

*Victor I. Usenko,
ScD (Doctor in Biology), Professor;*

*Dirgela E. Dordzhieva,
Graduate;*

*Irina S. Ryzhkina,
ScD (Doctor in Chemistry), full professor,
Leading Researcher;*

*Leisan I. Murtazina,
ScD, Junior Researcher;*

*Svetlana Yu. Sergeeva,
Junior Researcher,
Kazan State Academy of Veterinary Medicine n.a.NE. Bauman*

Polyoxidonium Immunomodulator Nonassociative Solutions Optimal Concentrations Influence on the Blood Indices of Laboratory Animals

Key words: nonassociate, polyoxidonium, immunomodulator white rats.

Annotation: The paper presents the results of polyoxidonium immunomodulator nonassociative solutions study and their influence on a body of white rats in optimal concentrations in a comparison with allopathic dose.

Многие из имеющихся лекарственных средств способны оказывать на организм животных и человека терапевтическое воздействие даже в значительно более низких дозах, чем аллопатические. Ряд биологически активных веществ (БАВ), приготовленных методом последовательных серийных разбавлений, образуют наноразмерные образования, обозначенные термином «наноассоциаты». Было выяснено, что экстремальные значения наноассоциатов, характеристик растворов и биоэффектов наблюдаются практически в одинаковых интервалах концентраций растворов БАВ, что позволяет прогнозировать появление биоэффекта в области низких концентраций. На основании ранее проведенных исследований было выяснено, что проявление сложных взаимоотношений в системе «концентрация – биоэффект» следует рассматривать с позиции структурирования самоорганизованного раствора БАВ в конкретных концентрациях с последующим взаимодействием биообъекта с наноассоциатами с помощью различных механизмов. Актуальность проблемы связана с изучением самоорганизации, физико-химических и биологических свойств иммуномодулятора полиоксидоний при низких и сверхнизких концентрациях растворов.

Целью исследований являлось изучение «активности» наноассоциатов и влияние низких и сверхнизких концентраций растворов полиоксидония на организм лабораторных животных.

Материалы и методы исследований. Прогнозирование и поиск интервалов концентраций, в которых возможно максимальное проявление биоэффекта растворов иммуномодулятора полиоксидоний (П), осуществлялись с использованием методов динамического светорассеивания (ДСР), электрофореза, кондуктометрии и рН-метрии. В широкой области концентраций (10^{-20} – 10^{-3} мг/мл) изучались самоорганизация и физико-химические свойства растворов П. Биологические свойства растворов П были изучены на белых беспородных крысах-самцах массой 180 - 200 г, содержащихся в виварии кафедры фармакологии и токсикологии ФГБОУ ВПО КГАВМ согласно зоотехнических требований. Работа проводилась в соответствии с требованием «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных (1977)», а контрольные и подопытные белые крысы получали сбалансированный по питательным веществам рацион и имели свободный доступ к питьевой воде. По принципу аналогов было сформировано 5 групп животных по 5 особей в каждой из них. Первая группа была контрольной, вторая-пятая – подопытными и получали инъекции иммуномодулятора в различных дозах и концентрациях при его разведении бидистиллированной водой. Во 2-й подопытной группе определение количества вводимого препарата проводили согласно рекомендуемой дозы, отраженной в инструкции по применению полиоксидония, а далее проводили ее перерасчет на крысу средней массой 200 г. Доза препарата для животных этой группы составляла 0,1 мг/кг массы тела (аллопатическая доза). Иммуномодулятор после растворения в бидистиллированной воде в объеме 1 мл вводили внутримышечно с внутренней поверхности бедра, животным 3-й группы препарат вводили в виде высоко разбавленного раствора 10^{-8} мг/мл, в 4-й – 10^{-11} и в 5-й – 10^{-16} мг/мл. Различные концентрации водных растворов П предварительно готовились методом последовательных серийных разбавлений с использованием бидистиллированной воды. Контрольным животным бидистиллированную воду в дозе 1 мл вводили в ту же область тела, что и подопытным крысам. Продолжительность опыта составляла 25 суток и включала 5 серий инъекций препарата и бидистиллированной воды последовательно через каждые 5 суток. Контрольных и подопытных животных из опыта выводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных 86/609/ЕЕС путем декапитации под эфирным наркозом. Взятие крови у животных для исследования осуществляли из шейной вены. Для определения гематологических показателей в периферической крови подсчитывали общее количество лейкоцитов ($\bullet 10^9$ /л), абсолютное и относительное количество нейтрофилов и лимфоцитов. Содержание лейкоцитов и лейкограмму определяли общепринятым методом с использованием клавишного механического счетчика крови (ЗАО «ЛЮиП», СПб, 1999) и камеры Горяева (Кудрявцев А.А., Кудрявцева Л.А., 1973). В сыворотке крови определяли уровень общего белка (г/л) рефрактометрическим методом. Статистическую обработку полученных в опыте цифровых данных обрабатывали методом вариационной статистики с помощью программного

