

І. І. Романовська, С. М. Пухлік, Б. М. Пухлик

## ІММОБІЛІЗАЦІЯ АЛЕРГЕНІВ ДЛЯ СТВОРЕННЯ ПОТЕНЦІЙНИХ ДІАГНОСТИЧНИХ І ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ ІНТРАНАЗАЛЬНОГО СПОСОБУ ВВЕДЕННЯ

Фізико-хімічний інститут ім. О. В. Богатського НАН України,  
Одеський державний медичний університет

Постійне зростання кількості алергічних захворювань, у тому числі алергічних ринітів (АР) і медикаментозної алергії, частота яких коливається, за даними ВООЗ, у межах 40 %, а діагностика і специфічна імунотерапія (СІТ) проводиться інвазійними способами, незручними, часто небезпечними для хворих, викликає необхідність розробки їх пролонгованих стабільних форм і нових шляхів введення. Засобом створення таких може бути іммобілізація алергенів і лікарських засобів (ЛЗ) із використанням полімерів медичного призначення для інтраназального введення.

Дані літератури про інтраназальні методи введення алергенів є вельми малочисельними: відоме проведення діагностики непереносимості аспірину розчином лізин-аспірину [1], СІТ алергічних ринітів паперовими дисками, імпрегнованими розчинами алергенів [2], ліпосомними формами алергенів, алергоїдами [3; 4] рекомбінантними алергенами [5]. Однак у деяких випадках не було досягнуто суттєвої стабілізації препаратів, пролонгованості алергену, виникали труднощі щодо точності його дозування, до того ж нові форми алергенів є складними і надмірно дорогими.

**Метою** даного дослідження було створення іммобілізованих форм алергенів інтраназального шляху введення як потенційних засобів для лікування, діагностики алергічних

ринітів і лікарської непереносимості новокаїну й аспірину, визначення функціонального стану слизової оболонки носової порожнини.

### Матеріали та методи дослідження

У роботі використовували комерційні препарати алергенів: харчових — алерген білка курячого яйця (АБКЯ), побутових — алерген хатнього пилу (АХП) і пилкових — алерген пилку берези (АПБ), стандартизовані в од. РНУ (білковий азот), усі препарати стабілізовані 0,4%-м розчином фенолу, а також новокаїн, метиленовий синій (МС), ацелізін-КМП (суміш DL-лізину ацетилсаліцилату та гліцину).

Як матриці для включення препаратів застосовували гідрофільні полімери — полівініловий спирт (ПВС) (М. м. 30 000), поліетиленоксид-400, (ПЕО-400), поліетиленгліколі (ПЕГ) з М. м. 13 000–15 000 і 40 000, желатину, желатину у комбінації з полівінілпіролідом (ПВП; (М. м. 2 000 000), а також гліцерин як пластифікатор і стабілізатор.

Полімерні плівки виготовляли за розробленою методикою: відповідні розраховані дози алергенів і ЛЗ змішували з розчинами полімерів і додавали гліцерин як пластифікатор.

Суміші розливали на основі, висушували в ексікаторі над  $\text{CaCl}_2$ , висікали однорідні еластичні непересихаючі плівки діаметром 0,5 см, запаюва-

ли їх у поліетиленові пакети і зберігали при температурі 4 °С у сухому, захищеному від світла місці.

Кількісне визначення вмісту білка [6], фенолу [7], новокаїну, МС [8], аспірину (АСП) у комерційних й іммобілізованих препаратах алергенів і ЛЗ проводили спектрофотометрично (СФ 46), для чого будували калібрувальні залежності.

Біофармацевтичну оцінку діагностичних плівок (ДП) із ЛЗ здійснювали в експерименті *in vitro* методом діалізу крізь гідратцелюлозну напівпроникну мембрану «Діацелл» (розмір пор 0,4 мкм) відносно дистильованої води при температурі 37 °С із кількісним визначенням препаратів у діалізаті.

Дані експерименту піддавали математичній обробці за програмами статистичної залежності, які включають обчислення значень середнього арифметичного, середнього квадратичного відхилення, стандартної середньої похибки експерименту та критерію Стьюдента [9], а також, у разі непараметричних показників, виконували обчислення за критеріями Уайта і Фішера [10].

Перевірка збереження вмісту ЛЗ у плівках проводилася методом ТШХ.

