

ФАРМАКО КИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№ 2.2019



Центр
Фармакоэкономических
Исследований

18 лет исследовательской работы

230 исследований

220 публикаций

48 партнёров

Комплексная клинико-экономическая оценка лекарственных средств для включения в ограничительные перечни

- Оценка эффективности и безопасности
 - систематический обзор
 - мета-анализ
 - не прямые и смешанные сравнения, сетевой мета-анализ
- Разработка моделей принятия решений в MS Excel
- Локальная адаптация CORE-моделей
- Клинико-экономический анализ
- Анализ влияния на бюджет
- Подготовка Предложения на включение в ограничительные перечни



Награждён в 2013 и 2014 гг. Всероссийской социальной премией в области организации здравоохранения, фармакоэкономики и рациональной фармакотерапии «Da.Signa»



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

член-корр. РАН, д.б.н., профессор, Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

**Белопищевская
Вера Геннадиевна**
к.б.н., Москва

**Бондарева
Ирина Борисовна**
д.б.н., Москва

**Воронина
Татьяна Александровна**
заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна
д.м.н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Москва

Казей Василий Игоревич
к.б.н., Москва

Ковалёв Георгий Иванович
д.м.н., профессор, Москва

**Колыванов Геннадий
Борисович**, д.б.н., Москва

Мирзоян Рубен Симонович
заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

**Раменская
Галина Владиславовна**
д.ф.н., профессор, Москва

**Сариев Абрек
Куангалиевич**
д.м.н., профессор, Москва

Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

**Смирнов Валерий
Валерьевич**, к.ф.н., Москва

**Стародубцев
Алексей Константинович**
д.м.н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Александрович
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Москва

Тюрников Иван Николаевич
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

Чистяков Виктор Владимирович
д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

**Белоусов
Дмитрий Юрьевич**
Ответственный за выпуск
журнала
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

**Афанасьева
Елена Владимировна**
Генеральный директор
ООО «Издательство ОКИ»
подписка
+7 (916) 986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна
Дизайн и верстка
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 01.10.2019 г. Тираж 400 экз.
Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова» РАН Тел./Факс: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» является приложением к журналу «Ка-
чественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» заре-
гистрирован Комитетом РФ по печати 28.05.2001 г. Свидетельство о регистрации средства
массовой информации ПИ № 77-9142. Авторские материалы не обязательно отражают
точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации,
содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Дайджест «Больничная аптека»
Фармакогенетика и Фармакогенотика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.izdat-OkI

Центр Фармакоэкономических Исследований
Market Access Solutions
Издательство ОКИ

ОБЗОРЫ

Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы

Григорьевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела в период
деполяризации предсердий у крыс с алкогольной
кардиомиопатией

Смирнова С.Л., Рощевская И.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н.,
Вититнова М.Б., Колик Л.Г., Крыжановский С.А. 17

Сравнительное изучение антиишемической активности
триметазидина и соединения АЛМ-802 в условиях
эндотелиальной дисфункции

Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М.,
Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А. 23

Влияние пробиотических лактобацилл
на неспецифическую резистентность
и физиологические показатели лабораторных животных

Овчарова А.Н., Софронова О.В., Полякова Л.Л. 28

Антиоксидантный и стресспротекторный эффекты
аскорбата лития в биомедицинских моделях у свиней

Остренко К.С. 32

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Изучение влияния анксиолитика ГМЛ-1
на активность изоформ цитохрома CYP2C9 и CYP1A2

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Бочков П.О., Новицкий А.А.,
Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. 36

Разработка и валидация методики количественного
определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс
с использованием ВЭЖХ-УФ

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Колыванов Г.Б.,
Литвин А.А., Бочков П.О., Бойко С.С.,
Жердев В.П. 41

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование острой и хронической токсичности готовой
лекарственной формы дипептидного миметика мозгового
нейротрофического фактора ГСБ-106

Алексеева С.В., Сорокина А.В., Волкова А.В., Забродина В.В.,
Мирошкина И.А., Качалов К.С., Алексеев И.В., Захаров А.Д.,
Поварнина П.Ю., Дурнев А.Д. 46

Исследование острой и хронической токсичности
готовой лекарственной формы ГК-2

Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А., Волкова А.В.,
Забродина В.В., Качалов К.С., Алексеев И.В., Захаров А.Д.,
Поварнина П.Ю., Дурнев А.Д. 51

Определение безвредности гликопептидов
молочнокислых бактерий на лабораторных животных

Софронова О.В., Полякова Л.Л., Овчарова А.Н. 59



Chief editor

Zherdev Vladimir

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Firsov Alexander

Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Belolipetskaia Vera

Ph.D., Moscow

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Kazey Vasily

Ph.D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Kolyanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Smirnov Valery

Ph.D., Moscow

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

Corresponding Member PAS,
Ph.D., Professor, Volgograd

Chistyakov Viktor

Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

Responsible for this issue
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

Afanasyeva Elena

CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription
+7(916)986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
site:www.izdat-ok.ru

Zhuk Elena

Design and layout
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 01.10.2019 r. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

115093, Moscow, Partinyy pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiskay, 8

FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»

Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Journal «Pharmacokinetics and Pharmacodynamics» is a supplement to the journal «Good Clinical Practice». Journal «Good Clinical Practice» registered by Russian Committee for Press 28.05.2001 Certificate of registration of mass media PI №77-9142. Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Digest «Hospital pharmacy»
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.izdat-Ok.ru

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OKI

REVIEWS

Matrix metalloproteinases and their inhibitors
Grigorkevich OS, Mokrov GV, Kosova LYU 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Cardioelectric field on the body surface during atrial depolarization in rats with alcoholic cardiomyopathy
Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kolik LG, Kryzhanovskii SA 17

A comparative study of the anti-ischemic activity of trimetazidine and the compound ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction
Barchukov VV, Tsorin IB, Likhoshesterov AM, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA 23

Influence of probiotic lactobacilli on nonspecific resistance and physiological parameters of laboratory animals
Ovcharova AN, Safronova OV, Polyakova LL 28

Antioxidant and anti-stress effect of ascorbate lithium has swine in biomedical model
Ostrenko KS 32

EXPERIMENTAL PHARMACOKINETICS

Study of the effect of anxiolytic GML-1 on the activity of cytochrome CYP2C9 and CYP1A2 isoforms
Gribakina OG, Shevchenko RV, Bochkov PO, Novitskiy AA, Litvin AA, Kolyanov GB, Zherdev VP 36

Development and validation of the quantification of GIZH-298, possessing in the rat blood plasma by HPLC-UF
Baraboshkin N.M., Gribakina OG, Shevchenko RV, Kolyanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Boyko SS, Zherdev VP 41

TOXICOLOGICAL STUDIES

The study of the acute and chronic toxicity dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 finished dosage form
Alekseeva SV, Sorokina AV, Volkova AV, Zabrodina VV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Alekseev IV, Zaharov AD, Povarnina PYu, Durnev AD 46

GK-2 new drug with neuroprotective properties the study of acute and chronic toxicity of the finished dosage forms
Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Volkova AV, Zabrodina VV, Kachalov KS, Alekseev IV, Zaharov AD, Povarnina PYu, Durnev AD 51

Determination of the safety of glycopeptides lactic acid bacteria in laboratory animals
Safronova OV, Polyakova LL, Ovcharova AN 59

Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы

Григоркевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. В 1962 г. Gross J и Lapierre С впервые была обнаружена металлопротеиназа. С тех пор было охарактеризовано более 20 ферментов этого семейства, а также подробно изучены их функции. Металлопротеиназы участвуют в регуляции кровяного давления, развитии и ремоделировании клеточного матрикса, обезболивании, рассеянном склерозе, процессе свертывания крови, заживления ран, в процессах опухолевой трансформации и метастазирования и др. Настоящий обзор посвящён рассмотрению представлений о структуре матриксных металлопротеиназ, механизме их действия, а так же эндогенным и экзогенным ингибиторам матриксных металлопротеиназ. Особый акцент сделан на анализе подходов к дизайну синтетических ингибиторов матриксных металлопротеиназ и их активности. Представленный обзор демонстрирует перспективность конструирования новых селективных ингибиторов матриксных металлопротеиназ.

Ключевые слова: протеиназы; металлопротеиназы; матриксные металлопротеиназы; ММП; тканевые ингибиторы матриксных металлопротеиназ; ингибиторы матриксных металлопротеиназ

Для цитирования:

Григоркевич О.С., Мокров Г.В., Косова Л.Ю. Матриксные металлопротеиназы и их ингибиторы // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 3–16. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10040.

Matrix metalloproteinases and their inhibitors

Grigorkevich OS, Mokrov GV, Kosova LYU

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Metalloproteinase was discovered by Gross and Lapierre in 1962 for the first time. Since then, more than 20 enzymes of this family have been characterized, and their functions have been studied in detail. Metalloproteinases take part in blood pressure regulation, the cell matrix extension and remodeling, anesthesia, multiple sclerosis, blood coagulation, wound healing, tumor transformation and metastasis, etc. This review covers structure of matrix metalloproteinases, their mechanism of action, as well as MMP's endogenous and exogenous inhibitors. A special place is occupied by analysis of approaches to matrix metalloproteinases synthetic inhibitors and their activity. This review demonstrates the perspectivity of new selective matrix metalloproteinase inhibitors design.

Keywords: proteinases; metalloproteinases; matrix metalloproteinases; MMP; tissue inhibitors of matrix metalloproteinases; inhibitors of matrix metalloproteinases

For citations:

Grigorkevich OS, Mokrov GV, Kosova LYU. Matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:3–16. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10040.

Введение

Металлопротеиназы впервые были обнаружены учёными в первой половине 20 века. Позднее стало известно, что они принимают участие во многих процессах в организме, таких как повышение и понижение артериального давления, болезнь Крона, ревматоидный артрит и др. Металлопротеиназы можно разделить на подгруппы, такие как семейство метцинцина, цинк-зависимые протеазы, которые включают матриксные металлопротеиназы (ММП), ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), а также дезинтегрин и металлопротеиназы с мотивами тромбоспондина (ADAMTS) [1]. Металлопротеиназы относятся к семейству ферментов из класса гидролаз, способных разрушать пептидную связь между аминокислотами в белках. Они также включают в себя аспарагиновые протеиназы, сериновые протеиназы и цистеиновые протеиназы. Все 4 класса металлопротеиназ способны катализировать гидролиз пептидной связи [2]. Все цинксодержащие металлопротеиназы содержат в активном центре двухвалентный атом цинка (Zn^{2+}). При гидролизе пептидной связи тетраэдрический ион Zn^{2+} координируется с тремя донорными группами из

фермента и молекулой воды. На рис. 1 [3] представлено схематическое изображение механизма гидролиза пептидной связи матриксными металлопротеиназами (ММП). ММП являются основным классом цинксодержащих металлопротеиназ. Им и посвящён данный обзор.

Матриксные металлопротеиназы

Семейство цинксодержащих металлопротеиназ в большинстве своём состоит из матриксных металлопротеиназ (ММП). ММП относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать все типы белков внеклеточного матрикса (ВКМ). Своё название они получили из-за способности специфически гидролизовать белки ВКМ. Они принимают участие в обмене белков соединительной ткани, в процессах нормального развития и ремоделирования клеточного матрикса, эмбриогенезе, репарации тканей, неоангиогенезе, а также в процессах опухолевой трансформации и метастазирования. Активно изучается роль ММП при ревматоидных артритах, остеоартритах, эндометриозе, аневризмах аорты, периодонтитах, аутоиммунных поражениях кожи, атероматозе и язвообразовании [4, 5].

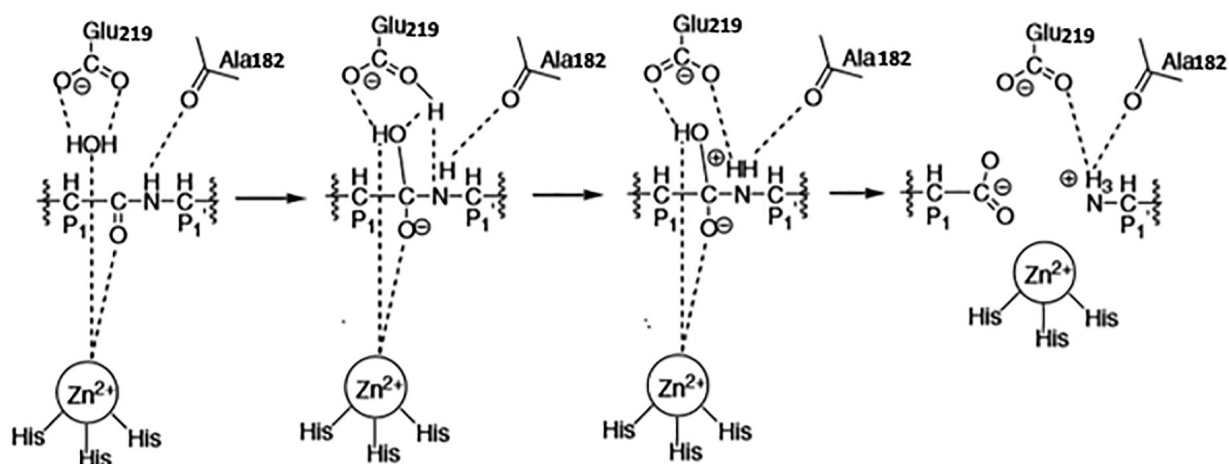


Рис. 1. Схематическое изображение механизма гидролиза пептидной связи в присутствии иона цинка Zn^{2+} ММП. Ион цинк, входящий в активный центр ММП, координирован тремя остатками гистидина (His). Частично обозначены аминокислоты Glu219 и Ala182, которые участвуют в процессе гидролиза [3].

Одно из самых ранних описаний ММП датируется 1949 г. [6]. В нем были описаны деполимеризующие ферменты, которые, как было предположено, могли способствовать росту опухоли, делая строу соединительной ткани, а также мелкие кровеносные сосуды более рыхлыми. 13 лет спустя, в 1962 году, *Gross J* и *Lapierre C* [6] впервые обнаружили коллагеназу во время изучения деградации тройного спирального коллагена при метаморфозе хвоста головастика. Коллаген расщепляли с помощью фермента, известного как промежуточная коллагеназа. В 1968 г. этот фермент в неактивной форме, называемой про-ММП (также называемый зимогеном ММП), был выделен из хвоста головастика и человеческой кожи [6]. Позже он был найден у позвоночных, насекомых (*Drosophila melanogaster*), нематод (*Caenorhabditis elegans*), гидр (*Hydra vulgaris*) и растений (*Arabidopsis*) [6].

Позднее были обнаружены и охарактеризованы другие ММП. Однако, как оказалось, многие вновь открытые ферменты были уже известны ранее или были найдены одновременно не связанными друг с другом группами учёных. Это приводило к тому, что одни и те же члены семейства ММП называли разными именами. В связи с этим, в 1989 году, *Harris Ed Jr* и его коллегами во время конференции «Destin Beach Matrix Metalloproteinase» было предложено использовать название «матриксная металлопротеиназа» или «матриксина» для этого семейства ферментов. (Первая обзорная статья, где впервые упомянуто название «матриксные металлопротеиназы», была написана *Birkedal-Hansen H* и опубликована в 1988 г.). Впоследствии, Международный союз биохимии и молекулярной биологии присвоил семейству название — «Matrix Metalloproteinases» и назначил каждому члену свой ферментный номер. К 1991 г. были названы и охарактеризованы ММП-1,

-2, -3, -7, -8, -9 и -10, а также тканевые эндогенные ингибиторы ММП 1 и 2 типа (ТИММП-1 и -2) [7]. Путём ДНК-клонирования было показано, что коллагеназы и желатиназы нейтрофилов генетически отличны от тех же самых ферментов, синтезируемых фибробластами. Нейтрофильная коллагеназа была обозначена ММП-8 а желатиназа — ММП-9 [8].

Строение матриксных металлопротеиназ

В 1994 г. с помощью рентген-кристаллографии лабораторией Longley были получены 3D структуры каталитических доменов ММП-1 и ММП-8 [9]. В 1995 г. удалось получить кристаллическую структуру у всей молекулы коллагеназы 1. В 1996–1997 гг. благодаря рентгеноструктурному анализу удалось получить 3D структуры комплексов каталитических доменов ММП-3 и ММП-8 с их ингибиторами [5].

На данный момент при помощи того же метода и ЯМР-спектроскопии помимо ММП-1 и ММП-8 были выяснены структуры ММП-2, ММП-3, ММП-7, ММП-9, ММП-10, ММП-11, ММП-12, ММП-13, ММП-14 и ММП-16. Частичны были выяснены структуры про-ММП-3 и про-ММП-9, про-ММП-1 и про-ММП-2. Комплексы про-ММП-2 совместно с ТИММП-2 каталитического домена ММП-3 с кат-ТИММП-1, ММП-14 и кат-ТИММП-2 помогли понять механизм катализа и связывания субстрата при поиске новых ингибиторов [9].

Благодаря новым методам исследования структур органических молекул оказалось возможным выяснить структуры ММП и их эндогенных ингибиторов, а также установить ряд общих особенностей. ММП состоит из следующих частей, представленных на рис. 2.

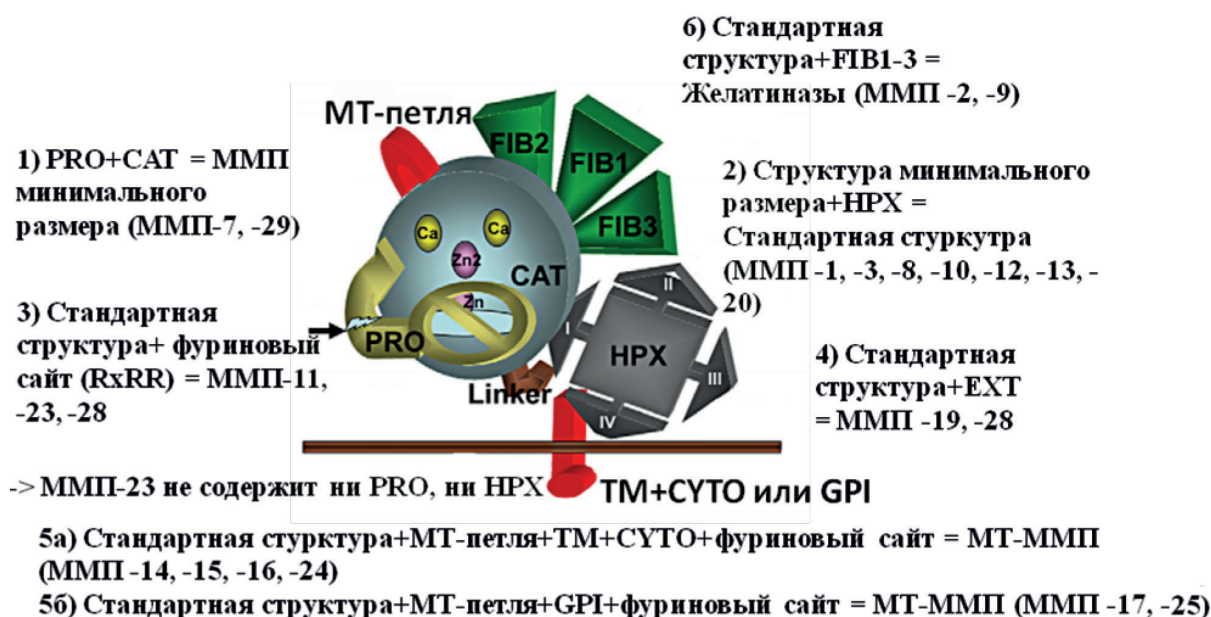


Рис. 2. Схематическое представление доменной структуры ММП человека

Примечания: Каталитический домен (CAT) с двумя ионами цинка (выделены розовым) и двумя ионами кальция (выделены жёлтым). Продомен (PRO) показан тёмно-жёлтым блокирует активный сайт. Линкерный пептид (LINKER) соединяет каталитический и гемопексиноподобный домен (HPX). Некоторые ММП показаны с расширением (EXT) на С-конце, которое не является мембранным якорем. MT-ММП (MT-петля) демонстрирует мембранный якорь, который является либо трансмембранной (TM) спиралью с небольшой цитоплазматической частью (CYTO), либо GPI-якорем (GPI). Фибронектиноподобные домены типа II (FIB1-3) показаны зелёным цветом [9].

Продомен (PRO)

Эта структура, которую условно можно разделить на два фрагмента: N-концевую последовательность (сигнальный домен) из 18–20 аминокислотных остатков (АКО), отщепляющихся во время активации фермента, и так называемого «пропептида», содержащего около 80 АКО. В последнем находится последовательность PRCGxPD (пролин — аргинин — цистеин — глицин — остаток любой аминокислоты — пролин — остаток любой аминокислоты). Эта последовательность несёт остаток цистеина, взаимодействующего с ионом Zn^{2+} в каталитическом домене. При этом образуется координационная связь и предотвращается связывание молекулы воды с ионом металла, благодаря чему фермент может существовать в неактивной форме (проММП) [10].

Каталитический домен (CAT)

Каталитический домен (CAT) состоит примерно из 170 АКО. Включает активный Zn-связывающий сайт в котором ион металла связывают три остатка гистидина. После сайта следует стабилизирующая структура из метионина, его восемь остатков образуют «метиониновую петлю», которая поддерживает структуру активного центра вокруг каталитического иона цинка [11, 12].

Шарнирная область (LINKER)

Ещё часто называют линкерный пептид. Его основная задача состоит в том, чтобы соединять каталитический домен с последующим гемопексиноподобным.

Она может состоять из разных АКО, расположенных в произвольном порядке [12].

Гемопексиноподобный домен (HPX) (С-концевой)

Гемопексиноподобный домен (HPX) образован серией около 200 АКО. Ответственен за специфичность при взаимодействии с белком. Раскручивает спирали в молекуле коллагена, попутно определяя её положение по отношению к ферменту. Именно на гемопексиноподобном домене происходит взаимодействие с тканевыми ингибиторами ММП [12].

Классификация матриксных металлопротеиназ

В 80–90-х годах, когда было охарактеризовано достаточное количество ММП, возникла необходимость их классификации. Сначала ММП были классифицированы относительно их *in vitro* субстратной специфичности (внеклеточный матрикс). Однако не было понятно почему конкретные субстраты были протестированы относительно определённых ММП [3].

Для того, чтобы фермент отнесли к семейству ММП, он должен отвечать следующим требованиям:

- 1) протеолиз не менее одного компонента ВКМ;
- 2) катализ, связанный с ионом Zn^{2+} в активном центре фермента;
- 3) активация протеиназами или ртутьорганикой;
- 4) ингибируется этилендиаминтетрауксусной кислотой (ЭДТА), 1,10-фенантролином и одним из тка-

невых эндогенных ингибиторов металлопротеиназ (ТИММП);

5) кДНК фермента должна быть гомологична с кДНК ММП-1.

Изначально предложенная классификация, заключающаяся в том, что протеиназа секретируется в про-формы, больше не применяется, в связи с открытием ММП-11 и ММП-28, которые внутриклеточно активируются фурином и секретируются в активных формах, а мембраны, связанные ММП, вообще не обязательно секретируются [13].

Активность некоторых ММП проверялась на коллагене I типа, фибронектине и ламинине. Однако далеко не все ММП проверялись на таком количестве субстратов. В итоге получилось так, что первые 10 ММП имели широкую субстратную специфичность, в то время как для ММП, открытых позднее (например, ММП-28), идентифицировано или исследовано только несколько субстратов. Такая ограниченная классификация субстратов привела к возникновению ряда ошибочных представлений и упрощений в понимании разнообразия функций ММП [13].

В результате были предложены две системы классификации матриксных металлопротеиназ. Одна из них представляет собой 5 подсемейств: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, митрилизины и мембранносвязанные ММП (МС-ММП). Недостаточно изученные относят в группу «другие ферменты» [14]. Всего на сегодняшний день известно 28 ферментов ММП (табл. 1).

Другая классификация предложена (Huxley-Jones J.) в 2007 г. [16]. В геноме он идентифицировал гены, способные кодировать ММП. На основании полученных данных он разделил ММП на шесть групп:

А. Подгруппа А ММП-26 и ММП-28).

В. Подгруппа В ММП-21 и ММП-23).

С. Подгруппа С ММП-25).

Д. Подгруппа D ММП-3, ММП-8, ММП-12, ММП-13 и чьи гены в хромосоме 11q21–24).

Е. Подгруппа E ММП-15, ММП-16 и которые являются мембранного типа.

Ф. Подгруппа F (ММП-2, ММП-9 и ММП-20).

Механизм активации ММП

В 1990 г. было обнаружено, что «цистеиновый выключатель» отвечает за регуляцию фермента в его неактивной форме. [6]. В организме ММП синтезируются в виде проферментов (проММП), которые активируются как протеолитически, так и непротеолитически соединениями ртути (HgCl_2 ; 4-аминофенилацетат ртути), хаотропными агентами и додецилсульфатом натрия [19, 20]. В основном, активность фермента регулируется благодаря наличию пропептида. Он взаимодействует с цинком в каталитическом домене, образуя координационную связь. Молекула воды, находящаяся в пропептиде, не связывается с ионом цинка, следовательно, не происходит катализа и расщепления субстрата, из-за чего фермент и остаётся в неактивной форме. Чтобы ММП активировались,

Таблица 1

Матриксные металлопротеиназы [9, 14–18]

ММП	Альтернативное название	Субстраты
Коллагеназы		
ММП-1	Интерстициальная коллагеназа	Коллаген I, II, III, VII, VIII, X, XI типов, агрекан, желатин, фибронектин, витронектин, ламинин, энтактин, тенасцин, верзикан, перлекан, проММП-1, проММП-2, проММП-9, $\alpha 2$ -макроглобулин, proTNF, C1q, IGFBP, $\alpha 1$ -антихимотрипсин
ММП-8	Нейтрофильная коллагеназа	Коллаген I, II, III, V, VII, VIII, X типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, $\alpha 2$ -макроглобулин, C1q, ангиотензин I, ангиотензин II, фибриноген, брадикинин
ММП-13	Коллагеназа-3	Коллаген I, II, III, IV, VII, IX, X, XIV типов, агрекан, желатин, фибронектин, перлекан, проММП-9, $\alpha 2$ -макроглобулин, C1q, фактор XII, фибриноген, $\alpha 1$ -антихимотрипсин
Желатиназы		
ММП-2	Желатиназа А Коллагеназа IV типа	Коллаген I, II, III, IV, V, VII, X, XI типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, верзикан, $\alpha 2$ -макроглобулин, проММП-1, проММП-2, проММП-9, проММП-13, proIL- β , proTGF- α , плазминоген, IGFBP-3/5, FGF-R1, CCL7, CXCL12
ММП-9	Желатиназа В	Коллаген IV, V, VII, X, XI, XIV типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, витронектин, верзикан, декорин, $\alpha 2$ -макроглобулин, proIL- β , proTGF- α , IL-2R α , ангиотензин I, ангиотензин II, плазминоген, CXCL6, CXCL8
Стромелизины		
ММП-3	Стромелизин 1	Коллагены II, III, IV, V, VII, IX, X, XI типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, перлекан, верзикан, проММП-1, проММП-3, проММП-7, проММП-8, проММП-9, проММП-13, $\alpha 2$ -макроглобулин, proIL-1 β , proTNF- α , антитромбин-III, PAI-1, плазминоген, IGFBP-3, $\alpha 1$ -антихимотрипсин

ММП	Альтернативное название	Субстраты
ММП-10	Стромелизин 2	Коллагены III, IV, V типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, проММП-1, проММП-7, проММП-8, проММП-9
ММП-11	Стромелизин 3	Коллаген IV типа, агрекан, фибронектин, желатин, ламинин, α 2-макроглобулин, α 2-антиплазмин, PAI-2, IGFBP-1
Митрилизины		
ММП-7	Митрилизин-1	Коллагены I, IV, X типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, декорин, фибулин, верзикан, проММП-1, проММП-2, проММП-7, проММП-9, α 2-макроглобулин, proTNF- α , плазминоген, β 4 интегрин, про- α -дефензин, Fas-L
ММП-26	Митрилизин-2, эндометаза	Коллаген IV типа, фибронектин, желатин, витронектин, α 2-антиплазмин, β 4 интегрин, фибриноген, E-кадхерин, проММП-9, Fas-L
Матриксные металлопротеиназы мембранного типа		
ММП-14	MT1-ММП	Коллагены I, II, III типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, энтактин, тенасцин, перлекан, проММП-2, проММП-13, α 2-макроглобулин, proTNF- α , фактор XII, фибриноген, CD44
ММП-15	MT2-ММП	Коллаген I типа, фибронектин, желатин, ламинин, энтактин, тенасцин, перлекан, проММП-2, proTNF- α
ММП-16	MT3-ММП	Коллагены I, III типов, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, проММП-2, α 2-макроглобулин
ММП-24	MT5-ММП	Фибронектин, желатин, хондроитина сульфат, проММП-2, N-кадхерин
Заякоренные с помощью гликозилфосфатидилинозита (GPI-anchored)		
ММП-17	MT4-ММП	Желатин, фибриноген, proTNF-
ММП-25	MT6-ММП, лейколезин	Коллаген IV типа, фибронектин, желатин, ламинин, хондроитина сульфат, дерматан-сульфат, α 2-макроглобулин, проММП-2, фибриноген, proTNF- α
Неклассифицированные матриксные металлопротеиназы		
ММП-12	Металлоэластаза, макрофагальная эластаза	Коллаген I, IV, V типов, агрекан, эластин, фибронектин, желатин, ламинин, витронектин, остеонектин, α 2-макроглобулин, proTNF- α , фактор XII, фибриноген, плазминоген
ММП-19	RASI-1	Коллаген IV типа, агрекан, фибронектин, желатин, ламинин, олигомерный матриксный протеин хряща, энтактин, фибриноген
ММП-20	Энамилизин	Коллаген V типа, агрекан, амелогенин, олигомерный матриксный протеин хряща
ММП-21	XMMP	α 1-антитрипсин, желатин
ММП-23		Желатин
ММП-27		Желатин, казеин
ММП-28	Эпилизин	Казеин

необходимо отщепить пропептид от каталитического домена. Зачастую это достигается автокатализом или взаимодействием с другими ММП (рис. 3) [12].

Ингибиторы матриксных металлопротеиназ

Разработка ингибиторов цинксодержащих металлопротеиназ в основном сконцентрирована на ингибиторах ММП и АПФ, потому что избыток в организме этих протеиназ может привести к появлению различного рода заболеваний. Ингибиторы других существующих металлопротеиназ, таких как CPA, TLN, NEP, TACE и др., разрабатываются только для структурного изучения, и поэтому их количество ограничено. В связи с этим, в данной статье мы остановимся только на описании ингибиторов ММП.

ММП в организме ингибируются α 2-макроглобулином, а также семейством тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИММП) [21]. ТИММП представляют собой семейство из четырёх ферментов. Они не специфичны для каждого типа ММП, хотя наблюдается определённая предпочтительность связывания ТИММП-1 с ММП-9, а ТИММП-2 с ММП-2 [22]. ТИММП связываются с активным центром ММП в соотношении 1:1, блокируя доступ к субстрату. В последовательности генов четырёх ТИММП не выявлено большого сходства, что говорит об уникальной биологической роли каждого эндогенного ингибитора. Например, ТИММП-2 выборочно взаимодействует с ММП-1 мембранного типа, которые участвуют в активации про-ММП-2. ТИММП-3 уникальны в своей способности к взаимодействию с внеклеточным ма-

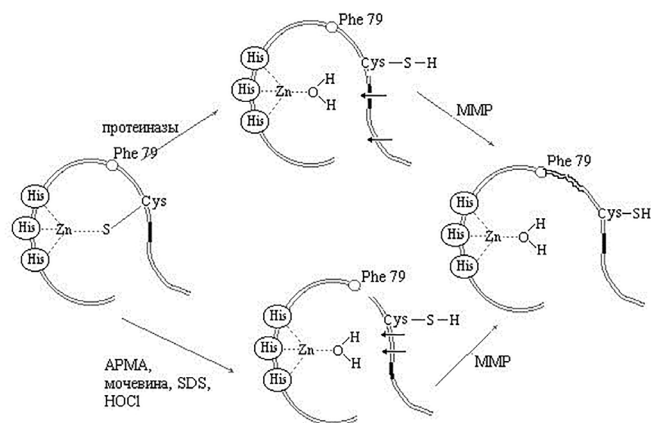


Рис. 3. проММП. Представлена активация проММП двумя путями: с помощью протеиназы и с использованием соединений ртути (HgCl_2); 4-аминофенилацетат (APMA), мочевины, додецилсульфата натрия (SDS) или HOCl [12]

триксом [23]. Про последнего представителя группы эндогенных ингибиторов, ТИММП-4, известно немного, однако предполагается, что он играет главную роль при связывании ММП в тканях сердца.

Все известные ТИММП (ТИММП 1–4) состоят из двух, связанных между собой шестью дисульфидными связями доменов: маленького С-концевого и большого N-концевого. Последний, который представляет собой остаток Cys, связывается с активным Zn^{2+} -связывающим центром ММП в эквимольном соотношении, вследствие чего и наблюдается ингибирование. С-концевой домен задействован в активации проММП [24].

За последние два десятилетия стало известно, что ММП играют основную роль в возникновении и прогрессировании многих патологий. В связи с этим большую популярность обрёл поиск ингибиторов ММП. Таким образом, позднее, были определены основные структурные требования к ингибиторам различных матриксных металлопротеиназ. Основным является наличие цинк-хелатирующей группы (ZBG). К таким группам относят гидроксаматную (CONHON), формилгидроксиламиновою, сульфгидрильную (SH), фосфиновую, аминокарбоксильную и карбоксильную группы (COOH) [25]. Также необходимо наличие, по меньшей мере, одной функциональной группы, способной образовывать водородную связь с ферментами. Последним требованием является наличие одной или нескольких боковых цепей, которые могут эффективно связываться с ферментами посредством ван-дер-ваальсовых взаимодействий [2].

К указанным требованиям может подходить множество соединений с различными структурами, поэтому они были разделены на несколько классов (рис. 4) [2, 25]:



Рис. 4. Дизайн ингибиторов матриксных металлопротеиназ

Примечания: показана структура коллагеновой фибриллы человека, подсайт фермента (S3-S3'), денатурирующего коллаген (ММП), структура природного субстрата ММП (PQGCNH(O)IAG) и структуры подклассов ингибиторов ММП [25].

1. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки с обеих сторон от ZBG, например P3-P2-P1-ZBG-P'1-P'2-P'1 — смешанные ингибиторы.

2. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки только с правой стороны от ZBG, например ZBG-P'1-P'2-P'3 — так называемые правосторонние ингибиторы.

