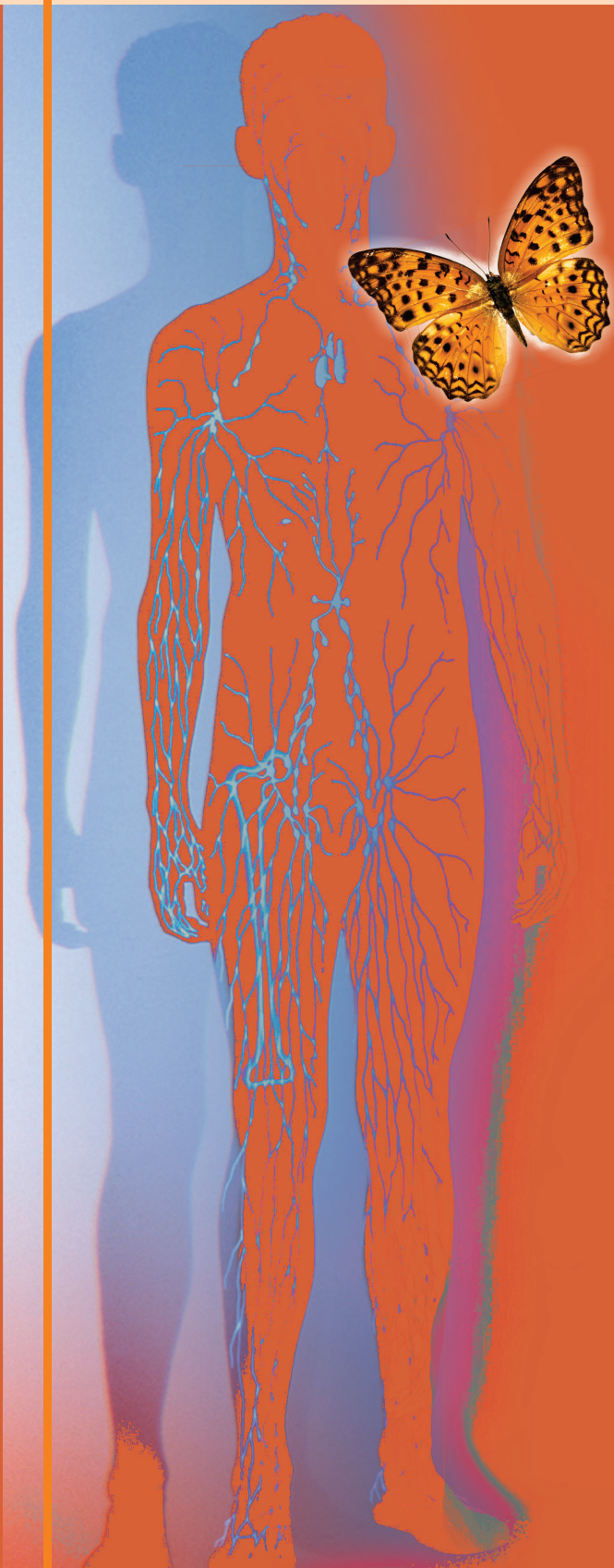


ФАРМАКОКИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№4.2016



- Независимая научная организация в области изучения экономики программ здравоохранения
- Более 200 исследований в области оценки медицинских технологий
- Опубликовано около 210 научных работ в рецензируемых медицинских журналах
- Партнёры – 40 ведущих зарубежных и российских фармацевтических компаний

Основные направления научной деятельности

- разработка научно-методических основ фармакоэкономических, фармакоэпидемиологических исследований и оценки качества жизни
- развитие методологии проведения оценки медицинских технологий

ПОЛНЫЙ СПЕКТР УСЛУГ ПО ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ

- фармакоэкономические исследования
- фармакоэпидемиологические исследования
- наблюдательные неинтервенционные исследования
- не прямые сравнительные исследования
- оценка технологий здравоохранения
- оценка качества жизни, связанного со здоровьем
- систематический литературный обзор и мета-анализ
- разработка математических моделей и локальная адаптация
- анализ больших баз данных
- создание мобильных приложений и интерактивных онлайн-презентаций
- формирование доказательной базы
- экспертиза и разработка клинико-экономического досье
- образовательные услуги
- информационно-консультационные услуги





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

Белолипецкая

Вера Геннадиевна

к.б.н., Москва

Белоусов Юрий Борисович

член-корр. РАН, д.м.н.,

профессор, 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, Иваново

Дурнев Андрей Дмитриевич

д.м.н., профессор, Москва

Казей Андрей Дмитриевич

к.б.н., Москва

Ковалёв Георгий Иванович

д.м.н., профессор, Москва

Кулмагамбетов

Ильяс Райханович

д.м.н., профессор, академик

НАН, Казахстан, Алматы

Мирзоян Рубен Симонович

заслуженный деятель науки

РФ, д.м.н., профессор, Москва

Насонов Александр Сергеевич

к.б.н., Москва

Раменская

Галина Владиславовна

д.ф.н., профессор, Москва

Сариев Абрек Куангалиевич

д.м.н., профессор, Москва

Соколов Андрей Владимирович

д.б.н., Москва

Спасов Александр Алексеевич

академик РАН, д.м.н.,

профессор, Волгоград

Стародубцев

Алексей Константинович

д.м.н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Александрович

д.м.н., профессор, Москва

Тюренков 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 12.10.2016 г.

ООО «МЕДИАКОЛОР», www.mediacolor.ru

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБУ «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 «Качественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» зарегистрирован 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.PharmacoKinetica.ru

www.ClinVest.ru

www.Clinical-Pharmacy.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Фармакокинетика и Фармакодинамика

Качественная клиническая практика

Клиническая фармация

Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.Izdat-Ok.ru

Центр Фармакоэкономических исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Исследование сравнительной фармакокинетики
таблетированных форм микофеноловой кислоты
Хохлов А.Л., Яичков И.И., Шитова А.М., Шитов Л.Н.,
Джурко Ю.А., Мирошников А.Е. 3

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ

Метаболиты витамина D: роль в диагностике и терапии
витамином-D-зависимых патологий
Громова О.А., Торшин И.Ю., Гилельс А.В.,
Гришина Т.Р., Томилова И.К. 9

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный хемореактивный анализ мексидола
Торшин И.Ю., Громова О.А., Сардарян И.С.,
Федотова Л.Э., Семенов В.А. 19

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ

Анализ лёгкой пептидной фракции Лаеннека
методами современной протеомики
Торшин И.Ю., Згода В.Г., Громова О.А., Баранов И.И.,
Демидов В.И., Назаренко О.А., Сотникова Н.Ю.,
Каримова И.М. 31

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Определение острой токсичности и негативного
воздействия высоких доз аскорбата лития
при длительном применении на крысах линии Вистар
Остренко К.С., Сардарян И.С., Громова О.А.,
Колоскова Е.М., Пронин А.В., Торшин И.Ю. 43

КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Здоровьесберегающие технологии поддержки
микронутриентами функции зрения
у студентов с миопией
Егорова Е.Ю., Быков А.Т., Громова О.А.,
Торшин И.Ю., Слышалова Н.Н., Хватова Н.В. 55

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№4
2016



Издательство
ОКИ

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

Belousov Yuri

Corresponding Member RAS,

Ph.D., Professor, Moscow

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

Honored Scientist RF, Ph.D.,

Professor, Moscow

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

Ph.D., Professor, Moscow

Kazey Andrey

Ph.D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Kulmagambetov Ilyas

Ph.D., Professor, Academician
National Academy of Sciences,
Almaty, Kazakhstan

Mirzoyan Ruben

Honored Scientist RF, Ph.D.,

Professor, Moscow

Nasonov Alexander

Ph.D., Moscow

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Sokolov Andrey

Ph.D., Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Starodubtcev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

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-oki.ru

Zhuk Elena

Design and layout

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 12.10.2016

Typography: LCC «MEDIACOLOR», www.mediacolor.ru

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

FGBI «Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusova» RAS

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. Copyright 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.Pharmacokinetics.ru

www.ClinVest.ru

www.Clinical-Pharmacy.ru

www.Pharmacogenetics-Pharmacogenomics.ru

Journals

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics

Good Clinical Practice

Clinical Pharmacy

Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.Izdat-OKI.ru

Center of Pharmacoeconomics

Reserch Market Access Solutions

Publisher OKI

CONTENTS

PHARMACOKINETICS STUDIES

A comparative study of pharmacokinetics of coated tablets of mycophenolic acid

Khokhlov A.L., Yaichkov I.I., Shitova A.M., Shitov L.N.,

Dzhurko Yu.A., Miroshnikov A.E. 3

STUDIES OF PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METABOLITES

The metabolites of vitamin D: role in the diagnosis

and in the therapy of vitamin-D-dependent pathologies

Gromova O.A., Torshin I.Yu., Gilels A.V.,

Grishina T.R., Tomilova I.K. 9

PRECLINICAL STUDIES

Comparative chemoreactome analysis of mexidol

Torshin I.Y., Gromova O.A., Sardaryan I.S.,

Fedotova L.E., Semenov V.A. 19

PROTEOMIC ANALYSIS

Analysis of the light peptide fraction of Laennec by proteomic methods

Torshin I.Yu., Zgoda V.G., Gromova O.A.,

Baranov I.I., Demidov V.I., Nazarenko O.A.,

Sotnikova N.Yu., Karimova I.M. 31

SECURITY RESEARCH

Determination of acute toxicity and adverse effects

of high doses of prolonged use of lithium

ascorbate on Wistar rats

Ostrenko K.S., Sardaryan I.S., Gromova O.A.,

Koloskov E.M., Pronin A.V., Torshin I.Yu. 43

CLINICAL STUDIES

Healthsaving technologies of supporting

micronutrients functions of eye-sight

at students with myopia

Egorova E.Yu., Bykov A.T., Gromova O.A.,

Torshin I.Yu., Slushalova N.N., Khvatova N.V. 55

CONTENTS

Исследование сравнительной фармакокинетики таблетированных форм микофеноловой кислоты

Хохлов А.Л.¹, Яичков И.И.¹, Шитова А.М.², Шитов Л.Н.^{1,2},
Джурко Ю.А.², Мирошников А.Е.¹

¹ – ФГБОУ ВО «Ярославского государственного медицинского университета» МЗ РФ, г. Ярославль

² – ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», г. Ярославль

Резюме. В рамках открытого, рандомизированного, перекрёстного исследования с 14-дневным периодом отмычки, с двумя последовательностями была изучена биоэквивалентность двух таблетированных форм микофеноловой кислоты на 48 добровольцах (дозировка 360 мг). Для анализируемых препаратов рассчитаны следующие фармакокинетические параметры: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , C_{max}/AUC . 90% доверительные интервалы для отношения геометрических средних значений параметров AUC_{0-t} и C_{max} микофеноловой кислоты составили 98,97–111,49% и 121,27–153,94% соответственно. Верхняя граница доверительного интервала, соответствующего параметру C_{max} , выходит за рамки допустимого согласно протоколу исследования диапазона (75–133%), что не позволило констатировать биоэквивалентность исследуемых препаратов. Также были проанализированы возможные причины расхождений фармакокинетических параметров.

Ключевые слова: микофеноловая кислота, фармакокинетика, биоэквивалентность

A comparative study of pharmacokinetics of coated tablets of mycophenolic acid

Khokhlov A.L.¹, Yaichkov I.I.¹, Shitova A.M.², Shitov L.N.^{1,2}, Dzhurko Yu.A.², Miroshnikov A.E.¹

¹ – The Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl

² – Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, Yaroslavl

Abstract. In a single-dose, two-treatment, two-period, two-sequence crossover study with a 14-days washout period was carried out the bioequivalence study of two tablet coated formulation of mycophenolic acid that given to 48 volunteers in equal doses (dosage 360 mg). There were calculated the followed parameters: AUC_{0-t} , C_{max} , T_{max} , C_{max}/AUC . 90% confidence interval for ratio of geometric mean AUC_{0-t} values was 98,97% – 111,49% and one for ratio of geometric mean C_{max} was 121,27% – 153,94%. The upper limit of the confidence interval of C_{max} values goes beyond the permissible range according to the protocol study (75-133%). It is not possible to state bioequivalence of drugs. Possible causes of discrepancies of pharmacokinetic parameters were analyzed.

Keywords: mycophenolic acid, pharmacokinetics, bioequivalence

Автор, ответственный за переписку:

Яичков Илья Игоревич – аспирант кафедры клинической фармакологии с курсом ИПДО ФГБОУ ВО «Ярославский государственные медицинский университет» МЗ России; 150043, Ярославль, ул. Автозаводская, д. 29, кв. 97; тел. +7 (910) 977-74-98; e-mail: ilya_1993_08@mail.ru

Введение

Внастоящее время трансплантация является наиболее перспективным направлением в лечении пациентов с тяжёлыми заболеваниями внутренних органов, позволяющим увеличить продолжительность жизни, обеспечить их физическую, социальную и психологическую адаптацию. Все реципиенты почки получают длительную иммуносупрессивную терапию, целью которой является предупреждение отторжения. Повышению не только краткосрочной, но и долгосрочной выживаемости способствовало внедрение в клиническую практику новых иммуносупрессивных препаратов – производных микофеноловой кислоты, которая впервые была выделена из плесневого гриба *Penicillium glaucum* в 1889 г. Применение препаратов данной группы способствует сильному, селективному, обратимому и неконкурентному ингибированию инозинмонофосфатдегидрогеназы – фермента, необходимого для синтеза гуанозина, а также предотвращению его инкорпорации в ДНК. Таким образом, приём

микофеноловой кислоты подавляет рост и деление лимфоцитов, что приводит к подавлению продукции цитокинов и ограничивает усиление иммунного ответа. Этот эффект сопровождается снижением экспрессии определённых рецепторов на поверхности Т-лимфоцитов, которые отвечают как за активацию цитокинов, так и за прямое распознавание клеток. В итоге данный препарат индуцирует апоптоз лимфоцитов, в очень низких концентрациях также подавляет *in-vitro* пролиферацию стимулированных митогенами В- и Т-лимфоцитов периферической крови человека.

В 90 гг. XX века был внедрён первый препарат микофеноловой кислоты – мофетила микофенолат, который успешно применяется в клинической практике. Однако эффективность терапии может снижаться в связи с развитием нежелательных побочных явлений, таких как гематологические, лимфопролиферативные заболевания, повышенный риск оппортунистических инфекций (цитомегаловирусной, герпесвирусной), желудочно-кишечных расстройств (тошноты, рвоты, диареи, гастрита и др.). Развитие побочных реакций

Таблица 1

Характеристика валидационных параметров методики

№ п/п	Валидационный параметр	Результаты
1	Селективность	Анализ 6 образцов бланковой плазмы крови и плазмы, содержащей аналит и внутренний стандарт, показал отсутствие интерференции в области времени удерживания микофеноловой кислоты и дейтерированного стандарта (рис. 1, 2)
2	LLOQ*	0,5 мкг/мл (точность 104,85% от теоретической, прецизионность (CV**) – 7,45%
3	Линейность	Диапазон концентраций: 0,50 – 30,00 мкг/мл. Коэффициент корреляции калибровочной кривой (r) находился в диапазоне от 0,9985 до 0,9996
4	Прецизионность и точность	Точность находилась в пределах от 99,76% до 111,38% внутри калибровочного диапазона. CV не превышал 9,01%
5	Степень извлечения	90,33%
6	Отсутствия влияния разведения	Образцы плазмы с добавлением аналита в концентрации 45,0 мкг/мл разводились в 2 раза пустой плазмой. Точность определения составила 100,16%
7	Эффект влияния матрицы	CV не превышал 11,94%
8	Стабильность	Краткосрочная (24 ч)
		99,18% от номинальной концентрации
		Долгосрочная (37 дней)
		100,38% от номинальной концентрации
		При замораживании/размораживании
		105,10% от номинальной концентрации
Примечание: *Нижний предел количественного определения; **Коэффициент вариации.		

может приводить к снижению дозы препарата, а иногда к временному прекращению приёма или полной отмене терапии. Это послужило стимулом к созданию более усовершенствованной формы доставки активно действующего вещества.

В 2002 г. в Европе был зарегистрирован микофенолат натрия, покрытый кишечнорастворимой оболочкой с целью защиты верхних отделов ЖКТ от токсического воздействия микофеноловой кислоты, в результате обеспечивая доставку активного вещества непосредственно в тонкий кишечник. В 2004 г. FDA одобрило к применению микофенолат натрия в комбинации с циклоспорином А и кортикостероидами для профилактики отторжения трансплантата после пересадки почки [1–5].

Согласно Guidelines on renal transplantation European Association of Urology 2013, в настоящее время применение микофенолатов при трансплантации почек является «золотым стандартом» [6].

Цель исследования

Целью данного исследования является оценка биоэквивалентности новой тестируемой таблетированной формы микофеноловой кислоты¹ и оригинального препарата².

¹ Производитель тестируемого препарата не разглашается из соображений конфиденциальности.

² Торговое название и производитель оригинального препарата не указан из-за соображений конфиденциальности

Методы исследования

Аналитическая методика

Оценка биоэквивалентности проводилась посредством изучения содержания микофеноловой кислоты в плазме крови испытуемых с помощью ВЭЖХ-МС/МС методики, описанной An-Sofie Decavele, Niels Favoreel, Fien Vander Heyden and Alain G. Verstraete с модификациями [7]. Для проведения анализов использовалась ВЭЖХ-МС/МС-система, оснащённая трёхквadrupольным масс-спектрометрическим детектором ThermoScientific TSQ Quantum Discovery Max. Данная методика валидирована в соответствии с требованиями Руководства по экспертизе лекарственных средств [8]. Полученные результаты валидационных тестов представлены в табл. 1.

Дизайн исследования

Исследование проводилось на 48 здоровых добровольцах в возрасте от 18 до 45 лет, соответствующих критериям включения. Дизайном исследования были предусмотрены 6 дублёров. Испытуемые были разделены на 2 группы случайным образом, согласно схеме рандомизации. Все участники тестировались на предмет употребления наркотических веществ и алкоголя. Женщинам дополнительно проводился тест на беременность. Общий анализ, биохимия крови и ЭКГ были проведены дважды: до начала исследования и после его окончания. Период между введениями препаратов составлял 14 дней. Взятие

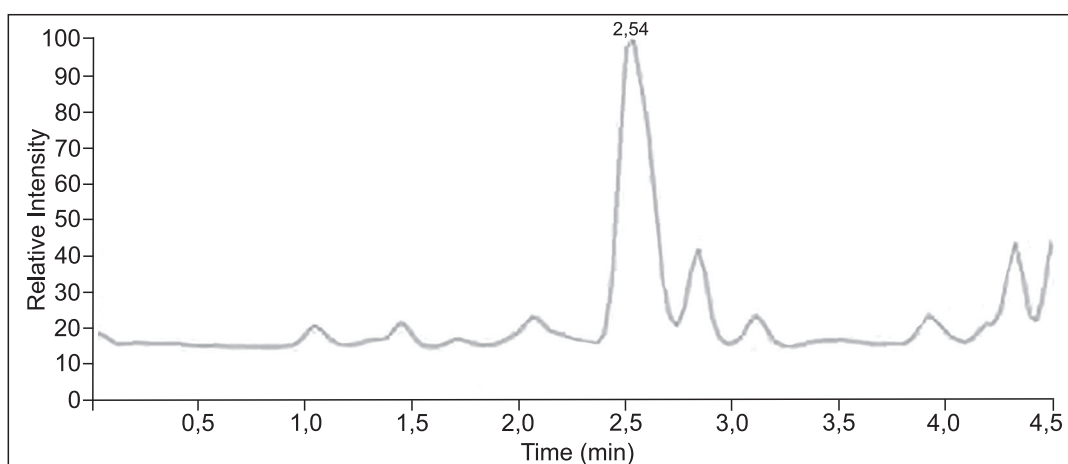


Рис. 1. Хроматограмма бланковой плазмы

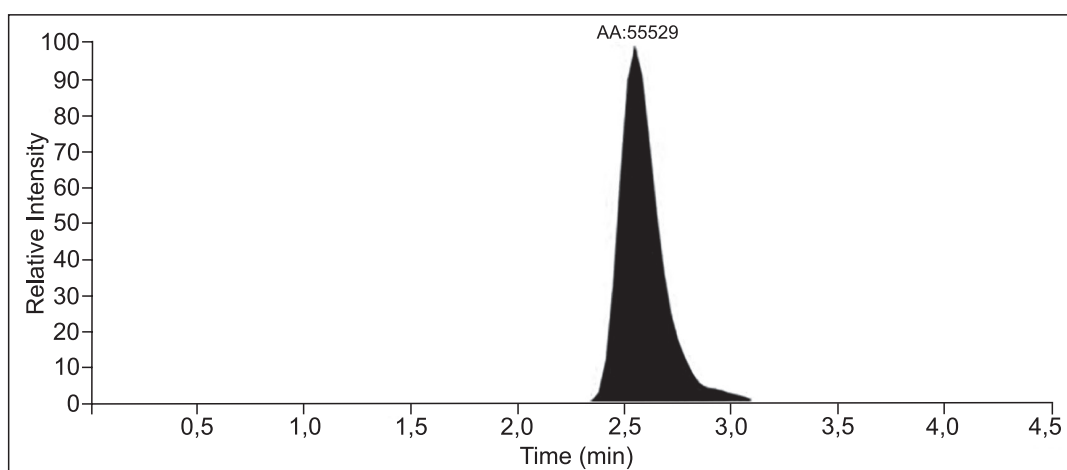


Рис. 2. Хроматограмма плазмы с добавлением микофеноловой кислоты в концентрации 0,5 мкг/мл

образцов крови для последующего количественного определения микофеноловой кислоты проводили до приёма лекарственного препарата и через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 12 ч, 18 ч, 24 ч, 48 ч и 72 ч после приёма таблеток в дозировке 360 мг. После отбора пробирку с кровью плавно переворачивали 4–5 раз, для избежания образования сгустка и центрифугировали в течение 10 минут при скорости 2 500 об/мин. Время от момента забора крови до начала центрифугирования составляло не более 15 минут. Далее, пробирки с отобранной плазмой замораживали до температуры не выше -20°C . Всего было отобрано и проанализировано 1 536 образцов крови в течение 2-х этапов.

Статистический анализ и расчёт фармакокинетических параметров

Статистический анализ выполняли с помощью программ StatSoft STATISTICA v.12, статистического пакета R, модуль Bear (Lee, Hsin-ya and Lee, Yung-jin, bear: Data Analysis Tool for Average Bioequivalence and Bioavailability) и Microsoft Excel 2007. Для каждого

добровольца по данным зависимости концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови от времени предполагалось рассчитать следующие фармакокинетические параметры, необходимые для оценки биоэквивалентности сравниваемых лекарственных препаратов:

- $C_{\max}$ — максимальное измеренное значение концентрации лекарственного вещества в плазме крови добровольца;
- $TC_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества в плазме крови добровольца;
- AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени (момент приёма препарата), до времени отбора последнего отбора крови, при котором концентрация препарата равна или выше нижнего предела количественного определения;
- $AUC_{0-\infty}$ — площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности;
- $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ — отношение значений AUC_{0-t} к $AUC_{0-\infty}$;
- $C_{\max}/AUC$ — относительная скорость всасывания;

• MRT — среднее время удержания ЛС в крови (среднее резидентное время).

- k_{el} — константа элиминации;
- $T_{1/2}$ — период полувыведения ЛС.

Фармакокинетические кривые микофеноловой кислоты имеют мультипиковый характер, связанный с кишечно-печёночной рециркуляцией исследуемого вещества. В связи тем, что у большинства добровольцев конечный моноэкспоненциальный участок кинетической кривой содержал менее трёх точек со значениями концентрации, равными или превышающими нижний предел количественной оценки, осуществление процедуры нелинейного регрессионного анализа для вычисления константы элиминации и связанных с ней параметров ($AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$, MRT) было невозможно. По указанной причине расчёт параметров k_{el} , $AUC_{0-\infty}$, $T_{1/2}$ и MRT не был выполнен.

Значения параметров C_{max} и TC_{max} оценивали, как наибольшее из измеренных значений концентрации и соответствующее время наблюдаемого максимума. Величину AUC_{0-t} рассчитывали при помощи метода трапеций.

В предположении о лог-нормальном распределении, сравнение средних значений параметров C_{max} , AUC_{0-t} и C_{max}/AUC_{0-t} для исследуемого препарата и препарата сравнения проводилось на основе мультипликативной модели, а доверительные интервалы строились для отношений соответствующих геометрических средних значений. После проведения логарифмического преобразования эти показатели анализировались с помощью дисперсионного анализа (ANOVA; параметрический метод). Дисперсионный анализ применялся для проверки гипотез о статистической значимости вклада различных факторов (различия между препаратами, различия между испытуемыми, последовательность приёма препаратов, периоды исследования) в наблюдаемую вариативность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации использовалась при расчёте доверительного интервала для отношения геометрических средних значений соответствующего параметра. Процедура статистического сравнения состояла в вычислении двусторонних 90%-х доверительных интервалов для отношений соответствующих геометрических средних значений для исследуемого препарата и препарата сравнения.

В данном исследовании были установлены следующие критерии приемлемости: границы оценённого доверительного интервала для AUC_{0-t} или $AUC_{0-\infty}$ находятся в пределах 80–125%; для показателей C_{max} и C_{max}/AUC_{0-t} , $C_{max}/AUC_{0-\infty}$, характеризующихся большей вариативностью, эти пределы составляли 75–133%.

Результаты

В популяцию для оценки фармакокинетических параметров вошли данные 45 добровольцев.

Фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов представлены в табл. 2.

Усреднённые фармакокинетические профили концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма, тестируемого и референтного препаратов представлены на рис. 3.