### Результати дослідження та їх обговорення

Використовуючи дані, наведені у літературі, та результати власних досліджень про стабілізуючу дію розчинів полімерів



стосовно ферментів (протеаза, стерилаза) [11], здійснили включення АБКЯ (1000 PNU) у 10%-ні розчини гідрофільних полімерів медичного призначення (ПВС, ПЕГ, ПЕО). При цьому відмітили високий рівень збереження вмісту білка і фенолу (81,7–100,0 %); через 3 міс зберігання вміст фенолу не змінився, білка зменшився на 10–20 % [12].

Оскільки полімерні плівки зручні для дозованого введення препарату, пролонгують його дію, здійснили включення АПБ, АБКЯ й АХП у плівки на основі ПВС.

Дані, наведені у табл. 1, демонструють утворення стабільних плівкових іммобілізованих форм алергенів (АХП і АБКЯ) у зростаючих дозах. Для діагностики АР отримали полімерні плівки (ДП) з алергенами дозою 200 PNU і часом виходу з плівки 30 хв.

Для підсилення пролонгування використовували обробку носія (ПВС) тетраборатом натрію, при цьому вихід алергену з плівки залежить від концентрації бури (рис. 1, 2). Утворення комплексу білка з носієм і бурою доведено дослідженнями кінематичної в'язкості розчинів і підтверджене методом УФ-спектроскопії на модельних алергенах овальбуміні та лізоцимі.

Іммобілізацію МС, новокаїну, ацелізіну здійснювали включенням у полімерні плівки на основі ПВС, желатини, желатини в комбінації з ПВП, визначали колір, площу, середню масу, розчинність.

Розроблені нами полімерні плівки (матриця — ПВС) для оцінки транспортної функції слизової оболонки носа з МС і сахаринатом натрію мали тривалий термін зберігання (2,5 роки), високу доступність, економічність [8].

Для діагностики алергії до новокаїну і непереносимості АСП розроблені плівки з кількісним вмістом новокаїну (10; 50 і 100 мкг) [8] і АСП (0,5; 1,5;