3. Соединения, которые имеют аминокислотные остатки только по левую сторону от ZBG, например P3-P2-P1-ZBG — левосторонние ингибиторы.

Данная классификация основана на специфичности по отношению к определённому субстрату, характерному для конкретной ММП. Эти ингибиторы отличаются по силе действия; правосторонние являются более мощными ингибиторами, однако среди левосторонних иногда также встречаются активные ингибиторы [3]. Позднее во всех представленных классах ингибиторов были выделены:

- природные ингибиторы ММП;
- ингибиторы, содержащие карбоксильную группу;
- ингибиторы, содержащие остаток гидроксамовой кислоты;
- ингибиторы на основе тиола;
- ингибиторы, содержащие фосфор;
- ингибиторы на основе сульфонамидов;
- ингибиторы на основе барбитуратов;
- ингибиторы не содержащие цинк-связывающую группу.

Природные ингибиторы ММП

Производные жирных кислот с длинной цепью (олеиновая, элаидиновая и паринаровая кислоты), обладают ингибирующей активностью по отношению к ММП. Паринаровая кислота (цис- и трансизомеры) —

¹ Здесь и далее в статье для обозначения взаимодействующих между собой остатков субстрата и фермента используют нomenclатуру Шехтера и Бергера [26].

ингибитор желатиназ, с $K_i \sim 10^{-6}$ М. Элаидиновая кислота, нанесённая на кожную ткань, также защищает клетки от воздействия желатиназ. Активность данного класса соединений связана с наличием карбоксильной ZBG и длинного углеводородного хвоста, взаимодействующего с S1' сайтом активного центра желатиназ (рис. 5) [27].

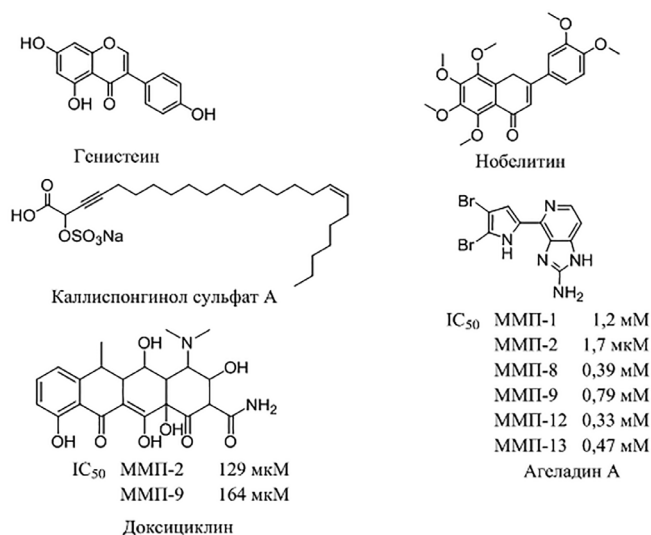


Рис. 5. Природные ингибиторы ММП

Флавоноиды и подобные структуры (рис. 5) [28–30]: агеладин А — флуоресцентный алкалоид, выделенный из морской губки, ингибирует ММП-1, -8, -9, -12, и -13 со значением $IC_{50} = 1,2; 0,39; 0,79; 0,33$, и $0,47$ мг/мл, соответственно; генистеин — (4Н-1-бензоперан-4-он-5,7-дигидрокси-3-4-гидроксифенил) изофлавоноид, промежуточное вещество в синтезе других изофлавоноидов, защищающих растения от микробов [28]. Содержится в сое, является ингибитором желатиназ, при этом способствует выделению ТИММП-1. Нобилетин — цитрусовый флавоноид, обладающий ингибирующей активностью против желатиназ. Является веществом, способствующим понижению роста раковых клеток [29].

Тетрациклины: периостат, также известный как доксициклин (см. рис. 5) — полусинтетическое тетрациклиновое соединение, которое помимо антибактериальной активности может остановить разрушение внеклеточного матрикса при заболеваниях полости рта и в миокарде. Доксициклин был разрешён FDA в 1998 г., и до сих пор остаётся единственным зарегистрированным ингибитором ММП-9 [30].

Гидроксаматные ингибиторы ММП

Ингибиторы на основе гидроксамовой кислоты являются самыми изученными и распространёнными среди всех соединений этой группы. Все они содержат гидроксаматную цинк-связывающую группу (CONHOH). Данные ингибиторы подразделяются на сукцинильные пептидные и непептидные гидроксаматы,

сульфонамидные гидроксаматы, а так же сульфонамиды на основе малоновой кислоты. Считается, что из всех представителей сукцинильные гидроксаматы обладают наибольшей аффинностью по отношению к ММП. Поэтому, до недавнего времени, они были наиболее широко изученными. Самыми известными ингибиторами данного класса являются батимастат и маримастат. Многими исследователями было обнаружено, что наличие заместителя в подсайте Р1 приводит к получению ингибиторов ММП широкого спектра действия. Всего было синтезировано множество сукцинильных гидроксаматов пептидной и не пептидной природы. Однако только батимастат и маримастат дошли до стадии клинических испытаний. Они обладают широким спектром действия и показали хорошую активность *in vivo* в ряде клинических моделей заболеваний [31, 32].

Батимастат проявил высокую ингибирующую активность по отношению к ММП-1, -2, -3, -7 и -9. Он является первым ингибитором ММП, для которого были проведены клинические испытания (I фаза, 1994 г.). Из-за плохой растворимости, отсутствия пероральной биодоступности батимастата и наличия побочных эффектов (мышечно-скелетная боль появлялась после 3–5 мес. применения препарата), клинические испытания этого вещества были прерваны на III фазе (рис. 6) [33, 34].

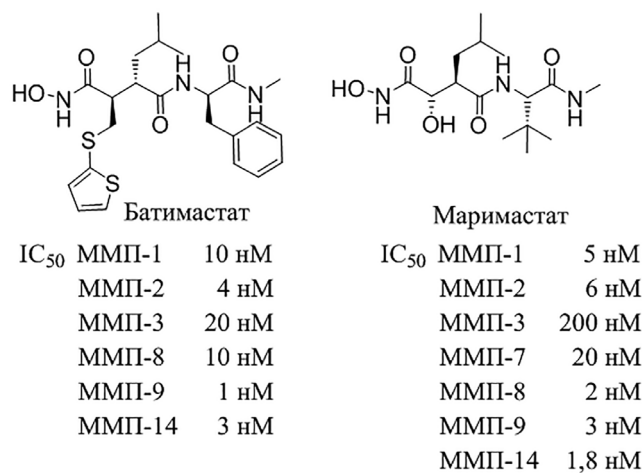


Рис. 6. Батимастат и маримастат

Маримастат является активным при пероральном применении, с периодом полураспада в плазме крови 8–10 ч. Маримастат прошёл III фазу клинических испытаний в отношении нескольких типов рака. Его биодоступность объяснили наличием гидрофильного ОН-фрагмента что, вероятно, может увеличить растворимость в воде соединения. Маримастат — обратимый ингибитор ММП, обладающий высокой аффинностью. Однако оказалось, что и маримастат вызывает скелетно-мышечные боли, но его применяют в терапии рака органов ЖКТ [35].

Гидроксаматные ингибиторы на основе малоновой кислоты связываются в АЦ ММП по другому механизму, нежели вышепредставленные ингибиторы (рис. 7) [36].

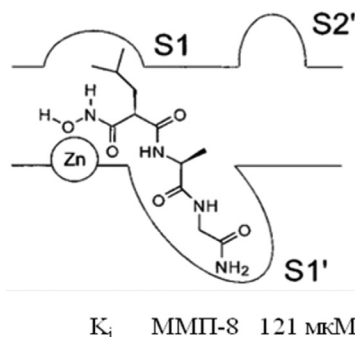
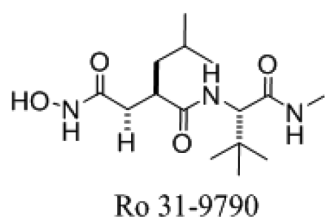


Рис. 7. Гидроксаматный ингибитор ММП на основе малоновой кислоты

Примечание: Несубстратоподобное связывание HONH-Mal(i-Bu)-Ala-Gly-NH₂ с ММП-8

Гидроксаматный фрагмент связывается с ионом цинка ММП как бидентантный хелатор, таким же образом, как и остальные гидроксаматы. Из-за отсутствия спейсера между цинк-связывающей и гидрофобной группой, изобутильный фрагмент занимает подсайт S1. Фрагмент Ala-Gly-NH₂ изгибается таким образом, чтобы занять карман S1'.

Модификация заместителя P2'-составляющей также влияет на фармакокинетическую активность потенциальных ингибиторов. Третбутильная группа в P2' положении (рис. 8) [31, 35] стерически закрывает амидную связь, так же является, по всей вероятности, наиболее предпочтительным заместителем, обеспечивающим наибольшее связывание с субстратом.



IC ₅₀	ММП-1	10 нМ
	ММП-2	8 нМ
	ММП-3	700 нМ
	ММП-14	1,9 нМ

Рис. 8. Пример ингибитора с заместителем P2'

Так же существуют соединения с заместителями в положении P3'. Однако по своей ингибирующей способности ингибиторы данного рода мало чем отличаются от ингибиторов с заместителем в P2'. Ранее предполагали, что ингибиторы с заместителем P3' из-за

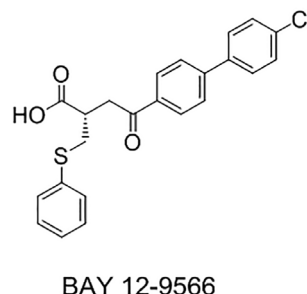
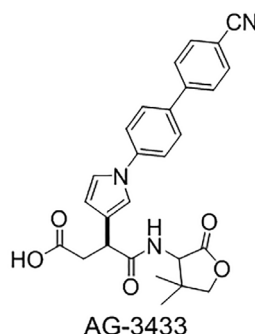
своего связывания с метионином способны селективно ингибировать ММП-7, однако позже эта информация была опровергнута [36].

При проведении клинических испытаний было обнаружено, что гидроксаматные ингибиторы являются метаболически лабильными, могут разрушаться до гидросиламина (канцероген) и, в случае пептидных ингибиторов, плохо усваиваются в ЖКТ, а также вызывают скелетно-мышечные боли в качестве побочного эффекта. Однако эти соединения доказали свою эффективность *in vivo*, поэтому их продолжают разрабатывать [37].

Ингибиторы ММП, содержащие карбоксильную группу

В ингибиторах на основе карбоновых кислот цинк-связывающей группой является карбоксильная группа (-COOH). Эти ингибиторы проявляют меньшее сродство к ММП, чем остальные. Однако они отличаются хорошей биодоступностью и отсутствием токсичности и побочных эффектов по сравнению с ингибиторами других классов. Так же известно, что некоторые карбоксильные ингибиторы действуют как селективные по отношению к некоторым ММП, которые имеют глубокий сайт связывания (S1'). К ним относятся ММП-2, ММП-3, ММП-8, ММП-9 и ММП-13. Таким образом, они являются перспективными для синтеза и последующего применения в клинической практике в качестве селективных ингибиторов некоторых классов ММП.

Соединения AG-3433 и BAY 12-9566 (рис. 9) [3, 31] являются одними из немногих карбоксилатных ингибиторов ММП, которые дошли до клинических исследований (AG-3433 прошёл I фазу, BAY 12-9566 дошёл до III фазы) как противоопухолевые средства. Они отличаются удлиненным и достаточно громоздким гидрофобным заместителем в месте связывания с сайтом S1'. Кроме того, наличие аминогруппы (-NH) в соединении AG-3433 позволяет образовывать дополнительные связи с аминокислотами АЦ ферментов.



K _i	ММП-2	0,9 нМ
	ММП-3	19 нМ
	ММП-7	4545 нМ
	ММП-13	3,3 нМ

K _i	ММП-1	>5000 нМ
	ММП-2	11 нМ
	ММП-3	143 нМ
	ММП-9	301 нМ
	ММП-13	1470 нМ

Рис. 9. Карбоксилатные ингибиторы AG-3433 и BAY 12-9566

Ещё один яркий представитель карбоксилатных ингибиторов ММП (рис. 10) [2] дифенилтетразол также обладает длинной биароматической группой для связывания с S1' сайтом в АЦ ММП. Однако, помимо этого, в его структуре присутствует сульфонамидная

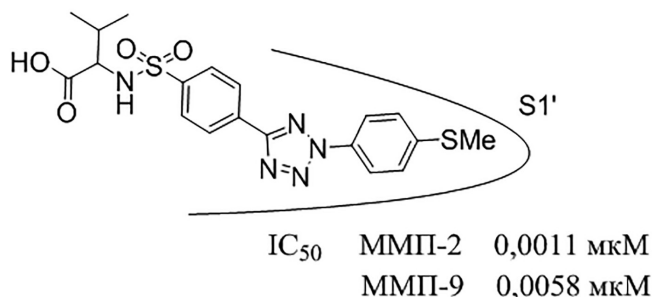


Рис. 10. Карбоксилатный ингибитор ММП

группа, которая образывает сильные водородные связи между одним из её атомов кислорода и основными NH-группами Leu181 и Ala182, присутствующими в ММП. В связи с этим, многие производные сульфонил-аминокислот на данный момент синтезированы в качестве ингибиторов ММП [2].

Ингибиторы ММП с тиольной цинк-связывающей группой

Тиольная группа является монодентантной, её сродство с ионом цинка в АЦ меньше, чем сродство бидентантных групп, таких как гидроксаматная и карбоксильная. Однако тиольные ингибиторы являются хорошо растворимыми и легче ионизируются. В результате их ингибиторные свойства почти такие же, как у гидроксаматных и карбоксилатных ингибиторов.

Среди ингибиторов ММП, содержащих тиольную цинк-связывающую группу, до клинических испытаний дошло всего два соединения (рис. 11) [3, 31].

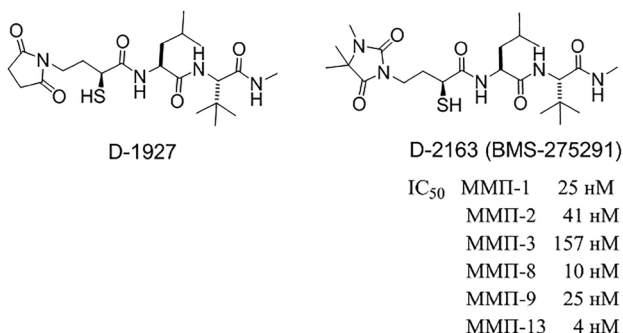


Рис. 11. Тиольные ингибиторы ММП D-1927 и D-2163 (BMS-275291)

Соединение D-1927 изначально разрабатывалось как противоопухолевое средство, однако не дошло до клинических исследований, а дошло до второй фазы клинических испытаний в качестве противовоспалительного средства.

Соединение D-2163 (BMS-275291) дошло до третьей фазы клинических исследований как противоопухолевый препарат [3, 31].

Фосфоросодержащие ингибиторы ММП

В основе фосфоросодержащих ингибиторов лежит либо фосфиновая, либо фосоновая кислота для связывания с ионом цинка. Например, на рис. 12 представлены синтезированные ингибиторы ММП, содержащие фосфор [31, 38]. Эти соединения являются моно- и бидентантными, соответственно, что позволяет им связываться с ионом цинка. Данные заместители не могут превзойти гидроксаматную группу по силе связывания цинка, но полностью выполняют роли акцепторов водородных связей и взаимодействуют с ферментом другими способами.

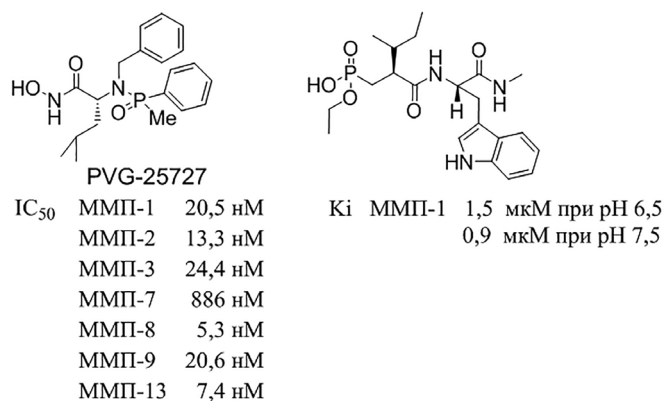


Рис. 12. Фосфоросодержащие ингибиторы ММП

Многие фосфоросодержащие ингибиторы являются селективными ингибиторами ММП-1, ММП-3 и ММП-13. Однако, не смотря на всю их перспективность, ни одно из них до сих пор не достигло стадии клинических исследований.

Ингибиторы ММП на основе сульфонамидов

Эффективность данной группы ингибиторов зависит от электронного окружения атома серы. Повышение положительного заряда на сере облегчает разложение вещества, поэтому при ней предпочтителен электрон-донорный заместитель. Сама SO₂-группа отвечает за водородные связи с аминокислотами субстрата. За счёт этого связывания комплекс становится более стабильным [3].

Из данных литературы известно, что гидроксаматы, содержащие сульфонамидную группу являются эффективными ингибиторами ММП [2, 31]. Некоторые из них дошли до III стадии клинических исследований в качестве противоопухолевых препаратов (AG-3340) (рис. 13) [3, 31].

Соединение CGS 27023A прошло I фазу клинических исследований в качестве противоопухолевого средства, а также препарата против артрита [3]. Важной особенностью представленных структур является нали-

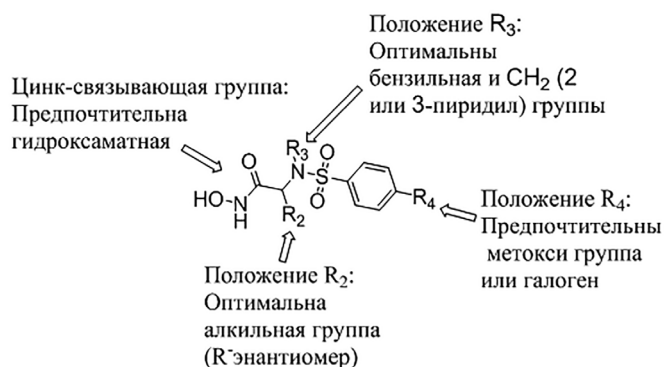


Рис. 13. Общая формула сульфамидного ингибитора ММП

чие алкильной изопропильной группы (–R энантиомера, при наличии хиральной активности), замедляющей метаболизм цинк-связывающего гидроксаматного участка ингибитора. S-изомер, при этом, практически не активен. Считается, что именно он связывается с подсайтом S1. Более громоздкий пиридилметил или бензильный фрагмент, присутствующий при атоме азота, который, вероятно, связывается с карманом S2, и арилсульфонильная группа для взаимодействия с карманом S1' (рис. 14) [2].

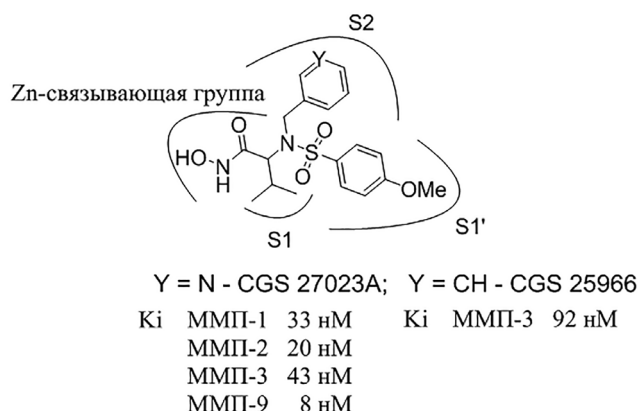


Рис. 14. Сульфонамидные ингибиторы ММП

Примерно в это же время был разработан ингибитор AG-3340 с IC₅₀, находящийся в наномолярном диапазоне концентраций [31]. Он прошёл II фазу клинических испытаний в качестве противоопухолевого средства и прошёл I стадию как препарат против макулодистрофии. Этот ингибитор и ингибиторы похожего строения обладают высокой селективностью и оральной биодоступностью (рис. 15) [3, 31].

Сульфонамидные ингибиторы на основе карбоновых кислот (рис. 16) в основном проявляют ингибиторную активность по отношению к ММП-2, ММП-1, ММП-3, ММП-7 и ММП-13 [39].

Ингибиторы ММП на основе барбитуратов

Эти соединения связывают цинк-ион ММП посредством карбонильного кислорода, кольцевого азота, либо же их комбинации (ионизированного кольца).

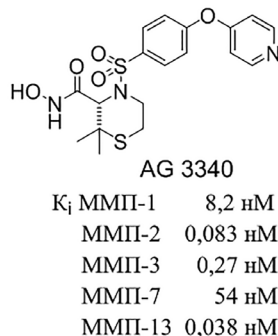


Рис. 15. Ингибитор ММП AG-3340

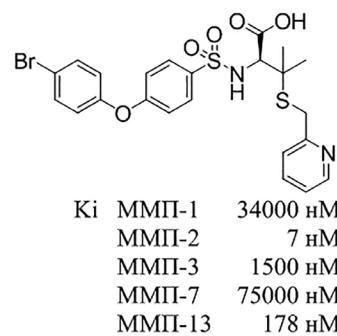


Рис. 16. Сульфонамидный ингибитор ММП на основе карбоновой кислоты

К этой группе относятся спиробарбитураты и другие 5,5-дизамещённые производные пиперазинов [40, 41].

В 2001 г. работники компании Hoffman La-Roche Company при скрининге противоопухолевых препаратов обнаружили, что 5,5-дизамещённые барбитураты стабильны *in vivo*, обладают хорошей ингибирующей активностью по отношению к желатиназам [41]. После этого, в 2011 г. группа Гильмера синтезировала 5-пиперазин и гомопиперазин-замещённые барбитураты. Впоследствии они описали новый тип ингибиторов ММП на основе барбитуратов, включающий донорную NO-группу [42]. Эта же группа изучила ряд гомодимерных соединений, полученных из 5-гомопиперазинзамещённых пиридинных трионов (барбитуратов) с линкерами размером в диапазоне от 2 до 20 атомов углерода [43]. Эти соединения разрабатывались в качестве перорально биодоступных ингибиторов желатиназ А и Б. Димерные соединения обладают такой же эффективностью и селективностью, как и класс мономерных гомопиперазиновых барбитуратов. Представленные на рис. 17 барбитураты показали хорошую ингибирующую активность по отношению к желатиназам и могут использоваться в качестве противоопухолевых средств [44].

Ингибиторы не содержащие цинк-связывающую группу

Многие десятилетия развитие ингибиторов ММП фокусировалось на подборе структур, которые связываются в активном центре фермента и хелатируют каталитический цинк. Однако из-за высокого сходства между каталитическими доменами ММП и других металлопротеиназ (например, АПФ) ингибиторы первых далеко не всегда оказываются селективными. В связи с этим перспективными оказались структуры, способные связываться с другими доменами, ММП и таким образом ингибировать их. В качестве целевого может быть использован гемопексинаподобный домен металлопротеиназ, структурные особенности которого позволяют повысить избирательность ингибиторов, вплоть до таких, как ингибиторы желатиназ, структура каталитических доменов которых практически идентична [45].

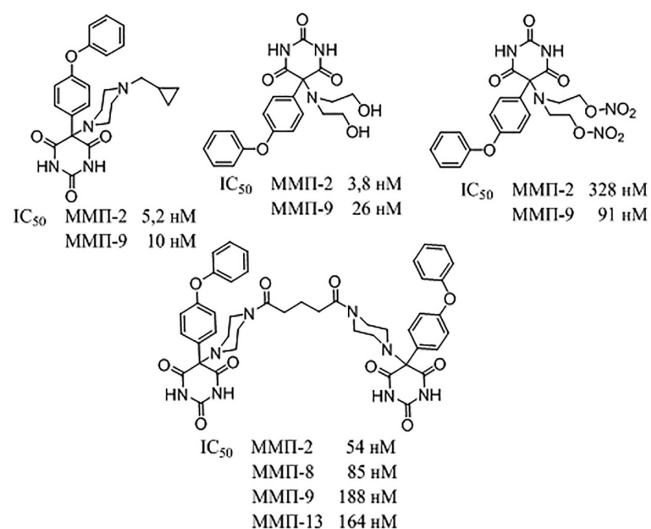


Рис. 17. 5,5-дизамещённые барбитуратные ингибиторы ММП

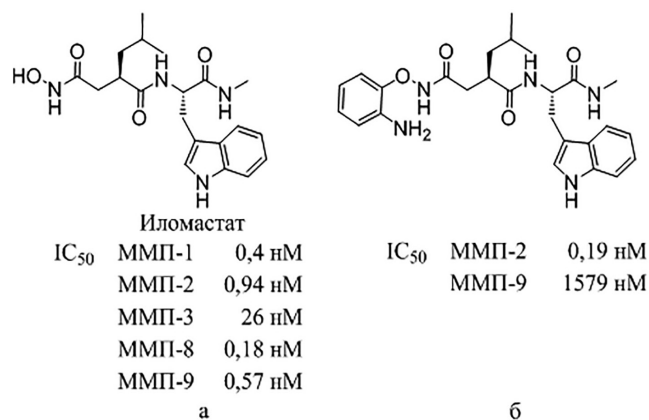
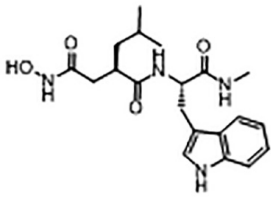
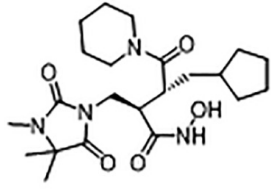
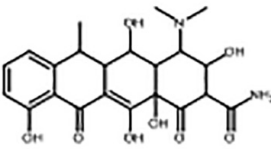


Рис. 18. Иломастат (а) и его аналог (б)

Таблица 2

Ингибиторы ММП

№	Ингибитор ММП	Структура	Показания	Статус	Компания	Ссылка
1	Маримастат (BB-2516)		Рак молочной железы; Рак лёгких; Сосудистые аномалии	Фаза III	Pfizer	[47]
2	Батимастат (BB-94)		Злокачественные опухоли	Фаза II	British Biotech	[48]
3	S-3304		Рак лёгких; Солитарные опухоли	Фаза II Фаза I	Shionogi	[49, 50]
4	COL-3 (NSC-683551)		Рефрактерный метастатический рак	Фаза I	National Cancer Institute (NCI)	[51]
5	CGS-27023A		Артрит; Злокачественные образования	Фаза I	Novartis	[52]

№	Ингибитор ММП	Структура	Показания	Статус	Компания	Ссылка
6	Иломастат		Злокачественные опухоли; Фибробластная коллагеназа кожи; Термолизин	Фаза III	Glycomed	[53]
7	RO 32-3555		Артрит	Фаза I	Roche	[54]
8	Доксици- клин		Постинфарктное ремоделирование миокарда; Сердечный амилоидоз	Фаза II Фаза III	Careggi Hospital IRCCS Policlinico S. Matteo	[54, 55]

Хорошим примером подобной модификации ингибитора является Иломастат (Ilomastat). Иломастат по своей природе является ингибитором широкого спектра действия из-за наличия в структуре гидроксаматной группы, которая связывается с ионом цинка металлопротеиназ [31, 46].

Для улучшения селективности Иломастата в 2016 г. группа учёных разработала и синтезировала новые аналоги Иломастата с замещёнными бензамидными группами вместо гидроксамовой кислоты [46] (рис. 18). Среди этих аналогов наиболее эффективным оказалось соединение, представленное на рис. 18б, которое проявляло ингибирующую активность против ММП-2 в пять раз более сильную, чем у Иломастата ($IC_{50} = 0,19$ нМ и $IC_{50} = 0,94$ нМ, соответственно). Важно отметить, что аналог демонстрировал более чем 8300-кратную селективность для ММП-2 по сравнению с ММП-9 ($IC_{50} = 1,58$ мкМ). Исследования показали, что связывание аналога с ММП происходит минуя каталитический домен, а также фармакокинетические свойства у аналога были лучше, чем у исходного Иломастата [44, 46].

Заключение

Анализ данных литературы, посвящённых матриксным металлопротеиназам и их ингибиторам, свидетельствует о том, что вышеупомянутые ферменты в настоящее время являются перспективными мишенями при поиске лекарственных средств, применяемых при различных сердечно-сосудистых заболеваниях, а также для лечения различных злокачественных образований (табл. 2). На сегодняшний день в клиническую практику не введено ни одного ингибитора ММП. Это делает актуальной дальнейшую разработку данной тематики по поиску клинически эффективных соединений с учётом спектра необходимых требований к активности, безопасности, фармакокинетики и прочих показателей ингибиторов.

Работа поддержана грантом Российского Фонда Фундаментальных исследований № 18-015-00244 А.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Григоркевич Оксана Сергеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: oksana.grigorkevich@academpharm.ru

ORCID: 0000-0001-7702-0569

SPIN-код: 9149-3541

м. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Grigorkevich Oksana

Corresponding author

e-mail: oksana.grigorkevich@academpharm.ru

ORCID: 0000-0001-7702-0569

SPIN code: 9149-3541

Junior Researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department. FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Мокров Григорий Владимирович

ORCID: 0000-0003-2617-0334

SPIN код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Косова Любовь Юрьевна

Студент РХТУ им. Д.И. Менделеева

Mokrov Grigory

ORCID: 0000-0003-2617-0334

SPIN code: 8755-7666

Candidate of Chemical Sciences
Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Kosova Liubov

Student of D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

Литература / References

- Rivera S, Khrestchatskiy M, Kaczmarek L, et al. Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System Physiology? *Journal of Neuroscience*. 2010;30(46):15337–15357. DOI: <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3467-10.2010>
- Gupta SP. Quantitative Structure Activity Relationship Studies on Zinc-Containing Metalloproteinase Inhibitors. *Chemical Reviews*. 2007;107(7):3042–3087. DOI: [10.1021/cr030448t](https://doi.org/10.1021/cr030448t)
- Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): Chemical–biological functions and (Q)SARs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2007;5:2223–2268. DOI: [10.1016/j.bmc.2007.01.011](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.01.011)
- Ярмолинская М.И., Молотков А.С., Денисова В.М. Матриксные металлопротеиназы и ингибиторы: классификация, механизм действия // *Журнал акушерства и женских болезней*. — 2012. — Т. 61. — № 1. — С. 113–125. [Yarmolinskaya MI, Molotkov AS, Denisova VM. Matriksnyye metalloproteinazy i inhibitory: klassifikatsiya, mekhanizm deistviya. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh boleznei*. 2012;61(1):113–125. (In Russ).]
- Маркелова Е.В., Здор В.В., Романчук А.Л. и др. Матриксные металлопротеиназы: их взаимосвязь с системой цитокинов, диагностический и прогностический потенциал // *Иммунология, аллергология, инфектология*. — 2016. — № 2. — С. 11–22. [Markelova EV, Zdor VV, Romanchuk AL, et al. Matriksnyye metalloproteinazy: ikh vzaimosvyaz' s sistemoi tsitokinov, diagnosticheskii i prognosticheskii potentsial. *Immunologiya, allergologiya, infektologiya*. 2016;2:11–22. (In Russ).]
- Zitka O, Kukacka J, Krizkova S, et al. Matrix Metalloproteinases. *Current Medicinal Chemistry*. 2010;17(31):3751–3768. DOI: [10.2174/092986710793213724](https://doi.org/10.2174/092986710793213724)
- Woessner JF. The family of matrix metalloproteinases. *Ann. NY Acad. Sci.* 1994;732:11–21.
- Supuran CT, Winum J, editors. *Drug design of zinc-enzyme inhibitors*. 1st ed. Hoboken: Wiley; 2009.
- Maskos K. Crystal structures of MMPs in complex with physiological and pharmacological inhibitors. *Biochimie*. 2005;87:249–263. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.11.019>
- Соловьёва Н.И. Основные металлопротеиназы соединительно-тканного матрикса // *Биоорганическая химия*. — 1994. — Т. 20. — № 2. — С. 143–152. [Solov'eva NI. Osnovnyye metalloproteinazy soedinitel'no-tkannogo matriksa. *Bioorganicheskaya khimiya*. 1994;20(2):143–152. (In Russ).]
- Butler GS. The canonical methionine 392 of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is not required for catalytic efficiency or structural integrity: probing the role of the methionine-turn in the metzincin metalloprotease superfamily. *J. Biol. Chem.* 2004;279(15):15615–15620. DOI: [10.1074/jbc.M312727200](https://doi.org/10.1074/jbc.M312727200)
- Lauer-Fields JI, Juska D, Fields GB. Matrix metalloproteinases and collagen metabolism. *Biopolymers*. 2002;66(1):19–32. DOI: [10.1002/bip.10201](https://doi.org/10.1002/bip.10201)
- Iyer RP, Patterson NL, Fields GB, et al. The History of Matrix Metalloproteinases (MMPs): Milestones, Myths, and (Mis)Perceptions. *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol*. 2012;17. DOI: [10.1152/ajpheart.00577.2012](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00577.2012)
- Coussens LM, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the development of cancer. *Chem. Rev.* 1996;3(11):895–904. DOI: [10.1016/S1074-5521\(96\)90178-7](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(96)90178-7)
- Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2008;75:346–359. DOI: [10.1016/j.bcp.2007.07.004](https://doi.org/10.1016/j.bcp.2007.07.004)
- Huxley-Jones J, Clarke TK, Beck C. The evolution of the vertebrate metzincins: Insights from Ciona intestinalis and Danio rerio. *BMC Evol. Biol.* 2007;7(1):63. DOI: [10.1186/1471-2148-7-63](https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-63)
- Шадрина А.С. Матриксные металлопротеиназы: структура, функции и генетический полиморфизм // *Патогенез*. — 2017. — Т. 15. — № 2. — С. 14–23. [Shadrina AS. Matriksnyye metalloproteinazy: struktura, funktsii i geneticheskii polimorfizm. *Patogenez*. 2017;15(2):14–23. (In Russ).] DOI: [10.25557/GM.2017.2.7297](https://doi.org/10.25557/GM.2017.2.7297)
- Клишо Е.В. Матриксные металлопротеиназы в онкогенезе // *Сибирский онкологический журнал*. — 2003. — № 2 — С. 62–70. [Klisho EV. Matriksnyye metalloproteinazy v onkogeneze. *Sibirskii onkologicheskii zhurnal*. 2003;2:62–70. (In Russ).]
- Stack MS, Itoh Y, Young TN, et al. Fluorescence quenching studies of matrix metalloproteinases (MMPs): evidence for structural rearrangement of the proMMP-2/TIMP-2 complex upon mercurial activation. *Arch. Biochem. Biophys.* 1996;333(1):163–169. DOI: [10.1006/abbi.1996.0377](https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0377)
- Kim TH, Mars WM. Expression and Activation of Pro-MMP-2 and Pro-MMP-9 During Rat Liver Regeneration. *Hepatology*. 2003;31(1):75–82. DOI: [10.1002/hep.510310114](https://doi.org/10.1002/hep.510310114)
- Woessner JF, Jr. MMPs and TIMPs – An Historical Perspective. *Mol Biotechnol.* 2002;22(1):33–49. DOI: [10.1385/MB:22:1:033](https://doi.org/10.1385/MB:22:1:033)
- Kim WU, Min SY, Cho ML, et al. Elevated matrix metalloproteinase 9 in patients with systemic Sclerosis. *Arthritis Res.* 2005;7(1):71–79. DOI: [10.1186/ar1454](https://doi.org/10.1186/ar1454)
- Yu WH, Yu S, Meng Q, et al. TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix. *Biol Chem.* 2000;275:31226–31232. DOI: [10.1074/jbc.M000907200](https://doi.org/10.1074/jbc.M000907200)
- Hundsley MM, Edwards DR. Metalloproteinases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *Int J Cancer.* 2005;11(6):849–860.
- Whittaker M, Ayscough A. Matrix metalloproteinases and their inhibitors – current status and future challenges. *Celltransmissions*. 2001;17(1):3–14.
- Schechter I, Berger A. Reprint of «On the size of the active site in proteases. I. Papain». *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012;425(3):497–502. DOI: [10.1016/j.bbrc.2012.08.015](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.08.015)
- Vanhoutte D, Heymans S. TIMPs and cardiac remodeling: 'Embracing the MMP-independent-side of the family'. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010;48(3):445–453. DOI: [10.1016/j.yjmcc.2009.09.013](https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.09.013)
- Fingleton B. Matrix Metalloproteinases as Valid Clinical Targets Current Pharmaceutical Design. *Curr. Pharm. Des.* 2007;13(3):333–346. DOI: [10.2174/138161207779313551](https://doi.org/10.2174/138161207779313551)
- Thomas NV, Kim SK. Metalloproteinase Inhibitors: Status and Scope from Marine Organisms. *Biochemistry Research International*. 2010;2010:1–10. DOI: [10.1155/2010/845975](https://doi.org/10.1155/2010/845975)
- Lindsey ML, Ma Y, Yabluchanskiy A. Matrix Metalloproteinase-9 Post Myocardial Infarction: Breakdowns and Breakthroughs. *Global J. Hum. Anat. Physiol. Res.* 2014;1(1):6–9.
- Whittaker M, Floyd CD, Brown P, et al. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem. Rev.* 1999;99(9):2735–2776. DOI: [10.1021/cr9804543](https://doi.org/10.1021/cr9804543)
- Levin JI. The design and synthesis of aryl hydroxamic acid inhibitors of MMPs and TAC. *Curr. Top. Med. Chem.* 2004;4(12):1289–1310. DOI: [10.2174/1568026043387935](https://doi.org/10.2174/1568026043387935)
- PharmaXChange.info [Internet]. Matrix Metalloproteinases: Its Implications in Cardiovascular Disorders [updated November 28, 2011]. Available from: <http://pharmaxchange.info/press/2011/11/matrix-metalloproteinases-its-implications-in-cardiovascular-disorders/>

