

# АНТИГИСТАМИННОЕ ДЕЙСТВИЕ НОВОГО ПЕПТИДНОГО ПРЕПАРАТА ИЗ ПЕЧЕНИ ТРЕСКОВЫХ

УДК 615.27

© К. Л. Крышень<sup>1</sup>, Д. В. Демченко<sup>2</sup>, О. Н. Пожарицкая<sup>2</sup>, М. Н. Макарова<sup>1, 2</sup>,  
Я. А. Гуцин<sup>1</sup>, А. В. Рыбакова<sup>2</sup>, А. В. Рыдловская<sup>2</sup>, А. Н. Шиков<sup>1, 2</sup>,  
В. Г. Макаров<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Северо-западный государственный медицинский университет им. И. И. Мечникова, Санкт-Петербург;

<sup>2</sup> Санкт-Петербургский институт фармации

## Ключевые слова:

пептидный препарат; гистамин; H<sub>1</sub>-гистаминовые рецепторы; базофилы; культура клеток; седативное действие.

## Резюме

В результате проведенной работы было изучено влияние пептидной субстанции на индуцированную продукцию гистамина культурой базофилов, взаимодействие препарата с H<sub>1</sub>-гистаминовыми рецепторами и возможное седативное действие на поведенческих моделях. Изучение влияния пептидной субстанции на индуцированную продукцию гистамина культурой базофилов показало, что внесение пептидной субстанции в культуру клеток не оказало значимого влияния на выброс гистамина. Исследование взаимодействия полипептидной субстанции с H<sub>1</sub>-гистаминовыми рецепторами подвздошной кишки морской свинки показало, что препарат подавляет реакцию гладкой мускулатуры на гистамин. По выраженности выявленный эффект был близок к таковому известного антигистаминового средства — субстанции кетотифена. При тестировании в «открытом поле» и «приподнятом крестообразном лабиринте» было установлено, что пептидный препарат не обладает седативным действием, характерным для антигистаминных препаратов 1-го поколения.

Гистамин — важный химический медиатор аллергической реакции и воспаления. Он синтезируется и накапливается во вторичных гранулах тучных клеток различных тканей и циркулирующих в крови базофилах. При запуске анафилактической реакции гистамин высвобождается из клеток и взаимодействует со специфическими гистаминовыми рецепторами. На сегодняшний день охарактеризовано 4 типа гистаминовых рецепторов, однако при аллергическом воспалении наибольшую роль играет взаимодействие гистамина с рецептором первого типа. Через H<sub>1</sub>-гистаминовые рецепторы медиатор вызывает спазм гладкой мускулатуры бронхов и кишечника, активирует антиген-презентирующие клетки, стимулирует экспрессию молекул клеточной адгезии, индуцирует привлечение эозинофилов и нейтрофилов в очаг воспаления, повышает проницаемость капилляров, за счет чего инициирует развитие отека тканей [5].

В соответствии с этим существуют две стратегии профилактики анафилактических реакций: ингибирование выброса гистамина из тучных клеток/базофилов и блокада H<sub>1</sub>-гистаминовых рецепторов пораженного органа. При этом сочетание возможности обеих стратегий в одном препарате повышает его эффективность [7].

В аллергологической и дерматологической практике наиболее изученными являются антигистаминные препараты, блокирующие H<sub>1</sub>-рецепторы гистамина, первого поколения, которые зарекомендовали себя как универсальные и безопасные средства [2]. Антигистаминные препараты блокируют действие гистамина на H<sub>1</sub>-рецепторы по механизму конкурентного ингибирования, причем их сродство к этим рецепторам значительно ниже, чем у гистамина. Поэтому данные лекарственные средства не способны вытеснить гистамин, связанный с рецептором, они только блокируют незанятые или высвобождаемые рецепторы. Соответственно, H<sub>1</sub>-блокаторы рецепторов гистамина наиболее эффективны для предупреждения аллергических реакций немедленного типа, а в случае развившейся реакции предупреждают выброс новых порций гистамина. По своему химическому строению большинство из них относятся к растворимым в жирах аминам, которые обладают сходной структурой.