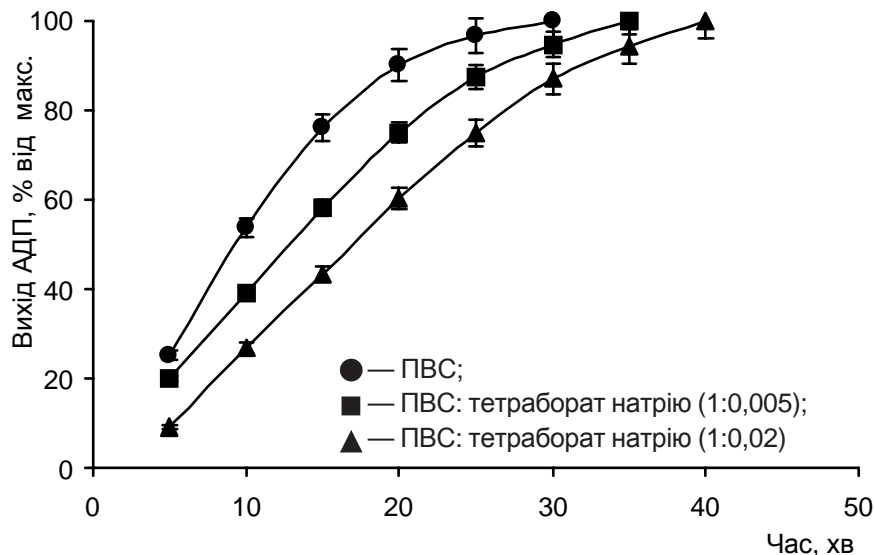


Рис. 1. Динаміка виходу алергену хатнього пилу з плівок ПВС

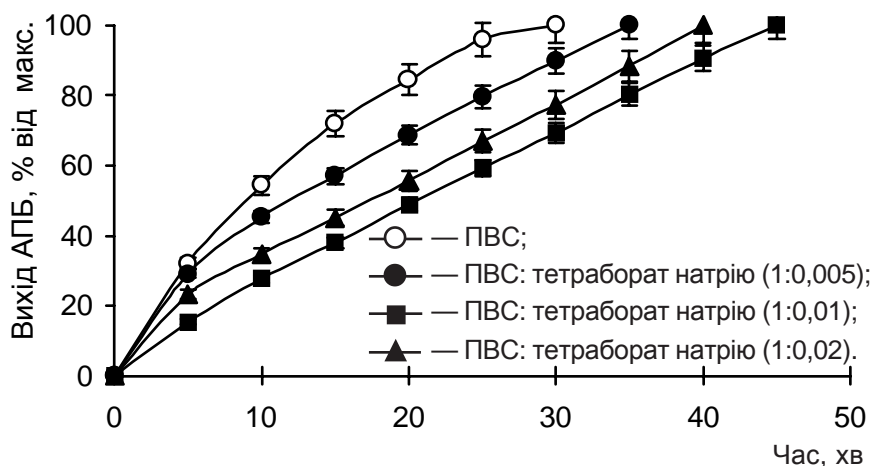


Рис. 2. Динаміка виходу алергену пилку берези з плівок ПВС

3,0 мг), стабільні при зберіганні (табл. 2), з високою доступністю, причому встановлено пролонгування досліджуваних ЛЗ при використанні желатини як матриці.

На основі плівкових форм алергенів був запропонований метод інтраназальної СІТ алергійних ринітів [13]: плівка з мінімальною дозою алергену вводиться у порожнину носа на носову перегородку на відстані 1,5–2 см від входу в ніс; у міру її розчинення (25–30 хв) відбувається поступовий вихід алергену з наступним всмоктуванням крізь слизову оболонку носа. Подальше введення плівок зі зростаючою концентрацією алергену

проводиться за традиційною схемою СІТ. Інтраназальна СІТ розпочата в 2002 г. у 28 хворих-добровольців віком 18–55 років із цілорічним алергійним ринітом (ЦАР) та виявленою гіперчутливістю до хатнього пилу. У 20 пацієнтів сьогодні спостерігається стабілізація алергічного процесу і підвищення якості життя, підтверджені ЛОР-оглядом, імунологічними дослідженнями, риноманометрією, причому побічної дії плівок не виявлено. Інтраназальна СІТ полімерними плівками з пилковими алергенами здійснювалася 40 хворим на ЦАР пилкової етіології у НДІ оториноларингології ім. О. С. Коломийченка (Київ)



Включення алергенів хатнього пилу та білка курячого яйця в плівки полівінілового спирту

Алерген	Масові співвідношення білок : носій	PNU	Вміст білка в іммобілізованому препараті			Вміст фенолу в іммобілізованому препараті				
			Після іммобілізації			Після іммобілізації				
			МКГ/Г носія, М±m	% від ВИХ.	Через 1 рік зберігання	МКГ/Г носія, М±m	% від ВИХ.	Через 1 рік зберігання		
АХП	1:1300	50	148,1±7,7	99,5	148,8±13,5	100,0	1,01±0,05	99,8	1,012±0,040	100,0
	1:650	100	300,3±10,4	100,0	300,0±20,9	100,0	2,03±0,18	97,6	1,88±0,20	90,2
	1:300	200	613,7±42,9	98,9	619,9±52,5	99,9	3,80±0,25	92,3	3,59±0,27	87,2
	1:200	300	955,6±37,2	100,0	912,6±61,9	95,5	4,85±0,32	79,5	4,30±0,30	70,5
	1:60	500	1580,0±69,0*	98,2	1254,0±74,7*	78,0	5,91±0,20*	56,3	4,06±0,39*	38,7
АБКЯ	1:1300	50	160,8±7,1	100,0	159,7±10,3	99,3	1,00±0,01	100,0	1,01±0,01	100,0
	1:650	100	318,0±10,4	98,8	321,9±25,5	100,0	1,98±0,06	96,1	1,91±0,08	92,8
	1:300	200	619,0±41,6	98,0	623,4±77,3	98,7	3,92±0,15	95,0	3,52±0,28	85,3
	1:200	300	998,5±41,9	99,2	904,5±68,4	90,4	5,49±0,27*	88,9	4,82±0,25*	78,1
	1:60	500	1546,2±100,0*	95,3	1229,2±76,1*	75,7	8,40±0,30*	80,9	6,76±0,45*	65,1

Примітка. При кількості експериментів n=6 вірогідність результатів у межах кожної серії експерименту становить P<0,001; \* — відмінності вірогідні (P<0,02) щодо вмісту алергену безпосередньо після іммобілізації.