обеспечения "Microsoft Excel – 2003". Полученные различия в цифровых данных считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение. Действующим началом полиоксидония является сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и (N-карбоксии)-1,4-этиленпиперазина бромид. По характеру распределения частиц в растворе изученную нами широкую область концентраций ($10^{-20} - 10^{-3}$ мг/мл) можно объективно разделить на два интервала: $10^{-3} - 10^{-7}$ мг/мл и $10^{-8} - 10^{-16}$ мг/мл. В результате проведенных исследований водных растворов **II** с использованием метода ДСР выявлено, что в интервале концентраций $10^{-3} - 10^{-7}$ мг/мл, а также после 10^{-16} мг/мл частицы в растворе не обнаруживаются ($P > 0,05$). В интервале концентраций $10^{-8} - 10^{-16}$ мг/мл выявляются нанообразования с практически мономодальным распределением частиц по размерам, соответствующим 120 ± 30 нм. Методом микроэлектрофореза в изученной области концентраций выявить ζ - потенциал частиц не удалось ($P > 0,05$). При изучении физико-химических свойств растворов **II** установлено, что значения χ растворов в интервале $10^{-3} - 10^{-7}$ мг/мл закономерно снижаются по мере уменьшения концентрации. В интервале $10^{-8} - 10^{-16}$ мг/мл концентрационная зависимость χ характеризуется нелинейностью, типичной для изученных ранее растворов биологически активных веществ, способных проявлять биоэффекты в области низких концентраций. Нами отмечено, что при концентрациях раствора 10^{-8} , 10^{-11} , 10^{-14} и 10^{-16} на зависимости удельной электропроводности наблюдаются максимумы, которые свидетельствуют об образовании в растворе наноассоциатов с экстремальными параметрами. Таким образом, основываясь на проведенных исследованиях, можно сделать предварительный прогноз, что в интервале концентраций $10^{-8} - 10^{-16}$ мг/мл раствора **II** следует ожидать появление биоэффекта в организме в ответ на действие растворов этого препарата с максимальным откликом при концентрациях растворов, равных 10^{-8} , 10^{-11} , 10^{-14} и 10^{-16} мг/мл.

Проведенное дальнейшее исследование разных концентраций растворов в области 10^{-8} , 10^{-11} и 10^{-16} мг/мл в сравнительном аспекте с аллопатической дозой и бидистиллированной водой показало следующие результаты. Так, содержание общего белка в сыворотке крови у контрольных белых крыс составляло $51,77 \pm 1,77$ г/л. Во всех подопытных группах отмечалось увеличение содержания общего белка в сыворотке крови. Наиболее высокие значения этого показателя отмечались в группе с разведением иммуномодулятора 10^{-16} мг/мл (наноассоциаты – 5-я группа). Значение показателя возросло на 16,6% ($P < 0,05$), по сравнению с контролем. В других группах повышение было менее значительным. Так, в подопытной группе животных с аллопатической дозой (2-я подопытная группа – 0,1 мг/кг массы тела) повышение составило 8,7%, в 3-й группе (10^{-8} мг/мл) – 10,2%, в 4-й подопытной группе (10^{-11} мг/мл) – 12,0%. Повышение уровня белка в сыворотке крови свидетельствует о нормализации клеточного метаболизма, повышении интенсивности анаболических процессов и снижении процессов протеолиза. При сравнении общего количества лейкоцитов в крови у контрольных и подопытных лабораторных животных следует отметить, что у последних также наблюдались более высокие значения этого показателя крови, но динамика изменений была несколько иной. Так, наиболее высокие результаты показателя количество лейкоцитов в крови отмечались во 2-й группе

(аллопатическая доза), где увеличение составило 57,1%, по сравнению с контролем ($P < 0,05$). Количество лейкоцитов у крыс этой группы в крови составило $7,13 \pm 1,23 \cdot 10^9$ /л. В других подопытных группах повышение значения этого показателя крови было более низким. Так, в 3-й группе повышение составляло 22%, в 4-й – на 18,2% и в 5-й – на 16,4%. Среди форменных элементов крови лейкоциты являются клетками, обеспечивающими иммунный статус организма. Среди различных видов лейкоцитов крови в процентном отношении преобладают лимфоциты и нейтрофилы (микрофаги). У белых крыс отмечается лимфоцитарный профиль крови, так как в процентном отношении эти клетки являются самыми массовыми среди лейкоцитов. При сравнении в различных подопытных группах и в контроле клеточного соотношения лимфоциты/нейтрофилы получили следующие результаты. Так, в контроле этот индекс клеточного соотношения составил 2,28, во 2-й группе – 4,14, в 3-й – 2,48, в 4-й – 1,89 и в 5-й – 2,47. Таким образом, анализ индекса клеточного соотношения лимфоцит/нейтрофил указывает на то, что в группе, где животным вводили аллопатическую дозу полиоксидония, происходит заметное преобладание лимфопоэза над гранулоцитопоэзом. Кроме того, в этой группе выявляется наибольшее количество лимфоцитов в крови не только в сравнении с контролем, но также и с другими подопытными группами. Так, количество лимфоцитов в крови у животных 2-й группы, по сравнению с контролем, превышало на 87,9%, в других же подопытных группах (2 - 4-я) соответственно на 23,1%, 14,4% и 17,2%. Количество нейтрофилов ($2,03 - 2,80 \cdot 10^9$ /л) в крови у крыс разных групп не имело таких резких различий, по сравнению с количеством лимфоцитов. Тем не менее, в процентном отношении к другим лейкоцитам эти различия просматривались. Так, в контроле процентное содержание нейтрофилов, по отношению к другим лейкоцитам, было наиболее высоким и уступало лишь значению показателя в 4-й группе животных на 16,8%.

Таким образом, применение иммуномодулятора полиоксидоний в виде водных растворов разных разбавлений показало, что наиболее высокие результаты по обеспечению в организме лимфопоэза, как клеток, обеспечивающих иммунный статус в организме, отмечаются после введения аллопатической дозы препарата (0,1 мг/кг массы тела). Тем не менее, инъекция крысам малых и сверхмалых последовательных серийных разбавлений (наноассоциаты) полиоксидония также оказывает положительное влияние на организм животных, а полученные результаты свидетельствуют, что примененные дозы в концентрации 10^{-8} мг/мл, 10^{-11} и 10^{-16} мг/мл можно использовать животным в профилактических целях для повышения иммунного статуса организма.