34. Graff von Roeder E, Grams R, Brandstetter H, et al. Design and Synthesis of Malonic Acid-Based Inhibitors of Human Neutrophil Collagenase (MMP8). *J. Med. Chem.* 1998;41(3):339–345. DOI: 10.1021/jm9706426
35. Preece G, Murphy G, Agers A. Metalloproteinase-mediated Regulation of L-selectin Levels on Leucocytes. *J Biol Chem.* 1996;271(20):11634–11640. DOI: 10.1074/jbc.271.20.11634
36. Kontogiorgis CA, Papaioannou P, Hadjipavlou-Litina DJ. Matrix Metalloproteinase Inhibitors: A Review on Pharmacophore Mapping and (Q)Sars Results. *Current Medicinal Chemistry.* 2005;12(3):339–355. DOI:10.2174/0929867053363243
37. Peterson JT. The importance of estimating the therapeutic index in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. *Cardiovasc. Res.* 2006;69:677–687. DOI:10.1016/j.cardiores.2005.11.032
38. Veerendhar A, Reich R, Breuer E. Phosphorus based inhibitors of matrix metalloproteinases. *Comptes Rendus Chimie.* 2010;13(8–9):1191–1202. DOI: 10.1016/j.crci.2010.07.003
39. Bender SL, Melwin AA. Metalloproteinase inhibitors, pharmaceutical composition containing them and their pharmaceutical compositions. United States patent US 5985900. 1999. Nov 16.
40. Kim SH, Pudzianowski AT, Leavitt KJ, et al. Structure-based design of potent and selective inhibitors of collagenase-3 (MMP-13). *Bioorg Med Chem Lett.* 2005;15(4):1101–1106. DOI:10.1002/chin.200526096
41. Wang J, Medina C, Radomski MW, et al. N-substituted homopiperazine barbiturates as gelatinase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2011;19(16):4985–4999. DOI:10.1016/j.bmc.2011.06.055
42. Wang J, O'Sullivan S, Harmon S, et al. Design of barbiturate-nitrate hybrids that inhibit MMP-9 activity and secretion. *J Med Chem.* 2012;55(5):2154–2162. DOI:10.1021/jm201352k
43. Wang J, Radomski MW, Medina C, et al. MMP inhibition by barbiturate homodimers. *Bioorg Med Chem Lett.* 2013;23(2):444–447. DOI:10.1016/j.bmcl.2012.11.063
44. Yue Zhong, Yu-Ting Lu, Ying Sun, et al. Recent opportunities in matrix metalloproteinase inhibitor drug design for cancer. *Expert Opinion on Drug Discovery.* 2017;13(1):75–87. DOI: 10.1080/17460441.2018.1398732
45. Jillian M Cathcart, Jian Cao. MMP Inhibitors: Past, present and future. *Frontiers in Bioscience.* 2015;20(7):1164–1178. DOI:10.2741/4365
46. Song J, Peng P, Chang J, et al. Selective non-zinc binding MMP-2 inhibitors: novel benzamide Ilomastat analogs with anti-tumor metastasis. *Bioorg Med Chem Lett.* 2016;26(9):2174–2178. DOI:10.1016/j.bmcl.2016.03.064
47. clinicaltrials.gov [Internet]. BB-2516 [update 2004 May 26; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=BB-2516&cntry=&state=&city=&dist>
48. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93(3):178–193. DOI:10.1093/jnci/93.3.178
49. clinicaltrials.gov [Internet]. A Phase 1 Study of S-3304 in Patients With Solid Tumors [update 2002 Apr 10; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00033215?cond=matrix+metalloproteinase&draw=10&rank=55>
50. clinicaltrials.gov [Internet]. Study of S-3304 in Patients With Locally Advanced Non-Small Cell Lung Cancer [update 2004 Feb 26; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/nct00078390>
51. clinicaltrials.gov [Internet]. A Phase I Study of Oral COL-3 (NSC-683551), a Matrix Metalloproteinase Inhibitor, in Patients With Refractory Metastatic [update 1999 Nov 4; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00001683?cond=matrix+metalloproteinase&draw=4&rank=20>
52. Grobelny D, Poncz L, Galaray RE. Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and *Pseudomonas aeruginosa* elastase by peptide hydroxamic acids. *Biochemistry.* 1992;31(31):7152–7154. DOI:10.1021/bi00146a017
53. Beckett RP, Whittaker M. Matrix metalloproteinase inhibitors 1998. *Expert Opin Ther Pat.* 1998;8(3):259–282. DOI.org/10.1517/13543776.8.3.259
54. clinicaltrials.gov [Internet]. Tetracycline (Doxycycline) and Post Myocardial Infarction Remodeling (TIPTOP) [update 2007 May 4; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00469261?cond=matrix+metalloproteinase&draw=10&rank=54>
55. clinicaltrials.gov [Internet]. A Study of Doxycycline and Tauroursodeoxycholic Acid (Doxy/TUDCA) Plus Standard Supportive Therapy Versus Standard Supportive Therapy Alone in Cardiac Amyloidosis Caused by Transthyretin [update 2018 Mar 29; cited 2018 Aug 17]. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03481972?term=Doxycycline&rank=1>

Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела в период деполяризации предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией

Смирнова С.Л.¹, Рощевская И.М.², Цорин И.Б.², Столярчук В.Н.²,
Вититнова М.Б.², Колик Л.Г.², Крыжановский С.А.²

¹ – ФИЦ Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук, Сыктывкар

² – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Цель работы – выявление по динамике электрического поля сердца на поверхности тела особенностей деполяризации предсердий у крыс на трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии. Исследовано электрическое поле сердца на поверхности тела в период деполяризации предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией. У крыс с алкогольной кардиомиопатией выявлены увеличение ЧСС, общей длительности деполяризации предсердий, периода восходящей и нисходящей фаз P_{II} волны на ЭКГ, более поздняя инверсия областей ЭПС и начало P_{II} волны по сравнению с контрольными животными. Длительность инверсии у опытных крыс достоверно увеличивается по сравнению с контрольными. Алкогольная кардиомиопатия приводит к значимым изменениям пространственных и временных параметров электрического поля сердца на начальных этапах деполяризации предсердий, а также к увеличению неоднородности их деполяризации. Выявленные изменения свидетельствуют о высоком риске развития фибрилляции предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией.

Ключевые слова: электрическое поле сердца; предсердия; алкогольная кардиомиопатия; белые беспородные крысы

Для цитирования:

Смирнова С.Л., Рощевская И.М., Цорин И.Б., Столярчук В.Н., Вититнова М.Б., Колик Л.Г., Крыжановский С.А. Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела в период деполяризации предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 17–22. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10041.

Cardioelectric field on the body surface during atrial depolarization in rats with alcoholic cardiomyopathy

Smirnova SL¹, Roshchevskaya IM², Tsorin IB², Stolyaruk VN²,
Vititnova MB², Kolik LG², Kryzhanovskii SA²

¹ – Komi Scientific Centre of the Ural branch of the Russian Academy of Sciences, Syktyvkar

² – FSBI «Zacusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. To study the features of an atrium depolarization on the dynamics of the cardioelectric field on the body surface at rats with an alcoholic cardiomyopathy. The cardioelectric field on the body surface of rats with an alcoholic cardiomyopathy was investigated during an atrium depolarization by the method of multiple synchronous cardioelectrotopography. In experimental and control animals, reflecting atrial depolarization, is formed before the appearance of the P_{II} wave on the ECG, inversion of the body surface potential mapping (BSMP) regions occurs before the beginning of the ascending phase of the P_{II} wave. In rats of the experimental group, it is shown an increase in the heart rate, the total duration of atrial depolarization, the period of the ascending and descending phases of the P_{II} wave on the ECG; later (relative to the peak of the P_{II} -wave) inversion of the BSMP regions and the beginning of the P_{II} wave by comparison with the control animals. The duration of inversion in experimental rats significantly increased compared with the control. Alcoholic cardiomyopathy leads to significant changes in the spatial and temporal parameters of the cardioelectric field at the initial stages of atrium depolarization, an increase in the non-uniformity of depolarization and a high risk of atrial arrhythmias.

Keywords: heart electrical field; atrium; alcoholic cardiomyopathy; white outbred rats

For citations:

Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kolik LG, Kryzhanovskii SA. Cardioelectric field on the body surface during atrial depolarization in rats with alcoholic cardiomyopathy. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:17–22. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10041.

Введение

Алкоголизм является одной из основных причин смертности населения, уступая лишь сердечно-сосудистым и онкологическим заболеваниям [1]. Основной причиной летальности при хроническом злоупотреблении алкоголем является алкогольная кардиомиопатия [2]. Не менее важно и то, что алкогольной кардиомиопатии присущ высокий риск внезапной сердечной смерти [3, 4], которая диагностируется у 30–40 % пациентов, страдающих этим заболеванием [5]. Согласно данным эпидемиологических исследо-

ваний, алкогольная кардиомиопатия занимает 2–3-е место среди причин внезапной сердечной смерти [4].

С учётом сказанного, а также малой изученностью механизмов, ответственных за формирование электрической нестабильности миокарда, сопутствующей алкогольной кардиомиопатии, является актуальным экспериментальное исследование механизмов изменения электрической активности сердца, разработка неинвазивных методов оценки функционального состояния миокарда и выявление факторов риска внезапной сердечной смерти на ранее разработанной нами трансляционной модели алкогольной кардио-

миопатии у крыс [6]. С использованием комплекса эхокардиографических, электрофизиологических, морфологических, гистологических, молекулярных методов было показано, что разработанная модель воспроизводит основные клинико-диагностические признаки алкогольной кардиомиопатии, в том числе и снижение электрической стабильности миокарда.

Исследование электрического поля сердца (ЭПС) при синхронной регистрации кардиоэлектрических потенциалов от множества униполярных отведений на поверхности торса свидетельствует о высокой информативности этого метода при изучении функционального состояния миокарда [7–9]. По расположению областей положительных и отрицательных кардиоэлектрических потенциалов на ЭПС на поверхности тела крыс в начальный период деполяризации предсердий можно судить о расположении очага начальной активности и основном направлении распространения волны возбуждения [10].

Цель исследования — выявление по динамике электрического поля сердца на поверхности тела особенностей деполяризации предсердий у крыс на трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии.

Материалы и методы

Животные

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г, которые содержались в виварии в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 09.06.2003 г. «Об учреждении правил лабораторной практики». Животные были получены из питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья, и прошли 20-суточный карантин в виварии НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Животные содержались в индивидуальных клетках (370×200×150 мм) в соответствии с нормами размещения в условиях контролируемого освещения (12 ч — свет / 12 ч — темнота) с принудительной 16-кратной в час вентиляции, при температуре 18–20 °С и относительной влажности воздуха 40–70 % на подстилке из простерилизованных древесных стружек. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123.

Животных рандомизировали на две группы: 1-я — контрольные крысы ($n = 13$), имели свободный доступ к питьевой воде и корму (стандартный брикетированный корм ПК-120-1; ООО «Лабораторснаб», РФ); 2-я — алкоголизованные крысы ($n = 16$), которые получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1, в качестве единственного источника жидкости получали 10 % водный раствор этанола в течение

24 нед. На протяжении всего исследования ежедневно регистрировали количество потребляемого этанола (г/кг). Все животные 2-й группы активно потребляли физиологически значимое количество 10 % раствора этанола. В пересчёте на чистый этанол среднее потребление алкоголя в течение эксперимента варьировалось в пределах 5,0–6,5 г/кг в сутки.

Электрофизиология

Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела крыс при алкогольной кардиомиопатии в период деполяризации предсердий исследовано методом множественной синхронной кардиоэлектротопографии. Крыс наркотизировали зоветилом (1,25 мг/кг, в/м) и уретаном (1 г/кг, в/б). Синхронную регистрацию кардиопотенциалов осуществляли от 64 подкожных игольчатых электродов, равномерно распределённых по поверхности грудной клетки (по четыре ряда на вентральной и дорсальной сторонам тела) при помощи электрокардиотопографической системы. Синхронно с униполярными кардиоэлектрическими потенциалами на поверхности тела регистрировали ЭКГ в биполярных отведениях от конечностей. В качестве реперного использовали ЭКГ во втором отведении, отсчёт времени производили относительно пика зубца R_{II} в мс (момент времени до R_{II} -пика указывается со знаком минус).

Полученные данные обрабатывали при помощи системы «Кардиоинформ» [7]. Кардиоэлектрическое поле на поверхности тела анализировали по моментным эквипотенциальным картам.

Статистика

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Statistica 10.0 (StatSoft, Inc., США). Тип распределения определяли с помощью W -критерия Шапиро—Уилка, различия между группами с помощью U -критерия Манна—Уитни при $p < 0,05$. Данные представляли в виде среднего арифметического $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Контрольная группа. До возникновения на ЭКГ во II отведении от конечностей P_{II} -волны (за $-65,8 \pm 6,6$ мс до R_{II} -пика) на поверхности тела крыс формируется ЭПС с краниальной областью положительных кардиоэлектрических потенциалов, каудальной — отрицательных, которые по мере деполяризации предсердий начинают смещаться: область положительных потенциалов — каудально, отрицательных — краниально (рис. 1А). Изменение взаимного расположения положительных и отрицательных зон кардиоэлектрических потенциалов завершается к началу P_{II} волны (за $-62,1 \pm 6,6$ мс до R_{II} -пика). В период восходящей и нисходящей фаз P_{II} волны расположение зон кар-

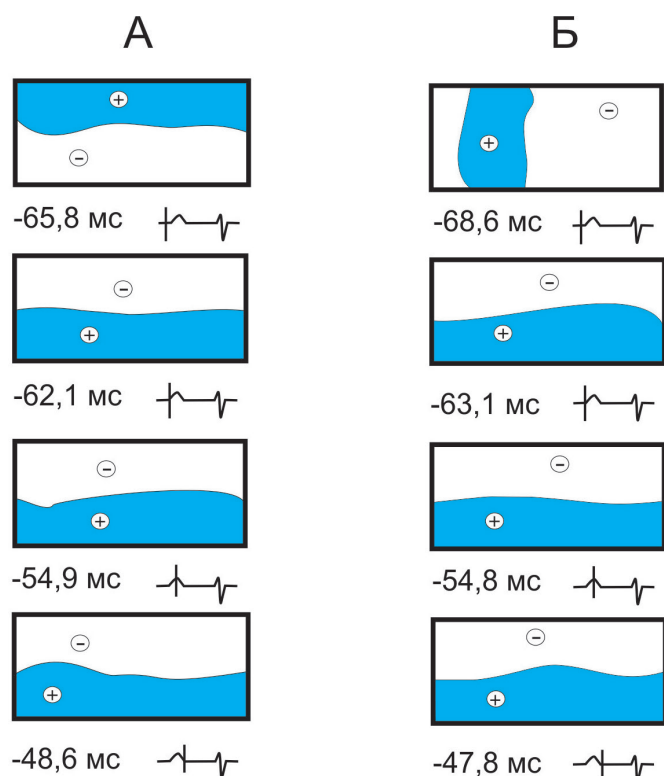


Рис. 1. Эквипотенциальные моментные карты на поверхности тела крысы в период деполяризации предсердий при алкогольной кардиомиопатии

Примечания: Контрольная группа животных (А) (крыса №9) и опытная группа животных (Б) (крыса №3). Закрашена область положительных кардиопотенциалов. Под каждой картой указано время в мс относительно пика R ; приведена ЭКГ во втором отведении с маркером времени.

диоэлектрических потенциалов не меняется: область положительных потенциалов кардиоэлектрического поля расположена каудально, отрицательных — краниально.

Опытная группа. У крыс опытной группы наблюдались: достоверно меньшая ЧСС; большая общая длительность деполяризации предсердий, длительности периода восходящей и нисходящей фаз P_{II} волны на ЭКГ во II отведении от конечностей; более раннее (относительно пика R_{II} -зубца) начало инверсии областей кардиоэлектрического поля на поверхности тела; начало P_{II} волны (табл.) по сравнению с контрольными животными. У алкоголизированных крыс выявлена существенно большая длительность инверсии положительной и отрицательной областей ЭПС на поверхности тела по сравнению с контрольными.

До возникновения на ЭКГ P_{II} волны (до вершины P -волны, за $-68,6 \pm 2,3$ мс относительно R_{II} -пика) на ЭПС на поверхности тела крыс область положительных кардиопотенциалов расположена кранио-каудально в средней части вентральной поверхности, область отрицательных потенциалов занимает право- и леволатеральную поверхность вентральной стороны и дорсальную сторону грудной клетки (рис. 1Б).

Таблица

Временные характеристики электрического поля сердца на поверхности тела (мс) и P_{II} -волны (мс), ЧСС (уд/мин) у крыс при алкогольной кардиомиопатии

Характеристики	Контроль	Опыт
Начало инверсии областей ЭПС	$-65,8 \pm 6,6$	$-68,6 \pm 2,3$
Длительность инверсии ЭПС	$3,6 \pm 0,6$	$5,5 \pm 1,1^*$
Начало P_{II} -волны	$-62,1 \pm 6,6$	$-63,1 \pm 3$
Вершина P_{II} -волны	$-54,9 \pm 6,2$	$-54,8 \pm 3,2$
Конец P_{II} -волны	$-48,6 \pm 6,4$	$-47,8 \pm 3,2$
Длительность восходящей фазы P_{II} -волны	$7,2 \pm 0,9$	$8,2 \pm 1,6$
Длительность нисходящей фазы P_{II} -волны	$6,3 \pm 0,8$	$7,1 \pm 0,9$
Длительность P_{II} -волны	$13,5 \pm 0,6$	$15,3 \pm 1^*$
ЧСС	517 ± 13	$486 \pm 16^*$

Примечания: Время указано в мс, относительно пика R_{II} (до пика имеет отрицательное значение). * — $P \leq 0,001$. Данные представлены в виде среднего арифметического значения $\pm$ стандартное квадратическое отклонение.

До начала восходящей фазы P_{II} волны (в период изоэлектрической линии на ЭКГ $_{II}$) на ЭПС происходит смещение зон положительных и отрицательных кардиопотенциалов. Области смещаются на вентральную и дорсальную поверхности: положительных кардиопотенциалов каудально, отрицательных — краниально. Изменение взаимного расположения положительных и отрицательных зон ЭПС и формирование кардиоэлектрического поля, характерного для деполяризации основной массы предсердий, завершается за $-63,1 \pm 3$ мс до вершины R_{II} волны (к началу P_{II} волны ЭКГ во II отведении от конечностей). В период восходящей и нисходящей фаз P_{II} волны расположение зон кардиоэлектрических потенциалов не меняется: область положительных потенциалов расположена каудально, отрицательных — краниально.

Анализ ЭПС на поверхности тела животных и человека в период начальной предсердной активности имеет большое диагностическое значение. Однако в основном анализ пространственно-временных или амплитудных характеристик ЭПС производится во время восходящей или нисходящей фаз P -волны на ЭКГ.

В период P -волны на ЭКГ на ЭПС на поверхности тела у разных видов теплокровных животных и человека наблюдается однотипное расположение областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов. Исследования, проведенные на собаках [11], свиньях [10], крысах линии Вистар [12], показали, что в период P -волны на ЭКГ на ЭПС на поверхности тела область положительных кардиопотенциалов занимает каудальную часть вентральной и дорсальной сторон, а

отрицательных — краниальную. При этом динамики смещения областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов на ЭПС на поверхности тела не наблюдается. Однотипное расположение областей положительных кардиопотенциалов в каудальной, и отрицательных потенциалов в краниальной части ЭПС на поверхности тела в период восходящей и нисходящей фаз P -волны свидетельствует о равномерном распространении волны возбуждения по предсердиям от синоатриального узла [10].

При экспериментальном моделировании заболеваний сердечно-сосудистой системы, характерных для человека, исследовании миокарда линейных животных с разными формами артериальной гипертензии нами было показано различное расположение областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов на поверхности тела в период P -волны на ЭКГ.

Экспериментально вызванная лёгочная гипертензия, связанная с гипертрофией правых отделов сердца, приводит к изменению параметров начальной предсердной активности: временных — к увеличению длительности деполяризации предсердий, и пространственных — в начальный период восходящей фазы P -волны на ЭКГ, свидетельствующих об изменении последовательности деполяризации предсердий [13].

У крыс линии SHR (спонтанно-гипертензивные крысы) область положительных потенциалов расположена на ЭПС каудально на вентральной стороне тела и занимает примерно 2/3 поверхности, область отрицательных кардиопотенциалов занимает полностью дорсальную сторону и краниальную часть вентральной поверхности. Такое расположение областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов ЭПС не характерно для периода восходящей и нисходящей фаз P -волны на ЭКГ у нормотензивных животных [14].

Исследование электрической активности предсердий крыс линии НИСАГ со стресс-индуцированной артериальной гипертензией показало, что формирующийся дополнительный очаг возбуждения на эпикарде в области впадения лёгочных вен в левое предсердие отражается на ЭПС на поверхности тела в период начала и в восходящую фазу P -волны на ЭКГ расположением зоны положительных кардиопотенциалов на вентральной поверхности каудально-праволатерально, остальную поверхность занимает область отрицательных кардиопотенциалов [12].

Однако нами ранее было показано формирование ЭПС на поверхности тела животных до начала восходящей фазы P -волны на ЭКГ, доказанное прямой регистрацией деполяризации миокарда в интрамуральных слоях предсердий свиньи. Показано, что изменение основного направления распространения

волны возбуждения в предсердиях приводит к инверсии взаимного расположения областей положительного и отрицательного кардиопотенциалов на ЭПС на поверхности тела [10].

На ЭПС на поверхности тела алкоголизованных крыс до возникновения P -волны на ЭКГ область положительных кардиопотенциалов расположена кранио-каудально в средней части вентральной поверхности, область отрицательных потенциалов занимает право- и леволатеральную поверхность вентральной стороны и дорсальную поверхность грудной клетки крыс. После смещения до начала восходящей фазы P_{II} -волны зона положительных кардиопотенциалов располагается каудально, отрицательных — краниально на вентральной и дорсальной сторонах.

Ранее нами на модели трансляционной алкогольной кардиомиопатии у крыс прямыми методами исследования выявлена значительная неоднородность последовательности деполяризации правого и левого предсердий и межпредсердной перегородки, вызванная формированием двух источников начальной активации в правом и левом предсердиях [15].

Формирование двух источников ранней активации в предсердиях вызывает значимые изменения пространственных и временных параметров ЭПС на начальных этапах деполяризации предсердий, до начала P_{II} -волны на ЭКГ во II отведении от конечностей, свидетельствующее об увеличении неоднородности деполяризации предсердий.

Таким образом, на начальных этапах формирования кардиоэлектрического поля на поверхности тела (до начала P_{II} -волны на ЭКГ во II отведении от конечностей) алкоголизованных крыс наблюдаются изменения в расположении областей положительных и отрицательных кардиопотенциалов, достоверное увеличение длительности инверсии по сравнению с контрольными животными.

Заключение

У животных с алкогольной кардиомиопатией выявлены значимые изменения пространственных и временных параметров электрического поля сердца на поверхности тела на начальных этапах деполяризации предсердий (до начала P_{II} -волны на ЭКГ во II отведении от конечностей), свидетельствующие об увеличении неоднородности деполяризации предсердий и высоком риске возникновения фибрилляции предсердий.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 0521-2019-0005.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Смирнова Светлана Леонидовна

ORCID ID: 0000-0003-4292-2444

SPIN код: 7341-0013

к. б. н., с. н. с. ФИЦ Коми научный центр
Уральского отделения Российской академии
наук, Сыктывкар**Smirnova Svetlana**

ORCID ID: 0000-0003-4292-2444

SPIN code: 7341-0013

Candidate of biological sciences, Senior research
scientist of VSEBB – Branch of the Komi Scientific
Center of the Ural Branch of RAS, Syktyvkar**Рощевская Ирина Михайловна**

ORCID ID: 0000-0002-6108-1444

SPIN код: 5424-2991

д. б. н., чл.-корр. РАН, г.н.с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Roshchevskaya Irina**

ORCID ID: 0000-0002-6108-1444

SPIN code: 5424-2991

Grand PhD in biological sciences, Correspond-
ing member of the Russian academy of sciences,
Chief researcher of laboratory of pharmacological
screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacol-
ogy», Moscow**Цорин Иосиф Борисович**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Tsorin Iosif**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Doctor of biological sciences, leading researcher
of laboratory of pharmacological screening FSBI
«Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow**Столярук Валерий Николаевич**

ORCID ID: 0000-0002-4779-427X

SPIN код: 3405-8229

к. м. н., с. н. с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Tsorin Iosif**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Doctor of biological sciences, leading researcher
of laboratory of pharmacological screening FSBI
«Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow**Вититнова Марина Борисовна**

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Vititnova Marina**

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN code: 1901-8919

Candidate of biological sciences, senior re-
searcher scientist of laboratory of pharmacological
screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacol-
ogy», Moscow**Колик Лариса Геннадьевна**

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

SPIN код: 9126-6922

д. б. н., профессор РАН, руководитель
лаборатории фармакологической регуляции
состояний зависимости ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Kolik Larisa**

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

SPIN code: 9126-6922

Grand PhD in biological sciences, professor of the
Russian academy of sciences, Head laboratory of
pharmacological regulation of alcohol and drug ad-
dition FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
Moscow**Крыжановский Сергей Александрович****Автор, ответственный за переписку**

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN код: 6596-4865

д. м. н., заведующий лабораторией
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Kryzhanovskii Sergey**

Corresponding autor

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

MD, Head of laboratory of pharmacological
screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacol-
ogy», Moscow

Литература / References

1. Бохан Н.А., Мандель А.И., Максименко Н.Н., Михалева Л.Д. Смертельные исходы при алкогольной зависимости // *Наркология*. — 2007. — № 12. — С. 37–40. [Bokhan NA, Mandel' AI, Maksimenko NN, Mikhaleva LD. Fatal outcomes in alcohol addiction. *Narkologiya*. 2007;12:37–40. (In Russ).]
2. Семенова В.Г., Антонова О.И., Евдокюшкина Г.Н., Гаврилова Н.С. Потери населения России в 2000–2008 гг., обусловленные алкоголем: масштабы, структура, тенденции // *Социальные аспекты здоровья населения*. — 2010. — № 2. — С. 34–37. [Semyonova VG, Antonova OI, Evdushkina GN, Gavrilova NS. Losses of the population of Russia in 2000–2008 caused by alcohol: Scales, structure, and tendencies. *Sotsial. Aspekty Zdorov'ya Naseleniya*. 2010;22:34–37. (In Russ).]
3. Vikhert AM, Tsiplenkova VS, Cherpachenko NM. Alcoholic cardiomyopathy and sudden death. *J Am Cardiol*. 1986;8(1Suppl.):3a–11a.
4. Klatsky AL. Alcohol and cardiovascular health. *Physiol Behav*. 2010;100(1):76–81. DOI: 10.1016/j.physbeh.2009.12.019
5. Чазов Е.И. Внезапная смерть. 2013, <http://www.medicusamicus.com/index.php?action=2x1229x1>. [Chazov EI. Sudden death. 2013. <http://www.medicusamicus.com/index.php?action=2x1229x1>. (In Russ).]
6. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., и др. Трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии // *Молекулярная медицина*. — 2015. — № 3. — С. 40–47. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Kolik LG, et al. Translation model of alcoholic cardiomyopathy. *Mol. Med*. 2015;3:40–47. (In Russ).]
7. Рошевский М.П., Артеева Н.В., Коломеец Н.Л., и др. Система «КАРДИОИНФОРМ» для визуализации и анализа электрического поля сердца // *Медицинский академический журнал*. — 2005. — № 5. — С. 74–79. [Roshchevsky MP, Arteeva NV, Kolomeets NL, et al. The system "Cardioinform" for visualization and analysis of the heart electric field. *Med. Akad. Zh*. 2005;5:74–79. (In Russ).]
8. Рошевская И.М. Кардиоэлектрическое поле теплокровных животных и человека. — СПб.: Наука; 2008. [Roshchevskaya IM. Kardioelektricheskoye pole teplokovnykh zhivotnykh i cheloveka. S-Pb.: Nauka; 2008. (In Russ).]
9. Bacharova L, Mateasik F, Krause R, et al. The effect of reduced intercellular coupling on electrocardiographic signs of left ventricular hypertrophy. *J Electrocardiol*. 2011;44:571–576. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2011.06.004
10. Рошевский М.П., Чудородова С.Л., Рошевская И.М. Отображение на поверхность тела деполяризации предсердий // *Доклады Академии наук*. — 2007. — Т. 412. — № 5. — С. 704–706. [Roshchevsky MP, Chudorodova SL, Roshchevskaya IM. Expression of atrial depolarization on the body surface. *Doklady Biological Sciences*. 2007;412(1):15–17. (In Russ).]
11. Mirvis DM. *Body surface electrocardiographic mapping*. Boston: Kluwer Academic Publishers; 1988.
12. Smirnova S, Ivanova L, Markel A, et al. Comparison of propagation of atrial excitation with the cardiopotential distribution on the body surface of hypertensive rats. *Anadolu. Kardiol. Derg*. 2012;12(3):195–199. DOI: 10.5152/akd.2012.060
13. Смирнова С.Л., Сулонова О.В., Рошевская И.М. Пространственно-временные характеристики электрического поля предсердий у крыс с экспериментально вызванной легочной гипертензией // *Известия Коми научного центра УрО РАН*. — 2016. — Т. 4. — № 28. — С. 67–72. [Smirnova SL, Suslonova OV, Roshchevskaya IM. Spatial-temporal characteristics of the electric field of atria in rats with experimentally induced pulmonary hypertension. *Izvestia Komi N.T.* 2016;4(28):67–72. (In Russ).]
14. Смирнова С.Л., Сулонова О.В., Рошевская И.М. Электрическое поле сердца на поверхности тела в период деполяризации предсердий у крыс со спонтанной артериальной гипертензией // *Практическая медицина*. — 2018. — Т. 1. — № 112. — С. 61–64. [Smirnova SL, Suslonova OV, Roshchevskaya IM. Cardioelectric field on the body surface during atrial depolarization in rats with spontaneous arterial hypertension. *Prakticheskaya medicina*. 2018; 1(112):61–64. (In Russ).]
15. Смирнова С.Л., Рошевская И.М., Рошевский М.П., и др. Деполяризация предсердий у крыс с алкогольной кардиомиопатией // *Доклады Академии наук*. — 2018. — Т. 479. — № 1. — С. 96–98. [Smirnova SL, Roshchevskaya IM, Roshchevsky MP, et al. Atria depolarization in rats with alcoholic cardiomyopathy. *Doklady Biological Sciences*. 2018;479(1):41–43. (In Russ).] DOI 10.7868/S0869565218010231

Сравнительное изучение антиишемической активности триметазида и соединения АЛМ-802 в условиях эндотелиальной дисфункции

Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М., Вититнова М.Б.,
Мокров Г.В., Крыжановский С.А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Цель исследования. Изучить на модели субэндокардиальной ишемии у крыс особенности антиишемического действия р-FOX ингибитора триметазида и сконструированного на основе его структуры тригидрохлорид N¹-(2,3,4-триметоксибензил)-N²-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (соединение АЛМ-802) в условиях эндотелиальной дисфункции. Материал и методы. Острую субэндокардиальную ишемию миокарда у наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг, в/б) вызывали путём инфузии изопротеренола (20 мкг/кг/мин, в/в). Эндотелиальную дисфункцию индуцировали, вызывая у крыс гипергомоцистеинемию (метионин 3 г/кг внутривенно 1 раз в сутки в течение 7 дней). Результаты. Показано, что у крыс с интактным сосудистым руслом и эталонный препарат триметазидин (30 мг/кг, в/в), и соединение АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) проявляют выраженную антиишемическую активность, тогда как у животных с эндотелиальной дисфункцией эффективно только соединение АЛМ-802. Заключение. Эндотелиальная дисфункция препятствует реализации антиишемического действия триметазида, но не влияет на таковое соединения АЛМ-802. При изучении антиишемических свойств новых фармакологических веществ определённую часть экспериментов целесообразно проводить в модельных экспериментах, воспроизводящих эндотелиальную дисфункцию.