Таблиця 2

Дослідження діагностичних плівок з ацелізином

Носій	Вих. концентрація АСП, мг/ДП	Характеристики ДП з ацелізином			Вміст аспірину в полімерних ДП з ацелізином*						
		Колір	Середня маса, мг, М±m	Розчинність, хв		Після включення		Через 1 міс зберігання		Через 3 міс зберігання	
				У воді	У фіз. розчині	Мг, М±m	% від ВИХ.	Мг, М±m	% від ВИХ.	Мг, М±m	% від ВИХ.
ПВС	0,5	Прозорі, безбарвні	9,4±0,1	4	3	0,50±0,01	100,0	0,49±0,02	98,0	0,49±0,01	98,0
	1,5		11,7±0,4	5	5	1,49±0,01	99,3	1,46±0,10	97,3	1,47±0,06	98,0
	3,0		13,5±0,6	6	6	2,99±0,01*	99,7	2,96±0,01	98,7	2,91±0,01*	97,0
Желатина	0,5	Прозорі, жовті	11,6±0,4	10	9	0,50±0,01	100,0	0,49±0,01	98,0	0,47±0,01	94,0
	1,5		13,6±0,3	11	11	1,48±0,01	98,7	1,47±0,05	98,0	1,43±0,02	95,3
	3,0		15,8±0,5	13	14	2,95±0,02	98,3	2,96±0,01	98,7	2,94±0,06	98,0
ПВС+ПВП	0,5	Непрозорі, білуваті	21,7±0,9	3	4	0,48±0,01	96,0	0,48±0,01	96,0	0,47±0,01	94,0
	1,5		22,4±0,9	5	5	1,48±0,02	98,6	1,47±0,01	98,0	1,45±0,03	96,7
	3,0		23,3±1,1	6	7	2,95±0,05*	98,3	2,92±0,02	97,3	2,79±0,04*	93,0

Примітка. При кількості експериментів n=6 вірогідність результатів у межах кожної серії експерименту становить P<0,001; \* — відмінності вірогідні (P<0,02) щодо вмісту аспірину безпосередньо після іммобілізації.

під керівництвом академіка Д. І. Заболотного: у 29 пацієнтів повністю зникли симптоми АР, у 8 — зменшилась їх вираженість.

Інтраназальна провокаційна проба ДП з АХП у 28 добровольців, хворих на ЦАР, показала зростання симптоматики АР (свербіж у носі, чхання, сльозотеча, закладення носа, ринорея) відповідно до виходу алергену з плівки (рис. 3). Її результати у 25 осіб були підтверджені внутрішньошкірною пробєю; показана вірогідність і відносна безпечність запропонованого методу [14]. Желатинові плівки з новокаїном для діагностики алергії до новокаїну застосовували у 10 хворих-добровольців із виявленою сенсibiliзацією до новокаїну. Через 15–20 хв після введення плівок у носову порожнину спостерігали чітку симптоматику алергічної реакції. При концентрації новокаїну 50 мкг у плівці досягається високий діагностичний результат і відзначається мінімум ускладнень.

За допомогою ДП із концентрацією АСП 3 мг (матриця ПВС) вперше розроблений інтраназальний провокаційний тест для діагностики непереносимості препарату. На рис. 4 наведені відмінності клінічних показників: місцевих симптомів і стану носового дихання у хворих 1-ї та 2-ї груп: з аспіриновою бронхіальною астмою і нечутливих до АСП.

У 28 хворих-добровольців із ЦАР досліджувалася транспортна функція миготливого епітелію слизової оболонки носа з ДП із МС (матриця ПВС). При цьому фіксували час виходу МС із плівки (7–8 хв), подальший його рух по слизовій оболонці носа і потоки слизу в глотці. У 20 пацієнтів із порушеною функцією слизового епітелію час транспорту МС становив 20–30 хв, у здорових осіб — 15–20 хв. Отже, запропонований спосіб діагностики транспортної функ-

