагоцитировавшие МФ (ФИ, %)		Число фагоцитированных дрожжей (ФЧ, у.е.)	
	Самцы	Самки	Самцы	Самки
Контроль	73,0±3,0	74,0±2,7	14,0±1,2	13,0±1,1
«Лизаргам», 2,4 мг/кг	72,0±2,8	75,0±2,8	13,0±1,3	14,0±1,2
«Лизаргам», 5,0 мг/кг	73,0±3,0	75,0±2,9	15,0±1,0	13,0±1,1

### Заключение

Доклинические исследования потенциального ЛС «Лизаргам» на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора для лечения нарушений мозгового кровообращения показали отсутствие у препарата аллергенности и иммунотоксического действия.

Препарат не обладает анафилактической активностью и не вызывает гиперчувствительность немедленного типа в реакциях общей анафилаксии и активной кожной анафилаксии.

При оценке аллергизирующего действия показано, что препарат не вызывает реакцию гиперчувствительности замедленного типа.

Изучение развития иммунного ответа после введения препарата «Лизаргам» показало, что в дозах, превышающих предполагаемую человеческую терапевтическую дозу, препарат не оказывает негативного воздействия на развитие гуморального и клеточного иммунного ответа.

Препарат не подавляет фагоцитарную функцию макрофагов, что указывает на отсутствие у него иммунотоксического действия.

Результаты, полученные в данном исследовании, могут быть использованы при изучении клинической безопасности потенциального ЛС «Лизаргам, спрей назальный, дозированный».

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

*Исследование выполнено по Государственному контракту № 14.N08.11.0096 от 25 августа 2016 г. «Доклинические исследования лекарственного средства на основе пептидэргического нейро- и стресс-протектора для лечения нарушений мозгового кровообращения» в рамках ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».*

### Список литературы

1. Дейко Р.Д., Кампе-Немм Е.А., Колобов А.А., Прусаков А.Н., Шпень В.М., Штрыголь С.Ю. Тетрапептид и средство, обладающее церебропротекторной и антиамнестической активностями (варианты) // Патент РФ №2537560. Заявка: 2013119051/04. Бюл. № 1. 2014.
2. Толкач П.Г., Башарин В.А., Гребенюк А.Н., Колобов А.А. Оценка эффективности пептида КК1 для профилактики отдаленных нарушений функций центральной нервной системы после тяжелой интоксикации оксидом углерода в эксперименте // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. 2015. № 3. С.29-34.
3. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. М.: «Русский врач», 2003. 154 с.
4. ГОСТ 58173-2018. Средства лекарственные для медицинского применения. Исследования иммунотоксичности лекарственных средств, предназначенных для человека. М: Стандартиформ. 2018. 12 с.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. А.Н. Миронова. Часть первая. М.: Гриф и К<sup>0</sup>, 2012. 944 с.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. А.Н. Миронова (Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая. М.: Гриф и К<sup>0</sup>, 2012. 536 с.
7. Cunningham A.J. A method of increased sensitivity for detecting single antibody-forming cells. Nature. 1965. Vol. 207. No. 5001. P.1106-1107.