Ключевые слова: α, ω-диарилметильные производные бис-(ω-аминоалкил)аминов; АЛМ-802; триметазидин; субэндокардиальная ишемия; эндотелиальная дисфункция; р-FOX ингибиторы

Для цитирования:

Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А. Сравнительное изучение антиишемической активности триметазида и соединения АЛМ-802 в условиях эндотелиальной дисфункции // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – № 2. – С.23–27. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10042.

A comparative study of the anti-ischemic activity of trimetazidine and the compound ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction

Barchukov VV, Tsorin IB, Likhosherstov AM, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA
FSBI «Zacusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Methods. Acute subendocardial myocardial ischemia in anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg, i.p.) was caused by isoproterenol (20 µg/kg/min, i.v.). Endothelial dysfunction was induced, causing hyperhomocysteinemia in rats (methionine 3 g/kg intragastrically 1 time per day for 7 days). *The aim.* To study on the subendocardial ischemia model in rats the peculiarities of the anti-ischemic action of p-FOX inhibitor trimetazidine and trihydrochloride N¹-(2,3,4-trimethoxybenzyl)-N²-{2-[(2,3,4-trimethoxybenzyl)amino]ethyl}-1,2-ethanediamine constructed on the basis of its structure (compound ALM-802) under conditions of endothelial dysfunction. *Results.* It was shown that in rats with an intact vascular bed and the reference drug trimetazidine (30 mg/kg, i.v.) and the compound ALM-802 (2 mg/kg, i.v.) demonstrated pronounced anti-ischemic activity, while in animals with endothelial dysfunction only the compound ALM-802 was effective. *Conclusion.* Endothelial dysfunction prevents the implementation of the trimetazidine anti-ischemic action, but does not affect on the compound ALM-802 effect. When studying the anti-ischemic properties of new pharmacological substances, it is advisable to carry out a certain part of the experiments in model experiments that reproduce endothelial dysfunction.

Keywords: α, ω-diarylmethyl derivatives of bis-(ω-aminoalkyl) amines; ALM-802; trimetazidine; subendocardial ischemia; endothelial dysfunction; p-FOX inhibitors.

For citations:

Barchukov VV, Tsorin IB, Likhosherstov AM, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA. A comparative study of the anti-ischemic activity of trimetazidine and the compound ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:23–27. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10042.

Введение

При изучении веществ, защищающих миокард от ишемического повреждения, эксперименты, как правило, проводят на интактных животных, у которых тем или иным способом моделируют ишемию миокарда [1]. Такой подход, хотя и даёт возможность принципиально оценить антиишемические свойства соединений, однако крайне далёк от реальной клинической ситуации. Из клинической практики хорошо известно, что у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) заболевание протекает на фоне сопутствующей патологии сосудистого русла, в частности эндотелиальной дисфункции (ЭД). Данные литературы подтверждают существование связи между ЭД и ИБС [2, 3]. Показано, что у пациентов с ИБС при нагрузке наблюдается расслабление ангиографически неповреждённых участков коронарных артерий, в то время как повреждённые участки артерий сокращаются. Вазоконстрикция во время нагрузки, по-видимому, связана с отсутствием в поражённых атеросклерозом участках сосудов эндогенных вазодилататоров, поскольку при перфузии тех же артерий органическими нитратами, которые являются эндотелий-независимыми вазодилататорами, все сегменты артерий отвечают расслаблением [4]. Необходимо также отметить, что у больных с распространённым атеросклерозом наблюдается сниженная эндотелий-зависимая реакция на ацетилхолин, при этом эндотелий-независимые реакции остаются неизменёнными [5]. Нарушение расслабления гладких мышц сосудов может увеличивать интенсивность приступов стенокардии у такого рода больных [6].

Известно, что формирование большинства адаптационных ишемических синдромов (stunned myocardium, гибернация и прекодиционирование) связано с особенностями метаболизма ишемизированных кардиомиоцитов [7, 8]. Показано, что в условиях ишемии миокарда основным источником АТФ является анаэробный гликолиз. При этом происходит подавление аэробного синтеза АТФ, осуществляемого за счёт физиологического β -окисления свободных жирных кислот, в результате чего в зоне неадекватного кровообращения миокарда резко возрастает содержание недоокисленных продуктов их метаболизма [9, 10]. Этот процесс получил название «метаболическое ремоделирование миокарда» [11]. Аномальное окисление свободных жирных кислот в ишемизированных кардиомиоцитах обуславливает формирование ишемической/постишемической дисфункции левого желудочка сердца, его ремоделирование и повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма [12, 13], а также инициирует процессы, ответственные за апоптоз кардиомиоцитов [14]. Накопленные данные о механизмах, лежащих в основе метаболического ремоделирования миокарда, позволили не только сформулировать теоретические подходы к медикаментозной цитопротекции — про-

цессу восстановления энергетического метаболизма ишемизированных кардиомиоцитов путём подавления аномального метаболизма свободных жирных кислот, но и создали фундаментальную базу для внедрения в клинику лекарственных средств (мельдоний, триметазидин, ранолозин), объединённых под названием «парциальные ингибиторы окисления жирных кислот» — p-FOX ингибиторы (partial fatty acid oxidation inhibitor) [15–19].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Зукосова» в течение ряда лет проводятся систематические исследования по поиску новых оригинальных p-FOX ингибиторов. В результате этих исследований в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов было выявлено соединение тригидрохлорид N¹-(2,3,4-триметоксибензил)-N²-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина, получившее шифр АЛМ-802 (рис. 1), которое по своей кардиопротективной активности, изученной на животных с интактным сосудистым руслом, как минимум, не уступает эталонному препарату триметазидин [20].

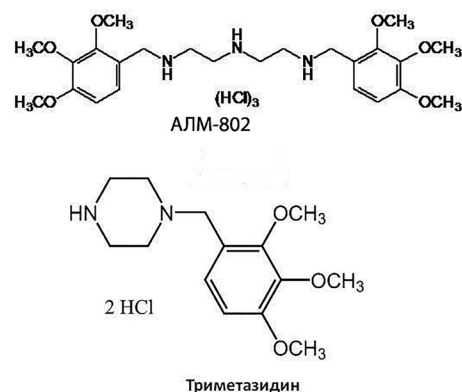


Рис. 1. Структурные формулы соединения АЛМ-802 и триметазидина

Цель настоящего исследования — изучение влияния ЭД на кардиопротективное действие соединения АЛМ-802 и триметазидина в условиях модели субэндокардиальной ишемии у крыс.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 250–300 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Зукосова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию

и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животные были рандомизированы на 2 группы: 1-я — интактные крысы ($n = 33$); 2-я — животные, у которых моделировали ЭД ($n = 29$). Часть животных каждой из групп использовали для проверки адекватности модели ЭД. Остальные крысы каждой из 2 экспериментальных групп были слепым методом разделены на 3 подгруппы: интактные крысы: 1-я — контроль ($n = 12$); 2-я — АЛМ-802 (2 мг/кг; $n = 7$); 3-я — триметазидин (30 мг/кг; $n = 8$; крысы с ЭД: 1-я — контроль ($n = 8$); 2-я — АЛМ-802 (2 мг/кг; $n = 8$); 3-я — триметазидин (30 мг/кг; $n = 8$). Все препараты вводили внутривенно за 2 мин до начала инфузии изопроterenола в изотоническом растворе натрия хлорида. Раствор для инъекций готовили так, чтобы на 100 г массы животного надо было вводить 0,1 мл жидкости. Животные контрольной группы получали эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида.

Экспериментальные модели:

— *Модель субэндокардиальной ишемии.* Острую субэндокардиальную ишемию миокарда вызывали по методу, описанному Yamamoto S, et al [21]. Для этой цели наркотизированным животным (уретан 1300 мг/кг в/б) с помощью инъектора «Линеомат» (Россия) внутривенно со скоростью 20 мкг/кг/мин вводили неселективный агонист β -адренорецепторов изопроterenол. Об интенсивности ишемического повреждения судили по величине депрессии сегмента ST на ЭКГ (II стандартное отведение) через 5 мин от момента начала инфузии изопроterenола. ЭКГ регистрировали с помощью компьютерного электрокардиографа «Полиспектр 8/EX» (Нейрософт, Россия).

— *Модель ЭД.* Для того чтобы индуцировать ЭД, у животных вызывали гипергомоцистеинемию. С этой целью крысам вводили метионин (3 г/кг внутрижелудочно 1 раз в сутки в течение 7 дней) в виде суспензии на солюбилизаторе TWIN-80 [22]. Для проверки адекватности модели у выбранных случайным образом интактных ($n = 6$) и получавших метионин ($n = 5$) крыс, наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б), регистрировали реакции АД на М-холиномиметик метахолин (0,25 мкг/кг в/в). Хорошо известно, что вазодилатация, вызываемая веществами такого типа, является эндотелий-зависимой [22]. АД регистрировали в правой сонной артерии с помощью прибора «Мингограф-82», соединённого с помощью аналого-цифрового преобразователя с персональным компьютером. С помощью программы «Photoshop CS5» рассчитывали площадь над кривой реакции.

При проведении экспериментов использовали изотонический раствор натрия хлорида («Красфарм»,

Россия), уретан («Acros Organics», Индия), изопроterenол («Sigma», Германия), триметазидин («Nivedita Chemicals Pvt. Ltd.», Индия), АЛМ-802 (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»).

Статистическая обработка. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Так как при проверке адекватности модели ЭД выборки имели нормальное распределение, а выборочные дисперсии были негомогенны, то статистическую значимость различий определяли с помощью аппроксимации критерия Стьюдента для выборок с неравными дисперсиями. Результаты экспериментов на модели субэндокардиальной ишемии имели нормальное распределение, и выборочные дисперсии были гомогенны, в связи с этим для определения значимости различий использовали двухфакторный дисперсионный анализ (анализируемые факторы: вещество и ЭД) с последующей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену—Кейлсу. Полученные результаты выражали в виде средних арифметических, их стандартных ошибок и 95 % доверительных интервалов. Различия считали статистически значимыми при ошибке первого рода $p \leq 0,05$. Статистическую обработку проводили с помощью программы «Biostat-2009» (серийный № 1-BsiGf-QeLFS).

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследований оценили адекватность использованной нами модели ЭД. Для этой цели определяли интенсивность эндотелий-зависимой вазодилатации, вызванной М-холиномиметиком метахолином (0,25 мкг/кг), как у интактных животных, так и у крыс, которым ежедневно в течение 7 дней вводили алифатическую серосодержащую незаменимую аминокислоту метионин. В результате трансминирования и последующего метилирования метионина в организме образуется серосодержащая аминокислота гомоцистеин, являющаяся промежуточным продуктом обмена метионина и цистеина. Известно, что повышение содержания гомоцистеина в плазме крови (гипергомоцистеинемия) является независимым предиктором развития ЭД — подавления эндотелий-зависимой вазодилатации артерий в результате угнетения синтеза оксида азота в эндотелиальных клетках сосудов [22]. Показано, что если у интактных животных величина вызванной метахолином эндотелий-зависимой вазодилатации, которую рассчитывали по площади над кривой АД [22], равна $12,1 \pm 2,3 \text{ см}^2$ ($n = 6$), то у животных, в течение 7 дней получавших метионин, она более чем в 2 раза меньше — $5,2 \pm 1,0 \text{ см}^2$ ($n = 5$, $p = 0,032$), что позволяет говорить о наличии у последних ЭД.

Анализ результатов, полученных в экспериментах на модели субэндокардиальной ишемии, с помощью двухфакторного дисперсионного анализа позволил установить, что оба изучаемых фактора оказывают статистически значимое воздействие на депрессию сегмен-

Таблица

Влияние соединения АЛМ-802 (2 мг/кг в/в) и триметазидина (30 мг/кг в/в) на депрессию сегмента *ST* на ЭКГ в условиях модели субэндокардиальной ишемии

Вещество	Депрессия сегмента <i>ST</i> , мВ	
	Интakтные крысы	Крысы с ЭД
Контроль	0,159±0,017 0,122÷0,196 <i>n</i> = 12	0,280±0,034 0,200÷0,360 <i>n</i> = 8 <i>p</i> ₁ = 0,0029
АЛ-802	0,023±0,006 0,008÷0,038; <i>n</i> = 7 <i>p</i> = 0,0015	0,063±0,022 0,011÷0,114 <i>n</i> = 8 <i>p</i> = 0,0001
Триметазидин	0,073±0,019 0,028÷0,117 <i>n</i> = 8 <i>p</i> = 0,0153 <i>p</i> ₂ = 0,327	0,244±0,035 0,160÷0,327 <i>n</i> = 8 <i>p</i> = 0,297 <i>p</i> ₂ = 0,0002

Примечание: *n* – в таблице указаны средние арифметические, их стандартные ошибки и доверительные интервалы; *p* – по отношению к контролю; *p*₁ – по отношению к интактным животным; *p*₂ – по отношению к животным, получавшим соединение АЛМ-802.

та *ST*, вызываемую изопроterenолом (20 мкг/кг/мин) через 5 мин от момента начала инфузии: фактор вещества – $F = 27,253$, $df = 2$, $p < 0,001$; фактор ЭД – $F = 31,091$, $df = 1$, $p < 0,001$ (F – квантиль распределения Фишера–Снедекора; df – число степеней свободы). Также имеет место статистически значимое взаимодействие факторов ($F = 3,484$, $df = 2$, $p = 0,0392$). Для остаточной дисперсии $df = 45$.

Действительно, дальнейший статистический анализ показал, что у интактных животных как соединение АЛМ-802, так и триметазидин, препятствовали развитию депрессии сегмента *ST*, вызываемой изопроterenолом (20 мкг/кг/мин в/в) на 5-й минуте инфузии (таблица). Так, если в контрольной группе интактных животных депрессия сегмента *ST* в среднем составляла 0,159±0,017 (0,122÷0,196) мВ, то у животных, которые получали триметазидин (30 мг/кг в/в) и АЛМ-802 (2,0 мг/кг в/в),

эта величина была равна 0,073±0,019 (0,028÷0,117; $p = 0,0153$) мВ и 0,023±0,006 (0,008÷0,038; $p = 0,0015$) мВ, соответственно. Как следует из полученных данных, у животных с интактным сосудистым руслом интенсивность антиишемического действия эталонного препарата триметазидин и соединения АЛМ-802 не различалась ($p = 0,327$).

Показано что ЭД усиливала интенсивность ишемических изменений на ЭКГ, вызываемых изопроterenолом. Так, если у интактных животных депрессия сегмента *ST* в среднем составляла 0,159±0,017 (0,122÷0,196) мВ, то у крыс со сформировавшейся ЭД этот показатель был равен 0,280±0,034 (0,200÷0,360; $p = 0,0029$) мВ. Эти результаты хорошо коррелируют с известными данными о том, что снижение вазодилатирующей способности артерий, в том числе и коронарных, увеличивает риск ишемического повреждения тканей.

При изучении антиишемической активности эталонного препарата триметазидин и соединения АЛМ-802 в условиях сформировавшейся ЭД было показано, что если соединение АЛМ-802 уменьшало депрессию сегмента *ST* на ЭКГ с 0,280±0,034 мВ до 0,063±0,022 мВ (0,011÷0,114; $p = 0,0001$) мВ, то триметазидин статистически значимых изменений по сравнению с контролем не вызывал (0,244±0,035; 0,160÷0,327 мВ; $p = 0,297$). При этом вызываемая изопроterenолом депрессия сегмента *ST* на ЭКГ у крыс с ЭД, получавших соединение АЛМ-802, была статистически значимо меньше чем у животных, которым вводили триметазидин ($p = 0,0002$).

Таким образом, эндотелиальная дисфункция препятствует реализации антиишемического действия триметазидина, но не влияет на таковое соединения АЛМ-802. При изучении антиишемических свойств новых фармакологических веществ определённую часть экспериментов целесообразно проводить в модельных экспериментах, воспроизводящих эндотелиальную дисфункцию.

Исследование выполнено в рамках Государственного задания № 0521-2019-0005

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Барчуков Владимир Валерьевич

ORCID ID: 0000-0003-4229-3107

SPIN код: 6743-4280

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Цорин Иосиф Борисович

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Лихошерстов Аркадий Михайлович

ORCID ID: 0000-0001-5935-5146

SPIN код: 1980-7331

к. х. н., консультант отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Barchukov Vladimir

ORCID ID: 0000-0003-4229-3107

SPIN code: 6743-4280

Research scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Tsorin Iosif

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Doctor of biological sciences, leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Likhosherstov Arkady

ORCID ID: 0000-0001-5935-5146

SPIN code: 1980-7331

PhD, Consultant of drug chemistry department. FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Вититнова Марина Борисовна

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Мокров Григорий Владимирович**

ORCID ID: 0000-0003-2617-0334

SPIN код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого
органического синтеза отдела химии
лекарственных средств ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Крыжановский Сергей Александрович****Автор, ответственный за переписку**

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN код: 6596-4865

д. м. н., заведующий лабораторией
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Vititnova Marina**

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN code: 1901-8919

Candidate of biological sciences, senior researcher
scientist of laboratory of pharmacological screening
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow**Mokrov Grigory**

ORCID ID: 0000-0003-2617-0334

SPIN code: 8755-7666

PhD, Acting leading researcher of the fine organic
synthesis laboratory at the drug chemistry depart-
ment FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
Moscow**Kryzhanovskii Sergey****Corresponding author**

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

MD, Head of laboratory of pharmacological
screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
Moscow**Литература / References**

1. Чичканов Г.Г., Цорин И.Б. Методические рекомендации по изучению противоишемического (антиангинального) действия лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н. Часть первая — М.: Гриф и К. 2013 — С. 417–433 [Chichkanov G.G., Tsorin I.B. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu protivoišemicheskogo (antianginal'nogo) deistviya lekarstvennykh sredstv. V kn.: Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Pod redaktsiei. Mironova A.N. Chast' pervaya Moscow: Grif i K. 2013 (In Russ).]
2. McKechnie R, Mosca L. Physical activity and coronary heart disease: prevention and effect on risk factors. *Cardiol Res.* 2003;11:21–25. DOI: 10.1097/01.CRD.0000044662.35377.51
3. Schiffrin EL, Touyz RM. Vascular biology of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998;32(Suppl.3):S2–S13.
4. Dinimeler S, Hermann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis. *Eur Cytokine Netw.* 1998;9:697–698.
5. Hamilton CA, Berg G, McIntyre M, et al. Effects of nitric oxide and super oxide on relaxation in human artery and vein. *Atherosclerosis.* 1997;133:77–86.
6. Корж А.Н. Значение эндотелиальной дисфункции в развитии заболеваний сердечно-сосудистой системы // *Международный медицинский журнал.* — 2003. — № 3. — С. 10–14 [Korzh A.N. Znachenie endotelial'noi disfunktsii v razvitii zabolevaniy serdechno-sosudistoi sistemy. Mezhdunarodnyi meditsinskii zhurnal. 2003;3:10–14 (In Russ).]
7. Myrmet T, Korvald C. New aspects of myocardial oxygen consumption. Invited review. *Scand Cardiovasc J.* 2000;34(3):233–241.
8. Tousoulis D, Bakogiannis C, Briasoulis A, et al. Targeting myocardial metabolism for the treatment of stable angina. *Curr Pharm. Des.* 2013;19(9):1587–1592.
9. van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res.* 2004;61(2):218–226.
10. Fukushima A, Milner K, Gupta A, Lopaschuk GD. Myocardial energy substrate metabolism in heart failure: From pathways to therapeutic targets. *Curr Pharm Des.* 2015;21(25):3654–3664.
11. van Bilsen M, van Nieuwenhoven FA, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):420–428. DOI: 10.1093/cvr/cvn282
12. Mamamtavishvili N, Sanikidze T, Pavliashvili N, et al. Some aspects of metabolic remodeling of myocardium during chronic heart failure. *Georgian Med News.* 2008;154:33–36.
13. Tuunanen H, Knuuti J. Metabolic remodelling in human heart failure. *Cardiovasc Res.* 2011;90(2):251–257. DOI: 10.1093/cvr/cvr052
14. Kolwicz SC Jr, Purohit S, Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes. *Circ Res.* 2013;113(5):603–616. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.302095
15. Rupp H, Zarain-Herzberg A, Maisch B. The use of partial fatty acid oxidation inhibitors for metabolic therapy of angina pectoris and heart failure. *Herz.* 2002;27(7):621–636. DOI: 10.1007/s00059-002-2428-x
16. Jaswal JS, Keung W, Wang W, et al. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation — a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813(7):1333–1350. DOI: 10.1016/j.bbamer.2011.01.015
17. Fukushima A, Milner K, Gupta A, Lopaschuk GD. Myocardial energy substrate metabolism in heart failure: From pathways to therapeutic targets. *Curr Pharm Des.* 2015;21(25):3654–3664.
18. Lam A, Lopaschuk GD. Anti-anginal effects of partial fatty acid oxidation inhibitors. *Curr Opin Pharmacol.* 2007;7(2):179–185. DOI: 10.1016/j.coph.2006.10.008
19. Bhandari B, Subramanian L. Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, its potential benefit in angina and other cardiovascular disorder. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov.* 2007;2(1):35–39.
20. Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., и др. Скрининг кардиотропной активности в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов // *Фармакокинетика и Фармакодинамика.* — 2016. — № 2. — С. 10–13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB, et al. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α , ω -diarilmethyl derivatives of bis-(ω -aminoalkyl)amines. *Farmakokinetika i Farmakodinamika.* 2016;2:10–13 (In Russ).]
21. Yamamoto S, Matsui K, Sasabe M, Ohashi NJ. Effect of an orally active Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, SMP-300, on experimental angina and myocardial infarction models in rats. *Cardiovasc Pharmacol.* 2002;39(2):234–241.
22. Корокин М.В., Покровский М.В., Кочкаров В.И., и др. Исследование эндотелио- и кардиопротективных эффектов эналаприла, лозартана и амлодипина при моделировании гипергомоцистеин индуцированной эндотелиальной дисфункции // *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова.* — 2014. — № 1. — С. 60–65. [Korokin M.V., Pokrovskii MV, Kochkarov VI, Gudyrev OS, et al. Research of endothelio- and cardioprotective effects of enalapril, losartan and amlodipin at modelling hyperhomocystein induced endothelial dysfunction. *Rossiiskii mediko-biologicheskii vestnik imeni akademika I.P. Pavlova.* 2014;1:60–65 (In Russ).]

Влияние пробиотических лактобацилл на неспецифическую резистентность и физиологические показатели лабораторных животных

Овчарова А.Н., Софронова О.В., Полякова Л.Л.

ВНИИФБиП животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. Академика Л.К. Эрнста», Боровск, Калужской обл.

Резюме. Для коррекции и профилактики нарушений микрофлоры широко используются микробные препараты – пробиотики, оказывающие положительное воздействие на состав кишечной микрофлоры, иммунную систему животных. Особую роль в становлении нормальной микрофлоры играют лактобациллы. В 2009 г. в лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП была составлена ассоциация из четырех штаммов лактобацилл: *Lactobacillus casei* LBR 1/90 (ВКМ В-2780D), *Lactobacillus paracasei* LBR 5/90 (ВКМ В-2781D), *Lactobacillus rhamnosus* LBR 33/90 (ВКПМ В-11277), *Lactobacillus rhamnosus* LBR 44/90 (ВКПМ В-11278), выделенных из пищеварительного тракта телят, получившая название тетралактобактерин (ТЛБ). Входящие в состав пробиотика штаммы не патогенны, обладают широким спектром антагонистической активности против бактерий родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* и *Salmonella*. Целью работы явилось изучение влияния тетралактобактерина на неспецифический иммунитет и физиологические показатели кроликов.

Ключевые слова: пробиотики; лактобациллы; иммунная система; кролики

Для цитирования:

Овчарова А.Н., Софронова О.В., Полякова Л.Л. Влияние пробиотических лактобацилл на неспецифическую резистентность и физиологические показатели лабораторных животных // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С.28–31. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10043.

Influence of probiotic lactobacilli on nonspecific resistance and physiological parameters of laboratory animals

Ovcharova AN, Safronova OV, Polyakova LL

All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of Federal state budgetary scientific institution "Federal Research Center Livestock – AUIAB Academician LK Ernst", Borovsk, Kaluga region, Russian Federation

Resume. For the correction and prevention of microflora disorders are widely used microbial preparations – probiotics, which have a positive effect on the composition of the intestinal microflora, the immune system of animals. Lactobacilli play a special role in the formation of normal microflora. In 2009. in the laboratory of biotechnology of microorganisms vniifbp was made Association of four strains of lactobacilli: *Lactobacillus casei* LBR 1/90 (VCM-2780D), *Lactobacillus paracasei* LBR 5/90 (VCM-2781D), *Lactobacillus rhamnosus* LBR 33/90 (VCM-11277), *Lactobacillus rhamnosus* LBR 44/90 (VCM-11278), isolated from the digestive tract of Calves, called tetralactobacterin (TLB). The strains included in probiotics are non-pathogenic and have a wide range of antagonistic activity against bacteria of the genera *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* and *Salmonella*. The aim of this work was to study the effect of tetrasaccharide on nonspecific immunity and physiological parameters of rabbits.

Keywords: probiotics; lactobacilli; immune system; rabbits

For citations:

Ovcharova AN, Safronova OV, Polyakova LL. Influence of probiotic lactobacilli on nonspecific resistance and physiological parameters of laboratory animals. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:28–31. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10043.

Введение

Для коррекции и профилактики нарушений микрофлоры широко используются микробные препараты – пробиотики, оказывающие положительное воздействие на состав кишечной микрофлоры, иммунную систему животных [1]. Установлено, что количественные изменения нормальной микрофлоры животных наступают уже в первые часы после введения пробиотических штаммов. Через две недели наблюдается подавление развития условно патогенных энтеробактерий, возрастание количества нормальной кишечной палочки, энтерококков, бифидобактерий и лактобацилл. Отмечаются изменения цитокинового профиля и морфологические изменения в органах пищеварительной (толстый отдел кишечника, печень) и иммунной (селезёнка) систем организма экспериментальных животных [2].

Особую роль в становлении нормальной микрофлоры играют лактобациллы. Они обладают выраженной антагонистической активностью в отношении патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, а также в отношении других видов и даже родственных штаммов лактобацилл [1]. Лактобациллы оказывают выраженное иммуностимулирующее и противоопухолевое воздействие. Они принимают участие в регулировании оптимальных уровней метаболических процессов, ингибируют адгезию, пенетрацию и размножение патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, обладают широким спектром антимикробных механизмов, продуцируют активные вещества белковой и небелковой природы [3]. Иммуномодулирующий эффект лактобацилл осуществляется посредством влияния на созревание и функционирование иммуннокомпетентных органов, увеличение фагоцитарной активности макрофагов и

нейтрофилов, стимуляции синтеза интерферонов и цитокинов [4, 5].

Среди биологически активных веществ, секретируемых лактобактериями, большую роль играют ферменты. Так, например, гидролазы, обеспечивают клетки низкомолекулярными продуктами распада компонентов питания, которые являются основными или дополнительными факторами роста, необходимыми для полноценного развития популяций молочнокислых бактерий и, кроме того, могут быть использованы организмом-хозяином [6].

В связи с вышеизложенным возникает необходимость разработки новых пробиотических препаратов с целью нормализации микрофлоры кишечника, повышение неспецифической резистентности организма.

В 2009 г. в лаборатории биотехнологии микроорганизмов ВНИИФБиП была составлена ассоциация из четырёх штаммов лактобацилл: *Lactobacillus casei* LBR 1/90 (ВКМ В-2780D), *Lactobacillus paracasei* LBR 5/90 (ВКМ В-2781D), *Lactobacillus rhamnosus* LBR 33/90 (ВКПМ В-11277), *Lactobacillus rhamnosus* LBR 44/90 (ВКПМ В-11278), выделенных из пищеварительного тракта телят, получившая название тетралактобактерин (ТЛБ). Входящие в состав пробиотика штаммы не патогенны, обладают широким спектром антагонистической активности против бактерий родов *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia* и *Salmonella*, показывают высокую адгезивность и устойчивы к ряду антибиотиков, устойчивы к неблагоприятным факторам ЖКТ, сбрасывают широкий спектр углеводов, отвечают требованиям, предъявляемым к микроорганизмам-пробиотикам [7].

Целью данной работы явилось изучение влияния тетралактобактерина на неспецифический иммунитет и физиологические показатели кроликов.

Материалы и методы

Эксперимент был проведён на кроликах калифорнийской породы. Из 3-месячных животных были сформированы две группы, опытная группа в дополнение к основному рациону (ОР) получала лиофилизированный препарат тетралактобактерин, содержащий 1×10^{10} КОЕ жизнеспособных клеток. Животные контрольной группы получали основной рацион. Препарат в количестве 30 мг на животное разводили в 1 мл дистиллированной воды и выпаивали из пипетки по 1 мл каждому кролику ежедневно в течение 21 дня, кролики контрольной группы получали дистиллированную воду в том же объёме.

Продолжительность опыта составила 1 месяц, в течение которого ежедневно осуществляли контроль за общим состоянием животных, в начале и конце опыта проводили взвешивание и учитывали потребление кормов.

Скармливание молодняку кроликов на протяжении 1 месяца препарата тетралактобактерин не оказало неблагоприятного воздействия на функционирование у

них пищеварительной, сердечно-сосудистой и мочеполовой систем. Заболеваний и гибели животных во всех группах отмечено не было.

Гематологические исследования показали, что основные параметры крови животных контрольной и опытной групп после трёхнедельного получения препаратов находились в пределах физиологической нормы. Количество эритроцитов в крови животных опытной группы было ниже, чем в контрольной, однако содержание гемоглобина было одинаковым. В лейкоцитарной формуле у кроликов опытной и контрольной групп существенных различий не наблюдалось, все параметры находились в пределах физиологической нормы.

Результаты и обсуждения

Наблюдалась стимуляция неспецифического иммунитета. У крольчат опытной группы в сравнении с контролем фагоцитарная активность достоверно ($p < 0,01$) возрастала — 69,4 против 47,1 % — в контрольной группе. Бактерицидная активность достоверно возрастала ($p < 0,01$) у кроликов, получавших ТЛБ, — 69,4 % против 37,8 % — в контроле.

Содержание лизоцима в сыворотке крови (табл. 1) животных как контрольной, так и опытной групп практически не изменялось.

При исследовании мочи у кроликов всех групп в ней не было обнаружено сахара и крови, но как у контрольных, так и у опытных животных моча содержала небольшие количества белка. Моча имела жёлтый цвет

Таблица 1

Гематологические показатели и показатели неспецифической резистентности крови кроликов

Показатели	Опыт	Контроль
Гемоглобин, г/л	127,25±3,12	127,00±1,78
Количество лейкоцитов, тыс./мкл	6,80±0,14	7,84±0,53
Количество эритроцитов, млн/мкл	7,41±0,22*	8,53±0,32
Базофилы	1,6	1,1
Эозинофилы	1,5	1,8
Псевдоэозинофилы:		
юные	—	—
палочкоядерные	0,8	0,3
сегментоядерные	13,5	13,6
Лимфоциты	80,5	81,0
Моноциты	2,1	2,2
Фагоцитарная активность, %	69,4±3,69**	47,1±1,29
Фагоцитарный индекс	5,06±0,16*	3,93±0,15
Бактерицидная активность сыворотки крови, %	56,4±2,09**	37,8±3,2
Лизоцимная активность сыворотки крови, мкг/мкл	45,7±0,64	43,9±0,98
Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.		

в обеих группах, рН в контрольной группе — 8,0, в опытной группе — 8,5, эти параметры свидетельствуют о нормальной функции мочевой системы как у контрольных, так и у животных, получавших препарат.

Патологоанатомические исследования внутренних органов кроликов

При проведении послеубойного осмотра тушек и внутренних органов кроликов в них не было обнаружено видимых патологических изменений (табл. 2).

Лёгкие — упругие, трахея и бронхи — чистые, отёчности, абсцессов и кровоизлияний нет. Масса сердца у кроликов опытной группы достоверно больше, чем у животных контрольной группы, перикард, эпикард и эндокард — без инфильтратов и кровоизлияний.

Таблица 2

Масса внутренних органов кроликов (M+m, n = 4)

Показатели	Группы животных	
	Опыт	Контроль
Сердце, г	8,33±0,45**	6,46±0,40
Лёгкие, г	12,53±0,49	11,78±0,89
Печень, г	92,83±10,61	76,9±4,39
Почки, г	19,23±1,43*	14,96±0,63
Селезёнка, г	1,45±0,09	1,33±0,17

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$.

Печень и селезёнка: края острые, паренхима вишневого цвета, очагов некроза и абсцессов нет. Желчный пузырь — в норме.

Серозные оболочки желудка, тонкого и толстого отделов кишечника — гладкие и блестящие. Слизистые оболочки — серовато-розовые, без геморагий и очагов воспаления.

Почки у кроликов опытных групп достоверно увеличены ($p < 0,01$) по сравнению с контролем, но не имеют признаков воспаления и кровоизлияний. Для установления причины этого явления необходимо проведение морфологического исследования.

Таблица 3

Биохимические показатели крови кроликов (M+m, n = 4)

Показатели	Группы животных	
	Опыт	Контроль
Альбумин, г/л	41,04±2,21	35,91±4,01
Общий белок, г/л	67,40±2,78*	59,90±5,14
Мочевина, ммоль/л	7,86±0,78	9,31±0,51
Креатинин, мкмоль/л	155,87±7,14	164,66±6,03
Глюкоза, моль/л	10,67±1,11	10,28±1,12

Примечание: * — $p < 0,05$

Биохимические исследования сыворотки крови кроликов

В сыворотке крови подопытных животных были определены общий белок, альбумин, креатинин, мочевина и глюкоза (табл. 3).

По количеству общего белка в сыворотке крови кроликов всех групп наблюдалось соответствие физиологическим нормам [8]. Количество альбумина варьировало в пределах физиологической нормы, которая составляет в сыворотке крови кроликов от 37,9 до 50,6 г/л.

Из углеводов основным источником энергии в организме является глюкоза. Физиологическая норма у кроликов — 4,16–5,27 ммоль/л. У подопытных животных содержание глюкозы было выше физиологической нормы, по-видимому, это связано с присутствием в рационе значительного количества сена, как источника труднопереваримых углеводов.