Седативное действие, определяется тем, что большинство антигистаминных препаратов первой генерации, легко растворяясь в липидах, хорошо проникают через гематоэнцефалический барьер и связываются с H<sub>1</sub>-рецепторами головного мозга. Возможно, их седативный эффект складывается из блокирования центральных серотониновых и ацетилхолиновых рецепторов. Из-за седативного эффекта большинство лекарств нельзя использовать в период выполнения работ, требующих внимания. Все препараты первого поколения потенцируют действие седативных и снотворных лекарств, наркотических и ненаркотических анальгетиков, ингибиторов моноаминоксидазы.

Ранее на модели контактного дерматита у мышей было показано, что введение пептидной субстанции из печени тресковых снижает признаки аллергической реакции (локальный отек, уровень IgE

в крови) [1]. Выявленная противоаллергическая активность позволила предположить наличие у препарата антигистаминного действия, которое может выражаться в ингибировании выброса гистамина из тучных клеток/базофилов и/или блокаде  $H_1$ -гистаминовых рецепторов пораженного органа.

Целью данной работы являлась оценка антигистаминного и седативного действия петидной субстанции из печени тресковых.

В соответствии с целью была поставлена задача: оценить влияние пептидной субстанции на индуцированную продукцию гистамина культурой базофилов, изучить взаимодействие препарата с  $H_1$ -гистаминовыми рецепторами и оценить возможное седативное действие на поведенческих моделях.

В качестве тест-системы для изучения влияния пептидной субстанции на индуцированную продукцию гистамина была выбрана перевиваемая линия базофилов крысы (RBL-1), как широко используемая в подобных целях культура клеток [4, 6, 8]. Оценку взаимодействия пептидного препарата с  $H_1$ -гистаминовыми рецепторами проводили на выделенных фрагментах подвздошной кишки морской свинки. Индуктором активации выброса гистамина служило химическое вещество, инициирующее дегрануляцию тучных клеток и базофилов — Compound 48/80 [4].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследовали новый пептидный препарат, представляющий оригинальный стандартизированный экстракт из печени тресковых (*Gadidae*), содержащий комплекс пептидов, свободных аминокислот и микроэлементы (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn).

В работе использовали реагенты: гистамин, Compound 48/80, кетотифен в виде fumarата (все Sigma-Aldrich, USA).

Исследование влияния препарата на продукцию гистамина культурой линии RBL-1.

*Исследование проводили в перевиваемой культуре клеток базофильной лейкемии крысы (RBL-1)* (Российская коллекция клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в соответствии с протоколом, в среде EMEM (ООО «Биолот», Россия) с глутамином (ПанЭко, Москва), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия) и 80 мкг/мл гентамицина. Эмбриональная телячья сыворотка добавлялась в культуральную среду для создания физиологических условий, гентамицин — для предотвращения заражения микрофлорой.

Compound 48/80 разводили в среде EMEM (ООО «Биолот») до концентрации 2 мг/мл. Пептидную субстанцию растворяли в культуральной среде EMEM,

готовя серию растворов с концентрацией: 320, 160, 80, 40 и 20 мкг/мл. Тестируемые концентрации составили: 8, 4, 2 и 1 мкг/мл. Субстанцию кетотифена растворяли в культуральной среде EMEM до концентрации 0,4 мг/мл.

Иммуноферментный анализ выполнен на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, USA) с использованием коммерческого набора Histamine ELISA (IBL International GMBH).

*Определения взаимодействия пептидной субстанции с  $H_1$ -гистаминовыми рецепторами*

Для выявления данного эффекта был выбран метод гистамин-индуцированного сокращения подвздошной кишки морской свинки с использованием установок изолированных тканей. В работе использовано 48 фрагментов подвздошной кишки, извлеченных из 12 беспородных морских свинок-самцов.

Морские свинки (Питомник лабораторных животных «Рапполово» РАМН, Ленинградская область) были в возрасте 14–16 недель массой 250–350 г.

Агентом, моделирующим аллергический ответ, являлся раствор гистамина в концентрации  $10^{-6}$  М. Его готовили последовательным десятикратным разведением приготовленного заранее исходного раствора ( $10^{-3}$  М). Пептидную субстанцию растворяли в растворе Кребса-Ханзеляйта, получая растворы с тестируемыми концентрациями вещества (4, 8, 16, 32, 64 и 128 мкг/мл), препарат сравнения кетотифен разводили тем же раствором до концентрации 0,005 мкг/мл.