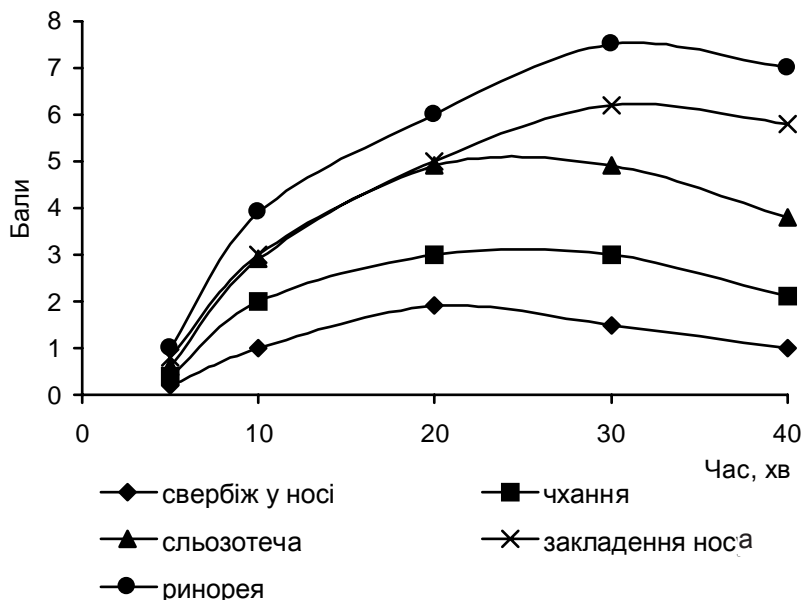


Рис. 3. Динаміка клінічних симптомів алергічного риніту при провокаційній пробі плівкою з алергеном хатнього пилу

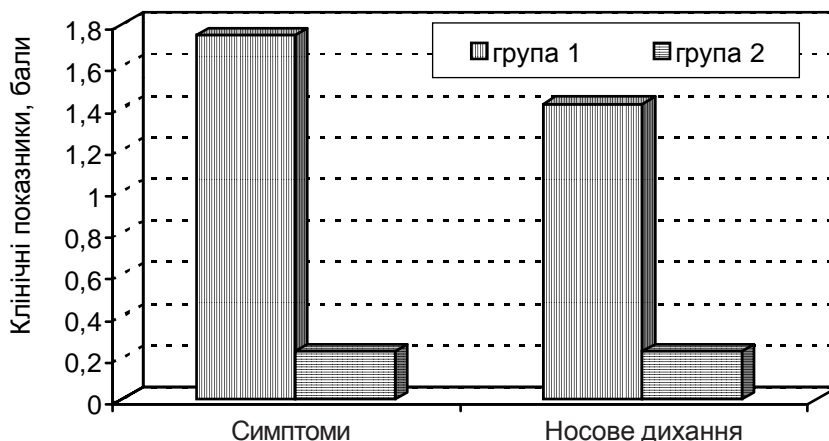


Рис. 4. Порівняльна оцінка клінічних показників між обстежуваними групами при проведенні інтраназального провокаційного тесту за допомогою полімерних плівок з ацелізином

ції епітелію слизової оболонки носа дозволяє вірогідно оцінити її в нормі та при патології.

### Висновки

1. Методи іммобілізації, що наводяться, дозволяють створювати стабільні пролонговані форми алергенів і розробляти інтраназальний шлях їх введення.
2. За допомогою полімерних плівок із включеними алергенами створений метод інтраназальної СІТ алергічних ринітів.
3. Плівкові форми алергенів дозволяють діагностува-

ти алергічні риніти, непереносимість ліків, стан слизової оболонки носової порожнини.

### ЛІТЕРАТУРА

1. Nasal provocation tests in the diagnosis of urticaria induced by acetylsalicylic acid / E. M. Thomaz, M. F. Ferreira, M. A. Spinola et al. // Allergy and asthma proc. — 1997. — Vol. 18. — P. 319-322.
2. Клиническая иммунология и аллергология / Под ред. Г. Лолорамл., Г. Фишера, Д. Адельмана. — М.: Практика, 2000. — 806 с.
3. Пухлик Б. М. Элементарная аллергология. — Винница: Велес, 2002. — С. 69-73.



4. Райкис Б. Н., Казиев А. Х. Настоящее и будущее лечебных аллергенов. — М.: Триада-Х, 2001. — 247 с.

5. Mucosal tolerance as therapy of type allergy: intranasal application of recombinated Bet v 1, the major birch-pollen allergen, leads to the suppression of allergic immune responses and airway inflammation in sensitized mice / B. Winkler, B. Baier, S. Wagner et al. // Allergy. — 2002. — Vol. 32. — P. 30-36.