Показатели креатинина мало отличались у кроликов опытных и контрольной групп. Показатели мочевины были достоверно ниже во 2- и 3-й опытных группах по сравнению с контролем.

Заключение

Таким образом, применение пробиотических препаратов на основе лактобацилл оказывает значительное влияние на факторы неспецифической резистентности лабораторных животных.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Овчарова Анастасия Никитовна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: naka7@yandex.ru

SPIN код: 2377-8689

к. б. н., с. н. с., лаборатории иммунобиотехнологии и микробиологии ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им Л.К. Эрнста, Боровск Калужская обл.

Ovcharova Anastasia

Corresponding author

e-mail: naka7@yandex.ru

SPIN code: 2377-8689

senior researcher, candidate of biological Sciences, VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga region

Софронова Ольга Владимировна

SPIN-код: 8603-7034

н. с., к. т. н., ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ ВИЖ
им Л.К. Эрнста, Боровск Калужская обл.

Safronova Olga

SPIN code: 8603-7034

researcher, candidate of technical sciences,
VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal Science Center
for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga region

Полякова Людмила Леонидовна

SPIN-код: 5853-4527

м. н. с. иммунобиотехнологии и
микробиологии, ВНИИФБиП ФГБНУ
ФНЦ ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Боровск,
Калужская обл.

Polyakova Lyudmila

SPIN code: 5853-4527

junior researcher of Immunobiotechnology and
Microbiology, VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal
Science Center for Animal Husbandry, Borovsk,
Kaluga region

Литература / References

1. Глушанова Н.А. Биологические свойства лактобацилл // *Бюллетень сибирской медицины*. — 2003. — № 4. — С. 50–58. [Glushanova NA. Biologicheskie svoystva laktobacill. Byulleten' sibirskoy mediciny. 2003;4:50–58. (In Russ).]
2. Козловский Ю.Е., Хомякова Т.И., Козловская Г.В., и др. Некоторые аспекты взаимодействия пробиотических бактерий с организмом экспериментальных животных // *Кролиководство и звероводство*. — 2018. — № 1. — С. 28–32. [Kozlovskiy YuE, Homyakova TI, Kozlovskaya GV, et al. Nekotorye aspekty vzaimodeystviya probioticheskikh bakterij s organizmom eksperimental'nykh zhivotnykh. *Krolikovodstvo i zverovodstvo*. 2018;1:28–32. (In Russ).]
3. Бондаренко В.М., Чупринина Р.П., Аладышева Ж.И., Мацулевич Т.В. Пробиотики и механизмы их терапевтического эффекта // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. — 2004. — № 3. — С. 83–87. [Bondarenko VM, Chuprinina RP, Aladysheva ZHI, Maculevich TV. Probiotiki i mekhanizmy ih terapevticheskogo effekta. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2004;3:83–87. (In Russ).]
4. Тераевич А.С., Закрепина Е.Н. Влияние пробиотиков на клеточный и гуморальный иммунитет // *Электронный научный журнал*. — 2016. — Т. 10. — № 7. — С. 23–27. [Teraevich AS, Zakrepina EN. Vliyanie probiotikov na kletochnyj i gumoral'nyj immunitet. *Elektronnyj nauchnyj zhurnal*. 2016;7(10):23–27. (In Russ).]

5. Галочкин В.А., Остренко К.С., Галочкина В.П. Взаимосвязь нервной, иммунной, эндокринной систем и факторов питания в регуляции резистентности и продуктивности животных // *Сельскохозяйственная биология*. — 2018. — № 4. — С. 673–686. [Galochkin VA, Ostrenko KS, Galochkina VP. Vzaimosvyaz' nervnoj, immunnoj, endokrinnoj sistem i faktorov pitaniya v reguljacii rezistentnosti i produktivnosti zhivotnykh. *Sel'skhozvaystvennaya biologiya*. 2018;4:673–686. (In Russ).]
6. Рябая Н.Е., Самарцев А.А. Ферментативная активность бифидо- и лактобактерий, входящих в состав пробиотиков. Материалы Междунар. науч.- практ. конф. 25–28 мая 2005 г., Минск-Нарочь / Сост. и общ. ред. А.Н. Евтушенкова. — Мн.: РИВШ, — 2005. — С. 218–219. [Ryabaya NE, Samarcev AA. Fermentativnaya aktivnost' bifido- i laktobakterij, vkhodyashchih v sostav probiotikov. Materialy Mezhdunar. nauch.- prakt. konf. 25–28 maya 2005 g., Minsk-Naroch' / Sost. i obshch. red. A.N. Evtushenkova. — Mн.: RIVSH, 2005.s.218–219. (In Russ).]
7. Зинченко Е.В., Панин А.Н., Панин В.А. Практические аспекты применения пробиотиков // *Ветеринарный консультант*. — 2003. — № 3. — С. 12–14. [Zinchenko EV, Panin AN, Panin VA. Prakticheskie aspekty primeneniya probiotikov. *Veterinarnyj konsul'tant*. 2003;3:12–14. (In Russ).]
8. Ефремов А.П., Мартынов П.Н. Интерьерные различия крольчат разного возраста fundamental research. ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет имени П.А. Столыпина». — 2012. — № 5. [Efremov AP, Martynov PN. Inter'ernye razlichiya krol'chat raznogo vozrasta fundamental research. FGBOU VPO «Omskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet imeni P.A. Stolypina». 2012;5 (In Russ).]

Антиоксидантный и стресспротекторный эффекты аскорбата лития в биомедицинских моделях у свиней

Остренко К.С.

ВНИИФБП животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. Академика Л.К. Эрнста», Боровск, Калужской обл.

Резюме. Во многих развитых странах свиньи уже давно привлекают внимание в качестве биологической модели. В мировой практике используют специально выведенные породы свиней и мини-свиней (в США – хормельские, хенфордские и т. д.). Широко применяются в экспериментах и аборигенные породы свиней – в США – юкатанские и американо-эссекские. В Европе самая крупная ферма мини-свиней находится в Германии, где разводится геттингенская порода. Свиньи эмоционально неустойчивые животные, с низкой резистентностью к стрессовым воздействиям. В связи с этим в качестве биомедицинской модели исследования на свиньях позволяют проверить длительное применение препаратов и их последствие. Цель работы – апробация неинвазивного антистрессового препарата аскорбата лития для снижения негативного воздействия спонтанных стресс-факторов, возникающих у свиней. Эксперимент проведен на 5 группах свиней породы ирландский ландрас (4 – опытные и 1 – контрольная) по 10 животных в каждой, в период с 2- до 7-месячного возраста. Животные 1-, 2, 3- и 4-й опытных групп ежедневно в течение всего периода откорма получали с кормом аскорбат лития в виде порошка в дозе 10, 5, 2 и 0,5 мг/кг живой массы, соответственно. Перед постановкой животных в опыт и в 6-месячном возрасте отбирали пробы крови. В плазме крови были определены адреналин, норадреналин, кортизол и прогестерон, малоновый диальдегид, тиол-дисульфидное соотношение, активность супероксиддисмутазы. На основании проведенных исследований можно сделать заключение о том, что в результате воздействия стрессоров, возникающих в процессе стандартного производственного цикла выращивания поросят, происходит усиление активности системы биологических активных центров свиней, вследствие чего повышается уровень общей реактивности организма. Экспериментальные данные по комплексу эндокринологических и биохимических параметров свидетельствуют о том, что аскорбат лития у свиней на откорме положительно влияет на антиоксидантный статус. Выявленные эффекты аскорбата лития свидетельствуют о перспективности разработки новых эффективных способов повышения стресс-устойчивости, неспецифической резистентности..

Ключевые слова: свиньи; антистрессовые препараты; аскорбат лития; катехоламины; кортизол; антиоксидантный статус

Для цитирования:

Остренко К.С. Антиоксидантный и стресспротекторный эффекты аскорбата лития в биомедицинских моделях у свиней // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 32–35. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10044.

Antioxidant and anti-stress effect of ascorbate lithium has swine in biomedical model

Ostrenko KS

All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of Federal state budgetary scientific institution «Federal Research Center Livestock – AUIAB Academician LK Ernst», Borovsk, Kaluga region

Resume. Pigs in many developed countries have long attracted attention as a biological model. In world practice using specially derived for diurnal breeds of pigs and mini-pigs (khorolskii, herfordshire, etc.). Widely used in experiments and native breeds of pigs – in the United States - Yuka-Tang and American-Essex. In Europe, the largest mini-pig farm is located in Germany, where the göttingen breed is bred. Pigs are emotionally unstable animals with low resistance to stress. In this regard, as a biomedical model of research on pigs allows to check the long-term use of drugs and their aftereffect. The aim of the work is to test a non-invasive anti-stress drug lithium ascorbate to reduce the negative impact of spontaneous stress factors arising in pigs. The experiment was conducted on 5 groups of Irish Landrace pigs (4 experimental and 1 control) with 10 heads each in the period from 2 months to 7 months of age. Animals of 1, 2, 3 and 4 experimental groups were daily fed lithium ascorbate in the form of powder at a dose of 10, 5, 2 and 0.5 mg/kg of live weight, respectively, throughout the fattening period. Before placing the animals in experience and 6 months of age, samples were taken of blood. Adrenaline, norepinephrine, cortisol and progesterone, Malon dialdehyde, thiol-disulfide ratio, superoxide dismutase activity were determined in the blood plasma. On the basis of the conducted researches it is possible to make the conclusion that as a result of influence of stressors arising in the course of a standard production cycle of cultivation of pigs there is a strengthening of activity of system of biological active centers of pigs owing to what the level of the General reactivity of an organism raises. Experimental data on the complex of endocrinological and biochemical parameters indicate that lithium ascorbate in fattening pigs has a positive effect on antioxidant status. The revealed effects of lithium ascorbate indicate the prospects for the development of new effective ways to increase stress resistance, nonspecific resistance.

Keywords: pigs; anti-stress preparations; lithium ascorbate; catecholamines; cortisol; antioxidant status

For citations:

Ostrenko KS. Antioxidant and anti-stress effect of ascorbate lithium has swine in biomedical models. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:32–35. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10044.

Во многих странах мира все шире используют для медико-биотехнологических исследовательских работ свиней. В мировой практике используют специально выведенные породы свиней и мини-свиней (в США — хормельские, хенфордские и т. д.) [1–2]. В США широко применяются в экспериментах и аборигенные породы свиней — юкатанские и американо-эссекские. В Европе самая крупная ферма мини-свиней находится в Германии, где разводится геттингенская порода.

Свиньи эмоционально неустойчивые животные, с низкой резистентностью к стрессовым воздействиям. В связи с этим в качестве биомедицинской модели исследования на свиньях позволяют проверить длительное применение препаратов и их последствие [3]. Стрессовое воздействие приводит к снижению интенсивности адаптивных реакций на все внешние раздражители. В результате этого ухудшается физиологическое состояние животных, нарушаются обменные процессы и ослабевают естественные защитные силы. Прежде всего, это обусловлено развитием хронического стресса и его вредных последствий, которые становятся основными факторами снижения продуктивности [4]. Одним из ведущих адаптивных эффектов ответной реакции организма на стресс-факторы любой этиологии является предотвращение избыточной активации процессов перекисного окисления липидов [5]. В результате чего возникают многочисленные нарушения работы тканей и органов, приводящих к дестабилизации гомеостаза и возникновению ряда хронических заболеваний. Главную роль в успешном функционировании всех систем иммунобиологического статуса играют биооксиданты и микроэлементы [6–9]. Потенцированное действие лития и аскорбиновой кислоты позволяет рассматривать его как один из путей регуляции активности процессов перекисного окисления [10].

Материалы и методы

Исследования были проведены в АО «Родина» Малоярославского района Калужской области. Исследования проводились на 5 группах свиней (породы Ирландский ландрас) по 10 голов в каждой. Опытные и контрольные группы были сформированы из поросят 2-месячного возраста по принципу парных аналогов. Рацион и технологический процесс не отличался от основной технологии откорма свиней. Аскорбат лития вводился с кормом. Первая группа получала аскорбат лития в дозе 10 мг/кг; 2-я группа — 5 мг/кг; 3-я группа — 2 мг/кг; 4-я группа — 0,5 мг/кг. Контрольная группа поросят находилась на основном рационе без добавления субстанции. В 2-месячном и в 6-месячном возрасте проводили забор крови в вакуумные пробирки с добавлением 10 % раствора трилона Б. В плазме крови были определены концентрации малонового диальдегида (в нмоль/мл), восстановленного глутатиона (в мкмоль/мл), окисленного глутатиона (в мкмоль/мл), тиол-дисульфидное соотношение, активность суперок-

сиддисмутазы (в Ед), активность глутатионпероксидазы (в Ед); адреналина (в нмоль/мл); норадреналина (в нмоль/мл), кортизола (в нмоль/мл).

Биометрическую обработку полученного материала проводили с помощью программного обеспечения Statistica 8. Достоверной считали разницу между группами при $p < 0,05$. Работа проводилась в рамках диссертационного исследования.

Результаты и обсуждение

Известно, что стресс сопровождается напряжённой работой гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системой в эндокринных, нейромедиаторных и нейрорепептидных взаимодействиях. В ходе исследования было установлено, что у животных 1-, 2-, 3 и 4-й опытных групп уровень кортизола был ниже на 28, 24, 21 и 3,6 %, соответственно, чем в контрольной группе; уровень адреналина в этих группах был на 59, 54, 44 и 9,5 %, а норадреналина на 55, 54, 46 и 17 % ниже по сравнению с контролем. Это указывает на активацию симпатoadреналовой и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы и подтверждает наличие стресса свиней контрольной группы в течение стандартного технологического процесса выращивания. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Показатели гормонального статуса ($M \pm m$, $n = 10$)

Группы	Адреналин, мкг/л	Норадреналин, мкг/л	Кортизол мкг/л
Возраст 2 месяца			
1	3,96±0,18	12,84±0,11	76,84±2,41
2	4,12±0,11	13,09±0,56	70,21±0,98
3	3,91±0,14	12,67±0,14	71,34±3,61
4	4,05±0,09	13,10±0,35	74,33±2,09
Контроль	3,87±0,19	12,06±0,68	73,41±1,99
Возраст 6 месяцев			
1	5,01±0,14*	16,37±0,96*	102,72±12,98*
2	5,67±0,09*	16,98±1,12*	108,67±14,82*
3	6,8±0,11*	19,84±1,02*	112,39±12,41
4	11,08±0,18	30,21±2,31	137,89±16,39
Контроль	12,24±3,19	36,62±5,86	143,12±13,09

Примечание: * — $p < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

При стрессе для энергообеспечения защитных реакций привлекается большое количество ненасыщенных жирных кислот и кислорода. Увеличение активности фосфолипаз происходит за счёт повышения глюкокортикоидов, это и приводит к усилению процесса перекисного окисления липидов, который вызывает деградацию гормонов стресса. Вследствие этого организм животных вынужден отвечать усилением кортикотропной функции гипофиза [10].

Состояния антиоксидантного статуса и его оценки, а также показатели неспецифической резистентности отражает тиол-дисульфидное соотношение и система редукции глутатиона. Отмечаются нарушения обменных процессов, вызванных стрессом, — снижение содержания SH-групп и увеличение количества SS-групп, что свидетельствует об изменении концентрации тиоловых соединений в крови при действии на организм внешних раздражителей. Функциональная роль соединений, содержащих сульфгидрильные группы, осуществляется благодаря увеличению активности большой группы ферментов и гормонов. В нашем эксперименте установлено, что антистрессовый эффект у свиней сопровождается повышением количества SH-групп в сыворотке крови. Данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

Функциональное состояние системы редукции глутатиона в крови ($M \pm m$, $n = 10$)

Группы	SH	SS	SH/SS	МДА	СОД
<i>Возраст 2 месяца</i>					
1	0,57±0,26	0,23±0,04	2,48	3,95±0,43	648±24
2	0,60±0,14	0,18±0,01	3,33	4,01±0,67	652±34
3	0,59±0,09	0,17±0,02	3,47	4,12±0,34	643±97
4	0,55±0,18	0,21±0,02	2,62	4,81±0,71	659±51
Контроль	0,58±0,11	0,22±0,01	2,64	5,38±0,79	645±42
<i>Возраст 6 месяцев</i>					
1	0,88±0,07*	0,26±0,09	3,38	2,94±0,26	821±48*
2	0,88±0,06*	0,28±0,04	2,93	2,90±0,14	736±31
3	0,78±0,09	0,31±0,03	2,37	3,33±0,31	751±105
4	0,63±0,18	0,33±0,17	1,91	4,01±0,18	722±90
Контроль	0,61±0,19	0,38±0,06	1,61	6,07±0,09	709±73

Примечания: SH — восстановленный глутатион + цистеин, мкмоль/мл; SS — окисленный глутатион + цистин, мкмоль/мл; МДА — малоновый диальдегид, нмоль/мл; СОД — активность супероксиддисмутазы; * — Ед. $p < 0,05$ по t -критерию при сравнении с контролем.

К соединениям, ответственным за неспецифическую резистентность, относятся глутатион, эрготионеин, цистеин, гомоцистеин и липоевая кислота. В крови животных в обычных условиях содержание окисленного глутатиона поддерживается на более низком уровне, чем восстановленного глутатиона. Стресс любой этиологии может привести к существенному накоплению окисленного глутатиона в печени и его выбросу в кровь, что приводит к окислению тиоловых групп белков плазмы и их инактивации.

Таким образом, количество SH-групп в крови и тканях организма свиней обусловлено различными факторами и в большой степени отражает интенсивность обменных процессов, связанных с различной энергией роста и продуктивностью животных, а «пороговая» концентрация SH-групп в крови соответствует наибольшему проявлению способности к росту и продуктивности.

Животные с высоким адаптивным потенциалом характеризуются более высокой функциональной активностью ферментативного и неферментативного звеньев системы антиоксидантной защиты и более низким содержанием продуктов свободнорадикального окисления.

Уменьшение интенсивности процессов образования энергии связано со снижением резистентности и с низким запасом гликогена и его быстрым расходом при технологических нагрузках, накоплением недоокисленных продуктов. Накопление шиффовых оснований и образование малонового диальдегида связано с разрушением альдегидгидроперекиси.

Животные опытных групп в возрасте 6 месяцев (см. табл. 2) явно превосходили остальных по содержанию SH-групп, величине тиол-дисульфидного соотношения и характеризовались наименьшей концентрацией вторичных продуктов перекисного окисления липидов в плазме в крови. При этом содержание SH- и SS-групп в плазме крови закономерно повышалось с возрастом (дисульфидных групп в меньшей степени); в результате снижалась концентрация МДА. Возможно, что эти эффекты обусловлены повышением активности антиоксидантной системы за счёт наличия в составе применяемого препарата аскорбиновой кислоты, которая является природным антиоксидантом. Выявлена синхронность изменения тиол-дисульфидного потенциала и продуктивности животных.

Заключение

На основании проведённых исследований можно сделать заключение о том, что в результате воздействия стрессоров, возникающих в процессе стандартного производственного цикла выращивания поросят на откорме, происходит усиление активности системы биологических активных центров свиней, вследствие чего повышается уровень общей реактивности организма, что отражается на картине крови. Повышение секреции катехоламинов мозговым слоем надпочечников вследствие стрессового воздействия свидетельствует об активации гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы, что является фактором быстрого перехода организма от состояния покоя к возбуждению. В связи с чем, активизируются компенсаторные функции для поддержания гомеостаза и замедляются процессы набора живой массы тела, что приводит к увеличению себестоимости конечной продукции. Таким образом, при введении с кормом аскорбата лития подсвинкам на откорме с 2-месячного возраста и до убоя в дозировке 10, 5 и 2 мг/кг массы тела, аскорбат лития проявляет выраженные адаптогенные и стресспротекторные свойства, предотвращает резкие выбросы адреналина и норадреналина, поддерживает на физиологическом уровне динамику кортизола в системном кровотоке. Экспериментальные данные по комплексу эндокринологических и биохимических параметров свидетельству-

ют о том, что аскорбат лития у свиней положительно влияет на антиоксидантный статус, и как следствие, способствует повышению стрессоустойчивости и неспецифической резистентности. Выявленные эффекты

аскорбата лития свидетельствуют о перспективности разработки новых эффективных способов повышения неспецифической резистентности и антистрессового действия в медицине.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Остренко Константин Сергеевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: ostrenkoks@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2235-1701

SPIN код: 6609-9581

с. н. с., к. б. н., заведующий лабораторией Иммунобиотехнологии и микробиологии, ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ ВИЖ им Л.К. Эрнста, Боровск, Калужской обл.

Ostrenko Konstantin

Corresponding author

e-mail: ostrenkoks@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2235-1701

SPIN code: 6609-9581

Senior Research Officer, candidate of Biological Sciences, head of the laboratory of Immunobiotechnology and Microbiology, VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga region

Литература / References

1. Roura E, Koopmans SJ, Lall s JP, et al. Critical review evaluating the pig as a model for human nutritional physiology. *Nutr Res Rev.* 2016;29(1):60–90. DOI: 10.1017/S0954422416000020
2. Piñeiro C, Manso A, Manzanilla EG, Morales J. Influence of sows' parity on performance and humoral immune response of the offspring. *Porcine Health Manag.* 2019;14(5):1. DOI: 10.1186/s40813-018-0111-8. eCollection 2019
3. Islamov RR, Sokolov ME, Bashirov FV, et al. A pilot study of cell-mediated gene therapy for spinal cord injury in mini pigs. *Neurosci Lett.* 2017;644:67–75. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.02.034
4. Майстров В.И., Галочкина В.П. Антиоксидантно-антирадикальная и тиолдисульфидная системы племенных бычков под влиянием комплекса биологически активных веществ // *С.-х. биол.* — 2006. — № 2. — С. 64–68. [Majstrov VI, Galochkina VP. Antioksidantno-antiradikal'naya i tiol-disulfidnaya sistemy plemennyh bychkov pod vliyaniem kompleksa biologicheskii aktivnyh veshchestv. *S.-h. biol.* 2006;2:64–68. (In Russ).]
5. Остренко К.С., Галочкин В.А., Колоскова Е.М., Галочкина В.П., Влияние нового микронутриента — аскорбата лития на стрессоустойчивость и продуктивность свиноматок // *Проблемы биологии продуктивных животных.* — 2017. — № 2. — С. 74–86. [Ostrenko KS, Galochkin VA, Koloskova EM, Galochkina VP. Vliyanie novogo mikronutrienta — askorbata litiya na stressoustojchivost' i produktivnost' svinomatok. *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh.* 2017;2:74–86. (In Russ).]

6. Bursać-Mitrović M, Milovanović DR, Mitić R, Jovanović D, Sovrlić M, Vasiljević P, Tomović J, Manojlović N. Effects of l-ascorbic acid and alpha-tocopherol on biochemical parameters of swimming-induced oxidative stress in serum of guinea pigs. *Afr J Tradit Complement Altern Med.* 2016 Jul 3;13(4):29–33. DOI: 10.21010/ajtcam.v13i4.5. eCollection 2016.
7. Петраков Е.С. Овчарова А.Н., Софронова О.В., Андреева И.Н. Влияние пробиотика на основе четырёх штаммов лактобацилл на неспецифическую резистентность и продуктивность телят-молочников // *Проблемы биологии продуктивных животных.* — 2018. — № 2. — С. 94–100. [Petrakov ES, Ovcharova AN, Sofronova OV, Andreeva IN. Vliyanie probiotika na osnove chetyryoh shtammov laktobacill na nespecificeskuyu rezistentnost' i produktivnost' telyat-molochnikov. *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh.* 2018;2:94–100. (In Russ).]
8. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G. Endocrinology of the stress response. *Ann. Rev. Physiol.* 2005;67:259–284.
9. Ramanathan K, Balakumar BS, Panneerselvam C. Effects of ascorbic acid and alpha-tocopherol on arsenic-induced oxidative stress. *Hum Exp Toxicol.* 2002 Dec;21(12):675–800.
10. Галочкин В.А., Галочкина В.П., Остренко К.С. Разработка теоретических основ и создание антистрессовых препаратов нового поколения // *Сельскохозяйственная биология.* — 2009. — № 2. — С. 43–55. [Galochkin VA, Galochkina VP, Ostrenko KS. Razrabotka teoreticheskikh osnov i sozdanie antistressovyh preparatov novogo pokoleniya. *Sel'skhozaystvennaya biologiya.* 2009;2:43–55. (In Russ).]

Изучение влияния анксиолитика ГМЛ-1 на активность изоформ цитохрома CYP2C9 и CYP1A2

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Бочков П.О., Новицкий А.А., Литвин А.А.,
Колыванов Г.Б., Жердев В.П.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Изучено влияние соединения ГМЛ-1 на активность изоформы цитохрома P450 CYP2C9 и CYP1A2 по маркерным препаратам лозартану и кофеину в экспериментах на крысах. Установлено, что ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг, в 10 раз превышающую максимальную эффективную анксиолитическую дозу 1 мг/кг (внутрижелудочное введение), не вызывает изменения активности исследуемых изоформ. Изучение влияния продолжительности введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг на изменение активности изофермента CYP2C9 показало, что введение ГМЛ-1 в течение 3 или 4 дней не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на изофермент CYP2C9.

Ключевые слова: ГМЛ-1; CYP2C9; CYP1A2; лозартан; кофеин; метаболическое отношение; межлекарственное взаимодействие

Для цитирования:

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Бочков П.О., Новицкий А.А., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. Изучение влияния анксиолитика ГМЛ-1 на активность изоформ цитохрома CYP2C9 и CYP1A2 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С.36–40. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10045.

Study of the effect of anxiolytic GML-1 on the activity of cytochrome CYP2C9 and CYP1A2 isoforms

Gribakina OG, Shevchenko RV, Bochkov PO, Novitskiy AA, Litvin AA,
Kolyvanov GB, Zherdev VP

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Effects of GML-1 compound on activity of isoforms CYP2C9 and CYP1A2 of cytochrome P450 using marker drugs losartane and caffeine in experiments on rats were studied. GML-1 in a dose 10 mg/kg of 10 times higher than the maximum effective anxiolytic dose 1 mg / kg (intraperitoneal administration) did not produce changes of the studied isoforms activity. Study of duration of GML-1 in a dose 10 mg/kg administration on the CYP2C9 activity changing was shown that 3 and 4 days administration of the drug did not affect neither inhibiting nor inducing effect of CYP2C9 isoform.

Keywords: GML-1; CYP2C9; CYP1A2; losartane; caffeine; metabolic ratio; drug-drug interaction

For citations:

Gribakina OG, Shevchenko RV, Bochkov PO, Novitskiy AA, Litvin AA, Kolyvanov GB, Zherdev VP. Study of the effect of anxiolytic GML-1 on the activity of cytochrome CYP2C9 and CYP1A2 isoforms. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:36–40. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10045.

Введение

Цитохром P450 (CYP) является важной метаболизирующей ферментной системой в организме человека, которая отвечает за окислительный метаболизм многочисленных эндогенных веществ и ксенобиотиков [1]. Лекарства и ксенобиотики у людей в первую очередь метаболизируются изоферментами семейств CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4 цитохрома P450 [2]. Многие лекарственные препараты могут влиять на активность изоформ цитохрома P450, являясь либо его ингибиторами, либо индукторами, что может лежать в основе межлекарственного взаимодействия [3].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» было синтезировано новое биологически активное соединение ГМЛ-1 (лиганд транслокаторного белка (TSPO)), обладающего анксиолитической активностью [4]. Влияние новых соединений на активность изоформы цитохрома P450 необходимо оценивать уже на доклиническом этапе, поэтому целью настоящего исследования явилась оценка влияния соединения ГМЛ-1 на изменение активности изофермента CYP2C9 и CYP1A2 в дозе 10 мг/кг (в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч). Для гарантированного выявления взаимодействия ГМЛ-1

и изоформы CYP2C9 использовали дозу 10 мг/кг, в 10 раз превышающую максимальную эффективную анксиолитическую дозу (1 мг/кг). Соединение ГМЛ-1 вводили крысам внутрижелудочно (в/ж). Изучено влияние длительности введения крысам ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг на возможный индуцирующий или ингибирующий эффекты CYP2C9 (3- и 4-дневное введение). Изучено влияние соединения ГМЛ-1 после его в/ж введения в дозе 10 мг/кг на возможный индуцирующий или ингибирующий эффекты изофермента CYP1A2.

Материалы и методы

Изучение влияния соединения ГМЛ-1 на изменение активности изоформы CYP2C9 после его введения в дозе 10 мг/кг по данным экскреции с мочой

В настоящем исследовании оценивали влияние ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг при введении препарата в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч. Выбор дозы основывался на результатах ранее проведённых исследований анксиолитической активности и экспериментальных данных фармакокинетики ГМЛ-1 у крыс [5, 6].

Индуцирующий или ингибирующий эффект ГМЛ-1 оценивали по абсолютным величинам метаболических

отношений препарата-маркера. Под «метаболическим отношением» (МО) понимали отношение концентрации метаболита лозартана (Е-3174) и кофеина (теобромин и параксантин) к концентрации исходного соединения в суточной моче.

На данном этапе исследования определяли метаболические отношения (Е-3174/лозартан) после введения лозартана без ГМЛ-1 (контроль; I) в сравнении с введением лозартана на фоне 4-дневного введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (II).

Крысам вводили сначала внутривенно лозартан (контроль), затем по истечении 4 суток этим же животным вводили в/ж ГМЛ-1 в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч (субхроническое введение). Лозартан животным вводили через 30 мин после последнего введения ГМЛ-1.

Препарат-маркер лозартан вводили в дозе 30 мг/кг. Крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Анализ проб мочи животных проводили с использованием ВЭЖХ. Методики экстракции и количественного определения исследуемых веществ подробно изложены в статье *Проинной О.Г. и соавт.* [7].

Достоверность различий между величинами МО препарата-маркера после введения лозартана без ГМЛ-1 (контроль) и на фоне субхронического введения ГМЛ-1 оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента.

Изучение влияния длительности введения крысам соединения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг на изменение активности изоформы CYP2C9 по данным экскреции с мочой

Исследования проводили на 2 группах крыс. В каждую группу входило по 8 животных. Субхроническое 3-дневное введение ГМЛ-1 — группа I и субхроническое 4-дневное введение ГМЛ-1 — группа II. Крысам I группы сначала вводили в/ж лозартан (контроль), затем по истечении 3 суток этим же животным вводили в/ж ГМЛ-1 в течение 3 дней, трёхкратно через каждые 3 ч. Крысам II группы сначала вводили лозартан (контроль), затем по истечении 3 суток этим же животным вводили в/ж ГМЛ-1 в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч. Лозартан животным обеих групп вводили через 30 мин после последнего введения ГМЛ-1. У каждой крысы собирали суточную мочу.

Изучение влияния соединения ГМЛ-1 на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP1A2 по данным экскреции с мочой

На данном этапе исследования определяли метаболические отношения (теобромин/кофеин и параксантин/кофеин) после введения кофеина без ГМЛ-1 (контроль; I) в сравнении с введением кофеина на фоне 4-дневного введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (II).

Крысам вводили сначала в/ж кофеин (контроль), затем по истечении 4 суток этим же животным вводили в/ж ГМЛ-1 в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч

(субхроническое введение). Кофеин животным вводили одновременно с последним введением ГМЛ-1.

Препарат-маркер кофеин вводили животным в дозе 50 мг/кг. Крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Анализ проб мочи животных проводили с использованием ВЭЖХ. Методики экстракции и количественного определения исследуемых веществ подробно изложены в статье [8].

Достоверность различий между величинами МО препарата-маркера после введения кофеина без ГМЛ-1 (контроль) и на фоне субхронического введения ГМЛ-1 оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента.

Результаты и обсуждение

На рис. 1 представлены метаболические отношения после введения крысам лозартана без ГМЛ-1 (контроль; I) и введения лозартана на фоне субхронического введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (II). Так, после введения лозартана без ГМЛ-1 средняя величина МО составила $1,88 \pm 0,25$, а после введения лозартана на фоне субхронического введения ГМЛ-1 — $2,14 \pm 0,26$.

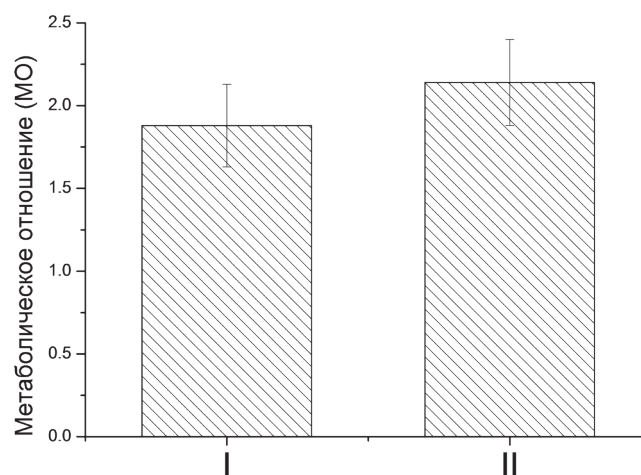


Рис. 1. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) после субхронического введения ГМЛ-1 крысам в дозе 10 мг/кг ($n = 8$; $\bar{x} \pm S_x$)

Примечание: I — введение лозартана без ГМЛ-1 (контроль, I); II — введение лозартана на фоне 4-х дневного введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (II)

При сравнении величин МО (Е-3174/лозартан) после введения лозартана без ГМЛ-1 (контрольная группа) и после введения лозартана на фоне 4-дневного введения ГМЛ-1 статистически значимые различия не выявлены ($p < 0,05$).

На рис. 2 представлены средние величины МО в контрольных группах в сравнении с аналогичными параметрами, полученными после введения лозартана на фоне 3- и 4-дневного введения ГМЛ-1.

При сравнении величин МО не выявлены статистически значимые различия в контрольных группах в сравнении с введением лозартана на фоне 3- и 4-дневного введения ГМЛ-1 ($p < 0,05$).