Седативное действие оценивали в тесте «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт» с учетом ориентировочно-исследовательского эмоционального, стереотипного и двигательного компонентов по поведенческому атласу для грызунов [3]. Исследование проведено на 60 аутбредных крысах, массой 180–220 г (Питомник лабораторных животных РАМН «Рапполово», Ленинградская область). Субстанцию вводили внутрижелудочно через атравматичный зонд в широком диапазоне доз от 10000 до 60000 мг/кг. Препарат для введения растворяли в воде. В качестве контроля вводили воду.

Эвтаназию животных осуществляли путем декапитации в  $CO_2$ -камере. Все эксперименты на животных выполнены в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказом № 708 н от 23.08.2010 и одобрены на заседании биоэтической комиссии Санкт-Петербургского института фармации.

Статистический анализ выполняли с помощью программного обеспечения Статистика 6.0 (StatSoft, USA). В качестве параметрического критерия использовали критерий Стьюдента для независимых переменных. Различия были определены при 0,05 уровне значимости. В качестве непараметрического критерия использовался критерий Вилкок-

■ Таблица 1. *Сотроунд 48/80-индуцированная секреция гистамина в перевиваемой культуре базофилов линии RBL-1 ( $M \pm m$ ,  $n = 10$ )*

Группа	Концентрация, мкг/мл	Продукция гистамина, % от контроля
Интактные	–	17 ± 4
Контроль	–	100 ± 24 *
Кетотифен	16	0 ± 0,2 **
Пептидная субстанция	1	91 ± 28 *
Пептидная субстанция	2	124 ± 26 *
Пептидная субстанция	4	95 ± 14 *
Пептидная субстанция	8	74 ± 30

\* — статистически значимое отличие от интактных по критерию Стьюдента, при  $p < 0,05$ ; \*\* — статистически значимое отличие от контроля по критерию Стьюдента, при  $p < 0,05$

сона. Различия были определены при 0,05 уровне значимости. Данные представлены в виде медианы (Me) и квартильного размаха (Q).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние полипептидной субстанции на индуцированную продукцию гистамина базофилами представлено в таблице 1. Из данных, приведенных в ней, видно, что уровень гистамина в культуре клеток, стимулированных веществом Сотроунд 48/80 (контроль), был в 5,9 раз выше, чем в культуре интактных клеток. Таким образом, внесение в культуру базофилов Сотроунд 48/80 индуцировало выброс гистамина. Дополнительная инкубация базофилов с субстанцией кетотифена, выбранной в качестве

препарата сравнения, привела к полному подавлению продукции медиатора. Это соответствует литературным данным [4], поэтому позволяет сделать вывод о корректности проведенного исследования.

Внесение пептидной субстанции в культуру клеток не оказало значимого влияния на выброс гистамина.

Изучение влияния полипептидной субстанции на  $H_1$ -гистаминовые рецепторы подвздошной кишки морской свинки показало, что препарат подавляет реакцию гладкой мускулатуры на гистамин. Это проявлялось в снижении амплитуды гистамин-индуцированного сокращения кишки и увеличении времени наступления максимального ответа (табл. 2).

■ Таблица 2. *Амплитуда гистамин-индуцированного сокращения подвздошной кишки и время наступления максимального ответа при применении полипептидной субстанции ( $Me \pm Q$ ,  $n = 8$ )*

Группа	Концентрация, мкг/мл	Показатели гистамин-индуцированного сокращения подвздошной кишки	
		Амплитуда сокращения, % от ответа на раствор 80 мМ KCl	Время наступления максимального ответа (долей от ответа на раствор 80 мМ KCl)
Контроль	–	100 ± 10	1,0 ± 0,2
Кетотифен	0,005	2 ± 2 *	45 ± 16 *
Пептидная субстанция	4	100 ± 8	1,0 ± 0,2
Пептидная субстанция	8	78 ± 13 *	3 ± 1 *
Пептидная субстанция	16	71 ± 15 *	7 ± 3 *
Пептидная субстанция	32	34 ± 10 *	20 ± 9 *
Пептидная субстанция	64	21 ± 6 *	35 ± 8 *
Пептидная субстанция	128	13 ± 3 *	53 ± 13 *