Таблица 2

Фармакокинетические параметры тестируемого и референтного препаратов

Параметр	Тестируемый препарат	Референтный препарат
C_{max} , мкг/мл	17,08±6,54 ¹	12,68±5,34
T_{max} , ч	1,50(0,75–4,00) ²	3,00(1,00–4,00)
AUC_{0-t} , мкг/мл·ч	23,49±8,46	22,79±9,75
C_{max}/AUC_{0-t} , ч ⁻¹	0,7510±0,2159	0,5757±0,1699
Примечание: ¹ Среднее арифметическое ± стандартное отклонение (M±SD); ² Медиана (минимальное—максимальное значение).		

Как видно из данных, представленных в табл. 2, среднее значение максимальной концентраций микофеноловой кислоты (C_{max}), определяемой в плазме крови добровольцев при приёме тестируемого препарата, выше аналогичного показателя, наблюдаемого при приёме референтного препарата: для тестируемого препарата данный показатель, составил 17,08 ± 6,54 мкг/мл (диапазон от 5,22 до 29,31 мкг/мл), для референтного — 12,68 ± 5,34 мкг/мл (диапазон от 3,07 до 23,34 мкг/мл). Различия между препаратами по параметру C_{max} являются статистически значимыми ($p = 0,000$, критерий Уилкоксона).

Как было отмечено выше, сравнение фармакокинетических профилей тестируемого и референтного препаратов продемонстрировало несовпадение времён достижения максимальной концентрации. Медианы TC_{max} для тестируемого и референтного препаратов были равны 1,5 ч и 3 ч соответственно. Различия между препаратами по параметру TC_{max} являются статистически значимыми ($p = 0,000$, критерий Уилкоксона).

Сравнение препаратов по площади под фармакокинетической кривой (AUC_{0-t}) показало, что данные показатели у тестируемого и референтного достаточно близки: средние значения AUC_{0-t} составили 23,49 ± 8,46 мкг·ч/мл (диапазон от 8,62 до 42,93) и 22,79 ± 9,75 мкг·ч/мл (диапазон от 6,94 до 50,04) для тестируемого и референтного препаратов соответственно. Различия между препаратами по параметру AUC_{0-t} статистически незначимы ($p = 0,375$, критерий Уилкоксона).

При сравнении тестируемого и референтного препаратов наблюдались следующие показатели скорости всасывания из желудочно-кишечного тракта (C_{max}/AUC_{0-t}): для тестируемого препарата данный пара-

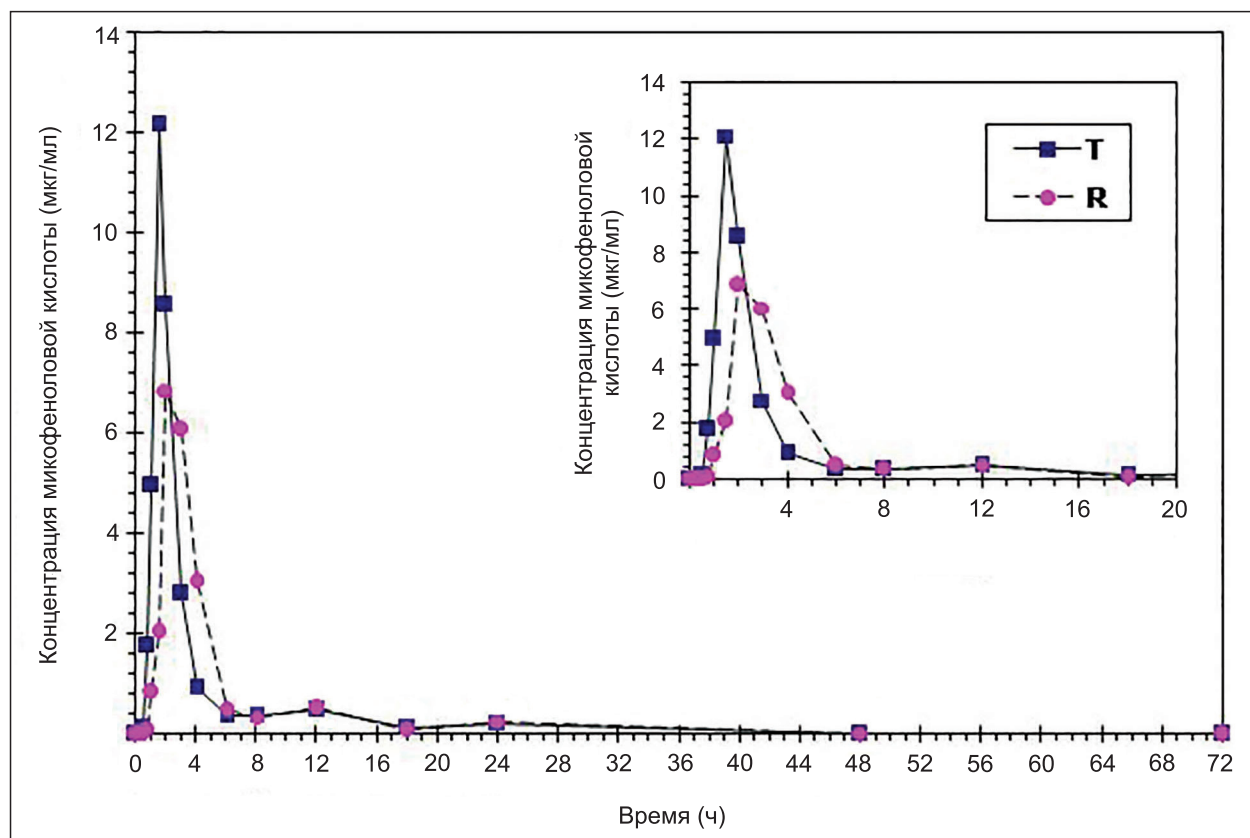


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические профили концентрации микофеноловой кислоты в плазме крови добровольцев после однократного приёма тестируемого (Т) и референтного (R) препаратов

метр ($M \pm SD$) составил $0,7510 \pm 0,2159 \text{ ч}^{-1}$, (диапазон от 0,2549 до 1,2514); для референтного препарата — $0,5757 \pm 0,1699 \text{ ч}^{-1}$, (диапазон от 0,2859 до 0,9939). Приведённые данные позволяют констатировать, что скорость всасывания действующего вещества из таблеток тестируемого препарата превышает аналогичный показатель референтного препарата. Различия между препаратами по параметру $C_{\max}/AUC_{0-t}$ статистически значимы ($p = 0,000$, критерий Уилкоксона).

Среднее геометрическое индивидуальных отношений $AUC_{0-t} (T) / AUC_{0-t} (R)$ (f') составило 105,05%, 90%-й доверительный интервал для логарифмически преобразованных данных: 98,97% — 111,49%, что укладывается в допустимый диапазон границ соответствующего доверительного интервала (80–125%). Среднее геометрическое индивидуальных отношений $C_{\max} (T) / C_{\max} (R)$ (f') составило 136,63%, 90%-й доверительный интервал для логарифмически преобразованных данных: 121,27% — 153,94%, верхняя граница выходит за рамки допустимого диапазона границ соответствующего доверительного интервала (75–133%). Значения коэффициентов внутрииндивидуальной вариабельности фармакокинетических параметров $C_{\max}$ и AUC_{0-t} составили 34,62% и 16,92% соответственно. Среднее геометрическое индивидуальных отношений $(C_{\max}/AUC_{0-t} (T)) / (C_{\max}/AUC_{0-t} (R))$ составило 130,07%, 90%-й доверительный интервал для логарифмически

преобразованных данных: 117,86% — 143,54%, верхняя граница выходит за рамки допустимого диапазона границ соответствующего доверительного интервала (75–133%).

Обсуждение

В результате выполненного исследования были показаны значимые различия фармакокинетики тестируемого и референтного препаратов. Тестируемый препарат характеризуется более высоким уровнем максимальной концентрации ($C_{\max}$) и более ранним временем её достижения ($TC_{\max}$): фармакокинетический профиль тестируемого препарата характеризуется ранним «острым» максимумом (см. рис. 3), тогда как профиль референтного препарата демонстрирует более плавное постепенное нарастание концентрации с достижением меньших уровней $C_{\max}$. Также следует отметить, что тестируемый препарат характеризуется более высокой скоростью всасывания действующего вещества ($C_{\max}/AUC$). При этом по основному показателю, характеризующему биодоступность действующего вещества из лекарственной формы — площади под фармакокинетической кривой (AUC), препараты не имеют значимых различий.

Доверительные интервалы для отношений геометрических средних значений показателей AUC_{0-t} тестируемого и референтного препаратов соответ-

ствуют допустимым пределам (80–125%), однако границы доверительных интервалов для отношений средних значений показателей $C_{\max}$ и $C_{\max}/AUC_{0-t}$ выходят за допустимые пределы (75–133%). В связи с этим препарат сравнения и тестируемый препарат не могут быть признаны биоэквивалентными.

Причиной различий в фармакокинетике изучаемых препаратов могли стать различия в параметрах технологического процесса. Так, более низкое давление прессования может быть причиной более быстрой дезинтеграции таблетированной формы и, как следствие, более быстрого всасывания действующего вещества.

Причины наблюдаемых различий также могут быть связаны с различиями в составе вспомогательных компонентов, входящих в состав исследуемых лекарственных препаратов. Содержание кукурузного крахмала — дезинтегранта, ускоряющего распад таблеток и скорость высвобождения действующего вещества в тестируемом препарате приблизительно в 3 раза больше, чем в референтном, а содержание связующих веществ повидона и кросс-повидона значительно ниже. Кроме того, содержание основного компонента оболочки — гипромеллозы фталата в исследуемом препарате примерно в 1,5 раза ниже, что также способствует более быстрому растворению оболочки и, следовательно, более быстрому всасыванию микофеноловой кислоты³. Данные различия в составе могли стать основной причиной получения неэквивалентных результатов.

³ Состав тестируемого препарата не разглашается из соображений конфиденциальности.

Вывод

По результатам проведённого исследования сравнительной фармакокинетики оригинальный препарат и тестируемый препарат не могут быть признаны биоэквивалентными по показателям $C_{\max}$ и $C_{\max}/AUC_{0-t}$. Исследуемый препарат имел более высокое значение максимальной концентрации в плазме и более высокую скорость всасывания по отношению к референтному. Данные различия могут быть обусловлены различным количеством разрыхляющих и связующих веществ.

Литература

1. Salvadori M., Holzer H., Mattos A., Sollinger H., Arns W., Oppenheimer F. et al. Enteric-coated mycophenolate sodium is therapeutically equivalent to mycophenolate mofetil in de novo renal transplant recipients. *Am J Transpl* 2003; 4: 231–236.
2. Budde K., Glander P. Pharmacokinetic principles of immunosuppressive drugs. *Ann Transplant* 2008; 13(3):5–10.
3. Hougardy J.M., Maufort L., Cotton F., Coussement J., Mikhalski D., Wissing K.M. et al. Therapeutic drug monitoring of enteric-coated mycophenolate sodium by limited sampling strategies is associated with a high rate of failure. *Clin kidn J* 2016; 3: 1–5.
4. Sobiak J., Resztak M., Glyda M., Szczepaniak P., Chrzanowska M. Pharmacokinetics of mycophenolate sodium co-administered with tacrolimus in the first year after renal transplantation. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*. 2016; 41: 331–338.
5. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Acute Kidney Injury Work Group. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney International Supple—ments* 2012; 1: 1–126.
6. Guidelines on renal transplantation European Association of Urology 2013, European Association of Urology 2013: 88.
7. Decavele An-S.C., Favoreel N., Heyden F.V., Verstraete A.G. Performance of the Roche Total Mycophenolic Acid assay on the Cobas Integra 400, Cobas 6000 and comparison to LC-MS/MS in liver transplant patients. *Clin Chem and Lab Med* 2011; 49 (7): 1159–65.
8. Руководство по экспертизе лекарственных средств, под ред. Миронова А. Н. Т. 1, М.: Гриф и К, Москва, 2013.

Метаболиты витамина D: роль в диагностике и терапии витамин-D-зависимых патологий

Громова О.А.¹, Торшин И.Ю.², Гилельс А.В.¹, Гришина Т.Р.¹, Томилова И.К.¹

¹ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

² – ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Долгопрудный

Резюме. В большинстве исследований по изучению взаимосвязи между витамином D и заболеваниями изучаются ассоциации только одного из метаболитов витамина D-25-гидроксивитамина D₃ (25(OH)D₃). При этом потенциальные эффекты уровней других метаболитов витамина D остаются вне внимания большинства исследователей. В настоящей работе рассмотрены биотрансформации холекальциферола, возможные ошибки в оценке дефицита D (связанные со свойствами тех или иных метаболитов витамина D₃), фундаментальные биологические роли метаболитов витамина D₃ и перспективы использования оценок уровней метаболитов витамина D₃ для клинической диагностики.

Ключевые слова: метаболиты витамина D, диагностика гиповитаминоза D, аквадетрим

The metabolites of vitamin D: role in the diagnosis and in the therapy of vitamin-D-dependent pathologies

Gromova O.A.¹, Torshin I.Yu.², Gilels A.V.¹, Grishina T.R.¹, Tomilova I.K.¹

¹ – FSBEI HE IvSMA Russian, Ivanovo

² – FSBEI HE Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

Abstract. Most studies on the relationship between vitamin D and various pathologies use only one of the metabolites of vitamin D-25-hydroxyvitamin D₃ (25(OH)D₃). Hence, the potential effects associated with changes in the levels of other vitamin D metabolites remain outside of the focus of most researchers. In this paper we analyze the known biotransformations of cholecalciferol, possible errors in the assessment of D deficiency related to the properties of various metabolites of vitamin D₃, a fundamental biological role of the different metabolites of vitamin D₃, and prospects for the use of the determination of vitamin D₃ metabolite levels for clinical diagnostics.

Keywords: metabolites of vitamin D, diagnosis of hypovitaminosis D, solubilization of vitamin D

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

За последнее десятилетие было показано, что достаточная обеспеченность организма витамином D, помимо поддержания здоровья костной и мышечной ткани, также необходима и для профилактики множества других патологий [1]. В результате, отмечается резкое возрастание количества анализов крови на содержание витамина D. Как правило, для оценки статуса пациента по витамину D измеряются концентрации 25-гидроксивитамина D в сыворотке крови.

К настоящему времени установлено существование более 50 метаболитов витамина D. Однако только два метаболита витамина D₃ – а именно, 25-гидроксивитамину D₃ («25(OH)D₃» или просто «25(OH)D») и 1,25-дигидроксивитамину D₃ («1,25(OH)₂D₃» или «1,25(OH)₂D»), получили наибольшее внимание исследователей [2]. Более того, подавляющее большинство эпидемиологических и клинических исследований ограничиваются измерениями только одного метаболита – 25(OH)D. Поэтому, весьма интересные и важные ассоциации показателей здоровья с концентрациями других метаболитов витамина D упускаются [3].

Традиция исследования только одного метаболита, 25(OH)D связана с тем, что именно этот метаболит

наиболее отчётливо ассоциирован с показателями здоровья костной ткани. Например, анализ ассоциаций уровней метаболитов витамина D в сыворотке крови с минеральной плотностью кости (МПК) показал, что только 25(OH)D был ассоциирован с более высокой МПК ($p = 0,054$, $n = 1773$, 18–50 лет). Данный показатель весьма информативен: разница в МПК между подгруппами пациентов с 25(OH)D < 20 нг/мл и 25(OH)D ≥ 30 нг/мл составила – 8,1 г/см³ (95% ДИ – 15–1,4) [4].

Другой причиной использования концентраций 25(OH)D как единственного биохимического маркера статуса витамина D является то, что приём препаратов витамина D в большей степени повышает именно уровни 25(OH)D. Например, дозозависимые эффекты приёма препаратов на основе различных метаболитов витамина D на метаболизм витамина D и абсорбцию кальция были исследованы в группе детей ($n = 323$). Дети были рандомизированы на группы – плацебо или приём 400, 1000, 2000 и 4000 МЕ/сут витамина D в течение 12 нед. Во всех группах, принимавших витамин D, отмечено выраженное увеличение концентрации 25(OH)D (например, +76 нмоль/л для 4000 МЕ/сут), в то время как изменения, например, концентрации 1,25(OH)₂D₃ в крови не были достоверными ($p > 0,05$) [5].

Тем не менее, информация об уровнях других метаболитов имеет и фундаментальное, и клиническое значение. В частности, такие метаболиты витамина D₃, как 1,24R,25(OH)₂D₃, 1,25S,26(OH)₂D₃, 1,25(OH)₂D₃ стимулируют адсорбцию кальция костной тканью и характеризуются синергидным противорахитическим эффектом [6]. Подчеркнём, что всасыванию кальция способствуют именно метаболиты холекальциферола, а не сам витамин D₃. Достоверный эффект на повышение всасывания кальция, например, от кальцитриола 1,25(OH)₂D₃ наблюдался даже при самой низкой дозе (0,5 мкг/сут), в то время как эффект от приёма витамина D₃ отмечен только при самой высокой дозе (50 000 МЕ/сут) и был опосредован биотрансформацией D₃ в 25(OH)D₃ [7]. Соотношение концентраций различных метаболитов витамина D является весьма перспективным диагностическим инструментом [3].

Настоящая работа представляет результаты систематического анализа фундаментальных и клинических исследований метаболитов витамина D. Последовательно рассматриваются биотрансформации холекальциферола, приводящие к образованию метаболитов витамина D, взаимосвязь уровней различных метаболитов витамина D₃ и ошибок в оценке дефицита витамина D. Также рассмотрены фундаментальные биологические роли метаболитов витамина D и предпосылки к использованию измеренных уровней метаболитов витамина D₃ как вспомогательного диагностического инструмента.

О биотрансформациях и фармакокинетике холекальциферола

Основные пути метаболизма производных витамина D₃ приведены на рис. 1. Каскад биотрансформаций метаболитов витамина D достаточно сложен. Напри-

мер, фермент CYP11A1 может гидроксилировать (т. е. присоединять -ОН группу) холекальциферол к атому углерода в позициях 17, 20, 22 и 23 стероидного ядра с получением более чем 10 метаболитов, в т. ч. 20(OH)D₃, 20,23(OH)₂D₃, 20,22(OH)₂D₃, 17,20(OH)₂D₃ и др. Получаемые при этом метаболиты (в частности, 20(OH)D₃) оказывают *противовоспалительный эффект за счёт ингибирования синтеза и секреции ФНО и IL-6*, также повышая уровни противовоспалительного цитокина IL-10. В то же время, CYP11A1 не действует на 25(OH)D₃ – основную форму витамина в крови [8].

Наиболее изученным и принципиально важным маршрутом биотрансформаций поступающего с пищей холекальциферола является последовательное преобразование витамина D₃ в 25(OH)D₃ и, затем, в «биологически активный» кальцитриол 1,25(OH)₂D₃ (рис. 2). В этом процессе, фермент CYP2R1 в печени преобразует витамин D₃ в 25(OH)D₃, который переносится с током крови в почки, где фермент CYP27B1 трансформирует 25(OH)D₃ в 1,25(OH)₂D₃.

Кальцитриол (1,25-дигидроксивитамин D), активная форма витамина D, является одним из высокоактивных стероидных гормонов и, по осуществлению того или иного биологического воздействия, подвергается деградации. Ген CYP24A1 индуцируется уровнями 1,25(OH)₂D₃ и синтезируемый при активации гена одноимённый фермент осуществляет цепь реакций для получения наименее активной формы витамина, кальцитроевой кислоты (рис. 3). Схожий набор реакций происходит и при биодеградации 25(OH)D₃ под контролем фермента CYP24A1 с образованием 24,25-дигидроксивитамина; 24,25(OH)₂D₃ образуется из 25(OH)D₃ под контролем фермента P450cc24 (25-гидроксивитамин-D₃-24-гидроксилазы) [9].

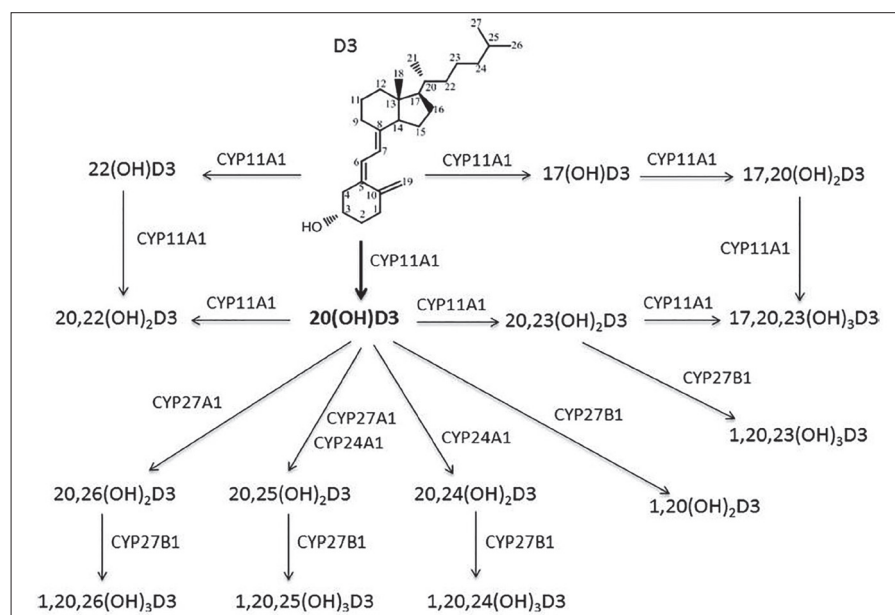
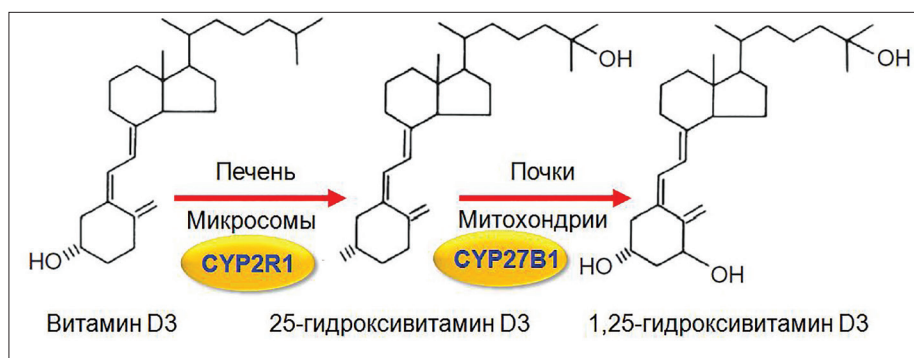
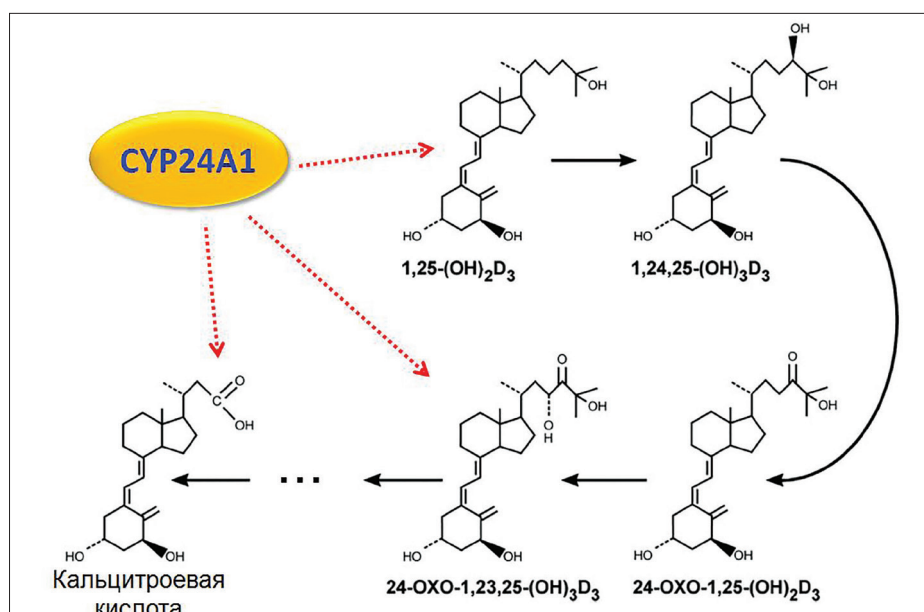


Рис. 1. Основные пути метаболизма витамина D₃ с участием ферментов-цитохромов CYP11A1, CYP27A1, CYP27B1 и CYP24A1

Рис. 2. Основной маршрут гомеостаза витамина D₃Рис. 3. Дегградация 1,25(OH)₂D₃

Несмотря на то что такие метаболиты, как 25(OH)D₃, 1,24R,25(OH)₃D₃, 1,23S,25(OH)₃D₃ характеризуются сниженным (по сравнению с 1,25(OH)₂D₃) сродством к рецептору VDR, они, всё же, дозозависимо активируют рецептор VDR. Данный эффект наблюдается даже для «неактивной» кальцитриевой кислоты [10]. Кальцитриевая кислота (которая хоть и считается «неактивным» метаболитом и продуктом окончательной деградации витамина D) в достаточно высоких концентрациях (IC₅₀—2,3±0,4 мкм/л) может активировать VDR-опосредованную транскрипцию. Кроме того, кальцитриевая кислота может быть одной из молекул-посредников, обеспечивающих защитные свойства витамина D против рака толстой кишки [11].

Поэтому, в соответствии с современными научными данными, даже кальцитриевую кислоту не следует именовать «неактивным» метаболитом витамина D. Этот вывод применим ко всем метаболитам витамина D. Различные метаболиты витамина D и их химические модификации отличаются по своим фармакологическим эффектам [12]:

- холекальциферол или кальцифедиол применяются у пациентов с нормальной функцией почек для коррекции дефицита витамина D;

- кальцитриол (1,25(OH)₂D₃) обладает самым мощным гиперкальциемическим эффектом, в т. ч. у пациентов с почечной недостаточностью, и существенно ингибирует активность паращитовидных желез (секреция ПТГ);

- 3-эпи-кальцитриол (3-эпи-1,25(OH)₂D₃) — сильный ингибитор секреции ПТГ с ослабленным гиперкальциемическим эффектом;

- альфакальцидол (1-(OH)D₃) назначают для лечения остеопороза и пациентам с дисфункцией почек для лечения гиперпаратиреоза.