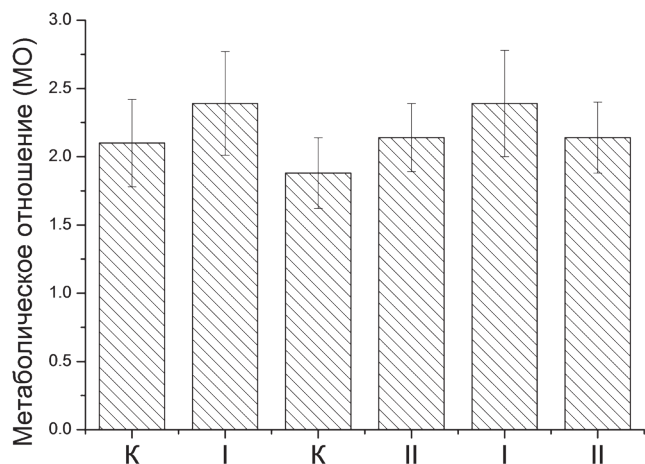


Рис. 2. Метаболические отношения (Е-3174/лозартан) после субхронического введения ГМЛ-1 крысам в дозе 10 мг/кг ($n = 8$; $\bar{x} \pm S_x$)

Примечание: К — введение лозартана в дозе 30 мг/кг без ГМЛ-1 (контрольные группы); I — введение лозартана в дозе 30 мг/кг на фоне 3-дневного введения ГМЛ-1 (группа I); II — введение лозартана в дозе 30 мг/кг на фоне 4-дневного введения ГМЛ-1 (группа II)

Средняя величина МО после субхронического 3-дневного введения ГМЛ-1 составила $2,39 \pm 0,38$ и в контрольной группе — $2,10 \pm 0,32$. Среднее значение МО после субхронического 4-дневного введения ГМЛ-1 составило — $2,14 \pm 0,26$ (контроль — $1,88 \pm 0,25$). Таким образом, продолжительность в/ж введения ГМЛ-1 в течение 3 или 4 дней в дозе 10 мг/кг не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на изофермент CYP2C9.

Так же было установлено, что ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг не оказывал индуцирующего/ингибирующего эффекта на изофермент CYP1A2 ($p < 0,05$).

На рис. 3 представлены величины МО метаболита кофеина — теобромина к неизменённому веществу после введения кофеина без ГМЛ-1 и на фоне 4-дневного в/ж введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг.

Среднее значение МО теобромина к неизменённому веществу после введения кофеина без ГМЛ-1

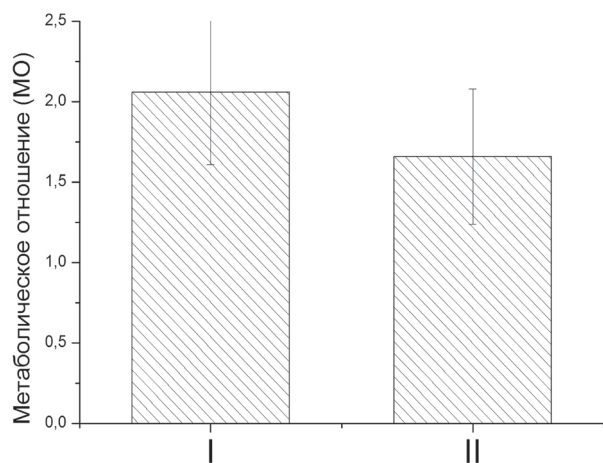


Рис. 3. МО теобромина к кофеину после введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг ($n = 8$; $\bar{x} \pm S_x$); I — контроль; II — ГМЛ-1

составило $2,06 \pm 0,45$, а на фоне 4-дневного введения ГМЛ-1 — $1,66 \pm 0,42$.

На рис. 4 представлены величины МО метаболита кофеина — параксантина к неизменённому веществу после введения кофеина без ГМЛ-1 (I) и на фоне 4-дневного в/ж введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (II).

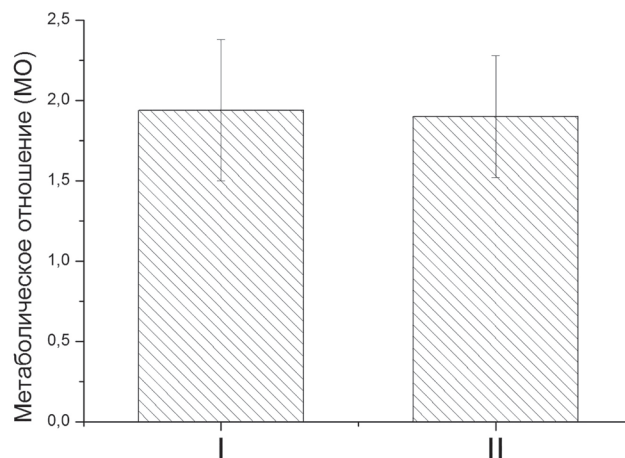


Рис. 4. МО параксантина к кофеину после введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг

Примечания: I — контроль; II — ГМЛ-1

Статистический анализ не выявил достоверно значимых различий между величинами МО параксантина в суточной моче животных после введения кофеина без ГМЛ-1 (I) и на фоне субхронического введения ГМЛ-1 (II). Так, для крыс группы I этот параметр равнялся $1,94 \pm 0,44$ и для крыс группы II — $1,90 \pm 0,38$, соответственно. То есть, введение кофеина на фоне 4-дневного в/ж введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг не вызвало изменения активности изофермента CYP1A2.

Заключение

На крысах изучено влияние ГМЛ-1 на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 (маркерный субстрат — лозартан) и CYP1A2 (маркерный субстрат — кофеин). Изучение влияния дозы 10 мг/кг на изменение активности изоферментов CYP2C9 и CYP1A2 показало, что ГМЛ-1 после 4-дневного введения (3 раза в день) не вызывает изменения активности данных изоформ. Изучение влияния продолжительности введения ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг на изменение активности изофермента CYP2C9 показало, что введение ГМЛ-1 в течение 3 или 4 дней не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на изофермент CYP2C9.

Таким образом, после введения крысам ГМЛ-1 в дозе, в 10 раз превышающую максимальную эффективную, не было выявлено межлекарственного взаимодействия с изоформами CYP2C9 и CYP1A2. Введение ГМЛ-1 в эффективных анксиолитических дозах (0,1–1,0 мг/кг) гарантированно исключает развитие межлекарственных взаимодействий.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Грибакина Оксана Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN код: 6266-8161

к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Gribakina Oxana

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN code: 6266-8161

Candidate of Biological Sciences, Research Officer
of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Шевченко Роман Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN код: 1844-6202

к. м. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Shevchenko Roman

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN code: 1844-6202

Candidate of Medical Sciences, Research Officer
of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Бочков Павел Олегович

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN код: 5576-8174

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Bochkov Pavel

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN code: 5576-8174

Candidate of Biological Sciences, Senior Research
Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Новицкий Александр Александрович

ORCID ID: 0000-0003-3188-6257

н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Novitsky Alexander

ORCID ID: 0000-0003-3188-6257

Research Officer of laboratory pharmacokinetics
FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
Moscow

Литвин Александр Алексеевич

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN код: 6193-5770

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Litvin Alexander

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN code: 6193-5770

Doctor of Biological sciences, leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Колыванов Геннадий Борисович

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN код: 2538-8639

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolyvanov Gennadiy

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN code: 2538-8639

Doctor of Biological sciences, Leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Жердев Владимир Павлович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией
фармакокинетики ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва

Zherdev Vladimir

Corresponding author

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN code: 2213-9592

MD, professor, Head of laboratory pharmaco-
kinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
Moscow

Литература / References

1. Frye RF. Probing the world of cytochrome P-450 enzymes. *Mol Interv.* 2004;4(3):157–162. DOI: 10.1124/mi.4.3.5
2. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, et al. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther.* 1994;270(1):414–423.
3. Кукес В.Г., Грачев С.В., Сычев Д.А., Раменская Г.В. *Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей.* — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 304 с. [Kukes VG, Grachev SV, Sychev DA, Ramenskaya GV. *Metabolizm lekarstvennykh sredstv. Nauchnye osnovy personalizirovannoy mediciny: rukovodstvo dlya vrachej.* Moscow: GEOTAR-Media. 2008;304 (In Russ).].
4. Яркова М.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Серединин С.Б. Анксиолитическое действие оригинальных производных пирроло[1,2- α] пиразина, лигандов TSPO, зависит от биосинтеза нейростероидов // *Хим.-фар. ж.* — 2016. — Т. 50. — № 8. — С. 3–6. [Yarkova MA, Mokrov GV, Gudasheva TA, Seredenin SB. Anksioliticheskoe dejstvie original'nykh proizvodnykh pirrolo[1,2- α] pirazina, ligandov TSPO, zavisit ot biosinteza nejrosteroidov. *Khim.-farm. zh.* 2016;50(8):3–6. (In Russ).] DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-8-3-6
5. Ярков С.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., и др. Фармакологическое изучение новых соединений — регуляторов 18 кДа транслокаторного белка // *Эксперим. и клин. фармакол.* — 2016. — Т. 79. — № 1. — С. 7–11. [Yarkov SA, Mokrov GV, Gudasheva TA, et al. Pharmacological study of new compounds acting as regulators of 18-kDa translocator protein ligands. *Experim. i klin. farmakol.* 2016;79(1):7–11 (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-1-7-11
6. Новицкий А.А., Бочков П.О., Шевченко Р.В., и др. Фармакокинетика потенциального анксиолитика ГМЛ-1 у крыс // *Эксперим. и клин. фармакол.* — 2018. — Т. 81 — № 6. — С. 24–28. [Novitskiy AA, Bochkov PO, Shevchenko RV, et al. Farmakokinetika potencial'nogo anksiolitika GML-1 u kryss. *Experim. i klin. farmakol.* 2018;81(6):24–28 (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-6-24-28
7. Пронина О.Г., Колыванов Г.Б., Виглинская А.О., и др. Количественное определение лозартана и его метаболита в моче крыс // *Вест. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* — 2012. — Т. 53. — № 3. — С. 194–197. [Pronina OG, Kolyvanov GB, Viglinskaya AO, et al. Kolichestvennoe opredelenie lozartana i ego metabolita v moche kryss. *Vest. Mosk. Un-ta. Ser. 2. Himiya.* 2012;53(3):194–197. (In Russ).].
8. Новицкая Я.Г., Литвин А.А., Жердев В.П., и др. Количественный анализ кофеина и его метаболитов в плазме крови крыс с применением ВЭЖХ, как метод определения метаболических отношений // *Вест. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия.* — 2013. — Т. 54 — № 1. — С. 56–60. [Novitskaya YaG, Litvin AA, Zherdev VP, et al. Kolichestvennyy analiz kofeina i ego metabolitov v plazme krovi kryss s primeneniem VEZHKh, kak metod opredeleniya metabolicheskikh otnoshenij. *Vest. Mosk. Un-ta. Ser. 2. Himiya.* 2013;54(1):56–60. (In Russ).].

Разработка и валидация методики количественного определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс с использованием ВЭЖХ-УФ

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.,
Бочков П.О., Бойко С.С., Жердев В.П.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Разработана методика количественного определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс. Анализ проводили с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовым детектированием. Методика линейна в диапазоне 100–5000 нг/мл. Процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови составил 86,88 %. Нижний предел обнаружения составил 100 нг/мл.

Ключевые слова: ГИЖ-298; количественное определение; высокоэффективная жидкостная хроматография; плазма крови

Для цитирования:

Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Бочков П.О., Бойко С.С., Жердев В.П. Разработка и валидация методики количественного определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс с использованием ВЭЖХ-УФ // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С.41–45. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10046.

Development and validation of the quantification of GIZH-298, possessing in the rat blood plasma by HPLC-UV

Gribakina OG, Shevchenko RV, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Boyko SS, Zherdev VP

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The technique of quantitative determination of a new compound GIZH-298 in the rat blood plasma was developed and validated. Analysis was performed by HPLC-UV. The method was linear in the range of 100–5000 ng/ml. Recovery of GIZH-298 was 86,88 %. Limit of detection was 100 ng/ml.

Keywords: GIZH-298; rat blood plasma; HPLC-UV; quantification

For citations:

Gribakina OG, Shevchenko RV, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Boyko SS, Zherdev VP. Development and validation of the quantification of GIZH-298, possessing in the rat blood plasma by HPLC-UV. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:41–45. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10046.

Введение

Эпилепсия является одним из самых распространённых неврологических заболеваний, по данным ВОЗ, заболеваемость которой в разных странах варьирует от 4 до 10 случаев на 1 000 человек [1]. До настоящего времени в России нет отечественных эффективных противоэпилептических препаратов (ПЭП), почти все препараты этой группы производятся за рубежом и имеют высокую стоимость. В связи с этим поиск новых высокоэффективных и малотоксичных отечественных ПЭП является актуальной задачей [2].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезировано новое производное оксима 4-бензоилпиридина — ГИЖ-298 (оксалат О-(2-морфолиноэтил)оксим 4-бензоилпиридина). Это соединение обладает противосудорожной активностью, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком и коразолом у грызунов в дозах 0,5–100 мг/кг внутрибрюшинно. ЛД₅₀ после внутрибрюшинного введения для соединения ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг (мыши). Таким образом, ГИЖ-298 имеет большую терапевтическую широту [3].

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного опреде-

ления ГИЖ-298 в плазме крови крыс для последующего изучения его экспериментальной фармакокинетики.

Материалы и методы

Структурная формула фармацевтической субстанции ГИЖ-298 (оксалат О-(2-морфолиноэтил)оксима 4-бензоилпиридина) представлена на рис. 1.

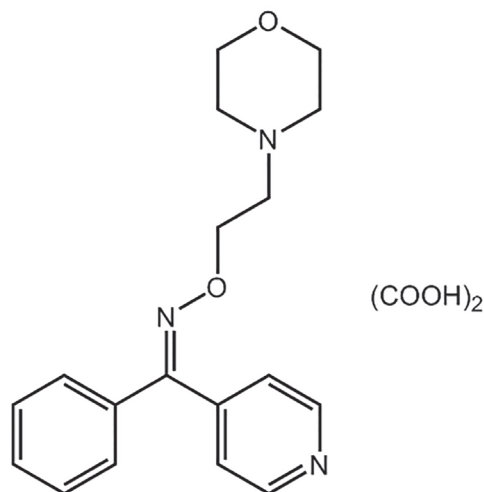


Рис. 1. Структурная формула ГИЖ-298

Производитель: ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва. Серия – 10.10.18. Используются следующие растворители и реактивы: вода ультрачистая «LiChrosolv», «Merck», ФРГ; аммония ацетат «Merck», ФРГ; кислота муравьиная 85 % «Acros Organics», РФ; метанол «LiChrosolv», «Merck», ФРГ; эфир диэтиловый ОАО «МедХимпром», РФ.

Исследование выполнено на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «Beckman Coulter» (США). Помпа – «Beckman System Gold 127 Solvent Module» и ультрафиолетового детектора – «Beckman Gold 166». Детектирование соединения проводили при длине волны 258 нм.

Условия хроматографического анализа ГИЖ-298 представлены в табл. 1.

Таблица 1

Условия хроматографического анализа ГИЖ-298 в плазме крови

Параметр	Значение
Колонка	Phenomenex Luna 5U C8, 250 4,6мм, 5мкм
Температура	25 °С
Режим элюирования	Изократический
Состав подвижной фазы	Ацетатный буфер (рН 3,0):метанол (2:1)
Скорость потока	1,0 мл/мин
Длина волны	258 нм
Тип детектирования	Ультрафиолетовый детектор
Объём, вводимой пробы	200 мкл
Время удерживания ГИЖ-298	7,8–8,3 мин
Время анализа	10 мин

В настоящей методике матрицей для приготовления калибровочных стандартов служила плазма крови крыс с массой тела 180–220 г, полученных из питомника Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», Московская обл. Образцы крови получали методом декапитации интактных животных. Плазму крови получали центрифугированием образцов цельной крови при 3 500 об/мин в течение 10 мин. Образцы плазмы крови крыс хранили при температуре –50 °С.

Пробоподготовка. Для пробоподготовки образцов для анализа использовали метод жидкость-жидкостной экстракции. Образцы плазмы крови, хранящиеся в морозильной камере, размораживали при комнатной температуре. К образцам плазмы крови объёмом 0,5 мл с целевыми концентрациями добавляли 0,1 мл 2 М раствора КОН и перемешивали на механическом вихревателе «Vortex». К полученному раствору добавляли 10 мл эфира диэтилового и помещали на

горизонтальный встряхиватель на 20 мин. После чего смесь замораживали при –50 °С в течение 15 мин, отделяли органический слой и упаривали в токе азота при 40 °С на водяной бане. Перед началом анализа сухой остаток растворяли в 0,5 мл подвижной фазы.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора). Матричный раствор ГИЖ-298 (100 мкг/мл) готовили растворением в метаноле точной навески (0,0100 г) ГИЖ-298 в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Приготовление калибровочных стандартов. Использовали калибровочные стандарты ГИЖ-298 с концентрациями 100, 250, 500, 750, 1 000, 2 500 и 5 000 нг/мл.

Калибровочные стандарты для валидации были приготовлены путём последовательного разбавления матричного раствора водой дистиллированной. Диапазон концентраций ГИЖ-298 выбирался исходя из концентраций, ожидаемых в исследовании экспериментальной фармакокинетики.

Концентрации ГИЖ-298 в анализируемых пробах определяли методом абсолютной калибровки.

Результаты и обсуждения

Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» [4]. В приведённых выше условиях время удерживания ГИЖ-298 в среднем составило около 8,0 мин (рис. 2б).

Селективность. Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы (плазма крови) на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты плазмы крови, метаболиты, продукты деструкции и др.).

На рис. 2 представлены типичные хроматограммы интактной плазмы крови крыс (а) и экстракта плазмы крови, содержащего 100 нг/мл ГИЖ-298 (б). Из рис. 2 видно, что потенциально мешающие вещества не оказывают влияния на анализ ГИЖ-298.

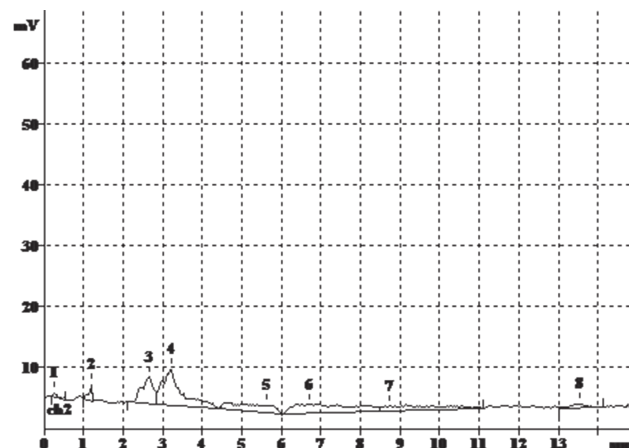


Рис. 2а. Хроматограмма интактной плазмы крови

Таблица 2

Параметры калибровочных кривых ГИЖ-298 в плазме крови крыс

Калибровочная кривая	Участок, отсекаемый от оси абсцисс (a)	Наклон кривой (b)	Коэффициент корреляции (r)
1	-1,240312	0,12401	0,9975
2	-1,64862	0,12066	0,9999
3	-3,32199	0,11881	0,9931

1. Отклонения нижнего стандарта кривой от теоретической концентрации не более 20 %;

2. Отклонения всех остальных стандартов не более 15 %;

3. Не менее 75 % ненулевых стандартов, включая нижний и верхний калибровочный стандарт должны удовлетворять вышеуказанным требованиям; все значения, которые не попадают в эти пределы, можно не учитывать, при условии, что они не изменяют установленную линейную модель.

Как видно из данных табл. 3 отклонения нижнего стандарта кривой от теоретической концентрации составило 0,84 %, т. е. менее 20 %. Отклонения всех остальных стандартов были менее 15 %, что также удовлетворяет критериям приемлемости.

Таблица 3

Концентрации стандартов ГИЖ-298, рассчитанные по уравнениям калибровочных кривых (нг/мл)

№/№ калибровочной кривой	Стд. А 100	Стд. В 250	Стд. С 500	Стд. D 750	Стд. Е 1000	Стд. F 2500	Стд. Н 5000
1	85,57	225,83	488,67	747,00	854,90	2488,91	5111,16
2	97,25	226,50	528,75	778,16	995,91	2486,08	5032,08
3	114,66	284,16	589,08	813,33	932,33	2044,50	5151,58
$\bar{x}$	99,16	245,50	535,5	779,50	927,71	2339,83	5098,27
SD	14,64	33,49	50,54	33,19	70,62	255,77	60,78
CV %	14,76	13,64	9,41	4,26	7,61	10,93	1,19
% от теоретического	0,84	1,8	7,1	3,93	7,23	6,40	1,96

Правильность и воспроизводимость внутри одной аналитической серии

Правильность и воспроизводимость внутри одной аналитической серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества (КК) с концентрациями ГИЖ-298: 100, 250, 1 000 и 2 500 нг/мл. Каждый образец КК определялся в 6 повторностях. Расчёт концентраций образцов КК проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по правильности и достоверности определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс внутри одной серии представлены в табл. 4 и удовлетворяли следующим критериям

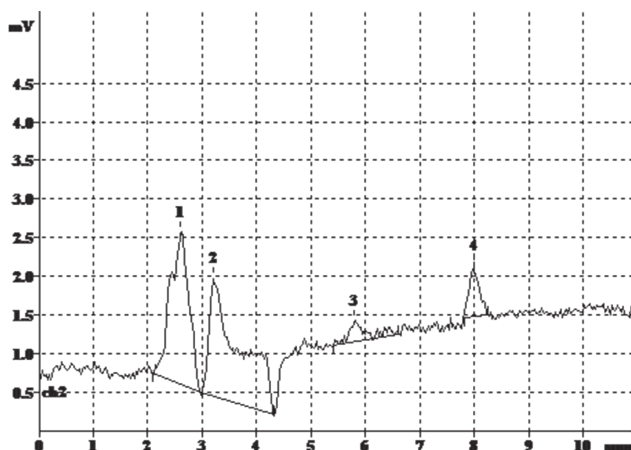


Рис. 26. Хроматограмма плазмы крови, содержащей 100 нг/мл ГИЖ-298

Линейность и чувствительность. Калибровочная кривая построена с использованием 7 калибровочных стандартов, охватывающих ожидаемый диапазон концентраций ГИЖ-298 в плазме крови крыс (100–5 000 нг/мл).

Самый низкий стандарт на калибровочной кривой соединения ГИЖ-298, равный 100 нг/мл, был принят в качестве предела количественного определения, т. к. были выполнены следующие условия:

- Показания стандарта на нижнем пределе количественного определения (НПКО) были не менее чем в 5 раз выше показаний пробы интактной плазмы крови. Значение стандарта на уровне НПКО поддавались определению и были дискретными и воспроизводимыми с точностью 14,76 % (не превышающей 20 %), и воспроизводимостью 99,16 % (входящей в диапазон 80–120 %).

- Предел обнаружения ГИЖ-298 был равен 100 нг/мл.

- Зависимость величины хроматографического пика от концентрации ГИЖ-298 калибровочных стандартов в области измерения методики была линейной в рассматриваемом диапазоне концентраций.

Для описания изучаемой зависимости использовалась линейная аппроксимация типа $y = a + b \times x$. Данная зависимость признана приемлемой, поскольку коэффициент корреляции для всех 3 калибровок был выше 0,99.

Параметры калибровочных кривых (коэффициенты уравнения и коэффициенты корреляции) представлены в табл. 2.

Для оценки прецизионности результатов построены 3 калибровочные кривые и проведён обратный расчёт концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические характеристики.

Прецизионность результатов с учётом критериев приемлемости достигается во всем используемом интервале концентраций (табл. 3).

Критерии приемлемости по калибровочным стандартам:

Таблица 4

Правильность и воспроизводимость определения соединения ГИЖ-298 в плазме крови крыс внутри одного аналитического цикла

№/№ калибровочной кривой	КК А (100 нг/мл)	КК В (250 нг/мл)	КК С (1000 нг/мл)	КК D (2500 нг/мл)
2	102,00	244,58	956,50	2215,42
	112,50	253,25	938,58	2148,75
	59,50	278,33	891,57	2531,50
	105,83	249,66	799,50	2513,75
	104,5	176,91	842,25	2246,42
	103,75	198,33	803,00	2372,83
$\bar{x}$	98,01	233,51	871,90	2338,11
SD	19,21	38,01	67,61	160,48
CV%	19,60	14,93	7,75	6,86
% от теоретического	1,99	6,59	12,81	6,47

приемлемости: воспроизводимость — среднее значение концентрации образца КК не должно превышать 15 % от теоретической величины, за исключением значения на уровне нижнего количественного предела, где допускается отклонение не выше 20 %; правильность — С. V. % значений концентраций каждого образца КК не должен превышать 15 %, за исключением значений НПКО, где этот параметр не должен быть выше 20 % [4].

Степень извлечения

Степень извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови определялась путём сравнения площадей хроматографических пиков образцов КК (принимались за 100 %) с площадями пиков тех же проб, которые подвергались процедуре пробоподготовки. Измерения каждого уровня концентрации стандартов (низкий — 100, средний — 1 000 и высокий — 5 000 нг/мл) проводили в трёх повторениях. Установлено, что процент извлечения ГИЖ-298 из плазмы крови составил 86,88 %.

Стабильность препарата после пробоподготовки

Для оценки стабильности ГИЖ-298 в плазме крови использовались образцы ГИЖ-298 250 и 1 000 нг/мл, которые хранились при комнатной температуре и дневном свете после пробоподготовки в течение 8 ч. Далее проводили анализ образцов вместе со свежеприготов-

Таблица 5

Краткосрочная стабильность ГИЖ-298 после пробоподготовки и хранения при комнатной температуре в течение 8 ч

Калибровочная кривая	Образцы после пробоподготовки		Свежеприготовленные образцы	
	250 нг/мл	1000 нг/мл	250 нг/мл	1000 нг/мл
2	259,25	942,42	228,33	986,58
	226,33	1068,83	242,25	951,91
	244,08	956,66	272,83	965,83
	255,25	964,83	235,83	976,42
	260,58	967,58	254,00	969,17
	243,83	929,83	241,83	952,33
$\bar{x}$	248,22	971,69	245,85	967,04
SD	12,96	49,67	15,69	13,57
CV%	5,22	5,11	6,38	1,40
Разница, %	0,95	0,47		

ленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации ГИЖ-298 после хранения при комнатной температуре сравнивали со средними значениями концентраций препарата в свежеприготовленных образцах КК. Полученные значения должны были удовлетворять критерию приемлемости, т. е. разница между результатами анализа до и после хранения не должна превышать 15 %.

Из данных табл. 5 следует, что концентрации ГИЖ-298 после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч удовлетворяют критерию приемлемости.

Заключение

Проведена валидация аналитической методики количественного определения ГИЖ-298 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. Нижний предел количественного определения ГИЖ-298 составил 100 нг/мл. Точность и прецизионность результатов анализа с учётом критериев приемлемости соблюдались во всем интервале исследуемых концентраций (100—5 000 нг/мл). При комнатной температуре пробы стабильны после пробоподготовки на протяжении 8 ч. Образцы плазмы крови можно разводить в два раза.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Грибакина Оксана Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN код: 6266-8161

к. б. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Gribakina Oxana

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN code: 6266-8161

Candidate of Biological Sciences, Research Officer
of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Шевченко Роман Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN код: 1844-6202

к. м. н., н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Колыванов Геннадий Борисович

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN код: 2538-8639

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Литвин Александр Алексеевич

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN код: 6193-5770

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Бочков Павел Олегович

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN код: 5576-8174

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Бойко Светлана Семёновна

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN код: 4176-8921

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Жердев Владимир Павлович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией
фармакокинетики ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва

Shevchenko Roman

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN code: 1844-6202

Candidate of Medical Sciences, Research Officer
of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Kolyvanov Gennadiy

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN code: 2538-8639

Doctor of Biological sciences, Leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Litvin Alexander

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN code: 6193-5770

Doctor of Biological sciences, leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Bochkov Pavel

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN code: 5576-8174

Candidate of Biological Sciences, Senior Research
Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Boyko Svetlana

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN code: 4176-8921

Candidate of Biological Sciences, Senior Research
Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Zherdev Vladimir

Corresponding author

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN code: 2213-9592

MD, professor, Head of laboratory pharmacokinetics
FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Who.int [internet]. World Health Organization. Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs999/en/>.

2. Гайдуков Игорь Олегович. Поиск веществ с противосудорожной активностью среди производных оксимов 3- и 4-бензоилпиридина: автореферат дисс. канд. биол. наук: 14.03.06/ Гайдуков Игорь Олегович. — М.: 2018. — 23 с. [Gajdukov IO. The search for compounds with the anticonvulsant activity of derivatives of oximes 3- and 4-benzoylpyridine. Autoabstract diss. candidate of biological sciences: 14.03.06/ Gajdukov Igor Olegovich. Moscow: 2018. (In Russ).].

3. Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Неробкова Н.Л., и др. Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью // Фармакокинетика и фармакодинамика. — 2017. — № 1. — С. 22–26. [Zhurenko LA, Mokrov GV, Nerobkova NL, et al. Novel 4- benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with aticonvulsant activity. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2017;1:22–26. (In Russ).].

4. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В.В. Береговых — М.: Литтерра, 2008. — 132 с. [Validaciya analiticheskikh metodik dlya proizvoditelej lekarstv. Ed. By VV Beregovyh. Moscow: Litterra. 2008. (In Russ).].

Исследование острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106

Алексеева С.В.¹, Сорокина А.В.¹, Волкова А.В.¹, Забродина В.В.¹, Мирошкина И.А.¹,
Качалов К.С.^{1,2}, Алексеев И.В.^{1,2}, Захаров А.Д.¹, Поварнина П.Ю.¹, Дурнев А.Д.¹

¹ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

² – Московский медицинский университет «Реавиз», Москва

Резюме. Проведено изучение острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы (ГЛФ) ГСБ-106, активным веществом которой является замещенный димерный пептид гексаметилендиамид бис(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина), обладающий антидепрессивной и нейропротекторной активностью. ГСБ-106, вводимый в максимально допустимых объемах и концентрациях при однократном внутривнутреннем и внутривнутреннем введении самцам и самкам беспородных белых мышей в максимально возможных дозах, составивших, соответственно, 120 мг/кг активного вещества (12 г/кг таблеточной массы) и 40 мг/кг активного вещества (4 г/кг таблеточной массы), не вызывал гибели животных. ГСБ-106 в дозах 1 мг/кг активного вещества (0,1 г/кг таблеточной массы) и 10 мг/кг активного вещества (1 г/кг таблеточной массы) при ежедневном пероральном и внутривнутреннем введении в течение месяца самкам и самцам крыс и кроликов не влиял на регистрируемые интегральные показатели. Токсических эффектов ГСБ-106 не отмечено при клинико-лабораторном, патоморфологическом и гистологическом исследованиях, выполненных в общепринятом объеме.

Ключевые слова: ГСБ-106; острая токсичность; хроническая токсичность; мыши; крысы; кролики

Для цитирования:

Алексеева С.В., Сорокина А.В., Волкова А.В., Забродина В.В., Мирошкина И.А., Качалов К.С., Алексеев И.В., Захаров А.Д., Поварнина П.Ю., Дурнев А.Д. Исследование острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 46–50. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10047.

The study of the acute and chronic toxicity dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 finished dosage form

Alekseeva SV¹, Sorokina AV¹, Volkova AV¹, Zabrodina VV¹, Miroshkina IA¹,
Kachalov KS^{1,2}, Alekseev IV^{1,2}, Zaharov AD¹, Povarnina PYu¹, Durnev AD¹

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Moscow Medical University «Reaviz», Moscow

Resume. The study of acute and chronic toxicity of the finished dosage form (SFF) GSB-106, the active substance of which is the substituted dimeric peptide, hexamethylenediamine bis (*N*-monosuccinyl-*L*-seryl-*L*-lysine), which has antidepressant and neuroprotective activity. GSB-106, administered in the maximum allowable volumes and concentrations in a single intragastric and intraperitoneal administration to males and females of outbred white mice in the maximum possible doses, which made up, respectively, 120 mg / kg of the active substance (12 g / kg tablet weight) and 40 mg / kg of active substance (4 g / kg tablet weight) did not cause the death of animals. GSB-106 in doses of 1 mg / kg of the active substance (0.1 g / kg of the tablet mass) and 10 mg / kg of the active substance (1 g / kg of the tablet mass) with daily oral and intragastric administration during the month to females and male rats and rabbits did not affect the recorded integral indicators. The toxic effects of GSB-106 were not observed in clinical, laboratory, pathological and histological studies performed in a generally accepted volume.

Keywords: GSB-106; acute toxicity; chronic toxicity; mice; rats; rabbits

For citations:

Alekseeva SV, Sorokina AV, Volkova AV, Zabrodina VV, Miroshkina IA, Kachalov KS, Alekseev IV, Zaharov AD, Povarnina PYu, Durnev AD. The study of the acute and chronic toxicity dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 finished dosage form. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2: 46–50. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10047.

Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе структуры β -изгиба 4-й петли мозгового нейротрофического фактора BDNF синтезирован низкомолекулярный миметик, представляющий собой димерный пептид ГСБ-106, обладающий антидепрессивной и нейропротекторной активностью [1].

Результаты, установленные в экспериментальных фармакологических исследованиях ГСБ-106 [2], определили перспективу создания на его основе нового

лекарственного препарата, потенциально превосходящего имеющиеся лекарства по эффективности и безопасности. Потребность в новых антидепрессантах весьма велика, поскольку число пациентов, страдающих депрессией, постоянно нарастает и сегодня распространённость депрессий в различных странах колеблется от 8 до 12 % [3].

Исследование острой и хронической токсичности является общепринятой процедурой доклинического исследования безопасности потенциальных лекарств.

Цель исследования

Оценка острой и хронической токсичности ГСБ-106 ГЛФ. Задачи исследования — определить среднелетальные дозы, установить выраженность токсического действия и переносимость препарата при однократном введении, зарегистрировать сроки развития интоксикации и гибели животных, определить класс токсичности ГЛФ ГСБ-106. Выявить возможные токсические эффекты ГСБ-106 при его ежедневном пероральном введении в течение одного месяца, возможные органы-мишени токсических воздействий и местное раздражающее действие, а также обратимость возможных токсических эффектов.

Материалы и методы

В эксперименте использовали таблеточную массу ГСБ-106 (серия 230317), предназначенную для формирования таблеток. Каждые 100 г массы содержали ГСБ-106 (замещенный димерный пептид, гексаметилендиамид бис(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина) — 1 г; MCC-101 — 34 г; лактозы — 60 г, Kollicoat IR — 4 г, магния стеарат — 1 г. Из таблеточной массы готовили суспензию *ex tempore* дисперсионным методом на 1 % растворе крахмала.

Все животные (мыши, крысы и кролики) были получены из сертифицированных питомников и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с крысами и кроликами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Зукосова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123.

Исследование острой токсичности было проведено на белых беспородных мышах ($n = 48$, масса 18–20 г) и белых беспородных крысах ($n = 48$, масса 180–200 г).