\* — статистически значимое отличие от показателей контрольной группы, при  $p < 0,05$

Субстанция оказывала действие в широком диапазоне концентраций (8–128 мкг/мл), при этом наиболее выраженный эффект был отмечен в максимальной из тестируемых концентраций (128 мкг/мл) — на фоне пептидной субстанции амплитуда гистамин-индуцированного сокращения составила 13% от контроля, а время наступления максимального ответа на гистамин было увеличено в 53 раза по сравнению с контролем. По выраженности выявленный эффект был близок к таковому известного антигистаминального средства — субстанции кетотифена (0,005 мкг/мл), снизившего амплитуду сокращения до 2% от контроля и увеличившего время наступления максимального ответа в 45 раз.

При тестировании в «открытом поле» и «приподнятом крестообразном лабиринте» животные после однократного внутривенного введения исследуемого полипептидного препарата демонстрировали преимущественно уравновешенный тип поведения, с умеренной локомоторной и поисковой активностью без проявления признаков тревожности. Пептидная субстанция из печени тресковых хорошо растворима в воде и не растворяется в липофильных растворителях. Таким образом, не обладая липофильностью, она не проникает через гематоэнцефалический барьер и не блокирует H<sub>1</sub>-гистаминовые рецепторы головного мозга, а также центральные серотониновые и м-холинорецепторы, т.е. не обладает седативным действием, характерным для антигистаминных препаратов 1-го поколения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование было направлено на изучение антигистаминального действия новой полипептидной субстанции, полученной из печени тресковых по оригинальной технологии. Оценивались два возможных механизма: влияние субстанции на индуцированную продукцию гистамина культурой базофилов *in vitro* и взаимодействие субстанции с H<sub>1</sub>-гистаминовыми рецепторами *ex vivo*.

Результаты исследования показали, что полипептидная субстанция дозозависимо подавляет реакцию гладкой мускулатуры на гистамин, что проявлялось в снижении амплитуды гистамин-индуцированного сокращения кишки и увеличении времени наступления максимального ответа. ЭД<sub>50</sub> субстанции по отношению к амплитуде сокращения составила 24,6 мкг/мл.

Таким образом, проведенное исследование позволило установить наличие у полипептидной субстанции антигистаминального действия, механизм действия которого заключается в снижении чувствительности H<sub>1</sub>-рецепторов к гистамину, при этом не оказывая седативного действия.

Работа выполнена в рамках государственного контракта ГК № 16.512.11.2020, 2011–2012 гг. по Федеральной целевой программе ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы», мероприятие 1.2.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Крышень К. Л., Демченко Д. В., Рыбакова А. В. и др. Оценка противоаллергенных свойств нового полипептидного препарата из печени тресковых // Эксперим. и клин. дерматокосметология. — 2012. — № 2. — С. 38–42.
2. Лусс Л. В. Выбор антигистаминных препаратов в лечении аллергических и псевдоаллергических реакций // Рос. аллергологич. журнал. — 2009. — № 1. — С. 1–7.
3. Пошивалов В. П. Фармакоэтология (сборник статей). — СПб.: Изд. СПбМУ, 1997.
4. Matsumoto T., Horiuchi M., Kamata K., Seyama Y. Effects of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* scherff treated with enzyme on histamine-induced contraction of guinea pig ileum and on histamine release from mast cells // J. Smooth Muscle Res. — 2009. — Vol. 45, N 2–3. — P. 75–86.
5. Nijmeijer S., Leurs R., Vischer H. F. Constitutive activity of the histamine H(1) receptor // Methods Enzymol. — 2010. — Vol. 484. — P. 127–147.
6. Sengoku T., Kishi S., Sakuma S. et al. FK506 inhibition of histamine release and cytokine production by mast cells and basophils // Int. J. Immunopharmacol. — 2000. — Vol. 22, N 3. — P. 189–201.
7. Simons F. E., Simons K. J. Histamine and H<sub>1</sub>-antihistamines: celebrating a century of progress // J. Allergy Clinical Immunology. — 2011. — Vol. 128, N 6. — P. 1139–1150.
8. Xiong S., Rodgers K. Effects of malathion metabolites on degranulation of and mediator release by human and rat basophilic cells // J. Toxicol. Environ. Jun. — 2006. — Vol. 51, N 2. — P. 159–175.