Заметим, что стереотип именование кальцитриола как единственной «активной» формы витамина D сложился в первой половине XX века и подразумевает под «активностью» исключительно гиперкальциемический эффект витамина D. Действительно, 1,25-дигидроксивитамин D₃, по сравнению с другими эндогенными метаболитами витамина D, наиболее полно

активирует рецепторы витамина D [13]. Тем не менее, уровни $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в крови являются в каком-то смысле «низкоинформативным» маркером дефицита витамина D_3 , т. к., по данным многочисленных клинико-эпидемиологических исследований, более низкие уровни $25(\text{OH})\text{D}_3$ не коррелируют с более низкими уровнями $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и с проявлениями дефицита витамина D ($n = 3661$) [14].

Отсутствие корреляции обусловлено фундаментальными физиологическими причинами. Во-первых, концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ на несколько порядков выше, чем концентрации $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Поэтому, даже при очень низких уровнях $25(\text{OH})\text{D}_3$ в крови, имеющееся количество $25(\text{OH})\text{D}_3$ позволяет поддерживать концентрации $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на требуемом уровне.

Во-вторых, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является высокоактивным стероидным гормоном и его уровни жёстко регулируются посредством физиологических систем организма. В частности, как было отмечено выше, при избытке $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ активируется экспрессия гена 24-гидроксилазы CYP24A1, что приводит к деградации молекулы $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$.

Жёсткая регуляция уровней $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является характерной физиологической особенностью данного метаболита как у человека, так и у животных, проживающих в весьма различных географических зонах, вне зависимости от инсоляции. Например, концентрации более 10 различных молекул метаболома в сыворотке крови (в т. ч. метаболитов витамина D) были измерены у 12 диких видов кошачьих, включая степную рысь (*Felis caracal*), гепарда (*Acinonyx jubatus*), пуму (*Felis concolor*), кота-рыболова (*Felis viverrinus*), леопарда (*Panthera pardus*), льва (*Panthera leo*), оцелота (*Felis pardalis*), манула (*Felis manul*), барханного кота (*Felis margarita*), сервала (*Felis serval*), снежного барса (*Panthera uncia*) и тигра (*Panthera tigris*). Анализ проб крови на содержание общего холестерина, триацилглицеридов, ЛПВП- и ЛПНП-холестерина, $25(\text{OH})\text{D}$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, ретиноидов, токоферолов и каротиноидов указал на достоверные межвидовые различия в уровнях всех метаболитов, кроме $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [15]. Заметим, что установленные в данном исследовании уровни кальцитриола у кошачьих (30–130 пмоль/л) вполне соответствуют нормам кальцитриола для человека (42–169 пмоль/л).

Хроническая почечная недостаточность характеризуется существенным снижением биосинтеза кальцитриола $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ из $25(\text{OH})\text{D}_3$. С другой стороны, известно, что биологическая активность кальцитриола снижается при уремии как за счёт снижения экспрессии рецепторов витамина D, так и вследствие нарушения взаимодействия рецепторов витамина D с ДНК из-за избытка мочевины и мочевой кислоты при уремии [16]. Поэтому, состояние здоровья почек у конкретного пациента является одним из важнейших факторов, определяющих отклик пациентов на терапию препаратами холекальциферола.

У разных пациентов, приём витамина D приводит к разной величине отклика уровней $25(\text{OH})\text{D}$ в сыворотке крови. Эта изменчивость отражает, помимо состояния почек, различия в интенсивности процессов всасывания витамина D (уровни холекальциферола) и деградации витамина D (уровни $24,25(\text{OH})_2\text{D}$, кальцитроевой кислоты и др.). Несмотря на эти очевидные различия в фармакокинетическом отклике на препараты витамина D, практически все клинические исследования и рекомендации экспертов подразумевают назначение фиксированных доз витамина D для всех пациентов [17].

Также важно отметить, что определение уровней различных метаболитов витамина D позволяет выяснить различные аспекты фармакокинетического отклика организма на приём витамина. Например, в группе женщин с маргинальным дефицитом витамина D ($n = 91$, $25(\text{OH})\text{D} < 30$ нг/мл) участницы получали витамин D_3 (2500 МЕ/сут) в течение 6 мес [17]. Отмечено достоверное увеличение концентраций всех метаболитов витамина D (рис. 4).

Тем не менее, значимость этих изменений *уровней метаболитов* была различной. Так, динамика уровней холекальциферола показывает, что пациентки, обследованные в работе [17], не принимали препаратов витамина D до начала исследования, а содержание холекальциферола в их рационе было минимальным.

Возрастание *уровней $25(\text{OH})\text{D}$* в динамике обсуждаемого исследования указывает на то, что нижняя граница нормы $25(\text{OH})\text{D}$ (30 нг/мл) у значительной части пациенток была достигнута только через 6 мес терапии. У пациенток с $25(\text{OH})\text{D} < 30$ нг/мл даже после 6-месячного курса терапии можно предположить наличие нарушений функции печени, в которой, собственно, и происходит биосинтез $25(\text{OH})\text{D}$.

Возрастание *уровней $24,25(\text{OH})_2\text{D}$* в динамике исследования указывает на возрастание общей интенсивности гомеостаза витамина D. Оценка уровней $24,25(\text{OH})_2\text{D}$, наряду с уровнями холекальциферола и $25(\text{OH})\text{D}$, может являться эффективным способом подбора дозы витамина D у индивидуальных пациенток.

Достаточно интересной подгруппой метаболитов витамина D, возникающих в результате биотрансформаций, являются т. н. «эпимеры витамина D». Эпимерами называются стереоизомеры – т. е. молекулы с одинаковой структурой химических связей, но с различной стереохимической конфигурацией (левовращающей, правовращающей). Например, C3-эпимеры витамина D отличаются от известных метаболитов витамина D только конфигурацией гидроксильной группы у 3-го атома углерода стероидного ядра. Так, метаболиту $25(\text{OH})\text{D}_3$ соответствует C-3-эпимер $25(\text{OH})\text{D}_3$ (3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$). Молекула 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ также может подвергаться 1-гидроксилированию с образованием 3-эпи- $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, который, в свою очередь, связывается с рецептором ви-

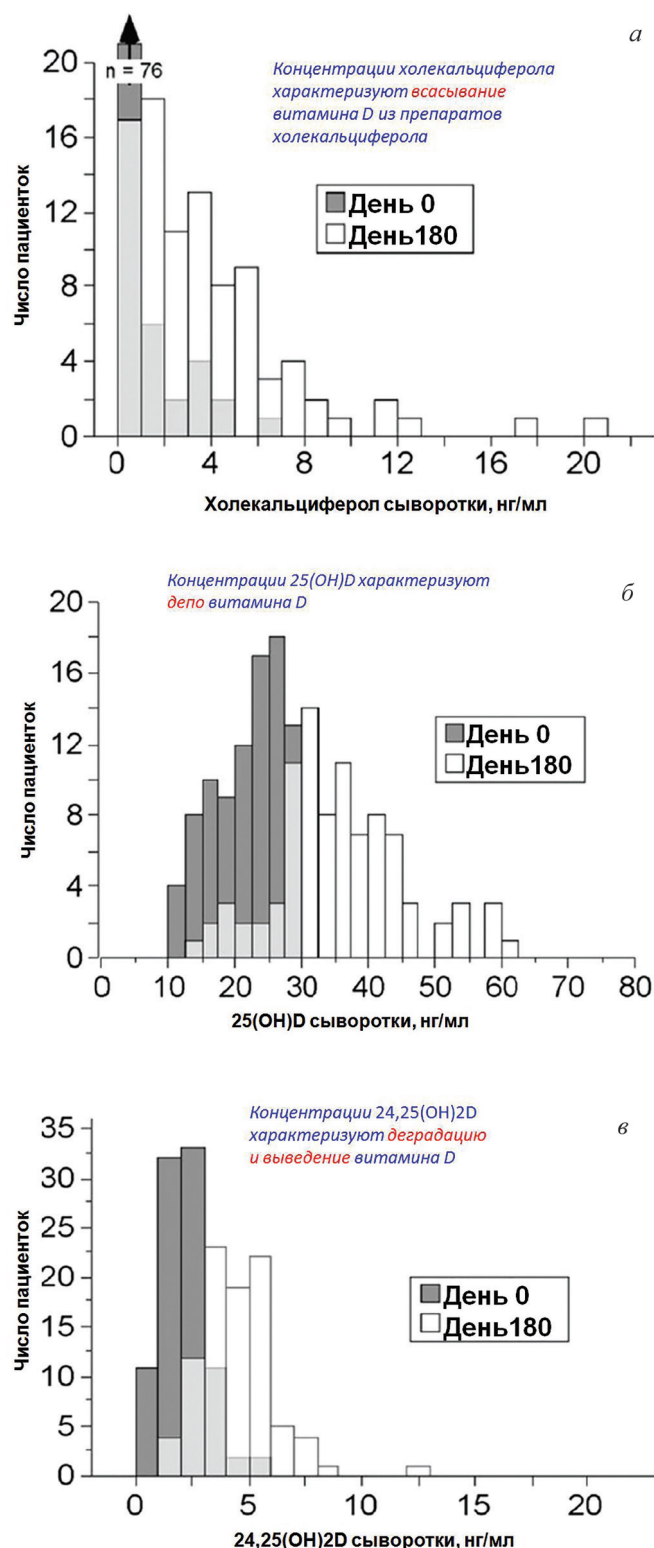


Рис. 4. Распределения уровней нескольких метаболитов витамина D в начале и в конце исследования. Представлены распределения частот встречаемости значений концентраций метаболитов на день «0» и на день «180» для (а) холекальциферола, (б) 25(OH)D и (в) 24,25(OH)₂D

Примечание: светло-серый цвет указывает на перекрытие данных на день «0» и «180»

тамина D (VDR). Хотя связывание 3-эпи-1,25(OH)₂D₃ VDR рецептором происходит с меньшим сродством по сравнению с 1,25(OH)₂D₃, данный С3-эпимер кальцитриола всё равно активирует транскрипцию витамин-D-зависимых генов [18].

Многие из эпимеров витамина D, во-первых, являются эндогенными (т. е. синтезируются в организме), и, во-вторых, могут характеризоваться существенно различными биологическими свойствами. Например, 3-эпи-1,25(OH)₂D₃, обнаруживаемый в концентрациях более 2,0 нг/мл у 41% здоровых добровольцев, характеризуется столь же сильным эффектом в подавлении секреции ПТГ, как и 1,25(OH)₂D₃. Однако 3-эпи-1,25(OH)₂D₃ характеризуется гораздо более слабыми кальциемическими эффектами, чем сам кальцитриол [19] (рис. 5). Поэтому, существование эпимеров несколько усложняет точное измерение концентраций метаболитов витамина D и приводит к завышенным оценкам уровней метаболитов.

Такие метаболиты витамина D, как холекальциферол, 25(OH)D₃ и 1,25(OH)₂D₃ характеризуются существенно различными фармакокинетическими

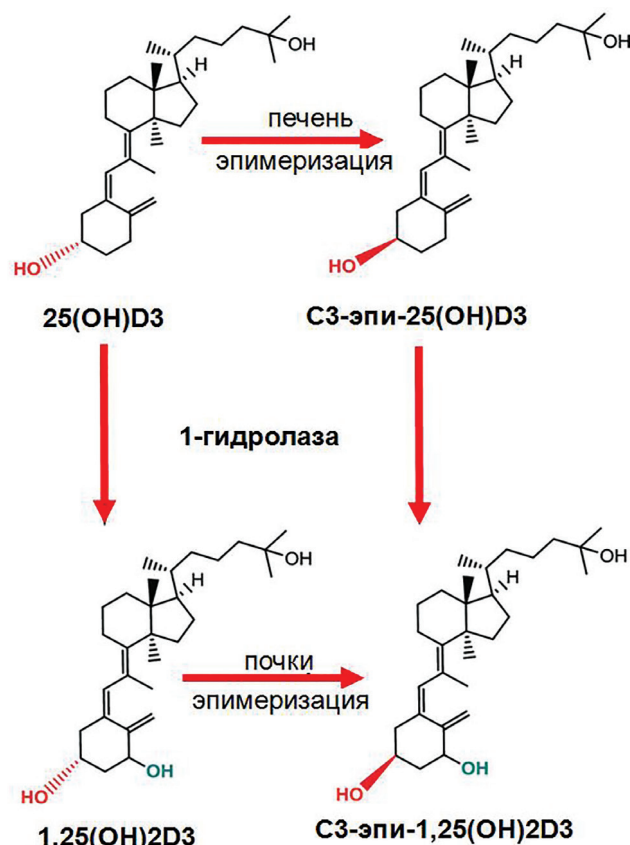


Рис. 5. Реакции эпимеризации метаболитов витамина D с образованием соответствующих стереоизомеров. Пунктирный треугольник к группе «ОН» обозначает химическую связь, находящуюся за плоскостью рисунка. Сплошной треугольник к группе «ОН» обозначает химическую связь, находящуюся перед плоскостью рисунка

свойствами. Воздействие приёма препаратов холекальциферола, $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ на уровни метаболитов витамина D в крови было изучено у здоровых добровольцев ($n = 116$, 28 ± 4 лет, потребление молока < 500 мл/сут, $25(\text{OH})\text{D} 67 \pm 25$ нмоль/л). Участники были рандомизированы на получение D_3 (25, 250 или 1 250 мкг/сут, 8 нед.), $25(\text{OH})\text{D}_3$ (10, 20 или 50 мкг/сут, 4 нед.) и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5, 1,0 или 1,0 мкг/сут, 2 нед.).

При приёме холекальциферола, у пациентов повышались уровни холекальциферола и $25(\text{OH})\text{D}$, но не уровни кальцитриола ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). При приёме $25(\text{OH})\text{D}_3$ повышались только уровни $25(\text{OH})\text{D}_3$, а при приёме $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — только уровни $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [20]. Были получены следующие оценки средних эффектов лечения здоровых взрослых (70 кг) для типично используемых дозировок этих метаболитов витамина D:

- 8-недельный курс витамина D_3 10 мкг/день (400 МЕ/сут) поднимает концентрацию холекальциферола в сыворотке крови на 4 нг/мл, а концентрацию $25(\text{OH})\text{D}$ на +4,4 нг/мл;
- 4-недельный курс $25(\text{OH})\text{D}_3$ (20 мкг/сут) поднимает уровни $25(\text{OH})\text{D}$ на +38 нг/мл;
- 2-недельный курс $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (0,5 мкг/сут) поднимает уровни $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ на +17 пмоль/л [20].

Метаболиты витамина D_3 и возможные ошибки в оценке дефицита D

Для определения уровней витамина D чаще всего используется хемилюминесцентный иммуноанализ, в котором для распознавания молекул используются моноклональные антитела. Поэтому на точность измерения уровней $25(\text{OH})\text{D}_3$ могут существенно влиять и другие метаболиты витамина D, весьма схожие с $25(\text{OH})\text{D}_3$ по химической структуре и ошибочно распознаваемые «моноклональным» антителом как $25(\text{OH})\text{D}_3$.

Например, при обследовании группы пациентов установлены следующие диапазоны значений концентраций различных метаболитов: $25(\text{OH})\text{D}_3$ — 7–60 нг/мл, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ — 10–100 пг/мл; 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ — 0,1–4,5 нг/мл [21]. Заметим, что при использовании стандартных тестов невозможно отличить молекулы $25(\text{OH})\text{D}_3$ и 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ в крови. Поэтому, получаемые значения $25(\text{OH})\text{D}_3$ могут быть завышены на 0,1–4,5 нг/мл за счёт 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$.

Более детальное исследование взаимосвязей концентраций различных метаболитов D_3 подтверждает этот вывод. Оценка точности определения 25-гидроксивитамина D в крупномасштабном клинико-эпидемиологическом исследовании ($n = 1100$) показала, что концентрации 3-эпи- $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ в высокой степени коррелируют с концентрацией $25(\text{OH})\text{D}_3$ в крови ($r = +0,95$). При этом концентрации каждого из этих метаболитов составляют 8–11% от концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ [22]. Таким образом, измеряемые концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ могут быть завышены на 16–22% (что составляет, в среднем, 5–8 нг/мл).

Биологические роли метаболитов витамина D_3 и данные фундаментальных исследований

Даже в случае наиболее исследованного эффекта витамина D (а именно, воздействие на гомеостаз костной ткани) биологически активным оказывается не только кальцитриол. Например, метаболиты витамина D_3 стимулируют остеогенную дифференцировку клеток пульпы зуба человека и клеток зубного фолликула. Установлено, что $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (в концентрациях 10–100 нМ) и $25(\text{OH})\text{D}_3$ (500 нМ) могут быть использованы в качестве индукторов остеогенеза зубов [23]. Применение метаболитов витамина D_3 способствовало активации процесса биоминерализации (рис. 6).

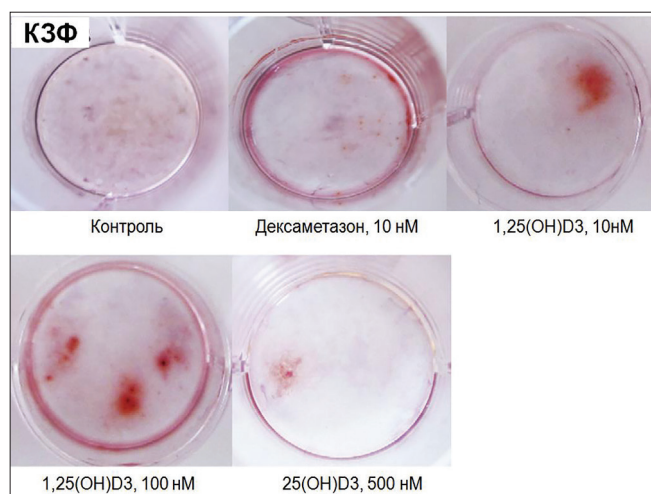


Рис. 6. Биоминерализация клеток зубного фолликула (КЗФ) при воздействии метаболитов витамина D_3 . Окрашивание клеток, в которых был стимулирован остеогенез, производилось ализариновым красным. Проведено сравнение с дексаметазоном (глюкокортикостероид, наиболее часто используемый для индукции остеогенеза)

Метаболиты витамина D, гидроксированные по 24-му атому углерода стероидного ядра (такие как $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) играют важную роль в заживлении переломов. В эксперименте дефицит активности цитохрома Cyp24a1, гидрокселирующего метаболиты витамина D по атому C-24, задерживает заживление перелома. Делеция гена CYP24A1 приводит к существенной задержке минерализации хрящевой матрицы и сопровождается снижением экспрессии генов-маркеров хондроцитов [24].

В росте хряща принимают участие различные метаболиты витамина D_3 . Уровни интерлейкина-1 в ростовой пластине хряща регулируются $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ [25]. Эпифизарные хондробласты содержат специфические рецепторы для $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, в то время как диафизарные остеобласты содержат специфические рецепторы для $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Во время эмбриогенеза и на ранних этапах постнатального развития, почки реагируют сначала на $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, а затем на $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ и на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Почки взрослого человека реагируют только на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Эпифизарные и диафизарные хондробласты на любой

стадии развития реагируют на $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, тогда как остеобласты реагируют только на $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Таким образом, например, метаболит $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ является одним из центральных факторов созревания хряща, особенно в период раннего постнатального развития [26].

В эксперименте, метаболиты витамина D ингибируют вирус гепатита C — холекальциферол (D_3), $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ проявляли противовирусную активность в микромолярном диапазоне концентраций. Сниженные концентрации $25(\text{OH})\text{D}_3$ ассоциированы с уменьшением ответной реакции организма на терапию интерфероном и рибавирином [27].

Тучные клетки преобразуют $25(\text{OH})\text{D}_3$ в $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ посредством цитохрома CYP27B1, и оба этих метаболита витамина D подавляют индуцируемые IgE провоспалительные реакции тучных клеток [28].

Метаболиты D_3 , $25(\text{OH})\text{D}_3$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ стабилизируют структуру эндотелия сосудов при физиологически значимых концентрациях. При этом эти эффекты метаболитов не зависят от «канонической» экспрессии генов, происходящей при активации рецептора витамина D (VDR) [29]. Холекальциферол (D_3) усиливал целостность межклеточных соединений, измеренных с помощью иммуноцитохимического окрашивания белка межклеточного взаимодействия кадгерина на фоне деструктивного воздействия провоспалительных цитокинов IL-1бета и ФНО-альфа. Таким образом, D_3 ингибирует дестабилизирующее воздействие провоспалительных цитокинов на межклеточные соединения в эндотелии (рис. 7).

Витамин D и его метаболиты ингибируют пролиферацию раковых клеток ($p < 0,001$) [30], чему имеются и клинические подтверждения. Так, низкие уровни $25(\text{OH})\text{D}$ (< 25 нг/мл), наряду с ожирением, низкой физической активностью и курением, являются независимыми факторами риска смертельного исхода у пациентов со злокачественной аденомой простаты ($n = 1822$, ОР — 1,6, 95% ДИ — 1,1–2,4, $p = 0,006$) [31], в то время как не было установлено ассоциаций с уровнями $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

Уровни метаболитов витамина D_3 и клиническая диагностика различных патологий

Как было отмечено ранее, более правильной процедурой исследования клинических эффектов витамина D было бы одновременное определение уровней всех известных метаболитов витамина D [21]. Обоснованием этого положения являются результаты клинических исследований, которые указывают уровни тех или иных метаболитов витамина D как независимых факторов риска патологий.

Например, в когорте пациентов, направленных на коронарную ангиографию ($n = 3299$), установлены независимые достоверные ассоциации различных метаболитов витамина D с субклинической анемией (гемоглобин — < 125 г/л, 16% участников). Пациенты

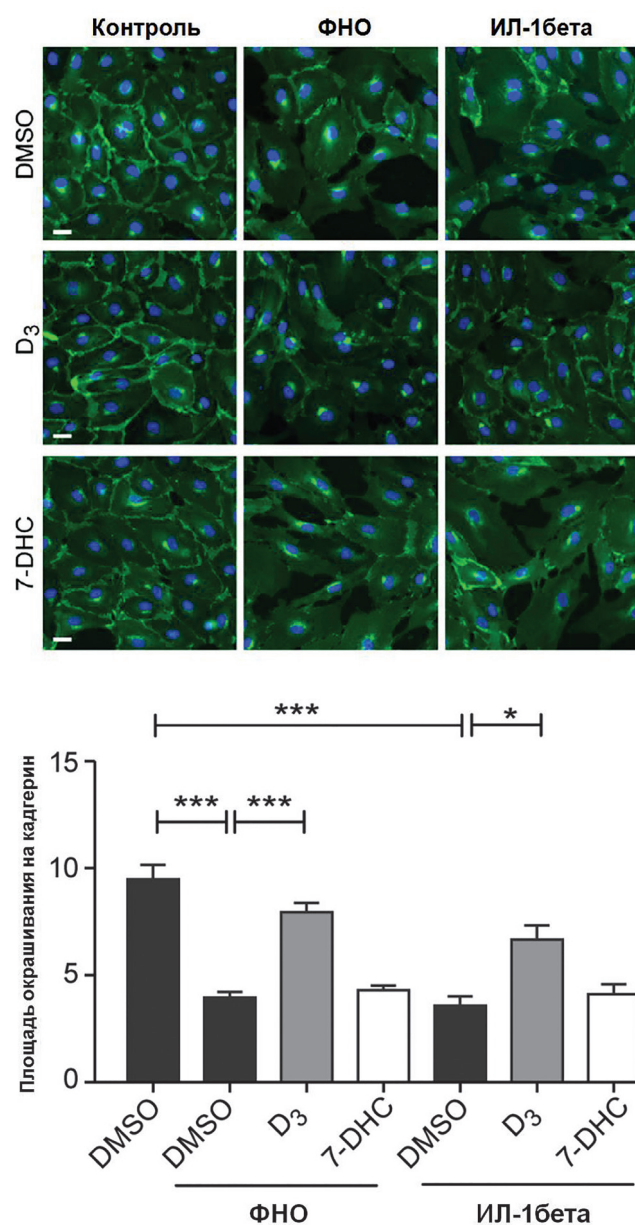


Рис. 7. Стабилизация холекальциферолом (D_3) межклеточных контактов. Эндотелиальные монослои клеток были подвержены действию провоспалительных IL-1бета и ФНО-альфа в присутствии контроля (DMSO, диметилсульфоксид; 7-DHC, 7-дигидрохолестерин) или D_3 . Клетки фиксировали и VE-кадгерин визуализировали с помощью иммунофлуоресцентной маркировки с последующим автоматизированным сбором и количественным анализом получаемых изображений. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

с $25(\text{OH})\text{D} < 12$ нг/мл (34% пациентов) имели на 6 г/л более низкие уровни гемоглобина (ОР — 1,5, 95% ДИ — 1,2–2,0) (рис. 8) [21].

В подгруппе пациентов с уровнями $1,25(\text{OH})_2\text{D} < 40$ пмоль/л (5,4%), по сравнению с подгруппой пациентов с $1,25(\text{OH})_2\text{D} > 70$ пмоль/л, гемоглобин был на 13 г/л ниже (ОР — 3,6, 95% ДИ — 2,3–5,5). Риск анемии был выше у пациентов с сочетанным дефицитом метаболитов $25(\text{OH})\text{D}$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (ОР — 5,1, 95% ДИ — 2,7–9,8).