ГСБ-106 вводили однократно в желудок с помощью металлического атравматического зонда в дозе 120 мг/кг активного вещества (12 г/кг таблеточной массы) и 40 мг/кг активного вещества (4 г/кг таблеточной массы) однократно внутрибрюшинно с использованием стерильных одноразовых шприцев самкам и самцам мышей и крыс [8]. Введение ГСБ-106 осуществляли в максимально возможных объемах для каждого из способов введения и для каждого из видов животных (мыши — 0,5 мл внутрижелудочно и 1 мл внутрибрюшинно; крысы — 5 мл внутрижелудочно и 5 мл внутрибрюшинно), в максимально возможных концентрациях суспензий, проходящих через иглу. Концентрации твердой фазы ГСБ-106 в суспензии составили 48 % при внутрижелудочном введении мышам и крысам, 8 % — при внутрибрюшинном введении мышам, 16 % — при внутрибрюшинном введении крысам. Животным контрольных групп

однократно вводили эквивалентный объем 1 % раствора крахмала [4, 5].

Общая продолжительность наблюдения за всеми экспериментальными и контрольными животными составляла 14 суток. Первые 8 ч после введения препарата каждое животное находилось в индивидуальной, прозрачной, пластиковой камере и было доступно для непрерывного визуального наблюдения. Через 8 ч все животные перемещались в клетки группового содержания. В последующие сутки для выявления возможной гибели, а также для регистрации общего состояния и поведения животных клетки осматривались ежедневно утром и вечером. В течение эксперимента фиксировали массу тела животных и суточное потребление корма и воды: до введения суспензии ГСБ-106 или 1 % раствора крахмала, в первые, седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента. На 15-е сутки после введений ГСБ-106 была осуществлена эвтаназия декапитацией всех выживших мышей и крыс.

Исследование хронической токсичности было проведено на двух видах животных: белых беспородных крысах обоего пола ($n = 48$) и кроликах породы шиншилла обоего пола ($n = 36$). ГСБ-106 вводили (в клинике планируется пероральное введение) крысам внутрижелудочно, ежедневно в течение месяца с помощью металлического атравматического зонда и кроликам перорально с помощью одноразовых шприцев. В эксперимент были введены четыре группы крыс: 1-я группа — контроль; 2-я группа получала препарат в фармакологически эффективной дозе 1 мг/кг по активному веществу (0,1 г/кг таблеточной массы); 3-я группа — препарат, превышающей фармакологически эффективную дозу в 10 раз, в дозе 10 мг/кг по активному веществу (1 г/кг таблеточной массы); 4-я группа («отставленная группа», сформированная для оценки обратимости возможных токсических эффектов) — препарат в дозе 10 мг/кг (1 г/кг таблеточной массы), и три группы кроликов: 1-я группа — контроль; 2-я группа получала 1 мг/кг по активному веществу (0,1 г/кг таблеточной массы); 3-я группа — 10 мг/кг по активному веществу (1 г/кг таблеточной массы). Животным контрольной группы (1-я группа) вводили 1 % раствор крахмала. Перед каждым введением препарата оценивали внешний вид и поведение экспериментальных животных [4, 5].

В течение опыта оценивали влияние ГСБ-106 на интегральные показатели: у крыс и кроликов — внешний вид, поведение, симптомы интоксикации, масса тела (еженедельно), у крыс — суточное потребление корма и воды (еженедельно). Регистрацию физиологических параметров проводили до начала эксперимента, через 24 ч после заключительного введения (крысы и кролики групп 1–3), через 2 нед. после заключительного введения (крысы «отставленной» группы 4). Влияние ГСБ-106 на сердечно-сосудистую систему оценивали с помощью компьютерного электрокардиографа «Поли-Спектр-8/В» во втором

стандартном отведении и неинвазивного измерения пульса и артериального давления с использованием модулей аппаратного комплекса ADInstruments и программного обеспечения LabChart (Австралия). Изучение поведенческих реакций у крыс проводили по тесту «Открытое поле». Измерения ректальной температуры у крыс осуществляли с использованием ректального датчика на оборудовании производства компании ADInstruments Ltd (Австралия). Гематологические исследования выполняли с помощью автоматического гематологического анализатора «Abacus Unior vet», Австрия (крысы), автоматического гематологического анализатора «MINDRAY», Германия (кролики). Определяли следующие гематологические показатели периферической крови: количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов; гематокрит, тромбокрит, средний объём эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, среднюю концентрацию гемоглобина в эритроците [12]. Количество ретикулоцитов подсчитано на мазках (окраска во влажной камере, микроскоп «Nikon Eclipse E200», Япония).

Соотношение различных видов лейкоцитов (окраска мазков крови по Романовскому) и морфометрические параметры эритроцитов были проанализированы на компьютеризированной микроскопической системе МЕКОС-Ц2. Отбор проб проводили до начала введения ГСБ-106 или 1 % раствора крахмала, через 24 ч после заключительного введения (крысы групп 1–3 и кролики всех групп), через 2 нед. после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы 4).

Исследование гемостаза у крыс и кроликов проводили с использованием коагулометра TS 4000 (США). Определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ), количество фибриногена. Биохимические исследования крови у крыс и кроликов осуществляли с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «Chem Well 2910 Combi» (США). Определяли содержание глюкозы, общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, активность аланин- и аспартатаминотрансферазы. Взятие материала проводили через 24 ч после заключительного введения ГСБ-106 (крысы групп 1–3 и кролики всех групп), через 2 нед. после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы 4).

Клинико-биохимическое исследование мочи крыс включало в себя определение удельного веса, кислотности, содержания глюкозы, белка (полуколичественный метод анализа) диагностическими полосками LabStrip U1116 на анализаторе мочи PRO DocUReader 2 (производитель «77 Электроника Кфт.», Венгрия), креатинина и мочевины (автоматический биохимический и иммуноферментный анализатор «Chem Well 2910 Combi», США).

Все животные опытных и контрольных групп были подвергнуты эвтаназии способом декапитации и патологоанатомическому вскрытию с последующей оценкой микроскопической картины внутренних органов, через 24 ч после заключительного введения (крысы и кролики групп 1–3), через 2 нед. после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы 4). Возможное местное раздражающее действие ГСБ-106 при пероральном и внутрижелудочном введении оценивали клинически, затем макроскопически при проведении патологоанатомического вскрытия, а также микроскопически при исследовании гистологических срезов пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки.

Нормальность распределения полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Если нормальность распределения отсутствовала или дисперсии выборок статистически различались, использовали непараметрические методы статистики. В случае независимых выборок сравнение проводили с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Краскалу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Фридмана, с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. Полученные результаты выражали в виде медиан, нижнего и верхнего квартилей. Во всех случаях различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

В результате наблюдений после однократного перорального и внутрибрюшинного введения готовой лекарственной формы ГСБ-106 в дозах 120 мг/кг активного вещества (12 г/кг таблеточной массы) и 40 мг/кг активного вещества (4 г/кг таблеточной массы) в максимально допустимых объёмах и концентрациях беспородным белым мышам и крысам не было установлено гибели животных.

ГСБ-106 при ежедневном пероральном введении крысам и кроликам в дозах 1 мг/кг активного вещества (0,1 г/кг таблеточной массы) и 10 мг/кг активного вещества (1 г/кг таблеточной массы) в течение одного месяца не вызывал изменений их общего состояния, внешнего вида и выраженных изменений массы тела экспериментальных животных, не влиял на потребление корма и потребление воды крысами опытных групп. ГСБ-106 не вызывал значительных изменений ректальной температуры и не влиял на поведения экспериментальных крыс в тесте «открытое поле».

В результате проведённого исследования не выявлено патологических изменений сердечно-сосудистой системы, регистрируемых по показателям электрокардиограммы во втором стандартном отведении и данным артериального давления у крыс.

ГСБ-106 не оказывал повреждающего действия на систему крови экспериментальных животных, не вызывал существенных изменений биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных и физико-химических свойств мочи у крыс.

В результате проведённого патологоанатомического вскрытия, последующих макроскопических и микроскопических исследований установлено, что ГСБ-106 не вызывает изменений строения внутренних органов крыс (головной мозг, сердце, лёгкие, тимус, печень, селезёнка, почки, надпочечники и гонады) и кроликов (сердце, лёгкие, тимус, печень, селезёнка, почки, надпочечники и гонады), а также головного мозга крыс и не обладает местно-раздражающим действием.

Заключение

Готовая лекарственная форма ГСБ-106 может быть отнесена к 5 классу токсичности — практически нетоксичное вещество (по классификации Сидорова К.К. — 1973 г.). Данные проведённых токсикологических исследований подкрепляют перспективы дальнейшего развития исследований ГСБ-106 в качестве лекарственного препарата.

Исследование выполнено в рамках Федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алексеева Светлана Витальевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN код: 8985-3418

с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Alekseeva Svetlana

Corresponding author

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN code: 8985-3418

Senior Research Officer of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Сорокина Александра Валериановна

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Sorokina Aleksandra

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

Candidate of Biological Sciences, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Волкова Анна Валерьевна

с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Volkova Anna

Senior Research Officer of laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Забродина Виктория Владимировна

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN код: 8473-6920

к. б. н., н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zabrodina Victoria

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN code: 8473-6920

Candidate of Biological Sciences, Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Мирошкина Ирина Александровна

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Miroshkina Irina

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Качалов Кирилл Сергеевич

SPIN код: 2992-6789

инженер 1-й категории лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва; студент фармацевтического факультета Московского медицинского университета «Реавиз»

Kachalov Kirill

SPIN code: 2992-6789

engineer of the 1st category of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow; student of the pharmaceutical faculty of the Moscow medical university «Reaviz»

Алексеев Иван Владимирович

SPIN код: 9757-6210

инженер 1-й категории лаборатории фармакологии мутагенеза институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Alekseev Ivan

SPIN code: 9757-6210

engineer of the 1st category of the laboratory of pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Захаров Алексей Дмитриевич

SPIN код: 9013-6228

инженер 1-й категории лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zakharov Aleksei

SPIN code: 9013-6228

engineer of the 1st category of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN код: 8426-0380

зав. лабораторией лекарственной токсикологии, член-корр. РАН, д. м. н. профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Durnev Andrei

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

Head of the laboratory of drug toxicology, RAS corresponding member, Ph.D., Professor, Director FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Серединин С.Б., Гудашева Т.А. Патент РФ №2410392 приоритет от 16.02.2011. [Seredinin SB, Gudasheva TA. Patent RF №2410392 prioritet ot 16.02.2011. (In Russ).] URL: <http://www.freepatent.ru/images/patents/50/2410392/patent-2410392.pdf> Ссылка активна на 12.12.2014.
2. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора // *Биоорганическая химия*. — 2012. — Т. 38. — № 3. — С. 280–290. [Gudasheva TA, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of the brain-derived neurotrophic factor. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012;38(3):243–252. (In Russ).]
3. Judd LL, Akiskal HS, Schettler PJ, et al. The longterm natural history of the weekly symptomatic status of bipolar I disorder. *Arch Gen Psychiatry*. 2002;59:530–537
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. Изучение хронической токсичности. — М.: Гриф и К; 2012. — С. 15–19. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. CH. 1. Metodicheskie rekomendacii po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie ostroj toksichnosti. Izuchenie hronicheskoy toksichnosti. Moscow: Grifi K; 2012:15–19. (In Russ).]
5. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «острой» токсичности. Изучение «хронической» токсичности. — М.: Медицина; 2005. — С. 41–54. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv.

- Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya farmakologicheskikh veshchestv. Izuchenie «ostroj» toksichnosti. Izuchenie «hronicheskoy» toksichnosti. Moscow: Medicina; 2005:41–54. (In Russ).]
6. Красовский Г.Н., Рахманин Ю.А., Егорова Н.А. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека. — М.: Медицина; 2009. [Krasovskij GN, Rahmanin YuA, Egorova NA. Ekstrapolyaciya toksikologicheskikh dannyh s zhivotnyh na cheloveka. Moscow: Medicina; 2009. (In Russ).]
7. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910
8. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств. РД 64-126-91. — М.: МЗ России, ФК; 1992. [Krasovskij GN, Rahmanin YuA, Egorova NA. Ekstrapolyaciya toksikologicheskikh dannyh s zhivotnyh na cheloveka. Moscow: MZ Russia, FK; 1992. (In Russ).]
9. Бельский М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kij MB. Elementy kolichestvennoy ocenki farmakologicheskogo effekta. L.: Medgiz; 1963. (In Russ).]
10. Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*. 2001;21:15–23.
11. Тэмк Х., Диам Х., Хаферлах Т. Атлас по гематологии. — М.: МЕДпресс-информ; 2010. [Тэмк Х, Диам Х, Хаферлах Т. Атлас по гематологии. Moscow: MEDpress-inform; 2010. (In Russ).]
12. Исследование системы крови в клинической практике / под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. — М.: Триада-Х; 1997. [Issledovanie sistemy krovi v klinicheskoy praktike pod red. G.I. Kozinca, V.A. Makarova. Moscow: Triada-H; 1997. (In Russ).]
13. Rolls GO. 101 Steps to Better Histology — a Practical Guide to Good Histology Practice. *Leica Microsystems*. 2008.

Исследование острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы ГК-2

Сорокина А.В.¹, Алексеева С.В.¹, Мирошкина И.А.¹, Волкова А.В.¹, Забродина В.В.¹, Качалов К.С.^{1,2}, Алексеев И.В.^{1,2}, Захаров А.Д.¹, Поварнина П.Ю.¹, Дурнев А.Д.¹

¹ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

² – Московский медицинский университет «Реавиз», Москва

Резюме. В работе представлены данные доклинического исследования острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы соединения ГК-2, обладающего нейротективными свойствами. Установлено, что ГК-2 при его однократном внутривенном введении в максимально допустимых объемах беспородным белым мышам и крысам обоего пола не вызывает гибели животных. Определены среднесмертные дозы ГК-2 при внутрибрюшинном введении. В опытах на мышах у самок LD₅₀ составила 15,4 (14,5–16,4) г/кг, у самцов LD₅₀ – 15,7 (14,6–16,9) г/кг. В опытах на крысах у самок и самцов LD₅₀ составила 6,9 (4,5–10,6) г/кг. Ежедневное внутривенное введение готовой лекарственной формы беспородным белым крысам и кроликам породы шиншилла обоего пола в течение одного месяца в дозе, соответствующей терапевтической – 1 мг/кг (в пересчете на активное вещество) и превышающей её в десять раз – 10 мг/кг (в пересчете на активное вещество) позволило установить, что ГК-2 не влияет на интегральные показатели. Исключение составили снижение прироста массы тела и дозозависимое снижение потребления корма и воды у самок крыс опытных групп. При клинико-лабораторном, патоморфологическом и гистологическом исследованиях, выполненных в соответствии с общим протоколом, токсических эффектов ГК-2 не установлено.

Ключевые слова: ГК-2; острая токсичность; хроническая токсичность; мыши; крысы; кролики

Для цитирования:

Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А., Волкова А.В., Забродина В.В., Качалов К.С., Алексеев И.В., Захаров А.Д., Поварнина П.Ю., Дурнев А.Д. Исследование острой и хронической токсичности готовой лекарственной формы ГК-2 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 51–58. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10048.

GK-2 new drug with neuroprotective properties the study of acute and chronic toxicity of the finished dosage forms

Sorokina AV¹, Alekseeva SV¹, Miroshkina IA¹, Volkova AV¹, Zabrodina VV¹, Kachalov KS^{1,2}, Alekseev IV^{1,2}, Zaharov AD¹, Povarnina PYu¹, Durnev AD¹

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Moscow Medical University «Reaviz», Moscow

Resume. The paper presents the data of preclinical studies of the acute and chronic toxicity of the finished dosage form of the compound GK-2, which has neuroprotective properties. It has been established that GK-2 does not cause the death of animals after a single intravenous administration in the maximum allowable volumes to outbred white mice and rats of both sexes. The average lethal doses of HA-2 were determined for intraperitoneal administration. In experiments on mice in females, the LD₅₀ was 15.4 (14.5–16.4) g / kg. In males, the LD₅₀ is 15.7 (14.6–16.9) g / kg. In experiments on rats in females and males, the LD₅₀ was 6.9 (4.5–10.6) g / kg. Daily intravenous administration of the finished dosage form to purebred white rats and rabbits of the chinchilla breed of both sexes for one month at a dose corresponding to therapeutic - 1 mg / kg (in terms of active substance) and exceeding it ten times - 10 mg / kg (in terms of active substance) allowed to establish that GK-2 does not affect the integral indicators. The exceptions were reduced body weight gain and a dose-dependent decrease in feed and water intake in female rats of the experimental groups. In clinical, laboratory, pathological and histological studies performed in accordance with the general protocol, the toxic effects of GK-2 have not been established.

Keywords: GK-2; acute toxicity; chronic toxicity; mice; rats; rabbits

For citations:

Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Volkova AV, Zabrodina VV, Kachalov KS, Alekseev IV, Zaharov AD, Povarnina PYu, Durnev AD. GK-2 new drug with neuroprotective properties the study of acute and chronic toxicity of the finished dosage forms. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:51–58. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10048.

Введение

В ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова РАН был синтезирован дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов с химической структурой гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина). Исследования фармакологической активности этого соединения, получившего обозначение ГК-2, показали перспективы его разработки в качестве нейротектора и инициировали

широкие исследования этого лекарственного кандидата [1]. Одним из обязательных фрагментов подобной работы являются доклинические токсикологические исследования, в частности, оценка повреждающего действия лекарственного кандидата при его однократном (острая токсичность) и многократном повторном (хроническая токсичность) введении [2, 3]. Значимость подобного рода исследований для развития потенциального лекарственного средства неоднократно описана ранее [2, 3].

Цель исследования

Изучение острой и хронической токсичности ГК-2.

Материалы и методы

Исследуемый препарат. В эксперименте использовали готовую лекарственную форму ГК-2 (серия 2050117, произведена в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»). В 1 мл готовой лекарственной формы (ГЛФ) было: ГК-2 (лиофилизата) — 0,001 г; сахарозы — 0,020 г; полиэтиленгликоля 4000 — 0,060 г. Для унификации расчётов 1 мл ГЛФ приравнивали к 1 г ГЛФ. В качестве контроля использовали стерильный физиологический раствор NaCl (серия 45) и плацебо (серия 2030117) в составе (на 1 мл): сахарозы — 0,020 г; полиэтиленгликоля 4000 — 0,060 г.

При изучении острой токсичности ГЛФ ГК-2 вводили однократно в дозах, вызывающих гибель части или всех животных в группе. Инъекции ГК-2 осуществляли внутривенно (в латеральную хвостовую вену: мышам — в дозе 11,4 г/кг, крысам — в дозе 9 г/кг). В отсутствие летальности, как произошло в эксперименте при внутривенном пути введения, ГК-2 применяли в предельно допустимых для введения животным объёмах: мышам — 0,5 мл, крысам — 2 мл [2]. Внутривенно мышам вводили ГК-2 в дозах 12; 15; 16,5; 18 и 21 г/кг, крысам — в дозах 3, 6, 9 и 12 г/кг. За животными наблюдали в течение 14 сут. после введения [4].

При исследовании хронической токсичности ГК-2 вводили внутривенно, как это планируется в случае его клинического применения, крысам — в латеральную хвостовую вену, кроликам — в краевую ушную вену. Внутривенное введение ГЛФ ГК-2 осуществляли 1 раз в сутки в течение одного месяца в дозе, соответствующей терапевтической — 100 мг/кг (1 мг/кг по активному веществу) и превышающей её в десять раз — 1000 мг/кг (10 мг/кг по активному веществу).

Лабораторные животные. Изучение острой токсичности проводили на беспородных белых мышах обоего пола ($n=120$, начальная масса 18–20 г) и беспородных белых крысах обоего пола ($n=84$, начальная масса 180–200 г).

Исследование хронической токсичности проводили на беспородных белых крысах обоего пола ($n=60$, начальная масса 180–200 г) и кроликах породы шиншилла обоего пола ($n=48$, начальная масса 2–2,5 кг).

Все экспериментальные животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с мышами, крысами и кроликами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [5] на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии

имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123.

Методы оценки возможного токсического действия.

Непосредственно после однократного внутривенного и внутривентрального введения за животными, находящимися в индивидуальных пластиковых камерах, вели непрерывное наблюдение. Оценивали динамику гибели и изменение поведения. Павших животных вскрывали, данные фиксировали в протоколе. Через 8 ч выживших животных перемещали в клетки для группового содержания. Ежедневно, в течение 14 сут. (утром и вечером) фиксировали отклонения во внешнем виде, общем клиническом состоянии, реакциях на внешние раздражители и динамику смертности [2–4]. В ходе эксперимента оценивали изменение массы тела животных, суточное потребление ими корма и воды, поведенческие реакции. На 15-е сутки после введения ГК-2, согласно общему протоколу [2], животных подвергали эвтаназии и проводили патологоанатомическое вскрытие.

В ходе исследования хронической токсичности ГК-2 оценивали его влияние на интегральные показатели: внешний вид, поведение и клинические симптомы интоксикации (ежедневно); а также динамику массы тела и потребление корма и воды у крыс (еженедельно). Регистрацию физиологических параметров проводили до начала эксперимента, через 24 ч (крысы 1-, 2-, 3- и 4-й групп и кролики 1–3-й группы) и через 2 нед. после заключительного введения ГК-2. Влияние на сердечно-сосудистую систему определяли по показателям электрокардиографии и артериального давления. Изучение поведенческих реакций у крыс проводили по тесту «Открытое поле». Для определения возможных токсических эффектов, их обратимости и поиска органов-мишеней проводили гематологические, биохимические и патоморфологические исследования [6–8]. Оценивали возможное местное раздражающее действие ГК-2 при его внутривенном введении. Объём исследований был определён общим протоколом [2]. Все данные, полученные при исследовании экспериментальных животных, сравнивали с таковыми контрольных животных, получавших в тех же условиях раствор натрия хлорида 0,9 % изотонического и плацебо. Общая продолжительность наблюдения за экспериментальными животными при оценке хронической токсичности составила 30 сут. (1-, 2-, 3- и 5-й группы крыс, 1-, 2-й и 3-й группы кроликов) и 45 сут. (4-я «отставленная» группа крыс).

Методы статистической обработки. В экспериментах по оценке острой токсичности и расчёте среднесмертельных доз ГЛФ ГК-2 использовали метод Литчфилда и Уилкоксона [4]. Статистическая обработка результатов осуществлялась согласно общему протоколу исследований [2]. Все регистрируемые характеристики животных до и после исследования представлены в таблицах в виде частотных и/или процентных показателей или при помощи среднего,

стандартного отклонения, медианы, верхней (75 %) и нижней квартилей (25 %), в зависимости от типа переменной. При оценке независимых выборок животных использовали критерий χ^2 (для частотных показателей), однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для непрерывных показателей с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннети. При невозможности использования ANOVA применяли непараметрический аналог дисперсионного анализа по Краскелу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Результаты считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты

При однократном внутривенном введении ГЛФ ГК-2 беспородным белым мышам (в дозе 11,4 г/кг) и крысам (в дозе 9 г/кг) определение средней смертельной дозы не представлялось возможным из-за отсутствия гибели животных.

В ходе эксперимента у мышей и крыс, которым внутривенно однократно вводили ГЛФ ГК-2, развивалась сходная клиническая картина. Во время введения препарата («на конце иглы») у животных отмечали тонические судороги и рефлекс Штрауба. Первые 2–7 мин после введения препарата животные лежали на животе, вытянув задние лапы. В этот же период у них регистрировали тремор и нарушение координации движений. Дыхание у большинства животных было частым и поверхностным. Кожные покровы и видимые слизистые оболочки были бледными, склеры глаз замутнёнными. Затем активность животных восстанавливалась, у них наблюдался груминг. Реакция на внешние раздражители соответствовали норме. Не было отмечено нарушений ушного и корнеального рефлексов. В дальнейший период наблюдения за животными у них отмечалось чередование активного перемещения в индивидуальных камерах с состоянием покоя. Через 8 ч после однократного внутривенного введения ГЛФ ГК-2 двигательная активность животных полностью восстанавливалась. На следующие сутки после внутривенного введения животные были гиперактивны, у них регистрировали кратковременный тремор и повышенную чувствительность на звуковые раздражители (вздрагивали и вокализировали). При движении животные расставляли задние лапы и держали хвосты горизонтально поверхности пола. Постепенно, через 3–4 сут., наблюдаемые клинические признаки токсического действия препарата нивелировались и в дальнейшем не было зарегистрировано ни одного случая гибели животных и не отмечено выраженных признаков интоксикации. Дыхание, сердечно-сосудистая деятельность, состояние шерстного покрова, кожи и видимых слизистых оболочек, реакция на внешние раздражители соответствовали норме.

При внутрибрюшинном введении была отмечена гибель мышей и крыс. Были произве-

дены расчёты среднесмертельных доз для беспородных белых мышей и крыс. LD₅₀ для самок беспородных белых мышей составила 15,4 (14,5–16,4) г/кг, самцов – 15,7 (14,6–16,9) г/кг. Для самок и самцов беспородных белых крыс LD₅₀ составила 6,9 (4,5–10,6) г/кг.

В ходе эксперимента у животных, однократно внутрибрюшинно получавших ГЛФ ГК-2, развивалась сходная клиническая картина. Большинство животных сразу после инъекции пытались дотянуться до места прокола и вылизать его. Почти сразу после введения препарата у животных отмечалось снижение двигательной активности. Через 5–10 мин состояние животных продолжало ухудшаться: во всех экспериментальных группах регистрировался тремор. При введении ГК-2 в высоких дозах регистрировали приступы клонических судорог, которые длились от 10 до 30 с. Дыхание было частым, поверхностным. Видимые слизистые и кожные покровы были бледными. Гибель животных наступала через 40 мин – 1,5 ч после непродолжительного приступа (1–3 мин) клонических судорог. Когда через 8 ч выживших животных перемещали в клетки группового содержания, у них фиксировали тремор различной степени выраженности и нарушение координации движения (динамическую атаксию). Хвосты у большинства животных были приподняты и параллельны полу. При движении животные высоко приподнимались на лапах, чтобы не касаться животом пола. Гибель животных отмечалась в первые трое, а у крыс в первые пять суток. Выжившие животные в течение первой недели были малоподвижны, у большинства отмечались тремор и нарушение координации движений. В это время реакция на внешние раздражители была повышенной, животные выпрыгивали из клеток, вокализировали и были агрессивны. В дальнейшем, на 7–10-е сутки после введения ГК-2, состояние и поведение животных нормализовалось и не отличалось от такового у контрольных животных.

Патологоанатомическое исследование, проведённое в ходе изучения острой токсичности ГК-2 при его внутрибрюшинном введении, позволило выявить у павших животных нарушения водно-солевого гомеостаза, а также ярко выраженные признаки расстройства кровообращения. У животных, павших на ранних сроках, в брюшной полости была обнаружена жидкость (у мышей в объёме 2–3 мл, у крыс в объёме 5–7 мл) от соломенно-жёлтого до розового цвета. У животных, павших в более поздние сроки, жидкость в брюшной полости, как правило, отсутствовала, а жир сальника и брыжейки выглядел, как гирлянда из сухих светло-жёлтых шариков. Спаек не было. Сосуды органов брюшной и тазовой полостей, а также сосуды брыжейки у животных, павших в ранние сроки эксперимента, были сильно кровенаполнены. На поверхности кишечника обнаруживались точечные кровоизлияния. С другой стороны, инъекция сосудов органов брюшной и тазовой полостей, а также сосудов

брыжейки у мышей, павших в более поздние сроки эксперимента, была не столь заметной.

Патологоанатомическое исследование мышей и крыс, выживших и выведенных из эксперимента спустя 14 сут. после однократного внутривенного и внутрибрюшинного введения ГК-2, позволило установить, что морфологическая картина их внутренних органов не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

Исследование хронической токсичности позволило установить, что ГК-2 в дозах 1 и 10 мг/кг (по активному веществу) при ежедневном внутривенном введении беспородным белым крысам и кроликам в течение одного месяца не вызывает изменений их общего состояния и внешнего вида, а также выраженных изменений массы тела экспериментальных животных. Исключение составили самки крыс экспериментальных групп, у которых наблюдали снижение показателей прироста массы тела (табл. 1). Также у этих же животных фиксировали дозозависимое снижение потребления корма и воды (табл. 2).

При хроническом внутривенном введении ГК-2 не вызывает выраженных изменений поведения экспериментальных животных в тесте «открытое поле», патологических изменений в показателях электрокардиограммы во втором стандартном отведении, и не влияет на артериальное давление и ректальную температуру животных. Не отмечено негативного влияния ГК-2 на систему крови экспериментальных животных, биохимические показатели сыворотки крови экспериментальных животных и физико-химические свойства мочи у крыс.

В результате проведенного патологоанатомического вскрытия установлено, что ежедневное внутривенное введение ГЛФ ГК-2 в дозах 1 и 10 мг/кг в течение одного месяца не вызывает закономерных изменений морфологической картины внутренних органов беспородных белых крыс обоего пола и кроликов породы шиншилла обоего пола.

Микроскопическая картина всех изученных внутренних органов и головного мозга беспородных белых крыс, выведенных из эксперимента через 24 ч или 14 сут. (крысы «отставленной» группы) после заключительного внутривенного введения ГЛФ ГК-2 в дозах 1 и 10 мг/кг, была аналогична таковой, наблюдаемой у крыс контрольной группы, получавших внутривенно раствор натрия хлорида 0,9 % изотонического или плацебо.

Микроскопическая картина всех изученных внутренних органов кроликов породы шиншилла, выведенных из эксперимента спустя 24 ч после заключительного внутривенного введения ГЛФ ГК-2 в дозах 1 и 10 мг/кг, была аналогична картине, наблюдаемой у кроликов контрольной группы, получавших внутривенно раствор натрия хлорида 0,9 % изотонического, и у кроликов, получавших внутривенно плацебо.

При оценке местного раздражающего действия под кожей в области боковых хвостовых вен большинства

крыс были обнаружены кровоизлияния различной величины — от мелких до средних и разлитых. У большинства кроликов под кожей в области краевых ушных вен были обнаружены небольшие кровоизлияния.

При микроскопическом изучении участков, прилежащих к местам внутривенных инъекций препарата ГК-2 в дозах 1 и 10 мг/кг, установлено, что их микроскопическая картина является идентичной таковой, наблюдаемой у контрольных животных, а также животных, которым в аналогичных условиях вводили плацебо. Эта картина характеризуется неизбежной реакцией на механическое повреждение вен и окружающих тканей в виде полнокровия, кровоизлияний,

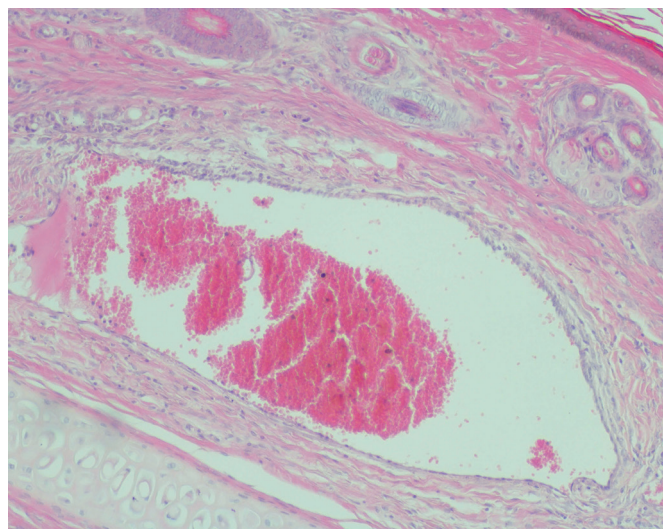


Рис. 1. Ткани уха кролика, которому внутривенно в течение одного месяца вводили раствора натрия хлорида 0,9 % изотонического. Увеличение 10×10, окраска гематоксилин-эозином

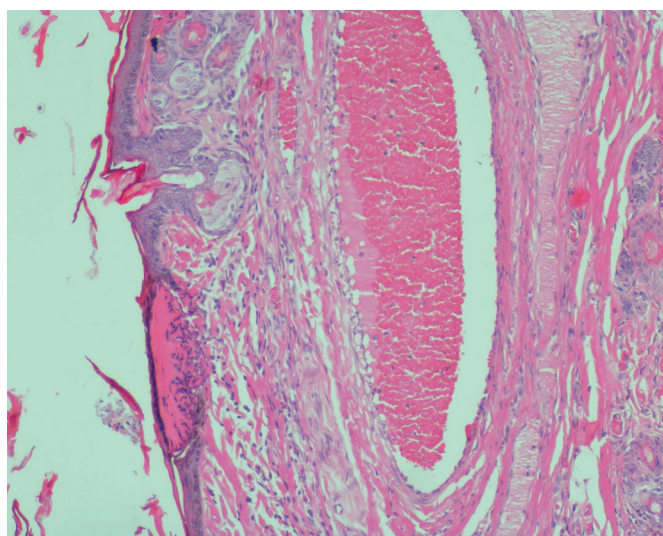


Рис. 2. Ткани уха кролика, которому внутривенно в течение одного месяца вводили плацебо. Увеличение 10×10, окраска гематоксилин-эозином

Таблица 1

Влияние ГК-2 на динамику массы крыс при внутривенном введении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в течение месяца

Группа	Масса крыс до введения парата, г	Масса, 1-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 2-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 3-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 4-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 5-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 6-я неделя после введения, г	Прирост массы, %
1-я группа Контроль	♀ 218 (206ч228)	232• (214ч245)	6,1 (3,9ч7,6)	244 (225ч255)	10,5 (8,9ч13,9)	255• (228ч266)	15,4 (10,7ч16,0)	263• (237ч279)	18,5 (15,0ч20,2)				
	♂ 254 (251ч264)	279• (274ч292)	11,4 (8,3ч13,8)	301 (294ч312)	19,2 (17,1ч25,9)	304• (294ч313)	19,2 (16,3ч25,1)	330 (320ч336)	28,6 (27,5ч31,8)				
2-я группа ГК-2, 1 мг/кг	♀ 221 (212ч226)	224 (218ч232)	2,4* (0,5ч2,7)	234 (224ч237)	5,9* (4,5ч7,2)	240• (230ч243)	8,8* (7,5ч9,6)	244• (233ч250)	11,1* (8,6ч12,3)				
	♂ 270 (259ч272)	287• (282ч295)	7,5 (6,6ч8,9)	311• (300ч323)	15,9 (13,2ч16,2)	323• (317ч336)	19,1 (17,3ч25,7)	338• (334ч357)	26,6 (23,9ч31,3)				
3-я и 4-я группы ГК-2, 10 мг/кг	♀ 211# (205ч220)	220• (210ч235)	4,1 (2,7ч4,8)	227• (210ч238)	6,7* (4,2ч9,8)	232• (216ч249)	8,8* (5,1ч13,8)	234 # (220ч257)	11,3 * (6,7ч16,8)	223♦♦ (217ч235)	9,2 (5,3ч13,0)	238• (232ч258)	16,3• (13,0ч22,5)
	♂ 244 (224ч268)	273• (249ч284)	8,1 (5,9ч12,9)	290• (274ч310)	18,6 (12,9ч26,3)	316• (299ч332)	15,4 (12,0ч19,5)	323• (312ч342)	30,9 (21,8ч44,3)	341♦♦ (312ч348)	53,4♦♦ (45,7ч55,1)	363♦♦ (336ч369)	64,9♦♦ (54,3ч67,5)
5-я группа Плацебо	♀ 229 (223ч236)	235• (230ч245)	3,5* (2,4ч3,9)	250• (234ч255)	6,6* (5,2ч8,8)	253• (243ч258)	8,9 (8,0ч9,2)	262• (260ч270)	13,6 (11,0ч16,6)				
	♂ 259 (247ч269)	284• (267ч293)	8,5 (7,8ч11,0)	305• (279ч316)	16,7 (13,0ч20,2)	324• (294ч334)	23,2 (16,6ч28,7)	349• (300ч355)	31,4 (19,0ч36,4)				

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; • — различие с фоном достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; ♦ — различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; ♦♦ — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с показателями, полученными через 2 нед.; # — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой плацебо; межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела–Уоллиса; для проверки различий между связанными выборками применялся критерий Вилкоксона.