## ANTIHISTAMINE ACTIVITY OF THE NEW PEPTIDE PREPARATION FROM THE COD LIVER

Kryshen K. L., Demchenko D. V., Pozharitskaya O. N., Makarova M. N., Gushchin Ya. A., Rybakova A. V., Rydlovskaya A. V., Shikov A. N., Makarov V. G.

♦ **Summary:** The effect of the peptide substance on the induced production of histamine by culture of basophile, interaction of the preparation with the H<sub>1</sub>-histamine receptors and possible sedative effect on animal models were studied. The introduction of the peptide substance in cell culture of basophile didn't have a significant effect on the histamine release. Study of the interaction of the polypeptide substance with H<sub>1</sub>-histamine receptors of guinea pig ileum showed that the preparation inhibits the response of unstriated muscles to histamine. The effect was similar to antihistamine drug - ketotifen. In the models of "open field" and "elevated criss-cross labyrinth" it was found that the peptide preparation hasn't a sedative effect.

♦ **Key words:** peptide preparation; histamine; H<sub>1</sub>-histamine receptors; basophiles; cell culture; sedative activity.

## ♦ Информация об авторах

*Крышень Кирилл Леонидович* — аспирант кафедры биологической и общей химии. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздравсоцразвития России. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: kryshen@bk.ru.

*Демченко Дмитрий Валентинович* — соискатель, инженер-технолог. Санкт-Петербургский институт фармации. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: demchenkodv@mail.ru.

*Пожарицкая Ольга Николаевна* — к. фарм. н., заместитель директора по новым технологиям. Санкт-Петербургский институт фармации. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: olgapozhar@mail.ru.

*Макарова Марина Николаевна* — к.б.н., доцент кафедры биологической и общей химии. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздравсоцразвития России. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: mmn2410@yandex.ru.

*Гущин Ярослав Александрович* — студент. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздравсоцразвития России. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: spbpharm@mail.ru.

*Рыбакова Анна Владимировна* — соискатель, врач-ветеринар. Санкт-Петербургский институт фармации. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: spbpharm@mail.ru.

*Рыдловская Анастасия Владимировна* — к.б.н., старший научный сотрудник. Санкт-Петербургский институт фармации. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: spbpharm@mail.ru.

*Шиков Александр Николаевич* — д. фарм. н., профессор кафедры фармакологии. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздравсоцразвития России. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33. E-mail: alexs79@mail.ru.

*Макаров Валерий Геннадьевич* — д.м.н., профессор кафедры биологической и общей химии. ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова» Минздравсоцразвития России. Генеральный директор, Санкт-Петербургский институт фармации. 195067, Санкт-Петербург, Пискаревский пр., д. 47/33.  
E-mail: makarov@ipharm.sp.ru.

*Kryshen Kirill Leonidovich* — postgraduate student. Mechnikov North-West State Medical University. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: kryshen@bk.ru.

*Demchenko Dmitriy Valentinovich* — postgraduate student, engineer. Saint-Petersburg institute of pharmacy. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: demchenkodv@mail.ru.

*Pozharitskaya Olga Nikolayevna* — the deputy of the general director in new technologies. Saint-Petersburg institute of pharmacy. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: olgapozhar@mail.ru.

*Makarova Marina Nikolayevna* — PhD. Mechnikov North-West State Medical University. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: mmn2410@yandex.ru.

*Gushchin Yaroslav Aleksandrovich* — student. Mechnikov North-West State Medical University. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: spbpharm@mail.ru.

*Rybakova Anna Vladimirovna* — postgraduate student, veterinarian. Saint-Petersburg institute of pharmacy. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: spbpharm@mail.ru.

*Rydlovskaya Anastasiya Vladimirovna* — PhD, senior scientific researcher. Saint-Petersburg institute of pharmacy. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: spbpharm@mail.ru.

*Shikov Aleksandr Nikolayevich* — PhD, ScD, professor. Mechnikov North-West State Medical University. 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: alexs79@mail.ru.

*Makarov Valeriy Gennadyevich* — PhD, ScD, professor. Mechnikov North-West State Medical University. General director, Saint-Petersburg institute of pharmacy 195067, Saint-Petersburg, Piskarevskiy pr., 47/33. E-mail: makarov@ipharm.sp.ru.