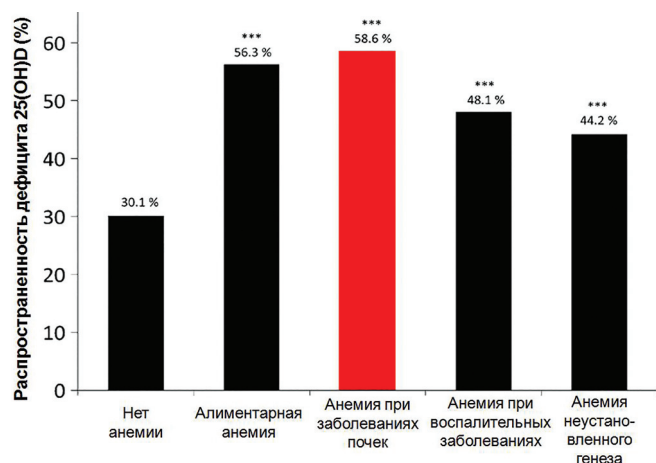


Рис. 8. Распространённость уровней $25(\text{OH})\text{D} < 30$ нмоль/л у пациентов с различными подтипами анемии.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ в сравнении с участниками без анемии

У пациентов с анемией на фоне хронической патологии почек отмечены самые высокие показатели распространённости дефицита метаболитов $25(\text{OH})\text{D}$ и $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ [21] (рис. 9).

Уровни метаболитов витамина D ассоциированы с риском анемии также и у пациентов, готовящихся к аорто-коронарному шунтированию ($n = 3\,615$). Как известно, даже субклиническая форма предоперационной анемии (гемоглобин — <125 г/л, встречалась у 27% пациентов) является независимым фактором риска послеоперационных осложнений. У пациентов с $25(\text{OH})\text{D} < 12$ нг/мл средние концентрации гемоглобина были на 0,5 г/дл ниже, чем у пациентов с $25(\text{OH})\text{D} > 20$ нг/мл ($p < 0,001$). Средние концентрации гемоглобина были на 12 г/л ниже у пациентов с $1,25(\text{OH})_2\text{D} < 40$ пмоль/л, чем у пациентов с $1,25(\text{OH})_2\text{D} > 70$ пмоль/л ($p < 0,001$). Риск анемии был наибольшим у пациентов с дефицитом как $25(\text{OH})\text{D}$, так и $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (OR — 3,6, 95% ДИ — 2,4–5,4) [32].

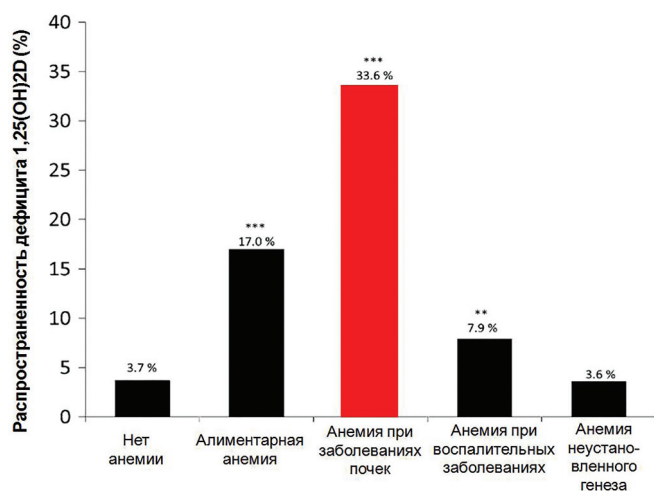


Рис. 9. Распространённость уровней $1,25(\text{OH})_2\text{D} < 40$ пмоль/л у пациентов с различными подтипами анемии.

** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ в сравнении с участниками без анемии

Концентрации $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ассоциированы с риском метаболического синдрома ($n = 2\,096$). Участники с уровнями $25(\text{OH})\text{D}$ более 30 нг/мл и $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ более 38 пг/мл продемонстрировали значительно более низкие шансы метаболического синдрома (OR — 0,4, 95% ДИ — 0,2–0,7) по сравнению со всеми другими участниками [33].

Уровни метаболитов витамина D в сыворотке крови ассоциированы с частотой рецидивов и инвалидностью у пациентов с рассеянным склерозом ($n = 267$). Уровни $25(\text{OH})\text{D}_3$ были достоверно ниже у пациентов с прогрессирующим фенотипом заболевания по сравнению с рецидивирующим-ремитирующим фенотипом (-12 нг/мл, $p = 0,04$). Ассоциация была достоверна и для уровней $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (-40 пмоль/л, $p = 0,018$). В то же время, низкие уровни $25(\text{OH})\text{D}_3$ были ассоциированы с высоким баллом по шкале EDSS (расширенная шкала Куртцке для оценки степени инвалидизации), в то время как уровни $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ не были достоверно ассоциированы с баллом по шкале EDSS [34] (рис. 10).

Гипотония мышц ассоциирована с низким уровнем в сыворотке крови метаболитов витамина D. Так, уровни 25-гидроксивитамина D ($r = 0,24$; $p = 0,0004$) и 1,25-дигидроксивитамина D ($r = 0,14$; $p = 0,045$) коррелировали с показателями мышечной силы у мужчин. У женщин только 1,25-гидроксивитамина D был достоверно ассоциирован с силой мышц ($r = 0,22$; $p = 0,03$) [35].

Низкие уровни метаболитов витамина D_3 в сыворотке крови ассоциированы с ревматоидным артритом. В группе пациенток ($n = 143$) у 16% отмечен глубочайший дефицит витамина D — уровни $25(\text{OH})\text{D}$ менее 5 нг/мл. В зимний сезон, у 73% пациенток отмечены уровни $25(\text{OH})\text{D}$ менее 20 нг/мл. При этом самые

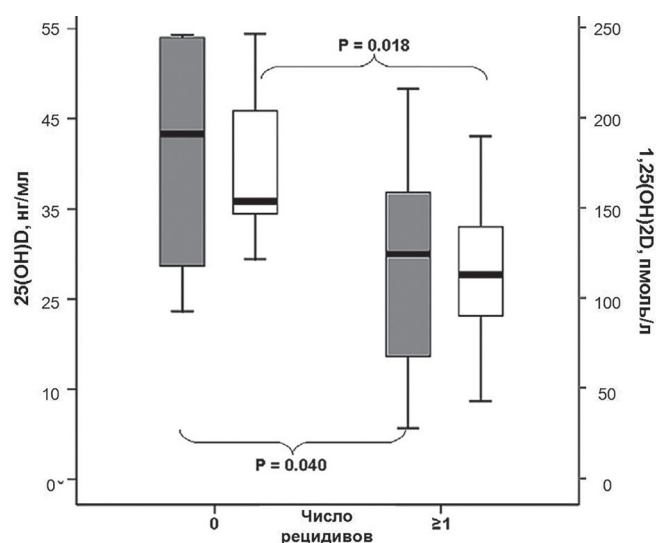


Рис. 10. Уровни метаболитов витамина D у пациентов с рассеянным склерозом ($n = 31$; длительность заболевания — ≤ 5 лет, балл EDSS $\leq 3,5$). Показаны данные для $25(\text{OH})\text{D}_3$ (серый цвет) и $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (белый цвет)

низкие значения уровней метаболитов витамина D₃ были обнаружены у пациенток с высокой активностью заболевания [3]. Установлено, что у пациентов с ревматоидным артритом ($n = 102$) концентрации 25(OH)D₃ и 1,25(OH)₂D также были достоверно ниже ($p = 0,01-0,001$). Показано, что более низкие уровни 25(OH)D₃, 24,25(OH)₂D₃, 25,26(OH)₂D в сыворотке крови соответствовали большей степени тяжести артрита [36].

Достаточно интересным и важным вопросом, имеющим отношение к клинической диагностике с использованием определения уровней метаболитов витамина D, является соотношение концентраций различных метаболитов. Например, при умеренной почечной недостаточности у детей было показано, что уровни 1,25(OH)₂D и 25(OH)D₃ были нормальными, а уровни 24,25(OH)₂D₃ были достоверно ниже у пациентов, и, что интересно, не показывали сезонных изменений. Терапия с помощью 25(OH)D₃ приводила к повышению уровней 25(OH)D₃ и 24,25(OH)₂D₃, но не 1,25(OH)₂D [37]. У пациенток с беременностью на фоне диабета ($n = 150$) уровни 25(OH)D₃ и 1,25(OH)₂D достоверно ниже, чем в контроле ($p = 0,001$), в то время как значения уровней 24,25(OH)₂D не отличаются между группами [38]. Эти и другие данные указывают на целесообразность определения уровней различных метаболитов витамина D в крови для получения более объективной клинической картины состояния пациента.

Заключение

У педиатров анализ «на витамин D» десятилетиями считался своего рода экзотическим лабораторным тестом, позволяющим проводить дифференциальный диагноз тяжёлых форм наследственно-обусловленных нарушений фосфорно-кальциевого обмена, и редко назначался. У терапевтов анализ «на витамин D» назначается несколько чаще, в связи с осознанием насущности проблемы остеопороза. Эти очевидные проблемы здоровья указали на необходимость определения в сыворотке крови уровней хотя бы одного метаболита витамина D — 25(OH)D₃, который действительно позволяет оценить обеспеченность организма витамином D у большинства пациентов. Например, с использованием определения уровней 25(OH)D₃ в крови в исследовании «Родничок-1» было показано, что применение водорастворимой фармацевтической формы витамина D (препарат Аквдетрим) позволяет эффективно компенсировать дефицит витамина D у детей до 3 лет [39].

Последующие клинико-эпидемиологические исследования показали, что уровни 25(OH)D₃ позволяют оценить обеспеченность витамином D, 1,25(OH)₂D₃ — состояние биосинтеза витамина D, а уровни 24,25(OH)₂D₃ — биodeградацию витамина D. Однако даже эта трёхчастная оценка является

упрощением, т. к. известно более 50 метаболитов витамина D. При этом пренебрежение, например, существованием эпимеров витамина D (что характерно для повсеместно используемого иммуноферментного анализа на витамин D) приводит к завышению обеспеченности организма витамином D на 8–16%, в среднем. Поэтому, даже уровни метаболита 25(OH)D₃ в сыворотке крови, равные 30 нг/мл и считающиеся «нормальными», для ряда пациента могут соответствовать умеренному гиповитаминозу D. Кроме того, существенными и специфическими биологическими активностями обладают и считающиеся ранее неактивными метаболиты 1,24R,25(OH)₂D₃, 1,23S,25(OH)₂D₃, 25,26(OH)₂D и др. Взаимосвязь дефицита витамина D с широчайшим кругом хронических заболеваний — сердечно-сосудистой и цереброваскулярной патологией, артериальной гипертонией, диабетом, ожирением, опухолевыми, инфекционными заболеваниями и др. указывает на необходимость определения уровней различных метаболитов витамина D для расширения диагностических возможностей.

Литература

1. Громова О.А., Торшин И.Ю. Витамин D — смена парадигмы. М.: ГэотарМед, 2017; 750.
2. Zerwekh J.E. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008; 87 (4): 1087S–1091S.
3. Muller M.J., Volmer D.A. Mass spectrometric profiling of vitamin D metabolites beyond 25-hydroxyvitamin D. *Clin Chem.* 2015; 61 (8): 1033–48 doi.
4. van Ballegooijen A.J., Robinson-Cohen C., Katz R., Criqui M., Budoff M., Li D., Siscovick D., Hoofnagle A., Shea S.J., Burke G., de Boer I.H., Kestenbaum B. Vitamin D metabolites and bone mineral density: The multi-ethnic study of atherosclerosis. *Bone.* 2015; 78: 186–93 doi.
5. Lewis R.D., Laing E.M., Hill Gallant K.M., Hall D.B., McCabe G.P., Hausman D.B., Martin B.R., Warden S.J., Peacock M., Weaver C.M. A randomized trial of vitamin D(3) supplementation in children: dose-response effects on vitamin D metabolites and calcium absorption. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 98 (12): 4816–25 doi.
6. Rambeck W.A., Weiser H., Meier W., Zucker H. Synergistic effects of vitamin D metabolites. *Ann Nutr Metab.* 1988; 32 (2): 108–111.
7. Heaney R.P., Barger-Lux M.J., Dowell M.S., Chen T.C., Holick M.F. Calcium absorptive effects of vitamin D and its major metabolites. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82 (12): 4111–4116.
8. Slominski A.T., Kim T.K., Li W., Yi A.K., Postlethwaite A., Tuckey R.C. The role of CYP11A1 in the production of vitamin D metabolites and their role in the regulation of epidermal functions. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014; 144 Pt A: 28–39 doi.
9. Sornes S., Bjoro T., Berg J.P., Torjesen P.A., Haug E. Calcitriol attenuates the basal and vasoactive intestinal peptide-stimulated cAMP production in prolactin-secreting rat pituitary (GH4C1) cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1994; 101 (1–2): 183–188.
10. Harant H., Spinner D., Reddy G.S., Lindley I.J. Natural metabolites of 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D(3) retain biologic activity mediated through the vitamin D receptor. *J Cell Biochem.* 2000; 78 (1): 112–120.
11. Teske K.A., Bogart J.W., Sanchez L.M., Yu O.B., Preston J.V., Cook J.M., Silvaggi N.R., Bikle D.D., Arnold L.A. Synthesis and evaluation of vitamin D receptor-mediated activities of cholesterol and vitamin D metabolites. *Eur J Med Chem.* 2016; 109: 238–46 doi.
12. Mazzaferro S., Goldsmith D., Larsson T.E., Massy Z.A., Cozzolino M. Vitamin D metabolites and/or analogs: which D for which patient? *Curr Vasc Pharmacol.* 2014; 12 (2): 339–349.

13. van Driel M., Pols H.A., van Leeuwen J.P. Osteoblast differentiation and control by vitamin D and vitamin D metabolites. *Curr Pharm Des.* 2004; 10 (21): 2535–2555.
14. Need A.G., O'Loughlin P.D., Morris H.A., Coates P.S., Horowitz M., Nordin B.E. Vitamin D metabolites and calcium absorption in severe vitamin D deficiency. *J Bone Miner Res.* 2008; 23 (11): 1859–63 doi.
15. Crissey S.D., Ange K.D., Jacobsen K.L., Slifka K.A., Bowen P.E., Stacewicz-Sapuntzakis M., Langman C.B., Sadler W., Kahn S., Ward A. Serum concentrations of lipids, vitamin d metabolites, retinol, retinyl esters, tocopherols and selected carotenoids in twelve captive wild felid species at four zoos. *J Nutr.* 2003; 133 (1): 160–166.
16. Schomig M., Ritz E. Management of disturbed calcium metabolism in uraemic patients: 1. Use of vitamin D metabolites. *Nephrol Dial Transplant.* 2000; 15: Suppl 5: 18–24.
17. Binkley N., Lappe J., Singh R.J., Khosla S., Krueger D., Drezner M.K., Blank R.D. Can vitamin D metabolite measurements facilitate a «treat-to-target» paradigm to guide vitamin D supplementation? *Osteoporos Int.* 2015; 26 (5): 1655–60 doi.
18. Singh R.J., Taylor R.L., Reddy G.S., Grebe S.K. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91 (8): 3055–61 Epub 2006 M.
19. Farrell C.J., Herrmann M. Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013; 27 (5): 675–88 doi.
20. Barger-Lux M.J., Heaney R.P., Dowell S., Chen T.C., Holick M.F. Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men. *Osteoporos Int.* 1998; 8 (3): 222–230.
21. Muller M.J., Stokes C.S., Lammert F., Volmer D.A. Chemotyping the distribution of vitamin D metabolites in human serum. *Sci Rep.* 2016; 6: 21080 doi.
22. Carter G.D., Jones J.C., Shannon J., Williams E.L., Jones G., Kaufmann M., Sempos C. 25-Hydroxyvitamin D assays: Potential interference from other circulating vitamin D metabolites. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2015; *J Steroid* : S0960–0760(15)3016.
23. Khanna-Jain R., Vuorinen A., Sandor G.K., Suuronen R., Miettinen S. Vitamin D(3) metabolites induce osteogenic differentiation in human dental pulp and human dental follicle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 122 (4): 133–41 doi.
24. St-Arnaud R. CYP24A1-deficient mice as a tool to uncover a biological activity for vitamin D metabolites hydroxylated at position 24. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2010; 121 (1–2): 254–6 doi.
25. Dean D.D., Schwartz Z., Muniz O.E., Arsenis C.H., Boyan B.D., Howell D.S. Interleukin-1 α and beta in growth plate cartilage are regulated by vitamin D metabolites in vivo. *J Bone Miner Res.* 1997; 12 (10): 1560–1569.
26. Somjen D., Earon Y., Harell S., Shimshoni Z., Weisman Y., Harell A., Kaye A.M., Binderman I. Developmental changes in responsiveness to vitamin D metabolites. *J Steroid Biochem.* 1987; 27 (4–6): 807–813.
27. Gutierrez J.A., Jones K.A., Flores R., Singhania A., Woelk C.H., Schooley R.T., Wyles D.L. Vitamin D Metabolites Inhibit Hepatitis C Virus and Modulate Cellular Gene Expression. *J Virol Antivir Res.* 2014; 3 (3). doi: 104172/2324-104178.
28. Yip K.H., Kolesnikoff N., Yu C., Hauschild N., Taing H., Biggs L., Goltzman D., Gregory P.A., Anderson P.H., Samuel M.S., Galli S.J., Lopez A.F., Grimbaldston M.A. Mechanisms of vitamin D(3) metabolite repression of IgE-dependent mast cell activation. *J Allergy Clin Immunol.* 2014; 133 (5): 1356–64, 1364e1–14.
29. Gibson C.C., Davis C.T., Zhu W., Bowman-Kirigin J.A., Walker A.E., Tai Z., Thomas K.R., Donato A.J., Lesniewski L.A., Li D.Y. Dietary Vitamin D and Its Metabolites Non-Genomically Stabilize the Endothelium. *PLoS One.* 2015; 10 (10): e0140370 doi.
30. Thomas M.G., Tebbutt S., Williamson R.C. Vitamin D and its metabolites inhibit cell proliferation in human rectal mucosa and a colon cancer cell line. *Gut.* 1992; 33 (12): 1660–1663.
31. Fang F., Kasperzyk J.L., Shui I., Hendrickson W., Hollis B.W., Fall K., Ma J., Gaziano J.M., Stampfer M.J., Mucci L.A., Giovannucci E. Prediagnostic plasma vitamin D metabolites and mortality among patients with prostate cancer. *PLoS One.* 2011; 6 (4): e18625.
32. Ernst J.B., Becker T., Kuhn J., Gummert J.F., Zittermann A. Independent association of circulating vitamin D metabolites with anemia risk in patients scheduled for cardiac surgery. *PLoS One.* 2015; 10 (4): e0124751 doi.
33. Bea J.W., Jurutka P.W., Hibler E.A., Lance P., Martinez M.E., Roe D.J., Sardo Molmenti C.L., Thompson P.A., Jacobs E.T. Concentrations of the vitamin D metabolite 1,25(OH) $_2$ D and odds of metabolic syndrome and its components. *Metabolism.* 2015; 64 (3): 447–59 doi.
34. Smolders J., Menheere P., Kessels A., Damoiseaux J., Hupperts R. Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2008; 14 (9): 1220–4 doi.
35. Bischoff H.A., Stahelin H.B., Tyndall A., Theiler R. Relationship between muscle strength and vitamin D metabolites: are there therapeutic possibilities in the elderly? *Z Rheumatol.* 2000; 59: Suppl 1: 39–41.
36. Als O.S., Riis B., Christiansen C. Serum concentration of vitamin D metabolites in rheumatoid arthritis. *Clin Rheumatol.* 1987; 6 (2): 238–243.
37. Taylor A., Norman M.E. Vitamin D metabolite profiles in moderate renal insufficiency of childhood. *Pediatr Nephrol.* 1988; 2 (4): 453–459.
38. Kuoppala T. Alterations in vitamin D metabolites and minerals in diabetic pregnancy. *Gynecol Obstet Invest.* 1988; 25 (2): 99–105.
39. Захарова И.Н., Мальцев С.В., Боровик Т.Э., Яцык Г.В., Малявская С.И., Вахлова И.В., Шуматова Т.А., Романцова Е.Б., Романюк Ф.П., Климов Л.Я., Пирожкова Н.И., Колесникова С.М., Курьянинова В.А., Васильева С.В., Мозжухина М.В., Евсеева Е.А. Результаты многоцентрового исследования «Родничок» по изучению недостаточности витамина D у детей раннего возраста в России. *Педиатрия.* 2015; 1: 62–67.

Сравнительный хемореактомный анализ мексидола

Торшин И.Ю.¹, Громова О.А.², Сардарян И.С.³,
Федотова Л.Э.³, Семенов В.А.^{1,4}

¹ – ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт», г. Долгопрудный

² – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

³ – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

⁴ – ФГБОУ ВО Кемеровская государственная медицинская академия Минздрава РФ, г. Кемерово

Резюме. В настоящей работе представлены результаты хемореактомного моделирования фармакологических эффектов этилметилгидроксипиридина сукцината (мексидол) в сравнении с контрольными молекулами (холина альфосцерат, пирацетам, глицин, семакс). Хемореактомный анализ показал, что мексидол может являться: 1) агонистом ацетилхолиновых и ГАМК-А рецепторов; 2) противовоспалительным агентом, эффекты которого осуществляются за счёт ингибирования синтеза провоспалительных простагландинов; 3) нейротропным агентом с нейротрофическими свойствами; 4) ингибитором коагуляции; 5) сахароснижающим средством; 6) гиполипидемическим средством. От молекул сравнения мексидол отличается более выраженный профиль безопасности (меньшее воздействие на серотониновые, дофаминовые и адренергические рецепторы, меньшая степень взаимодействия с калиевыми каналами сердца, ферментами MAO и цитохромами P450). Результаты моделирования позволяют уточнить механизм действия молекулы мексидола на молекулярном уровне.

Ключевые слова: мексидол, нейротропность, хемореактомный анализ, хемоинформатика, прогнозирование

Comparative chemoreactome analysis of mexidol

Torshin I.J.¹, Gromova O.A.¹, Sardaryan I.S.³,

Fedotova L.E.³, Semenov V.A.^{1,4}

¹ – Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny

² – FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo

³ – FSBI HPE «Saint Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg

⁴ – Kemerovo State Medical Academy of the RF Ministry of Health, Kemerovo

Abstract. The paper presents the results of chemoreactome modeling of the pharmacological effects of ethylmethylhydroxypyridine succinate (mexidol) as compared to control molecules (choline alfoscerate, piracetam, glycine, semax). Chemoreactome analysis showed that mexidol may be (1) an agonist of acetylcholine and GABA-A receptors; (2) an anti-inflammatory agent, the effects of which are carried out by inhibiting the synthesis of pro-inflammatory prostaglandins; (3) a neurotrophic agent with neuroprotective properties; (4) a coagulation inhibitor; (5) a diabetes medication and (6) a hypolipidemic agent. From the “control” molecules mexidol is distinguished by a more pronounced safety profile (a lower impact on serotonin, dopamine and adrenergic receptors, a lesser degree of interaction with the potassium channels of the heart, with the MAO enzyme and with the P450 cytochromes). The results of the chemoreactome modeling allowed us to formulate the mechanisms of action of mexidol at the molecular level.

Keywords: mexidol, neuroprotection, chemoreactome analysis, chemoinformatics, forecasting

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

В комплексной терапии пациентов с цереброваскулярной патологией (в частности, с ишемическим инсультом) широко используются препараты из перечня ЖНВЛП (жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов). Например, пациентам назначаются препараты, влияющие на парасимпатическую нервную систему (код АТХ N07A, например, холина альфосцерат и др.), мексидол (код АТХ N07X), пирацетам, глицин, семакс (пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и другие препараты с ноотропной активностью (код АТХ N06B).

Молекула этилметилгидроксипиридина сукцината (мексидол) является действующим началом одноименного препарата Мексидол® (фармацевтическая компания «БИОН»), а также многочисленных препаратов-дженериков (Медомекси, Мексibel, Мексидант, Мексикор, Мексиприм, Мексифин, Церекард и т. п.) [1]. Оригинальный препарат Мексидол® выпускается в разных лекарственных формах (раствор для внутривенного и внутримышечного введения; таблетки, покрытые оболочкой; таблетки, покрытые плёночной оболочкой) и оказывает положительное действие на состояние пациентов с ишемией головного мозга за счёт повышения синтеза АТФ, антиоксидантного,

антигипоксического, ноотропного, антитромботического, антиконвульсантного действия и др. [2].

Для более полного понимания условий, при которых клиническая эффективность мексидола будет максимальна, следует иметь как можно более полную информацию о молекулярных механизмах действия данной молекулы. Обычно считается, что основными механизмами действия мексидола являются антиоксидантный эффект и активация синтеза АТФ. Однако эти механизмы в принципе не могут объяснить наличие у мексидола ноотропного, антиконвульсантного и, тем более, анксиолитического действия.

Очевидно, что перечисленные эффекты не могут объясняться просто «антиоксидантным эффектом», синтезом АТФ и другими подобного рода «объяснениями». Показано, что мексидол модулирует активность сигнальных ферментов аденилатциклазы, рецепторов бензодиазепинов, ГАМК, ацетилхолина, улучшает микроциркуляцию и реологические свойства крови, уменьшает агрегацию тромбоцитов [3, 4], что также не может быть объяснено просто «антиоксидантным эффектом». Молекулярные механизмы осуществления перечисленных выше активностей мексидола так и не были достаточно исследованы.

В настоящей работе представлены результаты моделирования свойств мексидола в сравнении с контрольными молекулами с известным нейротропным и/или ноотропным действием (холина альфосцерат, пирацетам, глицин, семакс). Исследование проводится с использованием новейшего направления постгеномной фармакологии — хемореактивного моделирования. В рамках постгеномной парадигмы, молекула любого лекарственного средства «мимикрирует» под определённые метаболиты (вследствие наличия тех или иных сходств в химической структуре) и, связываясь с теми или иными белками протеома, производит соответствующие данному лекарству эффекты (как позитивные, так и негативные) [5]. Совокупность имеющихся для исследуемой молекулы данных о взаимодействии с белками протеома, рассматриваемых в ходе проведения хемореактивного анализа, и позволяет сделать обоснованные выводы о потенциальных эффектах молекулы.