Таблица 2

Влияние ГК-2 на суточное потребление корма и воды у крыс, при внутривенном введении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в течение месяца

Группа	Корм, г						Вода, мл							
	фон	1-я нед.	2-я нед.	3-я нед.	4-я нед.	5-я нед. «отст» гр	6-я нед. «отст» гр	фон	1-я нед.	2-я нед.	3-я нед.	4-я нед.	5-я нед. «отст» гр	6-я нед. «отст» гр
Контроль 1-я группа	♀	19,8 18,7ч20,7	16,8* 15,5ч17,8	21,2* 19,6ч22,2	18,7* 16,7ч19,5	22,2* 20,0ч23,6		39,8 37,7ч41,7	29,9* 27,7ч31,7	37,6* 34,8ч39,4	28,9* 25,9ч30,2	35,5* 32,1ч37,8		
	♂	22,3 22,1ч23,2	21,3* 20,9ч22,3	25,8* 25,2ч26,8	16,0* 15,5ч16,5	24,9* 24,2ч25,4		36,7 36,3ч38,1	30,8* 30,2ч32,2	33,1* 32,3ч34,3	33,3* 32,2ч34,4	33,6* 32,6ч34,3		
ГК-2 1 мг/кг 2-я группа	♀	18,6*# 17,9ч19,0	17,5*# 17,0ч18,1	12,1*#* 11,6ч12,2	15,3*#* 14,7ч15,5	16,6*#* 15,9ч17,0		29,3*# (8,1ч30,0	25,0*#* 24,3ч25,9	25,2*#* 24,1ч25,5	24,4*# 23,4ч24,7	25,2*#* 24,1ч25,8		
	♂	27,3* 26,3ч27,6	21,9*# 21,6ч22,5	19,0*#* 18,4ч19,8	22,3*# 21,9ч23,2	27,1*# 26,8ч28,6		40,2*# 38,7ч40,6	32,4*# 31,8ч33,3	33,3*#* 32,2ч34,7	32,5*#* 31,9ч33,8	33,9*# 33,5ч35,8		
ГК-2 10 мг/кг 3- и 4-я «отст» гр	♀	17,1*# 16,1ч17,9	14,3*# 13,0ч15,1	13,7*#* 12,4ч15,0	14,7*#* 12,9ч15,4	11,5*#* 10,0ч12,1	19,5*#* 19,0ч21,2	26,8*#* 25,3ч28,1	29,4*#* 26,8ч31,0	20,9*#* 18,9ч22,8	26,4*#* 23,3ч27,7	23,9*#*# 21,0ч25,2	32,0*#* 31,1ч33,7	32,8*#* (32,0ч35,6)
	♂	24,6*# 24,4ч27,0	22,0*# 21,5ч24,1	18,4*#* 17,4ч19,4	25,6*#* 24,2ч26,9	19,1*#* 18,2ч19,8	26,0*#* 23,8ч26,6	30,8*#* 28,5ч31,3	32,6*#* 32,3ч35,7	31,8*#* 31,0ч34,8	24,9*#*# 23,5ч26,3	35,7*#* 33,8ч37,6	31,0*#* 29,5ч32,1	38,5*#* 35,3ч39,3
Плацебо 5-я группа	♀	22,3*# 21,7ч22,9	14,2*#* 13,9ч14,8	13,2*#* 12,4ч13,5	17,9*#* 17,1ч18,2	19,1*#* 19,0ч19,7		34,9*#* 34,0ч36,0	32,2*#* 31,6ч33,6	17,8*#* 16,7ч18,2	24,4*#* 23,5ч24,9	31,8*#* 31,6ч32,8		
	♂	26,4*# 25,2ч27,4	20,6*#* 19,4ч21,3	17,5*#* 16,0ч18,2	24,9*#* 22,6ч25,7	27,1*#* 23,3ч27,6		40,0*#* 38,2ч41,7	31,3*#* 29,4ч32,2	30,3*#* 27,8ч31,3	38,2*#* 34,6ч39,3	36,5*#* 31,4ч37,2		
Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; * – различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; ♦ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) между 3- и 4-й группами; # – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой плацебо; межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела—Уоллиса; для проверки различий между связанными выборками применялся критерий Вилкоксона.														

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; * — различие с фоном достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; # — статистически значимые различия ($p < 0,05$) между 3- и 4-й группами; * — различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; ♦ — статистически значимые различия ($p < 0,05$) между 3- и 4-й группами; # — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой плацебо; межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела—Уоллиса; для проверки различий между связными выборками применялся критерий Вилкоксона.

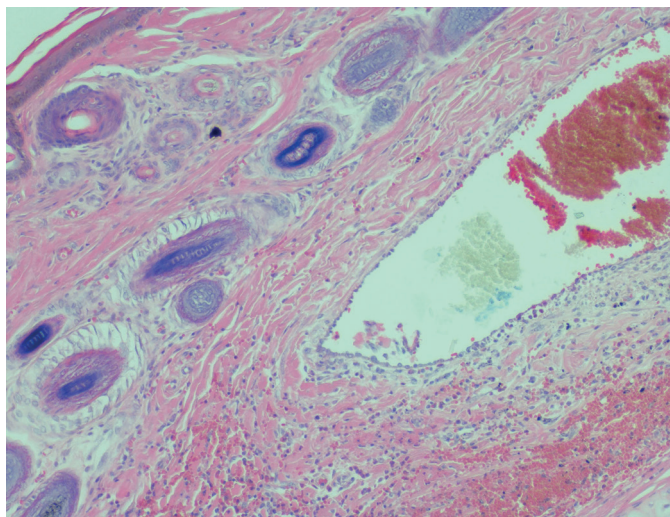


Рис. 3. Ткани уха кролика, которому внутривенно в течение одного месяца вводили ГЛФ ГК-2 в дозе 10 мг/кг. Увеличение 10×10, окраска гематоксилин-эозином

околососудистого отёка и умеренной инфильтрации полиморфноядерными лейкоцитами, лимфоцитами и макрофагами (рис. 1–3).

Заключение

Обобщая результаты оценки острой токсичности, следует констатировать, что при однократном внутривенном и/или внутрибрюшинном введении ГЛФ ГК-2 является относительно безвредным и, по классификации Сидорова К.К. (1973 г.), может быть отнесён к 6-му классу токсичности.

При исследовании хронической токсичности ГЛФ ГК-2, которое было выполнено в соответствии с протоколом, установленным Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [2, 3], не было выявлено токсических эффектов и местного раздражающего действия.

Проведённые исследования не установили данных, препятствующих дальнейшей разработке лекарственного кандидата ГЛФ ГК-2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сорокина Александра Валериановна

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Sorokina Aleksandra

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

Candidate of Biological Sciences, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Алексеева Светлана Витальевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN код: 8985-3418

с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Alekseeva Svetlana

Corresponding author

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN code: 8985-3418

Senior Research Officer of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Мирошкина Ирина Александровна

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Miroshkina Irina

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Волкова Анна Валерьевна

с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Volkova Anna

Senior Research Officer of laboratory of psychopharmacology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Забродина Виктория Владимировна

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN код: 8473-6920

к. б. н., н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zabrodina Victoria

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN code: 8473-6920

Candidate of Biological Sciences, Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Качалов Кирилл Сергеевич

SPIN код: 2992-6789

инженер 1-й категории лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва; студент фармацевтического факультета Московского медицинского университета «Реавиз», Москва

Алексеев Иван Владимирович

SPIN код: 9757-6210

инженер 1-й категории лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва; студент фармацевтического факультета Московского медицинского университета «Реавиз», Москва

Захаров Алексей Дмитриевич

SPIN код: 9013-6228

инженер 1-й категории лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Поварнина Полина Юрьевна

ORCID: 0000-0003-3278-8915

SPIN код: 5498-6724

зав. лабораторией лекарственной токсикологии, к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN код: 8426-0380

зав. лабораторией лекарственной токсикологии, член-корр. РАН, д. м. н. профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kachalov Kirill

SPIN code: 2992-6789

engineer of the 1st category of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow; student of the pharmaceutical faculty of the Moscow medical university «Reaviz», Moscow

Alekseev Ivan

SPIN code: 9757-6210

engineer of the 1st category of the laboratory of pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow; student of the pharmaceutical faculty of the Moscow medical university «Reaviz», Moscow

Zakharov Aleksei

SPIN code: 9013-6228

engineer of the 1st category of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Povarnina Polina

ORCID: 0000-0003-3278-8915

SPIN code: 5498-6724

PhD, Senior Researcher, Laboratory of Peptide Bioregulators, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Durnev Andrei

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

Head of the laboratory of drug toxicology, RAS corresponding member, Ph.D., Professor, Director FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Исследование in vitro нейропротективных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов ГК-2 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2010. — Т. 150. — № 11. — С. 538–541. [Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. In vitro study of neuroprotective properties of GK-2, a new original nerve growth factor mimetic. *Byulleten Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny*. 2010; 150 (11): 537–540 (In Russ).]
2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. Изучение хронической токсичности. — М.: Гриф и К; 2012. — С. 15–19. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. CH. 1. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie ostroj toksichnosti. Izuchenie hronicheskoy toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).]
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «острой» токсичности. Изучение «хронической» токсичности. — М.:

- Медицина; 2005. — С. 41–54. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novykh farmakologicheskikh veshchestv. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya farmakologicheskikh veshchestv. Moscow: Meditsina; 2005. (In Russ).]
4. Бельский М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kij MB. Elementy kolichestvennoy ocenki farmakologicheskogo efekta. Leningrad: Medgiz; 1963. (In Russ).]
5. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910
6. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. 5-е изд., испр. и доп. — Л.: Медицина; Ленингр. отд-ние. 1969. [Merkulov GA. Kurs patologistologicheskoi tekhniki. Leningrad: Medicine; 1969. (In Russ).]
7. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов / под ред. Саркисова Д.С. и Перова Ю.Л. — М.: Медицина; 1996 [Mikroskopicheskaya tekhnika. Rukovodstvo dlya vrachei i laborantov. Ed by Sarkisov DS, Perov YuL. Moscow. Medicine; 1996. (In Russ).]
8. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. — Смоленск: САУ; 2000. [Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo. Smolensk: SAU; 2000. (In Russ).]

Определение безвредности гликопептидов молочнокислых бактерий на лабораторных животных

Софронова О.В., Полякова Л.Л., Овчарова А.Н.

ВНИИФБиП животных – филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –
ВИЖ им. Академика Л.К. Эрнста», Боровск, Калужской обл.

Резюме. Изучение острой токсичности и аллергенности гликопептидов молочнокислых бактерий на мышах и кроликах. При современном уровне физического, химического и биологического загрязнения окружающей среды домашние и сельскохозяйственные животные не в меньшей, если не в большей, степени чем люди, страдают от вторично индуцированного иммунодефицита – разбалансировки нормального функционирования иммунной системы. Это приводит к существенному снижению общей сопротивляемости организма животного к различным заболеваниям вирусной и бактериальной природы. Восстановить нормальное функционирование иммунной системы животного можно с помощью иммуномодуляторов, действующим началом которых является синтезированный из природных компонентов гликопептид – универсальный структурный фрагмент оболочки клеток молочнокислых бактерий, взаимодействующий с иммунной системой животного организма.

Ключевые слова: гликопептиды; молочнокислые бактерии; среднесмертельная доза; токсичность и аллергенность

Для цитирования:

Софронова О.В., Полякова Л.Л., Овчарова А.Н. Определение безвредности гликопептидов молочнокислых бактерий на лабораторных животных // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 2. – С. 59–63. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10049.

Determination of the safety of glycopeptides lactic acid bacteria in laboratory animals

Soifronova OV, Polyakova LL, Ovcharova AN

All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of animals – branch of Federal state budgetary scientific institution "Federal
Research Center Livestock – AUIAB Academician LK Ernst", Borovsk, Kaluga region, Russian Federation

Resume. The study of acute toxicity and allergenicity glycopeptides lactic acid bacteria in mice and rabbits. At the present level of physical, chemical and biological pollution of the environment, domestic and farm animals in no less, if not more than people, suffer from secondary induced immunodeficiency – an imbalance in the normal functioning of the immune system. This leads to a significant reduction in the overall resistance of the animal to various diseases of a viral and bacterial nature. The normal functioning of the animal's immune system can be restored with the help of immunomodulators, the active principle of which is the glycopeptide synthesized from natural components – a universal structural fragment of the lactic acid bacteria cell membrane that interacts with the immune system of the animal organism.

Keywords: glycopeptides; lactic acid bacteria; the medium lethal dose; toxicity and allergenicity

For citations:

Soifronova OV, Polyakova LL, Ovcharova AN. Determination of the safety of glycopeptides lactic acid bacteria in laboratory animals. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;2:59–63. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10049.

Введение

Гликопептиды повышают общую сопротивляемость организма животного к патогенному фактору, прежде всего за счёт активации клеток фагоцитарной системы иммунитета (нейтрофилов и макрофагов). Последние путём фагоцитоза уничтожают патогенные микроорганизмы и, в то же время, секретируют медиаторы естественного иммунитета – цитокины, которые, воздействуя на широкий спектр клеток-мишеней, вызывают дальнейшее развитие защитной реакции организма [1–2].

Препарат, создаваемый на основе гликопептидов молочнокислых бактерий, планируется применять для профилактики и лечения инфекционных заболеваний; для снятия поствакцинальных осложнений и стрессового состояния [3].

Исследование токсических свойств синтетических и природных гликопептидов, проведённое в 70–80-е годы прошлого столетия, привело к созданию ряда синтетических фармацевтических препаратов нового класса – иммуномодуляторов. Учитывая высокую токсичность синтетических гликопептидов, нами были проведены дополнительные исследования безвредности природных гликопептидов, выделенных из различных видов молочнокислых бактерий [4–5].

Проведённые исследования показали значительно более низкую токсичность и аллергенность природных гликопептидов по сравнению с синтетическими фармакопейного качества.

Гликопептиды – это один из компонентов клеточной стенки бактерий, в частности, лактобацилл. Природные состоят из гликозидной (N-ацетил глюкозаминил - N'-ацетилмурамил) и пептидной части.

Аминокислотный состав пептидной части, выделенных из одного ряда лактобактерий (палочкообразных) содержит от двух (обязательных — L — аланил — D — изоглутамин) до семи аминокислот. Состав синтетических гликопептидов — строго определённый как гликозидной частью, выделяемой из стенок бактерий, так и двумя «пришитыми» аминокислотами L — аланил и D — изоглутамин.

Целью настоящей работы является изучение токсичности и аллергенности природных гликопептидов молочнокислых бактерий на лабораторных животных.

Материалы и методы

Исследования выполнены во ВНИИ физиологии, биохимии и питания сельскохозяйственных животных в соответствии с «Инструкцией о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предполагаемым для использования в составе рациона или для консервации кормов сельскохозяйственных животных, продукция от которых идёт в пищу населения» [8] (утверждена 14 декабря 1981 г.) и «Методическими указаниями по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве» [9].

Исследования были проведены на мышах и кроликах.

При изучении патогенности, определении средней смертельной дозы, токсичности и токсигенности гликопептидов эксперименты проводили на мышах обоего пола со стандартной живой массой тела 22–25 г.

Мышей содержали в виварии института в стандартных клетках, они получали полноценный рацион (ОР), состоящий из специального комбикорма ПК-121-1 (для лабораторных мышей и крыс) по 10 г на голову в сутки.

Определение среднесмертельной дозы. Из мышей было сформировано 4 группы по 10 особей в каждой группе. Контрольная (1-ая) группа получала ОР (добавок не получала), изучаемый препарат вводили с кормом в дозах: 0,05 мг/мышь (2-я группа — рекомендуемая доза), 0,5 мг/мышь (3-я группа — десятикратная доза) и 5,0 мг/мышь (4-я группа — стократная доза) на протяжении 7 суток.

Аналогично проводились испытания инъекционного препарата. Из мышей было сформировано 4 группы по 10 особей в каждой (5 самок и 5 самцов). Подопытным мышам (6–8-я группы) внутрибрюшинно вводили препарат в рекомендуемой, десятикратной и стократных дозах в объёме 0,5 мл, а контрольным животным (5-я группа) вместо препарата вводили стерильный изотонический раствор натрия хлорида в дозе 0,5 мл.

За животными велись наблюдения в течение 30 сут. после введения препарата и учитывалась их сохранность, общее состояние и внешний вид.

Определение острой токсичности (LD_{50}) препарата при введении его в желудок, было проведено на серых мышах. Десяти мышам (5 самок и 5 самцов) вместе с гранулами давали по 1,0 мл раствора препарата на

мышь с концентрацией 0,5 мг/мышь. Препарат скармливали в течение 10 дней, а наблюдение за животными велось в течение 2 недель.

Второй этап исследований токсичности гликопептида выполнен в виварии института на молодняке кроликов 2-месячного возраста.

Для изучения токсичности кролики породы калифорнийская по принципу парных аналогов были разделены на четыре группы по шесть животных в каждой. Первая группа получала ОР, состоящий из 150 г разнотравного сена и 200 г полнорационных гранул. Животные 2-, 3- и 4-й групп дополнительно к ОР в течение 7 дней получали по 1 мл раствора препарата: 2-я группа в количестве 0,8 мг на животное (рекомендуемая доза); 3-я группа — 8 мг (десятикратная доза), 4-я группа — 80 мг/животное (стократная доза).

Опыт продолжался 1,5 месяца. На протяжении всего опыта ежедневно осуществлялся контроль за общим состоянием животных, учитывали потребление ими кормов и проводили взвешивание кроликов и отбор крови до и после скармливания препарата [2].

Местное токсическое действие гликопептидов определяли путём нанесения раствора на кожу [1]. При постановке кожной пробы шерсть на боку выстригали на площади 6×9 см и двукратно с интервалом в 24 ч втирали в кожу раствор препарата, а контрольным животным втирали в кожу воду. Учёт реакции проводили ежедневно в течение 4 суток. До и после нанесения препарата измеряли толщину кожной складки.

Для изучения аллергенных свойств препарата в опыт были взяты те же животные, на которых испытывалось местное токсическое действие на кожу (по 4 кролика из контрольной и опытной групп). Кроликам на один и тот же выстриженный участок кожи наносили путём втирания на протяжении 8 сут. раствор препарата в концентрации 0,8 мг/мл. Через 14 сут. после последней аппликации гликопептида на кожу свежесостриженного участка спины этим же животным вновь втирали препарат в той же концентрации. Учёт реакции проводили через 24 ч.

Изучение раздражающего действия на конъюнктиву глаза. Для внесения раствора препарата в конъюнктивальный мешок кролику оттягивали верхнее веко и закапывали из пипетки 1–2 капли раствора препарата (без твёрдых частиц), а контрольным кроликам идентично вводили стерильную воду. В каждой группе было по 6 кроликов. Учёт реакции проводили ежедневно в течение 6 сут.

Результаты исследований и обсуждение

В последнее время появился интерес к иммуномодуляторам — гликопептидам как синтетическим, так и натуральным, выделенным из различных молочнокислых бактерий. В 1974 г. F. Lederer, et al. [10] обнаружили, что такие сравнительно небольшие по молекулярной массе соединения, такие как мурамилдипептид (MDP),

обладает такими же иммуномодулирующими свойствами, как адьювант Фрейда, что привело к производству новых иммуномодуляторов на его основе.

Одновременно болгарские учёные выделили биологически активные соединения из лизоцимного гидролизата клеток *Lactobacillus bulgaricus*. Выделенный препарат, названный бластолизин, используется в медицине и обладает противоопухолевыми свойствами. В совместном исследовании болгарских и московских учёных при изучении гликопептида бластолизина установлена его структура [13]. Этот гликопептид представляет собой дисахарид пентапептид, в котором пептидная часть состоит из следующей последовательности аминокислот: L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Asp-D-Ala. Начальная часть молекулы гликопептида установленной структуры представляет собой GMDP. Московскими учёными ИБХ им. Шемякина впервые был синтезирован GMDP, изучены его свойства и установлено, что препарат обладает противоопухолевой активностью аналогичной MDP [11].

Дальнейшие исследования: доклинические испытания, лекарственная форма и масштабирование технологии осуществлены в Латвии Институтом органического синтеза (г. Рига) и НПО «Биолар» (г. Олайне).

В мире были получены два фармацевтических препарата: Ромуртид — аналог MDP, производимый в Японии, и Ликопид — аналог GMDP, производимый в России, а также ветеринарный препарат Гликопин (аналог GMDP) — производитель ЗАО «Пептек» (Россия).

Следует отметить, что средняя смертельная доза (LD_{50}), характеризующая токсичность препарата, равна для MDP (Ромуртид) и GMDP (Ликопид и Гликопин) 25 и 100 мг/кг, соответственно [12, 14].

По нашему мнению, необходимо дальнейшее исследование природных гликопептидов из молочнокислых бактерий, включая их выделение и характеристику свойств. Такие препараты могут быть менее токсич-

ными, более дешевыми и найти широкое применение в качестве добавки для укрепления защитных сил организма как человека, так и животных.

Проведенные исследования показали, что применение гликопептидов молочнокислых бактерий в кормлении мышей и молодняка кроликов во всех использованных дозах (рекомендуемая, десяти- и стократная) не вызывало гибели подопытных животных (табл. 1). Не наблюдалось также каких-либо отклонений в их общем состоянии, внешнем виде, поведении и потреблении корма. Основные параметры крови животных контрольной и опытных групп находились в пределах физиологической нормы, лейкоцитарная формула во всех группах соответствовала лейкограмме здоровых животных.

Изучение раздражающего действия на конъюнктиву глаза и оценка аллергенности.

При определении воздействия гликопептида на слизистые оболочки глаз кроликов каких-либо изменений со стороны конъюнктивы, роговицы и зрачка не обнаружено. Не было гиперемии слизистой, отёчности или гнойных истечений из глаза.

Отсутствовало и местное токсическое действие изучаемого препарата при его нанесении на кожу кроликам. Не было утолщения кожной складки после втирания препарата; болезненность, припухлость, повышение температуры в месте нанесения отсутствовали.

Как показали дальнейшие исследования препарата, то он не проявлял аллергенных свойств: на месте нанесения препарата в соответствии с существующей методикой аллергической реакции в виде инфильтрации, изъязвления, некрозов ткани не наблюдалось.

Заключение

В настоящей работе была изучена безвредность гликопептидов молочнокислых бактерий. Исходя из

Таблица 1

Определение безвредности гликопептида для лабораторных животных (n^*/n^{**})

Вид животных	Путь введения микроорганизмов	Контроль	Испытуемые дозы препарата, мг/гол		
			рекомендуемая доза	десятикратная доза	стократная доза
Определение среднесмертельной дозы					
Мыши	Внутрибрюшинно	*10/0**	10/0	10/0	10/0
	С кормом	10/0	10/0	10/0	10/0
Определение токсичности					
Мыши	С кормом	10/0	—	10/0	—
Кролики	С кормом	6/0	6/0	6/0	6/0
Местное токсическое и аллергенное воздействие					
Кролики	В конъюнктивальный мешок	6/0	—	6/0	—
	Втирание в кожу	6/0	—	6/0	—
	Аллергенность	6/0	—	6/0	
Примечания: * — число животных в группе; ** — число погибших животных или давших реакцию на введение препарата.					

Примечания: * — число животных в группе; ** — число погибших животных или давших реакцию на введение препарата.

полученных данных, изучаемый нами препарат не оказывает токсичного, токсигенного и аллергенного действия на организм лабораторных животных, не раздражает неповрежденные слизистые оболочки.

Значения средней смертельной дозы (LD_{50}) для исследуемых природных гликопептидов из различных видов лактобактерий (*Lactobacillus bulgaricus*, *L. Acidophilus*, *L. Plantarum*) в эксперименте определить

не удалось, в связи с отсутствием гибели животных. Для синтетических гликопептидов MDP и GMDP LD_{50} составляет 25 мг/кг и 100 мг/кг, соответственно.

По совокупности полученных данных следует, что ни один из гликопептидов молочнокислых бактерий не токсичен для лабораторных животных, и изучаемый препарат может быть отнесён к четвёртому классу опасности, т. е. является безопасным для животных и человека.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Софронова Ольга Владимировна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: sova60@rambler.ru

SPIN код: 8603-7034

н. с., кандидат технических наук

Иммунобиотехнологии и микробиологии,

ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ ВИЖ

им Л.К. Эрнста, Боровск, Калужской обл.

Sofronova Olga

Corresponding author

e-mail: sova60@rambler.ru

SPIN code: 8603-7034

Research Officer, candidate of technical Sciences of Immunobiotechnology and Microbiology, VNI-IFBiP of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, Borovsk, Kaluga region

Полякова Людмила Леонидовна

SPIN код: 5853-4527

м. н. с., Иммунобиотехнологии и

микробиологии, ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ

ВИЖ им Л.К. Эрнста, Боровск, Калужской обл.

Polyakova Lyudmila

SPIN code: 5853-4527

Junior researcher of Immunobiotechnology and Microbiology, VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry», Borovsk, Kaluga region

Овчарова Анастасия Никитовна

SPIN код: 2377-8689

с. н. с., к. б. н., Иммунобиотехнологии и

микробиологии, ВНИИФБиП ФГБНУ ФНЦ

ВИЖ им Л.К. Эрнста, Боровск, Калужской обл

Ovcharova Anastasia

SPIN code: 2377-8689

Senior Research Officer, candidate of Biological Sciences of Immunobiotechnology and Microbiology, VNIIFBiP of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry», Borovsk, Kaluga region

Литература / References

1. Li X, Sun Q, Wang Y, et al. The regulatory effects of *L. plantarum* peptidoglycan microspheres on innate and humoral immunity in mouse. *J Microencapsul.* 2017;34(7):635–643. DOI: 10.1080/02652048.2017.1375037.
2. Agarwal R, Bartsch SM, Kelly BJ, et al. Newer glycopeptide antibiotics for treatment of complicated skin and soft tissue infections: systematic review, network meta-analysis and cost analysis. *Clin Microbiol Infect.* 2018;24(4):361–368. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.08.028
3. Остренко К.С., Галочкин В.А., Колоскова Е.М., Галочкина В.П. Влияние нового микронутриента – аскорбата лития на стрессоустойчивость и продуктивность свиноматок // *Проблемы биологии продуктивных животных.* – 2017. – № 2. – С. 74–86. [Ostrenko KS, Galochkin VA, Koloskova EM, Galochkina VP. Vliyanie novogo mikronutrienta – askorbata litiya na stressoustojchivost' i produktivnost' svinomatok. *Problemy biologii produktivnyh zhivotnyh.* 2017;2:74–86. (In Russ).]
4. Овчинников Ю.А., Иванов В.Т., и др. *Гликопептиды, обладающие противоопухолевой активностью и способ их получения* // Авторское свидетельство СССР № 727647, 1980. [Ovchinnikov YuA, Ivanov VT, et al. *Glikopeptidy, obladayushchie protivopuhoлевой aktivnost'yu i sposob ih polucheniya.* Avtorskoe svidetel'stvo SSSR №727647, 1980. (In Russ).]
5. Ермолаев Е.Д., Земтурис М.М., Софронова О.В. и др. *Способ выделения O-(2-ацетамидо-2-деокси- -D- глюкوپиранозил) – (1-4) – 2 - ацетамидо – 3 – O - 1 – карбоксиэтил) - 2-деокси- D-глюкозы из биомассы Micrococcus lysodeikticus* // Авторское свидетельство СССР №1496229, 1985. [Ermolaev ED, Zemturis MM, Sofronova OV, et al. *Sposob vydeleniya O-(2-acetamido-2-deoksi- -D- glyukopiranozil) – (1-4) – 2 - acetamido – 3 – O - 1 – karboksietil) - 2-deoksi- D-glyukozy iz biomassy Micrococcus lysodeikticus.* Avtorskoe svidetel'stvo SSSR №1496229, 1985. (In Russ).]
6. Подгорнова Н.Н., Ермолаев Е.Д., Лудрика Р., и др. *Способ получения гликопептидов* // Авторское свидетельство СССР № 1705303, 1991. [Podgornova NN, Ermolaev ED, Ludrika R, et al. *Sposob polucheniya glikopeptidov.* Avtorskoe svidetel'stvo SSSR №1705303, 1991. (In Russ).]
7. Lefrancier P, Derren M, Ghoay I. Apyrogenic, adjuvant active N-acetylmuramyl – dipeptides. *J. Med. Chem.* 1982;25:87–90.
8. Подгорнова Н.Н. *Лабораторная методика производства GMDP* // НПО «Биолар», Олайне, Латвия: 1988. [Podgornova NN. *Laboratornaya metodika proizvodstva GMDP.* NPO «Biolar», Olajne, Latviya: 1988. (In Russ).]
9. Инструкция о гигиенических требованиях к новым препаратам химического и биологического синтеза, предлагаемым для использования в составе рационов или для консервирования кормов с.-х. животных, продукция от которых идет в пищу населения. // Кн.: *Ветеринарные препараты.* Справочник. – М.: Агропромиздат. 1988. [Instrukciya o gigenicheskikh trebovaniyah k novym preparatam himicheskogo i biologicheskogo sinteza, predlagayemym dlya ispol'zovaniya v sostave racionov ili dlya konservirovaniya kormov s.-h. zhivotnyh, produkciya ot kotoryh idet v pishchu naseleniya. Kn.: *Veterinarnye preparaty.* Spravochnik. Moscow: Agropromizdat. 1988. (In Russ).]
10. Методические указания по определению токсических свойств препаратов, применяемых в ветеринарии и животноводстве // Кн.: *Ветеринарные препараты.* Справочник. – М.: Агропромиздат. 1988: 239–289. [Metodicheskie ukazaniya po opredeleniyu toksicheskikh svojstv preparatov, primenyaemyh v veterinarii i zhivotnovodstve. Kn.: *Veterinarnye preparaty.* Spravochnik. Moscow: Agropromizdat. 1988. (In Russ).]
11. F. Ellouz, A. Adams, R. Ciorbarn, F. Lederer. Muram peptides and lipopeptides: Studies towards immunostimulants. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1974;59: 1317–1320.
12. Безруков М.В. Структура активного компонента бластолизина. Синтез и свойства родственных соединений // Автореферат дисс. М.: 1987. [Bezrukov MV. *Struktura aktivnogo komponenta blastolizina. Sintez i svojstva rodstvennyh soedinenij.* Avtoreferat diss. Moscow: 1987. (In Russ).]
13. Bogdanov LG, Dalev PG, et al. Antitumor glycopeptides from *Lactobacillus Bulgaricus* cell wall. *FEBS Letters.* 1975;57(3):79–86.
14. Галочкин В.А., Галочкина В.П., Остренко К.С. Разработка теоретических основ и создание антистрессовых препаратов нового поколения // *Сельскохозяйственная биология.* – 2009. – № 2. – С. 43–55. [Galochkin VA, Galochkina VP, Ostrenko KS. *Razrabotka teoreticheskikh osnov i sozdanie antistressovyh preparatov novogo pokoleniya.* *Sel'skhozvaystvennaya biologiya.* 2009;2:43–55. (In Russ).]



Издательство ОКИ

ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей, фармакологов, сотрудников фармацевтических компаний, служащих регулирующих органов, членов Комитетов по Этике.

Сайт издательства: www.izdat-oki.ru



Журнал «**Качественная клиническая практика**» публикует материалы по планированию и проведению клинических исследований лекарственных средств, фармакоэкономике, фармакоэпидемиологии, биомедицинской этике, фармаконадзору, которые используются в преподавательской работе во многих медицинских ВУЗах.

Сайт журнала: www.clininvest.ru



Журнал «**Фармакокинетика и Фармакодинамика**» освещает фундаментальные и прикладные аспекты доклинических и клинических исследований фармакокинетики, в частности терапевтического лекарственного мониторинга, фармакодинамического и биофармацевтического изучения препаратов, их взаимодействия, оценки их биодоступности и биоэквивалентности.

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



Журнал «**Фармакогенетика и фармакогеномика**» публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, клинко-экспериментальных и фундаментальных научных работах, обзоры, лекции, описания клинических случаев, а также вспомогательные материалы по всем актуальным проблемам персонализированной медицины

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



Журнал «**Антибиотики и химиотерапия**» освещает проблемы поиска и получения новых антибиотиков, ферментов, биологически активных веществ, а также вопросы экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций.

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

**Тел.: +7 (910) 449-22-73;
e-mail: clininvest@mail.ru**



Маркет Аксес Солюшенс — это комплекс услуг по продвижению лекарственных средств, медицинского оборудования и медицинских технологий



Миссия:

Выявляя и продвигая новые медицинские технологии, повышать качество оказания медицинской помощи и эффективность системы здравоохранения

Фокус:

- Формирование уникального восприятия ценности продукта
- Позиционирование продукта на рынке
- Определение целевых областей применения
- Эффективное взаимодействие PR

Наши услуги:

- Анализ рынка и системы здравоохранения
- Маркетинговые исследования
- Разработка стратегии
- Регуляторные задачи
- Клинические исследования
- Оценка медицинских технологий
- Определение ценовой политики и целевого финансирования
- Построение эффективных бизнес-процессов для фармацевтических компаний



Мы всегда рады сотрудничеству:

☎ +7 (495) 664-32-70

✉ info@marketaccess.ru

🌐 www.Market-Access-Solutions.ru