6. Якубке Х. Д. Аминокислоты, пептиды, белки. — М.: Наука, 1985. — С. 335-356.

7. Коренман И. М. Фотометрический анализ. Методы определения органических соединений. — М.: Наука, 1983. — 358 с.

8. Романовская И. И., Давиденко Т. И., Пухлик С. М. Диагностичес-

кие полимерные пленки с новокаином и метиленовым синим // Вісн. ОНУ. — 2004. — Т. 9, № 3. — С. 108-113.

9. Иванов Ю. И., Погорелюк О. Н. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам. — М.: Медицина, 1990. — 224 с.

10. Архипова Г. П., Лаврова И. Г., Трошина И. М. Некоторые современные методы статистического анализа в медицине. — М., 1971. — 76 с.

11. Литическая активность иммобилизованной стерилизы (литического ферментного комплекса *Streptomyces recifensis* var. *lyticus*) / Т. И. Давиденко, И. И. Романовская, М. А. Чуманова и др. // Хим.-фарм.

журн. — 2001. — Т. 35, № 10. — С. 14-17.

12. Романовская И. И., Давиденко Т. И. Иммобилизация аллергенов белка куриного яйца и домашней пыли // Доп. НАН України. — 2000. — № 1. — С. 160-164.

13. Пат. 4268А Україна, МПК 7 А61В 10/00 Спосіб специфічної імунотерапії алергічних ринітів / Б. М. Пухлик, С. М. Пухлік, Т. І. Давиденко, І. І. Романовська, Д. І. Заболотний (Україна). — № 2000074259; Заявл. 17.07.2000; Опубл. 15.10.2001.

14. Пухлик С. М., Романовская И. И., Давиденко Т. И. Клинико-экспериментальное исследование изготовления и применения иммобилизованных аллергенов в ринологии // Ринология. — 2002. — № 1. — С. 42-45.

УДК 535-36/547.456.623

О. В. Сторчило, В. К. Напханюк, О. А. Багірова

## ФАРМАКОЛОГІЧНА КОРЕКЦІЯ ТРАНСПОРТУ ГЛЮКОЗИ В ТОНКІЙ КИШЦІ НАЩАДКІВ ОПРОМІНЕНИХ ТВАРИН

Одеський державний медичний університет

### Вступ

Сьогодні накопичено безліч даних про різноманітні вади розвитку у дітей, що народилися від опроміненних батьків: це порушення функцій сечостатевої системи, підвищення частоти загибелі після народження, порушення темпів росту, вади серця, помутніння кристалика, порушення пам'яті та здатності до асоціативного мислення, а також підвищена втомлюваність [1]. Вже через кілька років, коли вступить у життя покоління нащадків «чорнобильських дітей», можна очікувати на спалах спочатку домінуючих, а потім і рецесивних спадкових захворювань [2].

Тонка кишка, в якій відбуваються заключні процеси травлення та всмоктування мономерних нутрієнтів, однією з

перших реагує на опромінення: десквамацією ентероцитів, розшаруванням слизової оболонки, зміною ліпідного складу мембран ентероцитів, порушенням процесів спряження гідролізу та транспорту нутрієнтів, що призводить до глибоких порушень процесів асиміляції [3–6].

У зв'язку з наведеним дослідження транспорту глюкози є однією з класичних моделей вивчення функціонального стану тонкої кишки як за фізіологічних умов, так і за умов стресу. Тому нами така модель була використана для пошуку соціально адаптованих препаратів рослинного походження як фармакологічних коректорів транспортних процесів у тонкій кишці нащадків тварин, які зазнали дії тотального  $\gamma$ -опромінення в низькій дозі.

**Мета** роботи: з'ясування можливості фармакологічної корекції транспорту глюкози в слизовій оболонці тонкої кишки нащадків опромінених тварин препаратом «Легалон» й екстрактами плодів розто-ропші плямистої та квіток календули.

### Матеріали та методи дослідження

Досліди проведені на дво-місячних щурах-самцях лінії Вістар, що утримувалися на стандартному раціоні віварію. У досліді було використано кілька груп тварин:

- 1 — інтактні тварини;
- 2 — нащадки самців, опромінені у дозі 0,5 Гр ( $F_1$ );
- 3 — нащадки від  $F_1$  (тобто  $F_2$ ).

Слід зауважити, що використання у досліді нащадків