Анализ фармакологических «возможностей» мексидола и молекул сравнения проведён на основе хемоинформационного подхода, т. е. сравнения химической структуры исследуемых молекул со структурами миллионов других молекул, для которых молекулярно-фармакологические свойства известны. Процедура анализа основана на новейших технологиях машинного обучения [6–9], разрабатываемых в научной школе акад. РАН Ю.И. Журавлева и член-корр. РАН К.В. Рудакова.

Материалы и методы

Хемоинформатика — область исследований на стыке структурной химии, фармакологии и биоинформатики, в которой взаимосвязи типа «химическая струк-

тура» — «свойство вещества» исследуются методами современной информатики. Хемоинформационный анализ позволяет найти молекулы, схожие с исследуемой и, соответственно, предположить физиологические, фармакологические и другие свойства исследуемой молекулы на основе имеющейся информации о свойствах молекул, наиболее близких по структуре и представленных в базе данных PubChem [10].

Особый подраздел хемоинформатики, *хемореактивный анализ*, направлен на оценку биологических активностей исследуемой молекулы (в частности, моделирование профиля сродства исследуемой молекулярной структуры к различным белкам протеома). В настоящей работе был проведён сравнительный хемореактивный анализ молекул мексидол в сравнении с контрольными молекулами (холина альфосцерат, пирацетам, глицин, семакс, рис. 1).

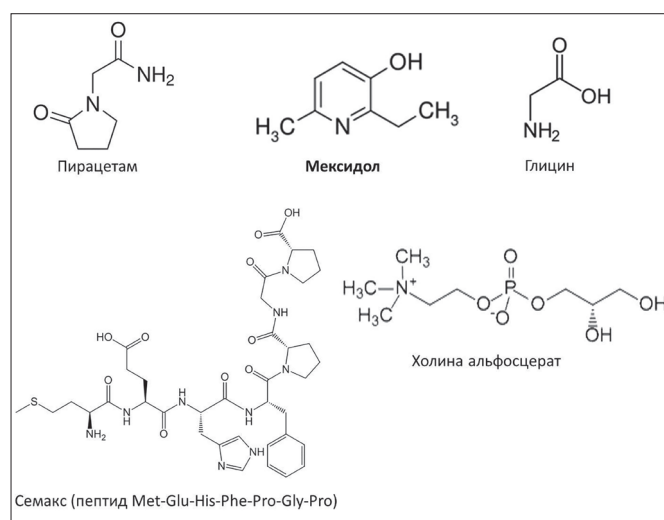


Рис. 1. Химические формулы исследованных молекул

Для проведения хемоинформационного анализа был разработан новый математический метод, основанный на комбинаторной теории разрешимости [9–12]. Комбинаторная теория разрешимости, представляющая собой развитие алгебраического подхода к задачам распознавания, является современным инструментом для исследования признаков описаний объектов. С использованием разработанной теории вычисляется функция расстояния между молекулами d_x , отражающая «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами. Таким образом, на первом этапе хемоинформационного анализа с использованием расстояния d_x устанавливается список наиболее близких к мексидолу химических структур. На втором этапе, для каждой молекулы из баз данных извлекаются все имеющиеся данные экспериментального измерения различных биологических свойств этой молекулы и проводится вычисление констант различных биологических активностей.

Результаты

С использованием описанного выше метода хемоинформационного анализа были проведены сравнения химической структуры мексидола с молекулами в базе данных метаболома человека и с молекулами в базах данных лекарственных средств. В качестве модели метаболома человека использовались более 40 000 соединений, приведённых в базе данных HMDB (Human Metabolome Database, т. е. база данных метаболома человека) [11]. Данные соединения включают большинство соединений, измеряемых в плазме крови человека и также ряд лекарственных средств и их метаболитов. В табл. 1 представлены наиболее интересные результаты анализа сходства мексидола с фармакологически активными веществами.

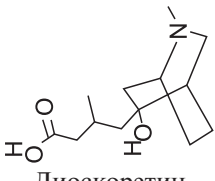
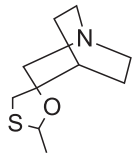
Таким образом, почти все сходные с мексидолом молекулы были обнаружены в растительных экстрактах (алкалоиды шелковицы, иминосахара гречки и др.).

Таблица 1

Соединения, полученные в результате хемоинформационного поиска, структурно сходные с мексидолом и характеризующиеся известной фармакологической активностью

d_x	Формула	Фармакологические роли
0,00		Исследуемая молекула
0,08		Алкалоид шелковицы, гипогликемический эффект
0,15		Иминосахар гречки, поддержка микробиоты
0,21		Ингибитор альфа-глюкозидаз, нормализация уровня глюкозы при диабете
0,21		Иминосахар шелковицы, ингибитор альфа-глюкозидаз, нормализация уровня глюкозы при диабете

0,21		Иминосахар гречки, поддержка микробиоты, гипогликемический эффект
0,21		Ингибитор альфа-глюкозидаз, нормализация уровня глюкозы при диабете
0,21		Ингибитор альфа-глюкозидаз, нормализация уровня глюкозы при диабете
0,25		Алкалоид шелковицы, гипогликемический эффект
0,25		Микобактериальный антибиотик
0,27		Нормализация уровня глюкозы при диабете
0,36		Антагонист никотиновых рецепторов, вазодилатор
0,46		Антисептик
0,46		Агонист ацетилхолиновых рецепторов
0,46		Антагонист никотиновых рецепторов, вазодилатор

0,50	 Диоскоретин	Гипогликемический эффект
0,50	 Цевимелин	Агонист мускариновых рецепторов ацетилхолина, лечение ксеростомии (сухость во рту)
Примечание: соединения упорядочены в соответствии со значением d_x , «химического расстояния» от молекулы мексидола (см. Методы). Более низкие значения d_x соответствуют большей структурной близости молекулы вещества к мексидолу		

Многие из этих молекул характеризуются известными гипогликемическим и антидиабетическим эффектами (в частности, за счёт ингибирования альфа-глюкозидаз, что способствует снижению уровня глюкозы в крови). Кроме того, схожие с мексидолом молекулы природного происхождения характеризуются и другими свойствами: взаимодействием с ацетилхолино-

выми рецепторами, вазодилаторными свойствами, антибактериальными свойствами, поддержкой микробиоты и др.

Результаты хемореактного моделирования свойств молекулы мексидола

Хемореактное моделирование показало, что мексидол может являться агонистом ацетилхолиновых рецепторов и ГАМК рецепторов (табл. 2). Активация М3 мускариновых рецепторов приводит к стимуляции пути выживания нейронов (молекулярный каскад ERK1/2). Активация каскада ERK1/2 тормозит апоптоз нейронов, т. е. обуславливает нейропротекторный эффект [12].

Активация мексидолом никотиновых рецепторов ацетилхолина типа $\alpha 4\beta 2$ нормализует процессы пре-синаптического и пост-синаптического возбуждения холинергических синапсов, что также способствует нейропротекции (в частности, улучшает внимание) [13]. Ингибирование М4 мускариновых рецепторов молекулой мексидола способствует ГАМКергической трансмиссии [14], что усиливает воздействие мексидола на ГАМК рецепторы.

Хемореактный анализ показал, что молекула мексидола является лучшим агонистом ГАМК рецеп-

Таблица 2

Хемореактные оценки взаимодействий мексидола и молекул сравнения с различными рецепторами нейротрансмиттеров

Об.	Ош.	Ед.	Активность	МКС	ХЛА	ПРЦ	ГЛИ	СМК
Ki	191	нМ	Сродство к серотонинергическому рецептору 5HT1A мозга крыс	1 498	145	144	32	151
IC50	99	нМ	Сродство к серотонинергическому рецептору 5HT1B, вытеснение [3H]5-НТ	1 919	72	333	НЭ	215
Ki	129	нМ	Сродство к альфа-2b адренергическим рецепторам человека, [3H] раувольфин	987	316	722	365	490
Ki	264	нМ	Сродство к альфа-2 адренергическим рецепторам мозга крыс	1 133	467	424	167	396
K	396	нМ	Сродство к D1 рецептору допамина стриатума крыс, [3H] фенолдопам	3 687	1 223	1 296	1 199	1 303
Ki	102	нМ	Сродство к рецептору допамина D2 человека, [3H] спиперон	997	72	149	НЭ	69
IC50	8	нМ	Сродство к бензодиазепиновому рецептору В крыс, [3H] диазепам	711	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	33	%	% повышения пикового тока ГАМКергических рецепторов при добавлении 1 мкМ ГАМК + 1 мкМ соединения по сравнению с 1 мкМ ГАМК	305	136	104	НЭ	108
—	21	%	Процент модуляции субмаксимального ответа (EC20) на ГАМК рецепторов ГАМК-А альфа-2-бета-3-гамма-2 человека	68	30	20	14	18
Ki	998	нМ	Сродство к мускариновым рецепторам М2 крыс, [3H] QNB	421	11 798	НЭ	НЭ	НЭ
Ki	389	нМ	Сродство к М4 мускариновым рецепторам ацетилхолина, [3H] оксотреморин	1 315	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	36	%	% секреции дофамина при активации α -никотиновых рецепторов ацетилхолина в стриатуме крыс	70	100	НЭ	НЭ	НЭ

Примечание: здесь и табл. 3–6. Об. — обозначение параметра биологической активности (константы) в соответствии с международной номенклатурой; Ед. — единицы измерения параметра; Ош. — ошибка (погрешность) значения параметра; МКС — мексидол; ХЛА — холина альфосцерат; ПРЦ — пирацетам; ГЛИ — глицин; СМК — Семакс; НЭ — нет эффекта.

торов, чем молекулы сравнения см. табл. 2). Например, мексидол повышает субмаксимальный ответ на стимуляцию ГАМК-А рецепторов типа $\alpha 2\beta 3\gamma 2$ на 68%, а для всех молекул сравнения — не более чем на 30%. Активация ГАМК-рецепторов проявляет нейропротекторный эффект в моделях поражения нейронов бета-амилоидом и в моделях спонтанной гипертензии [15]. Повышение выживания нейронов при активации ГАМК-рецепторов осуществляется, в частности, за счёт активации молекулярных каскадов выживания нейронов Akt (PKA) и ERK1/2 [16].

Хемореактомный анализ показал, что молекула мексидола вмешивается в модуляцию серотонинергической и дофаминергической активности в меньшей степени, чем молекулы сравнения. Так, значения констант ингибирования (K_i) серотониновых и дофаминовых рецепторов различных типов были выше именно для мексидола, что соответствует меньшему сродству мексидола к этим рецепторам (см. табл. 2). Например, полученное для глицина значение оценки сродства к рецептору серотонина 5HT1A было весьма высоким ($K_i = 32$ нМ), в то время как для мексидола сродство было в 15 раз более низким ($K_i = 1498$ нМ). Большая, по сравнению с контрольными молекулами, нейтральность мексидола по отношению к серотониновым и к дофаминовым рецепторам означает, что мексидол не будет способствовать резким колебаниям настроения у пациентов с депрессивными и тревожными расстройствами (рис. 2).

Результаты хемореактомного моделирования неврологических эффектов мексидола соответствуют обсуждаемым ранее нейропротекторным эффектам молекулы, ассоциированным с активацией ацетилхолиновых и ГАМК рецепторов. В частности, хемореактомное моделирование указывает на противосудорожную активность молекулы мексидола (табл. 3). Например, ингибирование фенилхинон-индуцированных судорог у мышей может осуществляться на 93% в случае использования мексидола, на 36% — в случае пираретама и только на 11% — в случае семакса. Кроме того, молекула мексидола может ингибировать образование и агрегацию бета-амилоида, а также избыточную активность сигнального фермента GSK3, что стимулирует рост нейритов и регенерацию нервной ткани [17] (табл. 3).

При ишемических процессах в мозге происходит интенсивный распад фосфолипидов нейрональных мембран и вырабатываются провоспалительные эйкозаноиды (простагландин E2, тромбоксаны и др.). Эти эйкозаноиды не только стимулируют процессы воспаления, но также усиливают боль и тромбообразование.

Хемореактомное моделирование мексидола показало более выраженное противовоспалительное действие молекулы за счёт ингибирования синтеза провоспалительных простагландинов посредством частичного ингибирования ферментов ЦОГ-2 и 5-липоксигеназы (табл. 4). Частичное ингибирование



Рис. 2. Хемореактомный анализ: основные молекулярные механизмы действия мексидола. ЦОГ-2, циклооксигеназа-2; 5-ЛОГ, 5-липоксигеназа

Таблица 3

Хемореактомные оценки экспериментальных неврологических эффектов мексидола и молекул сравнения

Об.	Ош.	Ед.	Активность	МКС	ХЛА	ПРЦ	ГЛИ	СМК
—	45	%	Обезболивающее действие в эксперименте	95	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
ED50	154	мг/кг	Противосудорожная активность у мышей при поражении электрическим током	71	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
HD50	4	мкМ	Внутривенная доза, вызывающая вестибулярные нарушения в течение 30 с у 50% мышей	82	НЭ	НЭ	29	НЭ
—	21	%	Ингибирование фенилхинон-индуцированных судорог у мышей, 50 мг/кг	93	19	36	НЭ	11
FC	1	—	Ингибирование агрегации бета-амилоида, флуориметрический анализ	2	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	263	%	Антиамилоидогенная активность в N2A клетках мыши, 1 мкМ	91	НЭ	122	НЭ	НЭ
—	19	%	Антагонизм глутаматного рецептора mGluR5, 30 мкМ	15	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
IC50	13	нМ	Ингибирование GSK3	75	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	1	%	Нейропротекторное действие при H ₂ O ₂ -индуцированной гибели нейронов клеток при инкубировании в 1 мкМ вещества за 24 ч до воздействия H ₂ O ₂	21	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	72	с	Антидепрессантная активность в модели имобилизационного стресса, 20 мг/кг	78	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ

Примечание: обозначения — см. в табл. 2.

Таблица 4

Хемореактомные оценки противовоспалительных эффектов мексидола и молекул сравнения

Об.	Ош.	Ед.	Активность	МКС	ХЛА	ПРЦ	ГЛИ	СМК
IC50	816	нМ	Ингибирование ЦОГ-2, арахидоновая кислота	1 029	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
IC50	45	нМ	Ингибирование ЦОГ-2-опосредованного синтеза PGE2	716	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	17	%	Ингибирование ЦОГ-2 моноцитов человека	46	23	НЭ	18	НЭ
IC50	109	нМ	Константа ингибирования ЦОГ-2, флуоресцентный анализ	75	351	274	265	107
—	0	—	Селективность ингибирования ЦОГ-2 относительно ЦОГ-1	3	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	24	%	Ингибирование простагландин D синтазы человека, 50 мкМ	84	28	26	НЭ	19
IC50	267	нМ	Ингибирование простагландин E синтазы	554	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	24	%	Ингибирование 5-липоксигеназы как остаточная активность нейтрофилов при стимуляции арахидоновой кислотой, 10 мкМ, ВЭЖХ анализ	65	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	54	%	Ингибирование синтеза простагландинов в каррагинан-индуцированной модели воспаления	92	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	46	%	Ингибирование NFκB активируемого ФНО-альфа, 50 мкМ	61	24	21	14	21
—	9	%	Ингибирование секреции гистамина, 25 мг/кг в кожной анафилаксии у самцов крыс	43	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	11	%	Противовоспалительная активность против адьювантного артрита у крыс в дозе 25 мг/кг	38	19	НЭ	23	НЭ
—	6	%	% снижения отека лап у крыс с моделью адьювантного артрита, 50 мг/кг	10	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	1	%	Противовоспалительная активность как ингибирование отека лап в дозе 50 мг/кг	48	41	НЭ	41	НЭ

Примечание: обозначения — см. в табл. 2.

ЦОГ-2 мексидолом, в отличие от использования таких специфических и сильных ингибиторов ЦОГ-2, как ацетилсалициловая кислота, может потенциально снижать риск формирования геморрагических осложнений.

Избыточное тромбообразование является одним из главных факторов цереброваскулярной патологии. Хемореактомное моделирование указало на более выраженный гемодинамический потенциал молекулы мексидола по сравнению с контрольными молекулами (табл. 5). Например, расчёты показали, что ингибирование коллаген-индуцированной агрегации тромбоцитов мексидолом осуществляется при гораздо более низких концентрациях вещества ($IC_{50} = 462$ нМ), чем в случае семакса ($IC_{50} = 4295$ нМ). Кроме того, мексидол может характеризоваться и более выраженным ингибированием коагуляционного фактора Ха (активатор протромбина).

Не менее интересные результаты получены при сравнении эффектов изучаемых молекул на метаболизм глюкозы и липидный профиль. Глюкозотолерантность существенно утяжеляет течение цереброваскулярной патологии и ухудшает прогноз. Моделирование указало на антигипергликемическую активность мексидола. Среди изученных молекул мексидол может снижать повышенные уровни глюкозы на 34%, холина альфосцерат — на 8%, а пирацетам — всего на 4%.

При этом, улучшение метаболизма глюкозы клетками при участии мексидола может осуществляться

за счёт активации фермента глюкокиназы и рецептора PPAR-гамма, что способствует нормализации уровня глюкозы в крови и также снижению уровней холестерина и триглицеридов (см. табл. 5). Например, снижение уровня триглицеридов в крови составило 29% для мексидола, 15% — для холина альфосцерат и всего 3% для семакса.

Подчеркнём, что результаты хемореактомного анализа позволяют предположить, что основой гипогликемического действия мексидола является активация PPAR-рецепторов (см. табл. 5). Белки-рецепторы типа PPAR (*активированный рецептор пролифераторов пероксисом*) необходимы для переработки избыточного холестерина и для снижения уровня глюкозы в крови.

PPAR-рецепторы способствуют увеличению в клетке числа пероксисом — обязательных клеточных органелл, содержащих окислительно-восстановительные ферменты (например, уратоксидазу, каталазу, ферменты расщепления жирных кислот). Пероксисомы необходимы для осуществления таких процессов, как метаболизм глюкозы, окисление жирных кислот, детоксикация, синтез желчных кислот, построение миелиновой оболочки нервных волокон и др. Наряду с митохондриями пероксисомы являются главными потребителями кислорода в клетке.

Наличие в пероксисомах большого количества фермента метаболизма жирных кислот (например, гидроксиметилглутарил лиазы, пероксисомального

Таблица 5

Хемореактомные оценки гемодинамических эффектов мексидола и молекул сравнения

Об.	Ош.	Ед.	Активность	МКС	ХЛА	ПРЦ	ГЛИ	СМК
Ki	498	нМ	Ингибирование тромбина	561	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
IC ₅₀	462	нМ	Ингибирование агрегации тромбоцитов плазмы крови человека	262	НЭ	НЭ	НЭ	4 295
Ki	47	нМ	Ингибирование фактора 10a	16	59	249	59	240
—	5	мкМ	Антикоагулянтная активность в плазме крови человека как концентрация, необходимая для удвоения времени свертывания крови после 30 с	34	НЭ	69	НЭ	НЭ
—	1	%	Антигипергликемическая активность как снижение уровней глюкозы в крови при дозе 100 мг/кг перед нагрузочным тестом глюкозой	34	8	4	НЭ	НЭ
EC ₅₀	124	нМ	Активация глюкокиназы как скорость формирования 6-фосфата	679	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
—	13	%	Активация рецепторов PPAR, 10 мкг/мл относительно росиглитазона	7	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ
IC ₅₀	36	нМ	Вытеснение агониста рецептора PPAR	287	НЭ	НЭ	392	НЭ
—	60	%	Снижение уровня холестерина сыворотки в эксперименте, 20 мг/кг в/б	39	НЭ	37	НЭ	13
—	1	%	Гиполипидемическая активность, % снижения триглицеридов у крыс при дозе 100 мг	29	15	НЭ	НЭ	3
—	4	%	Антиоксидантная активность как нейтрализация АФК, 100 мкМ, 20 мин	27	11	5	2	4
ILS	10	%	Увеличение продолжительности жизни мышей по сравнению с контрольными группами	141	НЭ	НЭ	НЭ	НЭ

Примечание: Обозначения — см. в табл. 2.

многофункционального фермента HSD17B4, пероксисомальной ацил-соА оксидазы ACOX1, лигаз длинноцепочечных жирных кислот и др.) обуславливает резкое увеличение интенсивности переработки жиров при увеличении числа пероксисом в клетке.

Активация белков PPAR приводит к усилению транскрипции генов, кодирующих белки переработки сахаров и липидов (в частности, пероксисомальной ацил-соА оксидазы ACOX1), что активирует процессы бета-окисления жирных кислот. Поэтому, агонисты PPAR-рецепторов (например, росиглитазон) используются при гипергликемии и гиперлипидемии [18]. Мексидол может являться частичным агонистом рецептора PPAR γ и, таким образом, проявлять гипогликемическое и антидиабетическое действие (рис. 3).

Результаты моделирования фармакодинамических свойств молекулы мексидол (прежде всего, по степени связывания с различными «нежелательными» таргетными белками) представлены в табл. 6. Моделирование показало, что мексидол существенно слабее, чем контрольные молекулы, взаимодействует с белками, ассоциированными с развитием нежелательных побочных эффектов лекарств.

Например, калиевый канал KCNH2 является важным «антитаргетным» белком, взаимодействий с которым следует избегать при разработке лекарственных средств [19], т. к. нарушения активности

KCNH2 приводят к формированию смертельно опасного «синдрома длинного QT», повышающего риск внезапной остановки сердца вследствие спонтанно развивающейся аритмии [9, 20]. В результате хемореактного моделирования было установлено, что, по сравнению с контрольными молекулами, молекула мексидола характеризовалась самым низким сродством к калиевому каналу KCNH2: значение константы ингибирования для мексидола составило $K_i = 4\,443\text{ нМ}$, для остальных молекул $K_i < 3\,058\text{ нМ}$ (т. е. для ингибирования канала KCNH2 мексидолом необходима более высокая концентрация мексидола, чем молекул сравнения).

Таким образом, хемореактное моделирование молекулы указало на различные фармакологические активности мексидола: активация мускариновых и никотиновых рецепторов ацетилхолина, активация ГАМК-А рецепторов, ингибирование ЦОГ-2 и 5-липоксигеназы, ингибирование биосинтеза простагландина E2, ингибирование ФНО-альфа активированного фактора транскрипции NF-kB, активация рецептора PPAR α и др.

Каждой из этих активностей соответствуют определённые гены из генома человека. В ходе проведённого анализа, был получен список из 54 генов, задействованных в реализации фармакологических эффектов мексидола. Анализ аннотаций этих генов

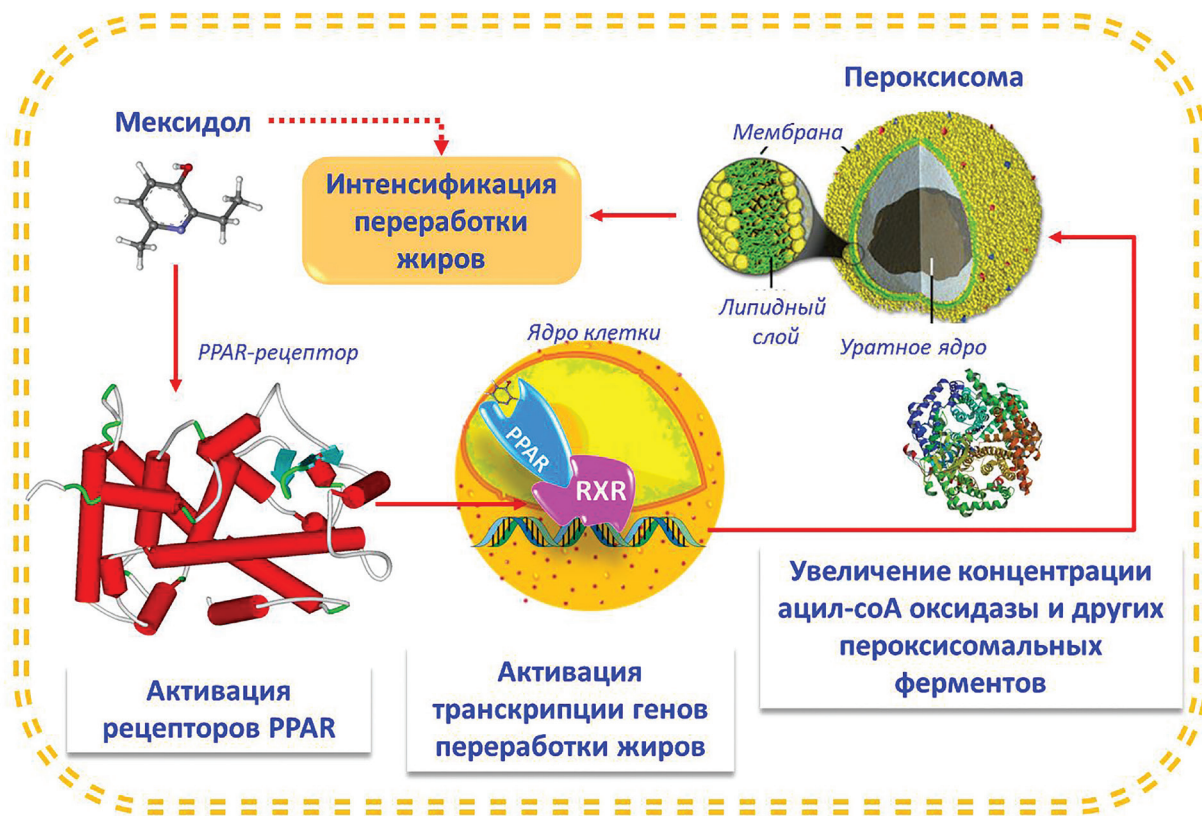


Рис. 3. Пространственная структура белков PPAR, необходимых для переработки простых сахаров и липидов в пероксисомах

Таблица 6

Хемореактомные оценки фармакокинетических и фармакодинамических свойств мексидола и молекул сравнения

Об.	Ош.	Ед.	Активность	МКС	ХЛА	ПРЦ	ГЛИ	СМК
—	17	%	% всасывания в ЖКТ человека	89	13	35	9	27
F	17	%	Биодоступность	68	53	27	17	31
IC50	934	нМ	Ингибирование CYP2D6 человека	3 923	1 125	3 383	1 170	1 261
Ki	644	нМ	Ингибирование KCHN1 человека	4 443	339	3 058	102	1 911
Ki	945	нМ	Ингибирование MAO-A крыс	2 017	НЭ	248	НЭ	НЭ
—	18	%	Гепатопротекторное действие на гепатоцитах (ингибирование D-галактозамин-индуцированной цитотоксичности)	26	12	НЭ	13	НЭ

Примечание: Обозначения — см. в предыдущих таблицах.

с использованием биологических ролей белков по международной номенклатуре Gene Ontology (GO) указал на основные биологические роли мексидола:

- Неврологические роли (синаптическая передача сигнала, визуальное восприятие, циркадианный ритм, регулирование цикла сна/бодрствования, двигательное поведение).
- Формирование структур нейронов (нейрон, аксон, оконечность аксона, синаптический мембранный везикул, дендрит, нейрит).
- Вазоактивное действие (активация биосинтеза оксида азота, активация роста клеток гладких мышц).
- Эмбриональное и пост-эмбриональное развитие (пост-эмбриональное развитие, рост многоклеточного организма, развитие мозга, развитие неба).
- Регенерация тканей (активация деления клеток, ранозаживление, рост клеток, торможение апоптоза);
- Антиоксидантное действие (ответы клеток на окислительный стресс, на перекись водорода, на гипероксию).
- Клеточное дыхание, энергетический метаболизм (ответ на гипоксию, митохондрии, метаболизм глюкозы и липидов, перенос электрона, связывание гема, ответ на инсулин).
- Иммунитет, регуляция воспаления (активация противовирусной защиты, воспалительная реакция, ответ на липополисахариды, активация сигналов I β /NF κ B, ответ на глюкокортикоиды).
- Синергизм с другими микронутриентами (связывание ионов железа, кальция, цинка).

Анализ аннотаций генов, вовлечённых в осуществление эффектов мексидола позволяет установить молекулярные механизмы осуществления самых различных фармакологических эффектов. Например, антиоксидантный эффект мексидола заявляется как один из основных эффектов этого препарата. Считается, что развитие антиоксидантного эффекта связано с повышением активности супероксиддисмутаз и ингибированием перекисного окисления липидов. Более детального исследования молекулярных механизмов

осуществления антиоксидантного эффекта мексидола не проводилось.

Заметим, что эффективность мексидола как антиоксиданта вряд ли обусловлена прямым взаимодействием молекулы мексидола с активными формами кислорода (АФК), а, скорее, с некоторыми специфическими взаимодействиями с определёнными белками-рецепторами.

Антиоксидантному действию мексидола соответствуют следующие биологические роли по международной номенклатуре GO: GO:0006979 «Ответ на окислительный стресс», GO:0070301 «Клеточный ответ на перекись водорода» и GO:0055093 «Ответ на гипероксию». Этим биологическим ролям соответствуют 5 генов и соответствующих этим генам белков:

- CHRNA4 Ацетилхолиновый рецептор альфа-4;
- CHRNA7 Ацетилхолиновый рецептор альфа-7;
- PTGS2 Простагландин синтетаза 2 (циклооксигеназа-2, ЦОГ-2);
- NFkB1 Ядерный фактор транскрипции NF-каппа-B;
- ALOX5 Арахидонат 5-липоксигеназа.

Иначе говоря, анализ аннотаций генов показал, что реализация антиоксидантного эффекта мексидола вряд ли возможна без задействования этих генов. Соответственно, данный список генов позволяет сформулировать более реалистичные механизмы антиоксидантного действия мексидола, чем прямое взаимодействие молекул мексидола с АФК.

Так, взаимодействуя с ионотропными (никотиновыми) рецепторами, **ацетилхолин** тормозит повреждения клеток, вызываемые перекисью водорода [21]. В частности, активация $\alpha 4$ [22] и $\alpha 7$ [23, 24] рецепторов ацетилхолина противодействует окислительным повреждениям ДНК [25]. В частности, активация $\alpha 7$ рецепторов к ацетилхолину способствует снижению активности про-воспалительного и про-оксидантного транскрипционного фактора NF- κ B [26], повышению экспрессии антиоксидантных генов SOD1 (супероксиддисмутазы), GPX1 (глутатион пероксидазы 1) [26] и HMOX1 (гем оксигеназы 1) [27] (рис. 4).

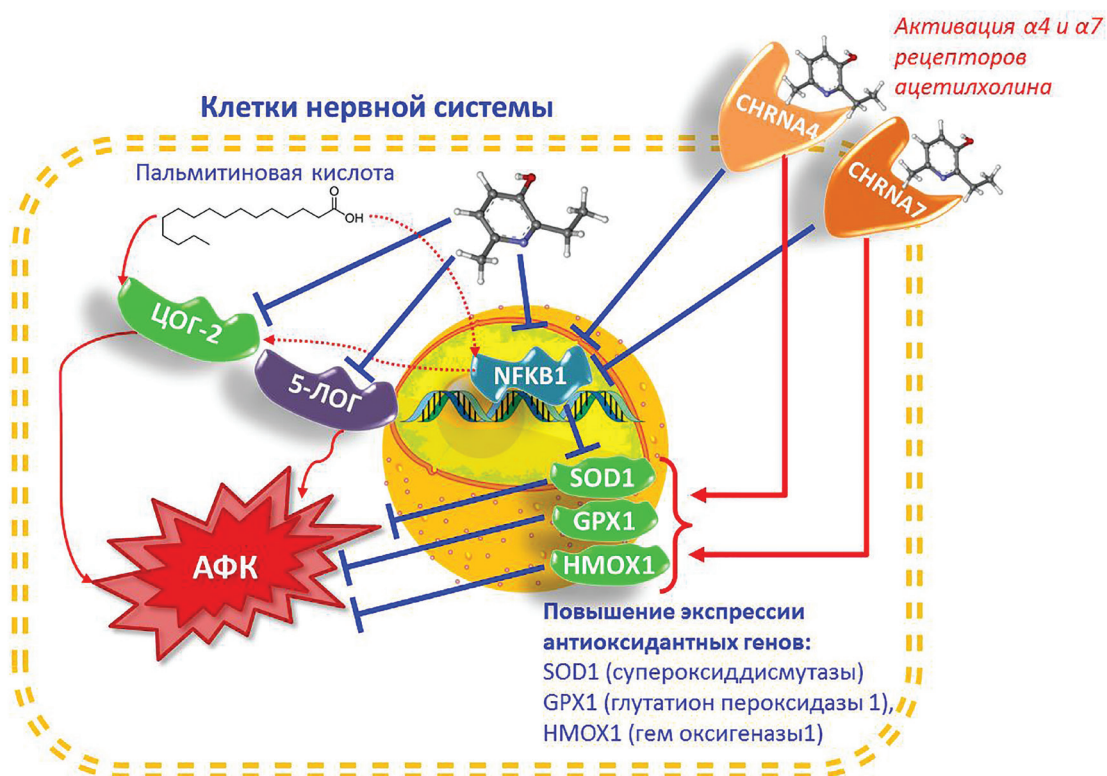


Рис. 4. Молекулярные механизмы антиоксидантного эффекта мексидола, сформулированные в результате проведения хемореактного анализа

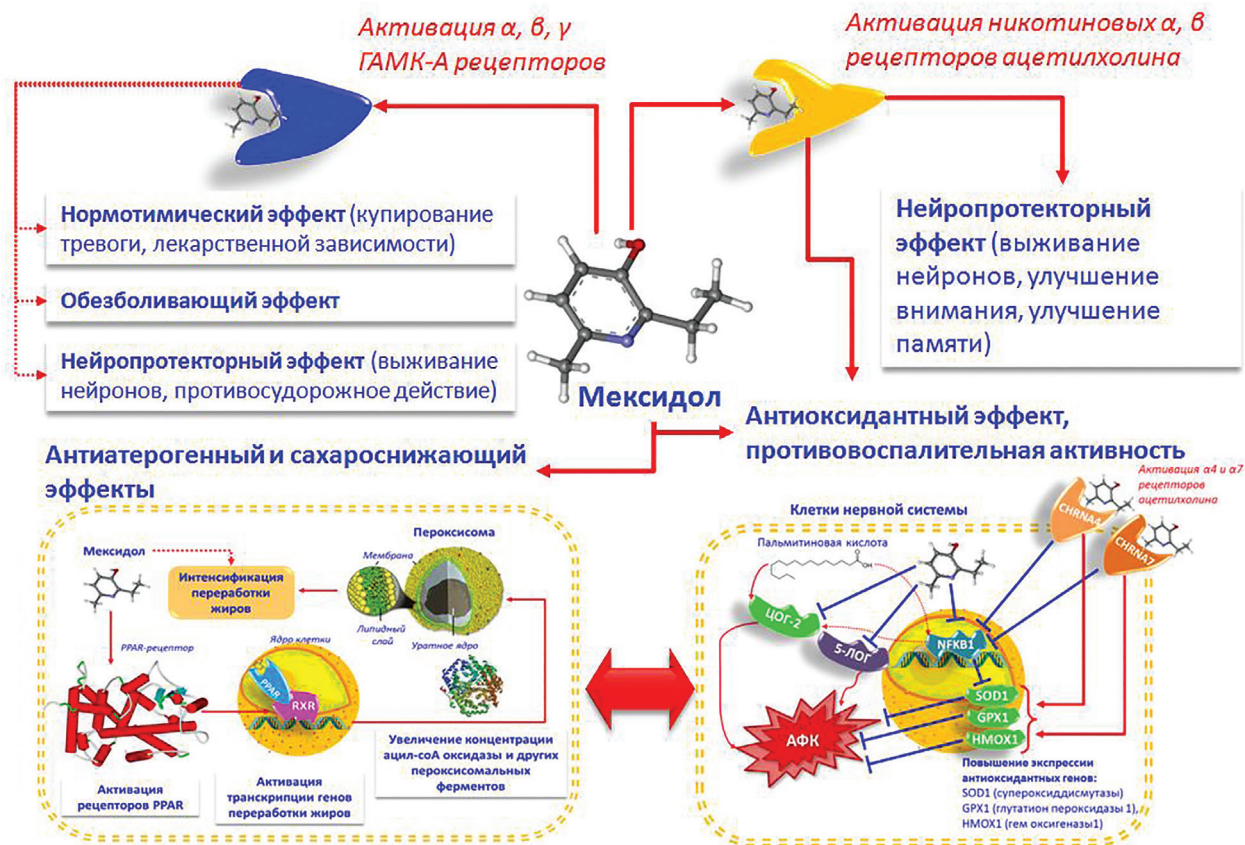


Рис. 5. Результаты хемореактного моделирования мексидола

При переработке пальмитиновой кислоты активность фермента ЦОГ-2 (ген PTGS2) способствует не только синтезу провоспалительных простагландинов, но и нарастанию окислительного стресса. Более того, пальмитат-анион способствует ещё большему повышению экспрессии гена PTGS2 при участии транскрипционного фактора NF-κB [28]. Мексидол, в соответствии с результатами хемореактомного анализа, будет ингибировать и фермент ЦОГ-2 и активность транскрипционного фактора NF-κB, тем самым осуществляя антиоксидантный эффект. Ингибирование ЦОГ-2 также способствует повышению активности ацетилхолиновых рецепторов [29].

Заключение

Результаты хемореактомного анализа показали, что главными мишенями фармакологического действия молекулы мексидола являются ацетилхолиновые рецепторы, ГАМК-А рецепторы, ферменты ЦОГ-2, 5-ЛОГ и PPAR-рецептор (рис. 5). Молекула мексидола является агонистом ацетилхолиновых рецепторов в большей степени, чем молекулы сравнения (холина альфосцерат, пирацетам, глицин, семакс). Активация холинергической нейротрансмиссии вносит существенный вклад в нейропротекцию при ишемии и когнитивных расстройствах. Кроме того, активация ионотропных ацетилхолиновых рецепторов типов α4 и α7 способствует реализации антиоксидантного эффекта. Молекула мексидола также является более выраженным агонистом ГАМК рецепторов, чем молекулы сравнения. Активация ГАМК-А рецепторов важна для нейропротекции и для реализации противосудорожного действия. Мексидол в большей степени, чем молекулы сравнения, проявляет противовоспалительные свойства за счёт частичного ингибирования ферментов ЦОГ-2 и 5-ЛОГ. В-четвертых, активация мексидолом PPAR-рецептора способствует интенсификации переработки жиров и углеводов. И, наконец, от молекул сравнения мексидол отличается более высокой безопасностью (меньшая степень взаимодействия с «про-аритмическими» каналами KCNH2, ферментами MAO и CYP1A1, более слабое влияние на серотониновые и опиоидные рецепторы).

Литература

- Об утверждении перечней жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов для медицинского применения на 2016 год. Распоряжение от 26 декабря 2015 года №2724-п. <http://government.ru/docs/21361/>
- S.A. Rumyantseva A.; I. Fedin; O. N. Sokhova. Antioxidant Treatment of Ischemic Brain Lesions. *Neuroscience and Behavioral Physiology*, 2012, 42 (8): 842–845. doi:10.1007/s11055-012-9646-3.
- Косенко В.Г., Карагезян Е.А., Лулева Л.В., Смоленко Л.Ф. Применение мексидола в психиатрической практике. *Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова*. 2006; 6.
- Volchegorskii I.A., Miroshnichenko I.Y., Rassokhina L.M., Faizullin R.M., Malkin M.P., Pryakhina K.E., Kalugina A.V. Comparative analysis of the anxiolytic effects of 3-hydroxypyridine and succinic acid derivatives. *Bull Exp Biol Med*. 2015 Apr; 158 (6): 756–61. doi: 10.1007/s10517-015-2855-3.
- Torshin I. Yu. Bioinformatics in the post-genomic era: physiology and medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA (2007), ISBN 1-60021-752-4.
- Журавлёв Ю.И., Рудаков К.В., Торшин И.Ю. Алгебраические критерии локальной разрешимости и регулярности как инструмент исследования морфологии аминокислотных последовательностей. *Труды МФТИ*. 2011; 3: 4: 67–76.
- Рудаков К.В., Торшин И.Ю. Об отборе информативных значений признаков на базе критериев разрешимости в задаче распознавания вторичной структуры белка. *ДАН*. 2011; 441: 1: 1–5.
- Журавлев Ю.И. Об алгебраическом подходе к решению задач распознавания или классификации. *Проблемы кибернетики*. Вып. 33. М.: Наука, 1978; 5–68.
- Торшин И.Ю., Громова О.А. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. М.: Изд. МЦНМО, 2012; 768.
- Bolton E., Wang Y., Thiessen P.A., Bryant S.H. PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12 IN Annual Reports in Computational Chemistry, Volume 4, American Chemical Society, Washington, DC, 2008 Apr. (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).
- Wishart D.S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A.C., Young N., Cheng D., Jewell K., Arndt D., Sawhney S., Fung C., Nikolai L., Lewis M., Coutouly M.A., Forsythe I., Tang P., Shrivastava S., Jeroncio K., Stothard P., Amegbey G., Block D., Hau D.D., Wagner J., Miniaci J., Clements M., Gebremedhin M., Guo N., Zhang Y., Duggan G.E., Macinnis G.D., Weljie A.M., Dowlatabadi R., Bamforth F., Clive D., Greiner R., Li L., Marrie T., Sykes B.D., Vogel H.J., Querengesser L. HMDB: the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Res*. 2007; 35 (Database:D521-D526).
- Olianas M.C., Dedoni S., Onali P. Protection from interferon-beta-induced neuronal apoptosis through stimulation of muscarinic acetylcholine receptors coupled to ERK1/2 activation. *Br J Pharmacol*. 2016; 173 (19): 2910–2928 doi.
- Lin N.H., Gunn D.E., Ryther K.B., Garvey D.S., Donnelly-Roberts D.L., Decker M.W., Brioni J.D., Buckley M.J., Rodrigues A.D., Marsh K.G., Anderson D.J., Buccafusco J.J., Prendergast M.A., Sullivan J.P., Williams M., Arneric S.P., Holladay M.W. Structure-activity studies on 2-methyl-3-(2(S)-pyrrolidinylmethoxy) pyridine (ABT-089): an orally bioavailable 3-pyridyl ether nicotinic acetylcholine receptor ligand with cognition-enhancing properties. *J Med Chem*. 1997; 40 (3): 385–390.
- Nakamura M., Jang I.S. Muscarinic M4 receptors regulate GABAergic transmission in rat tuberomammillary nucleus neurons. *Neuropharmacology*. 2012; 63 (6): 936–44 doi.
- Vandevrede L., Tavassoli E., Luo J., Qin Z., Yue L., Pepperberg D.R., Thatcher G.R. Novel analogues of chlormethiazole are neuroprotective in four cellular models of neurodegeneration by a mechanism with variable dependence on GABA(A) receptor potentiation. *Br J Pharmacol*. 2014; 171 (2): 389–402 doi.
- Avolio E., Mahata S.K., Mantuano E., Mele M., Alo R., Facciolo R.M., Talani G., Canonaco M. Antihypertensive and neuroprotective effects of catestatin in spontaneously hypertensive rats: interaction with GABAergic transmission in amygdala and brainstem. *Neuroscience*. 2014; 270: 48–57 doi.
- Young W. Spinal cord regeneration. *Cell Transplant*. 2014; 23 (4–5): 573–611 doi.
- Gaikwad A.B., Viswanad B., Ramarao P. PPAR gamma agonists partially restores hyperglycemia induced aggravation of vascular dysfunction to angiotensin II in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance. *Pharmacol Res*. 2007; 55 (5): 400–7 Epub 2007 Feb.
- Braga R.C., Alves V.M., Silva M.F., Muratov E., Fourches D., Tropsha A., Andrade C.H. Tuning HERG out: antitarget QSAR models for drug development. *Curr Top Med Chem*. 2014; 14 (11): 1399–1415.
- Sanguinetti M.C., Tristani-Firouzi M. hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*. 2006; 440 (7083): 463–469.
- Palee S., Apajai N., Shinlapawittayatorn K., Chattipakorn S.C., Chattipakorn N. Acetylcholine Attenuates Hydrogen Peroxide-Induced Intracellular Calcium Dyshomeostasis Through Both Muscarinic and Nicotinic Receptors in Cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 39 (1): 341–9 doi.

22. Dorszewska J., Florczak J., Rozycka A., Jaroszevska-Kolecka J., Trzeciak W.H., Kozubski W. Polymorphisms of the CHRNA4 gene encoding the alpha4 subunit of nicotinic acetylcholine receptor as related to the oxidative DNA damage and the level of apoptotic proteins in lymphocytes of the patients with Alzheimer's disease. *DNA Cell Biol.* 2005; 24 (12): 786–794.
23. Li Y., King M.A., Meyer E.M. alpha7 nicotinic receptor-mediated protection against ethanol-induced oxidative stress and cytotoxicity in PC12 cells. *Brain Res.* 2000; 861 (1): 165–167.
24. Stegemann A., Bohm M. The alpha7 nicotinic acetylcholine receptor agonist tropisetron counteracts UVA-mediated oxidative stress in human dermal fibroblasts. *Exp Dermatol.* 2016; Exp Dermat: 101111/exd13220.
25. Shan K.R., Qi X.L., Long Y.G., Nordberg A., Guan Z.Z. Decreased nicotinic receptors in PC12 cells and rat brains influenced by fluoride toxicity—a mechanism relating to a damage at the level in post-transcription of the receptor genes. *Toxicology.* 2004; 200 (2–3): 169–177.
26. Han Z., Shen F., He Y., Degos V., Camus M., Maze M., Young W.L., Su H. Activation of alpha-7 nicotinic acetylcholine receptor reduces ischemic stroke injury through reduction of pro-inflammatory macrophages and oxidative stress. *PLoS One.* 2014; 9 (8): e105711 doi.
27. Navarro E., Buendia I., Parada E., Leon R., Jansen-Duerr P., Pircher H., Egea J., Lopez M.G. Alpha7 nicotinic receptor activation protects against oxidative stress via heme-oxygenase I induction. *Biochem Pharmacol.* 2015; 97 (4): 473–81 doi.
28. Gao Z., Zhang H., Liu J., Lau C.W., Liu P., Chen Z.Y., Lee H.K., Tipoe G.L., Ho H.M., Yao X., Huang Y. Cyclooxygenase-2-dependent oxidative stress mediates palmitate-induced impairment of endothelium-dependent relaxations in mouse arteries. *Biochem Pharmacol.* 2014; 91 (4): 474–82 doi.
29. Nishizaki T., Matsuoka T., Nomura T., Sumikawa K. Modulation of ACh receptor currents by arachidonic acid. *Brain Res Mol Brain Res.* 1998; 57 (1): 173–179.

Анализ лёгкой пептидной фракции Лаеннека методами современной протеомики

**Торшин И.Ю.¹, Згода В.Г.², Громова О.А.³, Баранов И.И.⁴, Демидов В.И.³,
Назаренко О.А.³, Сотникова Н.Ю.³, Каримова И.М.⁵**

¹ – ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Долгопрудный

² – ФГБНУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича», г. Москва

³ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

⁴ – ФГБУ «Научный центр акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова» Минздрава России, г. Москва

⁵ – ГБОУ ВПО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, Москва

Резюме. Препарат Лаеннек основан на стандартизованном гидролизате плаценты человека и отличается высокой эффективностью при регенерации тканей. В настоящем исследовании проведён анализ лёгкой пептидной фракции препарата Лаеннек до 3 000 Да тремя методами: (1) высокоточной масс-спектрометрией на масс-спектрометре Q-Exactive (Thermo Scientific, Германия); (2) иммуноферментным анализом на содержание эпитопов белков посредством иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA) с использованием моноклональных антител к IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNF α , IL-12) и (3) секвенирование выделенных пептидов. Установлена высокая степень стандартизации препарата по пептидам. С использованием стандартного программного обеспечения были установлены аминокислотные последовательности 47 пептидов. Установлено наличие в составе Лаеннека пептидов альбумина, коллагенов α 2, α 2, XIX α 1, «цинковых пальцев», а также активных пептидных фрагментов ростовых факторов IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. Наличие этих пептидов в составе Лаеннека позволило сформулировать ряд ранее неизвестных молекулярных механизмов действия препарата.

Ключевые слова: гидролизат плаценты, Лаеннек, масс-спектрометрия, иммуноферментный анализ, секвенирование пептидов, протеомика

Analysis of the light peptide fraction of Laennec by proteomic methods

Torshin I.Yu.¹, Zgoda V.G.², Gromova O.A.³, Baranov I.I.⁴, Demidov V.I.³, Nazarenko O.A.³, Sotnikova N.Yu.³, Karimova I.M.⁵

¹ – «Moscow Institute of Physics and Technology (State University)», Dolgoprudny

² – FGBNU V.N. Orekhovich Research Institute of Biomedical Chemistry, Moscow

³ – FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo

⁴ – FSBI «Research Center for Obstetrics, Gynecology and Perinatology» Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

⁵ – A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow

Abstract. Laennec preparation is based on standardized human placenta hydrolyzate and is highly effective in the regeneration of tissues. This study presents the results of analysis of the light peptide fraction of Laennec (<3 000 Da) by using three methods: (1) mass spectrometry using Q-Exactive (ThermoScientific, Germany), (2) enzyme immunoassay for the discovery of epitopes of proteins by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with monoclonal antibodies to IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF and chemokines (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNF α , IL-12) and (3) peptide sequencing. The results indicated high degree of standardization of Laennec concerning the peptide composition. Amino acid sequences of 47 peptides were established using standard software. The composition of Laennec includes the peptide fragments of albumin, collagens α 2, α 2, XIX α 1, «zinc fingers», regenerative growth factors IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF. The presence of these peptides in Laennec allowed us to formulate a number of previously unknown molecular mechanisms of the Laennec action.

Keywords: placenta hydrolyzate, Laennec, mass spectrometry, immunoassay, peptide sequencing, proteomics

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна — д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

В современной клинической медицине, гидролизаты плаценты человека (ГПЧ) используются, начиная с первой четверти 20-го века (во многом, благодаря работам В.П. Филатова, 1875–1956 гг.). Систематический анализ более 3 500 публикаций по клинической и экспериментальной фармакологии ГПЧ позволил установить репрезентативный набор исследований, описывающих практически все документированные применения гидролизатов плаценты, такие как им-

мунорегуляция, ранозаживление, нейротрофические эффекты, нормализация пигментации кожи, гепатопротекция [1].

Разносторонние клинические эффекты гидролизатов плаценты являются следствием их сложнейшего молекулярного состава. ГПЧ содержат значительные количества т. н. «биогенных стимуляторов» (пептиды, гормоны, и др.). В составе плаценты человека и высших приматов обнаружено более 4 000 различных белков, включая различные факторы роста, гормоны, цитохромы, факторы фибринолиза, ферменты энер-

гетического метаболизма и т. д. [2], идентифицированы эстрадиол [3], простагландины [4], энкефалины и другие нейропептиды [5, 6], ряд микроэлементов (прежде всего, значительные количества органического цинка) [7].

Лекарственный препарат Лаеннек, получаемый из гидролизата плаценты путём ферментации, ультрафильтрации и других высокотехнологичных процессов, хорошо зарекомендовал себя в эстетической медицине, гепатологии и лечении атопического дерматита. Ранее, нами был проведён экспериментально-теоретический анализ некоторых элементов пептидного состава препарата Лаеннек с последующим биоинформационным анализом функций обнаруженных пептидов [8]. В составе препарата были найдены пептидные фрагменты инсулиноподобного фактора роста (пептид SRLI), иммуноглобулина G (пептид SSFGI), интерлейкина-1 α (пептид MLRLRQSI). Важно отметить установление наличия в составе препарата активного пептида нейромедина N (пептид KIPYI). Данные пептиды отчасти объясняют иммуномодуляторный, гепатопротекторный, нейропротекторный эффекты препарата.

В настоящей работе впервые предпринята попытка систематического исследования лёгкой пептидной фракции препарата Лаеннек до 3 000 Да с использованием одной из передовых технологий современной протеомики — гибридного масс-спектрометра (МС), соединяющего в себе возможности хроматографического выделения ионов и многомерного МС-анализа. МС-орбитальные «ловушки ионов» в составе таких приборов работают в режиме высокого разрешения и позволяют проводить идентификацию молекул пептидов и белков небольшого размера. Быстрая скорость сканирования и многозадачность позволяют проводить идентификацию и количественный анализ большого числа компонентов с высокой точностью, что чрезвычайно важно при анализе лекарственных препаратов сложного состава.

Материалы и методы

Процесс экспериментального исследования пептидного состава Лаеннека состоял из трёх основных этапов: очистки препарата, хроматографического разделения пептидов и определения масс-спектра лёгкой пептидной фракции препарата Лаеннек до 3 000 Да с параллельной идентификацией аминокислотных последовательностей пептидов.

Очистка препарата состояла в отделении липидной фракции и обессоливании, ультрафильтрации до 3 000 Да. Для очистки препарата от липидной фракции использовался модифицированный метод Брокерхоффа-Давсона-Хьюшера [9]. Сначала проводили мягкое щелочное дезацилирование фосфолипидов. Методику отработывали на смеси 1 мл протеолизосом из 1–20 мг фосфатидилхолина и 0,05–0,2 мг

бацитрацина или грамицидина А. 1 мл образца очищенного Лаеннека лиофилизировали, доливали гексан, метанол (1:1, v/v) и разводили в 2 раза 0,25М NaOH в метаноле. 45 мин инкубировали при встряхивании при комнатной температуре, включая 15 мин — при $t = 75^{\circ}\text{C}$. Последовательно приливали метанол, гексан и воду (1:4:4, v/v), перемешивали и центрифугировали 1 мин при 1 000 g. Фракцию с гексаном отделяли, водно-метанольную — нейтрализовали HCl до pH 4–6. К нейтрализованной водно-метанольной фракции добавляли гексан, перемешивали, центрифугировали 1 мин при 1 000 g, осторожно отсасывали фракцию с гексаном, не затрагивая осадок на границе раздела фаз. Повторяли процедуру 4 раза. Водно-метанольную фракцию объединяли, лиофилизировали, осадок ресуспендировали сначала в смеси метанол:вода (1:1), супернатант сливали, затем в смеси хлороформ:метанол (1:1), 0,2% ТФУ, супернатанты объединяли, высушивали от хлороформа и обессоливали.

Обессоливание лёгкой пептидной фракции проводили на мини-колонке при помощи центрифугирования [10]. В мини-колонку 0,75×4,5 см («Raining Instrument», США) наливали 2 мл сефадекса G-10 («Pharmacia», Швеция), декантированного в смеси метанол:вода (85:15, v/v), каплями добавляли 160 мкл того же раствора и уравнивали на центрифуге 1 мин при 1 000 g. Процедуру повторяли до тех пор, пока на выходе не остаётся 150 мкл раствора. 150 мкл образца каплями наносили на гель и центрифугировали, как описано выше. Гель после однократного использования заменяли. После процедуры обессоливания потери белка составляли не более 35%.

Хроматографическое разделение пептидов. Пептиды в составе выделенной лёгкой пептидной фракции разделялись с использованием параллельной системы хроматографического разделения пептидов Ultimate 3000 RSLCnano system (производство Dionex). Исследуемые образцы пептидной фракции вводили в хроматографическую «колонку-ловушку» Acclaim PepMap (2 см, внутренний диаметр 75 мкм, C₁₈, 3 μm , 100 А, производство Thermo Scientific) со скоростью 2 мкл/мин в сочетании с 0,1% раствором муравьиной кислоты в воде. Через 5 мин колонка-ловушка автоматически подсоединялась к колонке для аналитической хроматографии (колонка Zorbax 300SB- C18, 15 см × внутренний диаметр 75 мкм, 3,5 мкм, производство Agilent). Элюирование пептидов проводили с применением смеси растворителей «А» (0,1% (об) раствор муравьиной кислоты в дистиллированной воде для ВЭЖХ) и «В» (0,1% (об) раствор муравьиной кислоты в 80% (об) растворе ацетонитрила в воде). Хроматографическое разделение пептидов проводили с применением линейного градиента растворителя В (от 5 до 40%) при скорости 300 нл/мин в течение 120 мин с последующей стадией промывки (промывка 10 мин 99% растворителем В) и стадией уравнивания (промывка 10 мин 5% растворителем В).

Масс-спектрометрия с параллельной идентификацией пептидов. Масс-спектрометрический (МС) анализ осуществляли с использованием масс-спектрометра Q-Exactive (Thermo Scientific, Германия). Были использованы наноаэрозольный источник ионов «Flex» с напряжением ионизации 1 800 V и температурой капилляра 200 °С. Данные масс-спектра собирались в соответствии с количеством имеющегося в МС камере количества пептида-прекурсора; собирались данные о частицах пептидов, возникающих при фрагментации исходных пептидов в МС камере. Предварительное сканирование осуществлялось при разрешении 70 000, диапазон сканирования — 400–1 200 m/z, целевые значения AGC — 1×10^6 , максимальное время впрыскивания — 50 мс. Фрагментацию пептидных частиц в МС-камере проводили для 20 наиболее часто встречающихся ионов при нормированной энергии столкновения — 30, динамическом исключении — 10 с. Сканирование MS/MS образующихся ионов проводилось с разрешением 17,500, целевые значения составили 105, максимальное время впрыска — 100 мс, окно изоляции — 2,0. Последовательности пептидов определялись программным обеспечением Mascot (<http://www.matrixscience.com>) с использованием базы данных аминокислотных последовательностей SwissProt.

Иммуноферментный анализ пептидной фракции Лаеннека. Иммуноферментный анализ (сокращённо ИФА, англ. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) — лабораторный иммунологический метод качественного или количественного определения различных соединений, макромолекул, вирусов и пр., в основе которого лежит специфическая реакция антиген–антитело. В основе ИФА лежит принцип

взаимодействия иммуносорбента — антигена возбудителя инфекции — с выявляемыми антителами и в соединении этого комплекса антиген–антитело с иммуноглобулинами, содержащим ферментную метку.

Был проведён ряд тестов на установление содержания в составе Лаеннека таких ростовых факторов, как IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNFa, IL-12 и др.). Определение содержания данных белков (или соответствующих эпитопов этих белков) проводилось посредством иммуноферментного анализа (ИФА, ELISA). Моноклональные антитела к определённому белку (например, к IGF-1) были введены в 96-луночный планшет для проведения ИФА (Immulon 2 HB, ThermoScientific) и инкубировались при 4 °С в течение 12 ч. Затем добавлялась пептидная фракция Лаеннека и инкубировалась при комнатной температуре в течение 1 ч. Неадсорбированное содержимое образцов удаляли из лунок трёхкратной промывкой буфером. Затем добавлялись стрептавидин-сопряжённая щёлочная фосфатаза и p-нитрофенил фосфат, и оптическая плотность окраски получаемого раствора считывалась ридером Multiskan-GO Microplate Spectrophotometer (ThermoScientific).

Результаты и обсуждение

В ходе исследования был изучен состав двух образцов пептидной фракции Лаеннека при различных условиях эксперимента. Всего было проведено 6 протеомных экспериментов. Результаты каждого из этих экспериментов наиболее удобно представить в виде двумерных (2D) масс-спектрограмм (рис. 1). Каждая

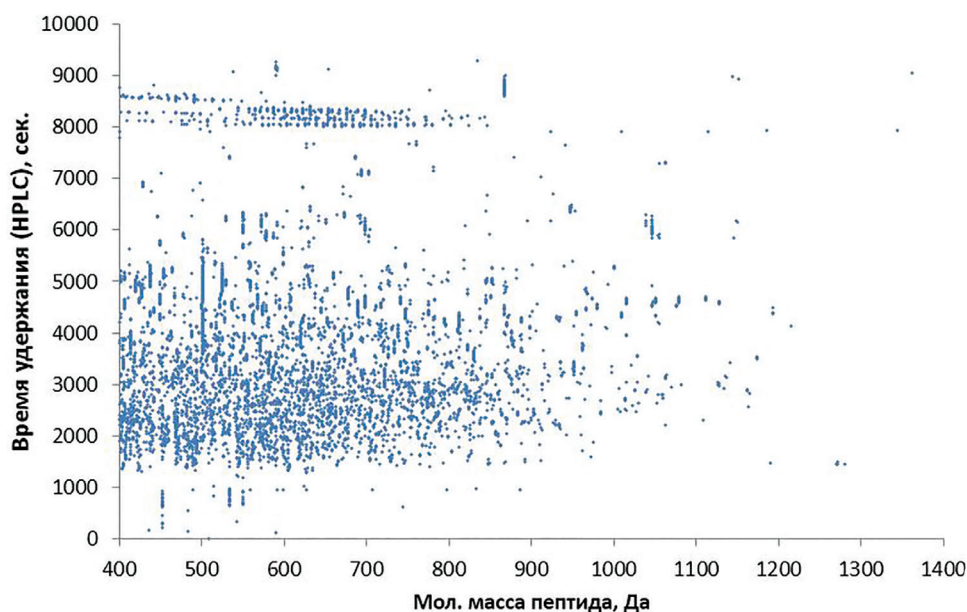


Рис. 1. Пример двумерной (2D) масс-спектрограммы пептидной фракции препарата Лаеннек.
Примечание: Каждая точка на 2D спектрограмме представляет, по крайней мере, 1 пептид, обнаруженный в составе Лаеннека

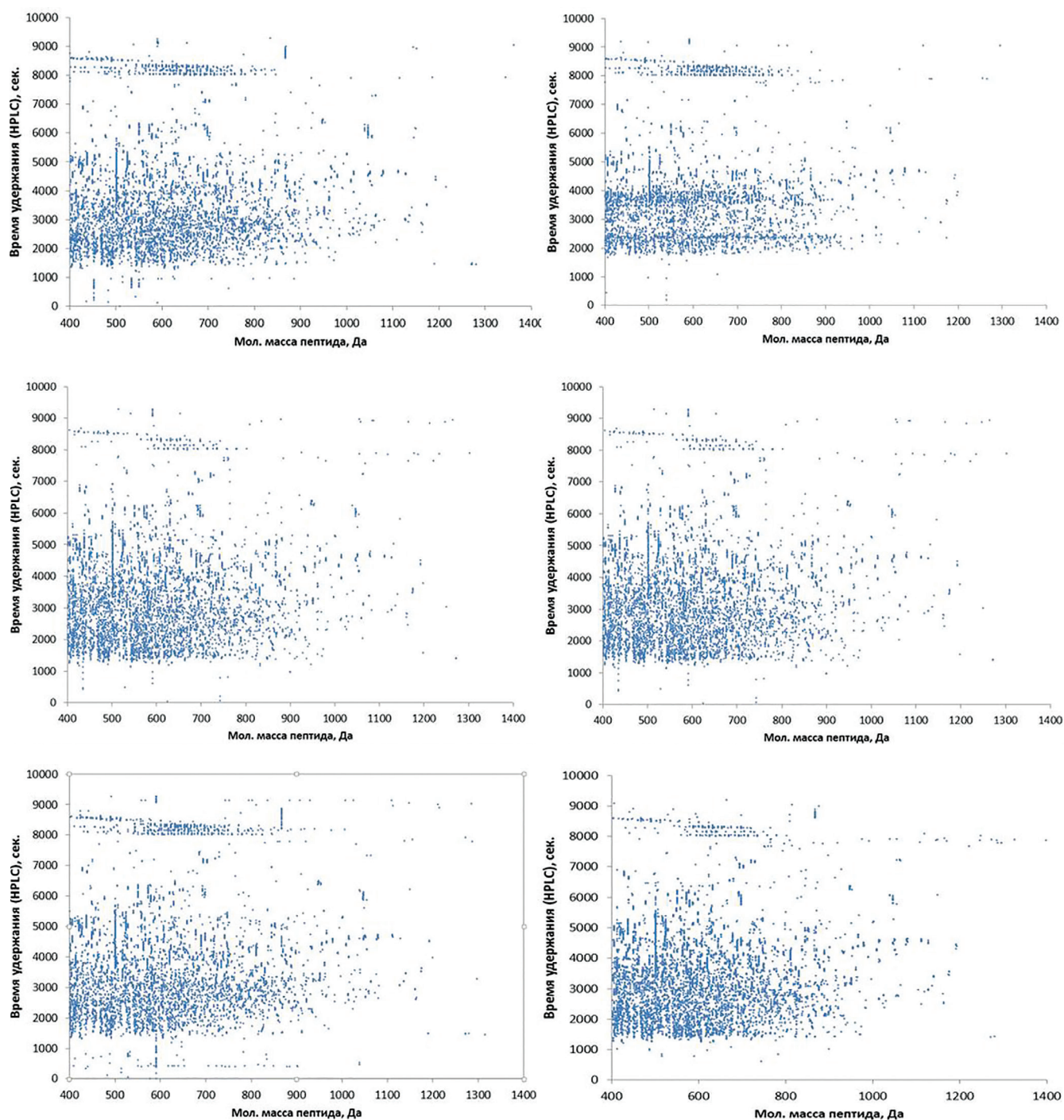


Рис. 2. 2D масс-спектрограммы всех проведённых экспериментов (различные образцы, различные условия съёмки масс-спектров)

точка 2D спектрограммы соответствует пептиду; по оси «Х» представлено значение молекулярной массы этого пептида, а по оси «Y» — значение хроматографического «времени удержания» пептида (которое характеризует скорость прохождения пептида через хроматографическую колонку).

На рис. 2 приведены результаты всех проведённых протеомных экспериментов. Важным результатом является очевидная схожесть распределений пептидов по молекулярной массе и времени удержания пептида.

Это указывает на хорошую стандартизацию препарата Лаеннек по пептидному составу и на приемлемое технологическое качество проведённых протеомных анализов.

Объединённая 2D масс-спектрограмма пептидной фракции Лаеннека (рис. 3), которая включила результаты всех проведённых протеомных экспериментов, указывает на ключевые особенности пептидного состава Лаеннека.



Рис. 3. Объединённая 2D масс-спектрограмма пептидной фракции Лаеннека (все эксперименты).
Примечание: Точки, соответствующие выделенным пептидам, окрашены в соответствии с зарядами пептидов. Пептиды, для которых удалось идентифицировать аминокислотную последовательность, отмечены треугольниками

На полученной диаграмме плотности (рис. 4) точки с более высокими значениями плотности соответствуют пептидам с более высокой частотой встречаемости.

Кластерный анализ пиков плотности на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека представлен на рис. 5.

Интересно сопоставить результаты МС-исследования состава Лаеннека с результатами ранее проведённого иммуноферментного анализа (ИФА) препарата. Нами было проведено количественное определение

содержания в Лаеннеке различных белков методом иммуноферментного анализа. ИФА с антителами к пептидам, перечисленным в табл. 1 указал на значительное содержание в Лаеннеке инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1), лептина, трансформирующего фактора роста $\beta 1$, фактора роста гепатоцитов.

Сопоставление результатов кластерного анализа масс-спектрометрических данных по пептидному составу Лаеннека с результатами иммуноферментного анализа препарата позволяет сделать весьма интерес-

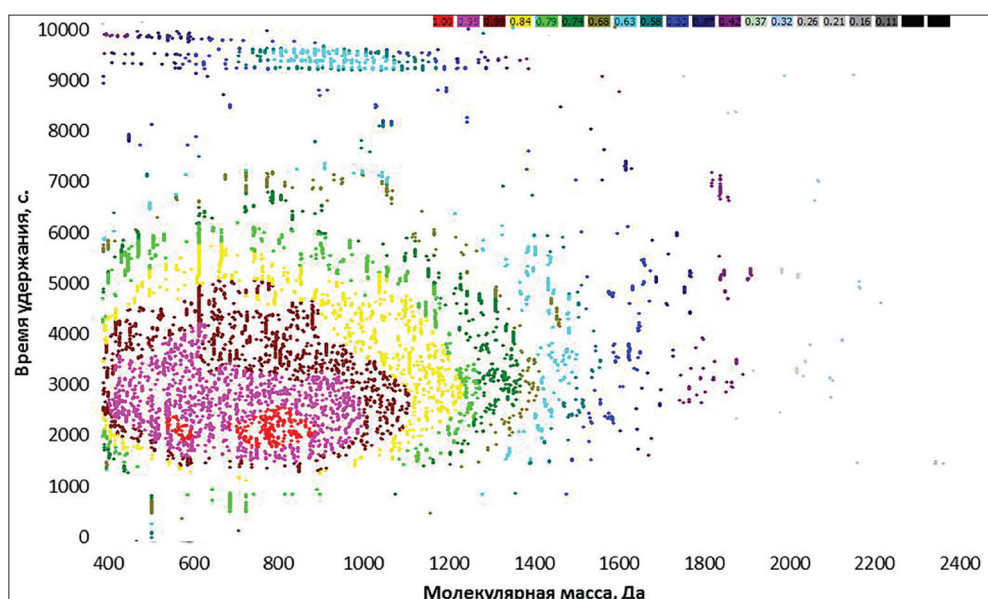


Рис. 4. Анализ плотности расположения точек на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека.

Примечание: Точки с более высокими значениями плотности (красные, пурпурные, тёмнокрасные) соответствуют более высокой встречаемости пептидов

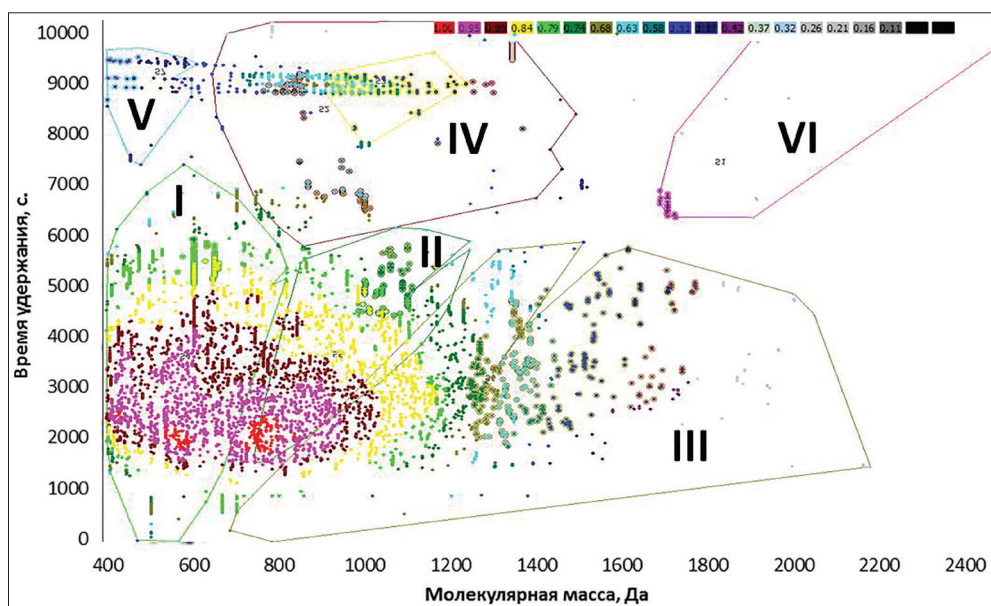


Рис. 5. Кластерный анализ пиков плотности на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека.

Примечание: Кластеры (т.е. пики плотности, обведены линиями) соответствуют наиболее типичным значениям молекулярных масс пептидов, встречающихся в составе пептидной фракции

Таблица 1

Количественное определение различных пептидов, обнаруженных в составе препарата Лаеннек (иммуноферментный анализ). Содержание пептидов указано в пг/мл (за исключением ИФН γ , количество которого указано в МЕ/мл)

Пептид	Название	Содержание
ИФР-1	Инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1)	4 100
Лептин	Белковый гормон лептин	1 200
TGF- β 1	Трансформирующий фактор роста β 1	500
HGF	Фактор роста гепатоцитов (ФРГ)	130
M-CSF	Фактор роста колоний макрофагов	87
VEGF	Фактор роста васкулярного эндотелия	28
PDGF	Тромбоцитарный фактор роста	13,5
IL-8	Интерлейкин-8	8,8
IL-1 α	Интерлейкин-1 α	7,3
IL-1 β	Интерлейкин-1 β	6,8
G-CSF	Колонистимулирующий фактор гранулоцитов	6,6
TNF α	Фактор некроза опухоли α (ФНО- α)	5
IL-12	Интерлейкин-12	4,6
EGF	Эпидермальный фактор роста	2,6
IL-10	Интерлейкин-10	1,2
IL-3	Интерлейкин-3	1
IL-5	Интерлейкин-5	1
IL-4	Интерлейкин-4	0,8
IL-6	Интерлейкин-6	0,2
IL-2	Интерлейкин-2	0,1
IFN- γ	Интерферон- γ	0,01

ные выводы. Так, количественное определение содержания в Лаеннеке различных ростовых факторов или их фрагментов методом иммуноферментного анализа ELISA указало на значительное содержание в Лаеннеке инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1, ~4 100 пг/мл), лептина (~1 200 пг/мл), трансформирующего

фактора роста β 1 (ТФР β 1, ~500 пг/мл), фактора роста гепатоцитов (ФРГ, ~130 пг/мл) и следовых количеств ряда других ростовых факторов.

С использованием стандартного программного обеспечения (программный пакет и сервер MASCOT) были установлены аминокислотные последователь-

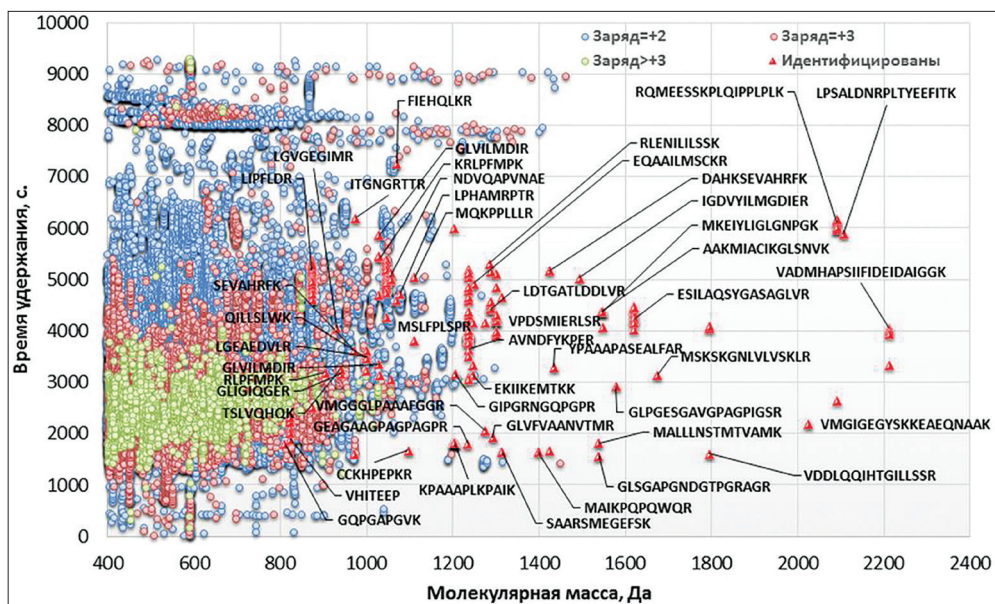


Рис. 6. Аминокислотные последовательности пептидов, идентифицированных на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека

ности новых 47 пептидов в лёгкой фракции препарата (рис. 6). Данные пептиды расположены, преимущественно, в пределах III-го и VI-го кластеров.

Представленные на рис. 6 данные позволяют сделать однозначный вывод: стандартное программное обеспечение, используемое для анализа многомерных данных пептидной масс-спектрометрии, не отличается высокой степенью применимости к анализу произвольной смеси пептидов. В самом деле, из более чем 10 000 точек на объединённой 2D масс-спектрограмме пептидной фракции Лаеннека (рис. 6) повсеместно используемый программный пакет позволил провести идентификацию аминокислотных последовательностей всего для 47 пептидов (т. е. менее чем 0,5% от всех зарегистрированных в ходе экспериментов пептидов).

Тем не менее, данные, собранные в ходе настоящего масс-спектрометрического исследования (в частности, данные по расщеплению пептидов при различных условиях ионизации), в принципе, могут позволить установить хотя бы приблизительные аминокислотные последовательности всех пептидов, находящихся в составе Лаеннека. Очевидно, что разработка такого метода анализа МС-данных лежит вне задач настоящей статьи.

Тем не менее, с использованием стандартного программного обеспечения были установлены аминокислотные последовательности 47 пептидов. Следует отметить, что из 47 пептидов, для которых стандартный пакет «MASCOT» позволил идентифицировать аминокислотные последовательности, только 12 пептидов, перечисленные в табл. 2, могут быть отнесены к белкам протеома человека с достаточно высокой степенью достоверности. Последовательности остальных 35 пептидов могут являться как артефактами, связанными со сложной технологией приготовления препарата

(которая, возможно, включает трипсинолиз, ферментирование с последующей ультрафильтрацией, частичным фракционированием, нагревом и др.), так и с недостатками обсуждаемого программного обеспечения для анализа данных МС.

В целом, установлено наличие в составе Лаеннека пептидов альбумина, коллагенов Iα2, Vα2, XIXα1, «цинковых пальцев» и др. (см. табл. 2). Наличие этих пептидов в составе пептидной фракции Лаеннека позволило сформулировать ряд ранее неизвестных молекулярных механизмов действия препарата. Ниже представлены результаты анализа биологической активности этих пептидов.

Пептидный фрагмент DAHKSEVAHRFK альбумина.

Данный пептид является N-концевым пептидом альбумина и имеет конформацию альфа-спирали (рис. 7). Однако как весь пептид, так и его фрагмент «ДАНК», обладают рядом интересных биологических свойств, не относящихся непосредственно к вхождению этого пептида в молекулу альбумина.

Пептид «DAHKSEVAHRFK» и такие его фрагменты, как «ДАНК» (т. е. Asp-Ala-His-Lys), проявляют выраженные антиоксидантные свойства [11]. Было установлено, что фрагмент «ДАНК» в составе пептида формирует устойчивый сайт связывания ионов меди. В сочетании с ионом меди пептид «DAHKSEVAHRFK» формирует пептидный аналог супероксиддисмутазы (СОД) — известного антиоксидантного фермента.

Антиоксидантный эффект пептидных фрагментов «DAHKSEVAHRFK» зависит от наличия иона меди в составе структуры пептида. Без иона меди антиоксидантные свойства пептидных фрагментов, измеряемые как ингибирование формирования прооксидантных радикалов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (т. н. «TBARS»), были крайне низ-

Таблица 2

Идентификация пептидных фрагментов белков протеома человека, обнаруженных в составе Лаеннека

Белок протеома человека	Обнаруженный пептид	Пептид в составе белка
Альбумин	DAHKSEVAHRFK	DAHKSEVAHRFK
Коллаген I α 2	GEAGAAGPAGPAGPR	GEAGAAGPAGPAGPR
Коллаген V α 2	GLPGESGAVGPAGPIGSR	GVPGDPGAVGPLGPRGER
Коллаген XIX α 1	GLSGAPGNDGTPGR	GTPGTPGNDGVPGR
Rwd домен белка RNF25	ITGNGRTT	IKGNGRT
Pwwp домен	ITGNGRTT	ITEDGRT
Субъединица 26S протеосомы (макропаин)	VADMHAPSIIFIDEIDAIGGK	VAEEHAPSIVFIDEIDAIGTK
Белок лейцинового повтора 63	RLENILILSSK	RLENILILSSK
Белок оптимизации трансляции митохондрий 1	KMIACIKGL	KMITCIRGL
Изоцитрат дегидрогеназа 1	ACIKGLSNV	ACIKGLPNV
Карбоксипептидаза A5	GQPGAPGVK	GQPPAPGVK
Активатор плазминогена	GQPGAPGVK	GQPGEPGV
Хорионический гонадотропин	GQPGAPGVK	QPGAP
«Цинковый палец» KRAB	RQMEESSKPLQIPPLPLK	RLLEENALPVLQVPSLPLK
«Цинковый палец» № 549	TSLVQHQK	TSLIQHQK

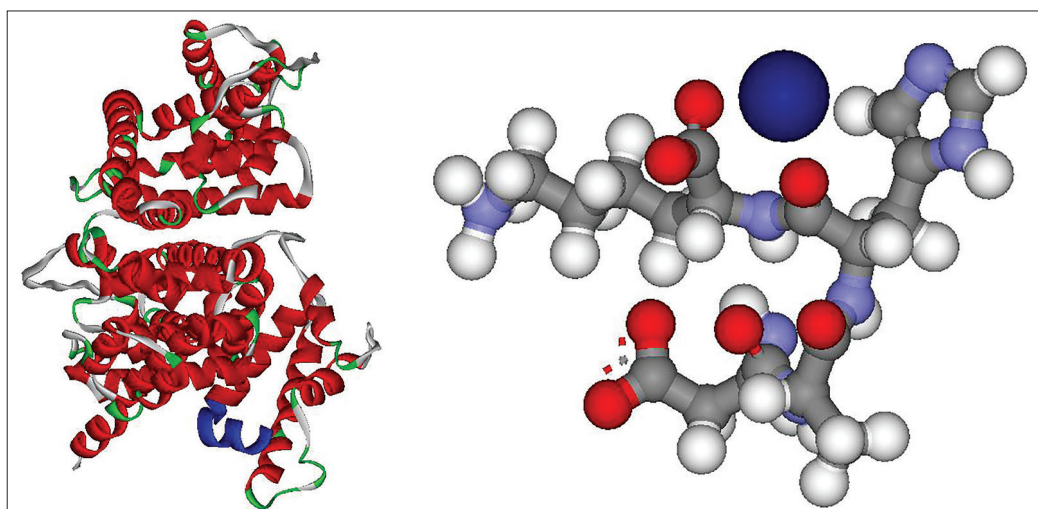


Рис. 7. Расположение пептида «DAHKSEVAHRFK», обнаруженного в составе Лаеннека, в пространственной структуре альбумина (выделен синим цветом, pdb-файл 2TF0: A). Справа, показан предположительный сайт связывания иона меди пептидным фрагментом «DAHK»

кими (единицы процентов). Добавление к пептидам ионов меди существенно повышало антиоксидантные свойства пептидов. Например, комплекс ДАНК: Cu (соотношение 2:1) ингибировал формирование TBARS на 95,4%, а комплекс ДАНКSEVAHRFK: Cu (соотношение 2:1) — на 95,8%. В комплексе с медью, исследуемые пептиды также снижали перекисное окисление липидов (рис. 8).

В сочетании с ионом меди, пептидный фрагмент пептид «ДАНК» и сам пептид «ДАНКSEVAHRFK» формируют пептидные аналоги СОД. СОД-подобная активность этих пептидных комплексов исследовалась с использованием восстановления вещества NBT (краситель «нитро-голубой тетразолиум») и показала

существенную СОД-активность в наномолярном диапазоне концентраций пептида (рис. 9). Напомним, что ферменты СОД, наряду с глутатион пероксидазами и каталазой, являются важнейшими ферментами антиоксидантной защиты организма.

Пептид «GEAGAAGPAGPAGPR» коллагена I α 2. В составе Лаеннека было обнаружено несколько пептидов коллагенов различных типов: I α 2, V α 2 и XIX α 1. Аннотировать функции этих пептидов стало возможным на основе информации о белок-белковых взаимодействиях, представленной в базе данных всех известных пространственных структур белок-белковых комплексов (PDB, Protein Data Bank).

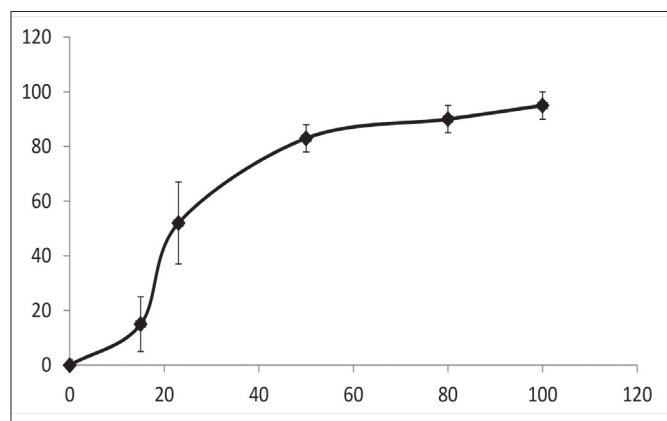


Рис. 8. Ингибирование перекисного окисления ЛПНП комплексом пептидного фрагмента ДАНК с ионом меди.

Примечание: Титрование проводилось в присутствии 0,5 мг/мл ЛПНП, 0 ммоль/л CuCl_2 , 0,5 ммоль/л аскорбата и 1 ммоль/л перекиси водорода. Образцы выдерживались 3 ч при 37 °С

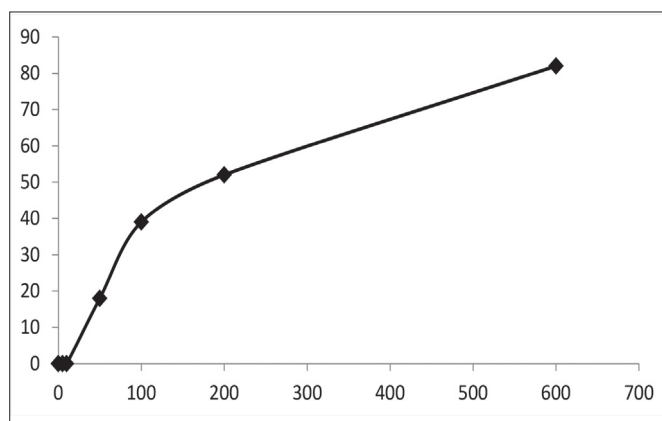


Рис. 9. Исследование СОД-подобной активности комплекса ДАНК: Cu (в соотношении 1:1).

Примечание: Исследование проводилось с использованием 1,2 ммоль/л раствора красителя NBT («нитро-голубой тетразолиум»)

Предварительный анализ показал, что эти пептиды коллагена могут участвовать в образовании более 20 белок-белковых комплексов в протеоме человека (например, с белком Sparg, адгезином, факторами коагуляции крови, интегринами и др.). Очевидно, что систематическое рассмотрение всех этих взаимодействий пептидных фрагментов коллагена находится вне рамок настоящей статьи.

Важно отметить, что аминокислотный мотив, известный как «GVMGFO» и соответствующий фрагменту GAAGPA в пептиде «GEAGAAGPAGPAGPR», является основным сайтом связывания рецепторов дискоидиновых доменами [12]. Рецепторы дискоидиновых доменов, DDR1 и DDR2 – повсеместно распространённые тирозинкиназные рецепторы,

активируемые за счёт связывания с коллагеном. Анализ пространственной структуры комплекса коллагеновых пептидов с дискоидиновым рецептором DDR2 показал, что пептид GEAGAAGPAGPAGP непосредственно участвует в связывании с рецептором DDR2 (рис. 10) [13].

Связывание коллагена рецепторами DDR приводит к устойчивой активации этих рецепторов, которые регулируют адгезию, рост, миграцию и деление клеток, а также реконструкцию внеклеточного матрикса соединительной ткани [14]. Делеции DDR1 в эксперименте приводят к аномалиям развития и функции почек [15], нарушениям заживления ран [16], снижению интенсивности роста хондроцитов [17]. Сходный фенотип наблюдается у пациентов с врождёнными

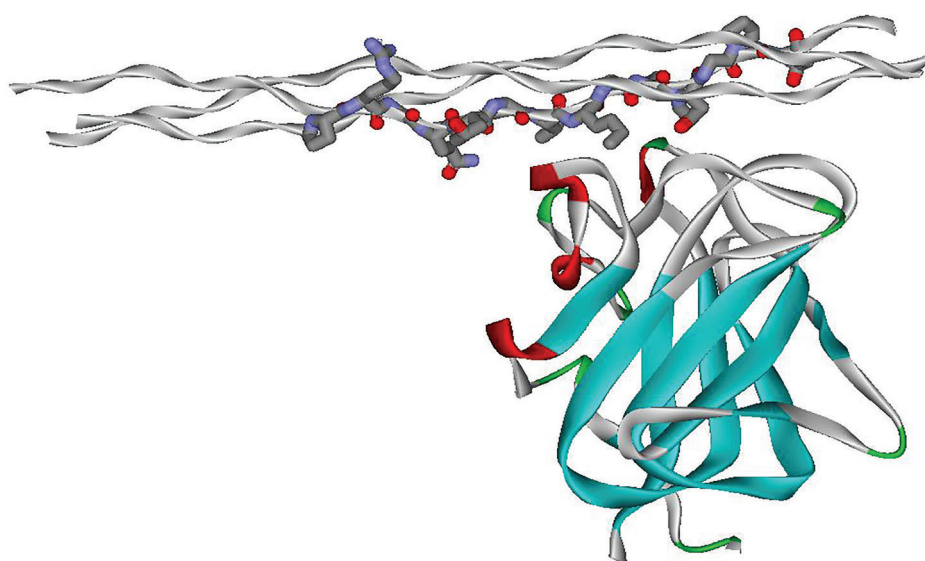


Рис. 10. Пептид GEAGAAGPAGPAGP (показан решётчатой моделью) соответствует фрагменту коллагена 14–27 в комплексе коллагена с дискоидиновым рецептором DDR2 (pdb-файл 2WUH: B)

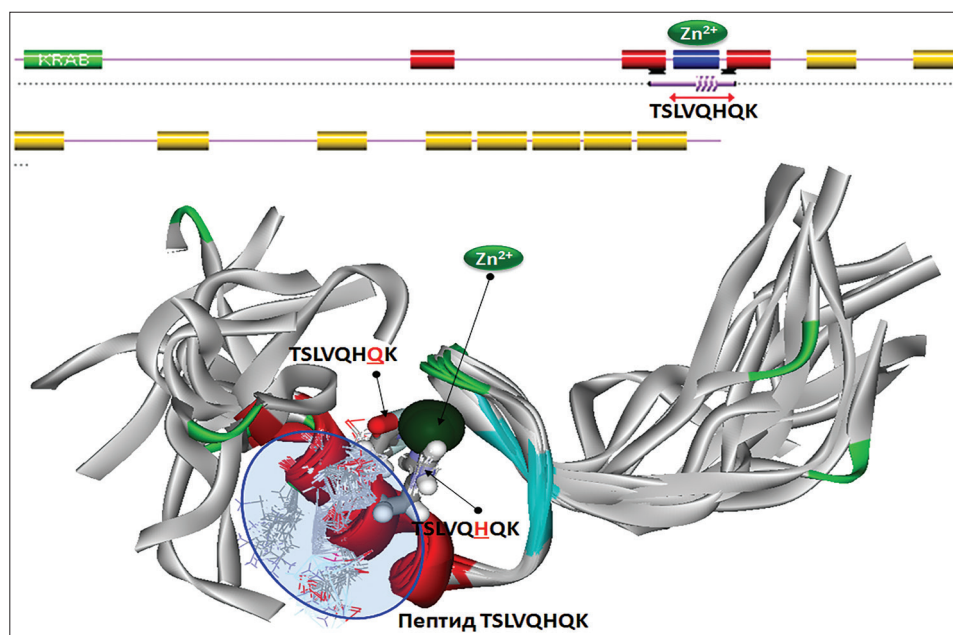


Рис. 11. Пептид TSLVQHQQK, найденный в составе Лаеннека, образует сайт связывания иона цинка в составе «цинкового пальца» № 549 протеома человека. Модель на основе PDB файла 2EMB

генетическими дефектами гена DDR2 [18]. Нарушения функции рецепторов DDR в организме человека также ассоциированы с остеоартритом, фиброзом и повышенной восприимчивостью к канцерогенезу [14]. Таким образом, активация DDR рецепторов пептидом «GEAGAAGPAGPAGP» коллагена Iα2, обнаруженным в составе Лаеннека, стимулирует качественную реконструкцию кожи, хряща и может оказывать противоопухолевый эффект.

Пептид «ITGNGRTT». Данный пептид, найденный в составе Лаеннека, отличается высокой степенью сходства с пептидом IKGNGRT Rwd домена белка RNF25 (Ring Finger Protein 25, аминокислоты 31–37 в pdb 2DAY: A). Этот белок взаимодействует с фактором транскрипции NF-κB, который регулирует процессы воспаления, а также связывает убиквитин лигазы, необходимый для контролируемой деградации внутриклеточных белков на протеасоме [19]. Также этот пептид схож с пептидом ITEDGRT в структуре Pwwp-домен содержащего протеина 2b (аминокислоты 8–14 в pdb 4LD6: A), который также регулирует деградацию белков на протеасоме [20]. Другой пептид, обнаруженный в составе Лаеннека, «VADMHAPSIFIDEIDAIGGK», схож с фрагментом 270–290 субъединицы 26S- протеасомы (pdb 4CR2: I) [21]. Снижение избыточного воспалительного ответа является неотъемлемым компонентом регенерации кожи.

Пептид «GQPGAPGVK», обнаруженный в составе Лаеннека, схож с пептидом «GQPGEPGV», входящим в состав белка-активатора плазминогена (PDB файл 1BQY: A, аминокислоты 202–209) [22].

Пептид «TSLVQHQQK» является фрагментом белка типа «цинковый палец». Присутствие данного пептида

отчасти объясняет высокую стабильность содержания цинка в Лаеннеке. В микроэлементном составе препарата Лаеннек обращают на себя внимание повышенное содержание цинка, брома и относительно высокое содержание кобальта и селена природного происхождения [7]. В частности, Лаеннек содержит *высокое количество эссенциального микроэлемента цинка: 788±114 мкг/кг.*

При этом содержание цинка в исследованных образцах было довольно стабильно: различия образцов по содержанию цинка не превышали 15%. Наиболее вероятным объяснением высокого содержания цинка, сравнительно низкой вариабельности его содержания является специфическое связывание цинка определёнными пептидами. Такими пептидами могут являться, например, пептид коллагена Iα2 «GEAGAAGPAGPAGPR» — известно, что фрагмент этого пептида, «AGPAGPR» является пептидом-хелатором цинка [23]. Кроме того, анализ пространственной структура белка типа «цинковый палец» показал, что пептид «TSLVQHQQK» непосредственно участвует в связывании иона цинка в контексте структуре белка (рис. 11) и может, таким образом, являться *цинк-связывающим пептидом.*

Заключение

Разнонаправленные регенераторные способности препарата Лаеннек обусловлены сложнейшим пептидным составом препарата. Даже при наличии хорошей обеспеченности тканей, нуждающихся в регенерации, макро- и микронутриентами, репарация тканей может быть существенно оптимизирована

целевым применением особых пептидных факторов, стимулирующих регенерацию тканей.

Масс-спектрометрическое исследование позволило установить в составе Лаеннека наличие таких пептидных факторов как

1) фрагмент альбумина DANKSEVAHRFK (который в комплексе с ионами Cu^{2+} является аналогом антиоксидантного фермента СОД);

2) пептидный фрагмент коллагена I α 2 GEAGAAGPAGPAGPR (активирует рецепторы дискоидиновых доменов, которые обеспечивают реконструкцию соединительной ткани кожи и суставов, а также поддерживает противоопухолевый иммунитет);

3) пептид «ITGNRRTT» в составе Лаеннека, который регулирует процессы воспаления, а также связывает убиквитин лигазы, необходимые для контролируемой деградации внутриклеточных белков на протеасоме;

4) пептид «VADMHAPSIIFIDEIDAIGGK», который снижает избыточный воспалительный ответ и является неотъемлемым компонентом регенерации кожи;

5) пептид «GQPGAPGVK» схож с пептидом «GQPGEPGV», входящим в состав белка-активатора плазминогена;

6) пептидный фрагмент TSLVQHQQK белка типа «цинковый палец», который, по всей видимости, обеспечивает высокую стабильность содержания цинка в Лаеннеке.

Сравнение результатов масс-спектрометрического анализа пептидной фракции Лаеннека с данными иммуноферментного анализа показало, что в составе Лаеннека присутствуют пептидные фрагменты таких ростовых факторов, как инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1), белковый гормон лептин, трансформирующий фактор роста β 1, фактор роста гепатоцитов (ФРГ) и др.

Для более точной информации в исследовании проведён тройной контроль состава препарата — анализ пептидной фракции препарата Лаеннек тремя методами: (1) высокоточной масс-спектрометрией на Q-Exactive (Thermo Scientific, Германия); (2) иммуноферментный анализ на содержание эпитопов белков с использованием моноклональных антител к IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNF α , IL-12) (ИФА, ELISA) и (3) секвенирование выделенных пептидов. Установлена высокая степень стандартизации препарата по пептидам. С использованием стандартного программного обеспечения были установлены аминокислотные последовательности 47 пептидов. Установлено наличие в составе Лаеннека пептидов альбумина, коллагенов I α 2, V α 2, XIX α 1, «цинковых пальцев», а также активных центров IGF-1, TGF-1, HGF, VEGF, PDGF, EGF и др. и хемокинов (IL-8, IL-1a, IL-1b, TNF α , IL-12 и др. Наличие этих пептидов и фрагментов факторов роста в составе пептидной фракции Лаеннека позволило

сформулировать ряд ранее неизвестных молекулярных механизмов действия препарата.

Наиболее ярко клинический эффект действия пептидов в составе лёгкой фракции Лаеннека до 3 000 Да наблюдается именно в повреждённых тканях: заживлении резанных ран кожи, термических и химических ожогов, при воспалительных повреждениях соединительной ткани суставов, при повреждениях печени (стеатогепатоз, хронический гепатит, гемоsiderоз, т.е. избыточное отложение гемосидерина в тканях организма) и др. В таких случаях, пептиды Лаеннека способствуют регенерации ткани не только за счёт протективного воздействия на выживание клеток в очаге повреждения, но и за счёт восстановления сложной иерархии взаимодействий между клетками и внеклеточным матриксом, а также обеспечения антиоксидантной защиты.

Литература

1. Громова О.А., Торшин И.Ю., Диброва Е.А., Каримова И.М., Гилельс А.В., Кустова Е.В. Мировой опыт применения препаратов из плаценты человека, Пластическая хирургия и косметология. 2011; 2: 63–67.
2. Boeckmann B., Bairoch A., Apweiler R. et al. The SWISS-PROT protein knowledgebase and its supplement TrEMBL in 2003". Nucleic Acids Research. 2003; 31 (1): 365–370.
3. Beyssac I., Martini M.C., Cotte J. Oestrogen identification and dosage in filatov human placenta extracts by high performance liquid chromatography. Int J Cosmet Sci. 1986; 8 (4): 175–188.
4. Julliard J.H., Shibasaki T., Ling N., Guillemin R. High-molecular-weight immunoreactive beta-endorphin in extracts of human placenta is a fragment of immunoglobulin G. Science. 1980; 208 (4440): 183–185.
5. Sastry B.V., Tayeb O.S., Barnwell S.L. Peptides from human placenta: methionine enkephalin and substance P. Placenta Suppl. 1981; 3: 327–337.
6. Sakura H., Aoki S., Ozawa T. The neuropeptide, head activator, in human placenta and serum from pregnant women. Acta Endocrinol (Copenh). 1991; 125 (5): 454–458.
7. Громова О.А., Торшин И.Ю., Волков А.Ю., Назаренко О.А., Сма-рыгин А.В. Анализ микроэлементного состава препарата Лаеннек, как основа его фармакологического действия. Эстетическая медицина и пластическая хирургия. 2011; 1: 43–47.
8. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гилельс А.В., Диброва Е.А., Гришина Т.Р., Волков А.Ю., Лиманова О.А., Томилова И.К., Демидов В.И. Препараты плаценты человека: фундаментальные и клинические исследования. Врач. 2014; 4: 67–72.
9. Кеймс М. Техника липидологии, М.: Мир. 1975; 322.
10. Дарбье А. Практическая химия белка, М.: Мир. 1989; 621.
11. Bar-Or D., Rael L.T., Lau E.P., Rao N.K., Thomas G.W., Winkler J.V., Yukl R.L., Kingston R.G., Curtis C.G. An analog of the human albumin N-terminus (Asp-Ala-His-Lys) prevents formation of copper-induced reactive oxygen species. Biochem Biophys Res Commun. 2001; 284 (3): 856–862.
12. Konitsiotis A.D., Raynal N., Bihan D., Hohenester E., Farndale R.W., Leitinger B. Characterization of high affinity binding motifs for the discoidin domain receptor DDR2 in collagen. J Biol Chem. 2008; 283 (11): 6861–8 doi.
13. Carafoli F., Bihan D., Stathopoulos S., Konitsiotis A.D., Kvasnakul M., Farndale R.W., Leitinger B., Hohenester E. Crystallographic insight into collagen recognition by discoidin domain receptor 2. Structure. 2009; 17 (12): 1573–81 doi.
14. Vogel W.F., Abdulhussein R., Ford C.E. Sensing extracellular matrix: an update on discoidin domain receptor function. Cell Signal. 2006; 18 (8): 1108–16 Epub 2006 F.
15. Gross O., Beirowski B., Harvey S.J., McFadden C., Chen D., Tam S., Thorne P.S., Smyth N., Addicks K., Bloch W., Ninomiya Y., Sado Y., Weber M., Vogel W.F. DDR1-deficient mice show localized subepithelial GBM

thickening with focal loss of slit diaphragms and proteinuria. *Kidney Int.* 2004; 66 (1): 102–111.

16. Hou G., Vogel W., Bendeck M.P. The discoidin domain receptor tyrosine kinase DDR1 in arterial wound repair. *J Clin Invest.* 2001; 107 (6): 727–735.

17. Kano K., Marin de Evsikova C., Young J., Wnek C., Maddatu T.P., Nishina P.M., Naggert J.K. A novel dwarfism with gonadal dysfunction due to loss-of-function allele of the collagen receptor gene, *Ddr2*, in the mouse. *Mol Endocrinol.* 2008; 22 (8): 1866–80.

18. Bargal R., Cormier-Daire V., Ben-Neriah Z., Le Merrer M., Sosna J., Melki J., Zangen D.H., Smithson S.F., Borochowitz Z., Belostotsky R., Raas-Rothschild A. Mutations in *DDR2* gene cause SMED with short limbs and abnormal calcifications. *Am J Hum Genet.* 2009; 84 (1): 80–4 doi.

19. Asamitsu K., Tetsuka T., Kanazawa S., Okamoto T. RING finger protein AO7 supports NF-kappaB-mediated transcription by interacting

with the transactivation domain of the p65 subunit. *J Biol Chem.* 2003; 278 (29): 26879–87 Epub 2003.

20. Rolland T., Tasan M., Charleaux B., Pevzner S.J., Zhong Q., Sahni N., Yi S., Lemmens I., Fontanillo C., Mosca R., Kamburov A. *et al.* A proteome-scale map of the human interactome network. *Cell.* 2014; 159 (5): 1212–26 doi.

21. Unverdorben P., Beck F., Sledz P., Schweitzer A., Pfeifer G., Plitzko J.M., Baumeister W., Forster F. Deep classification of a large cryo-EM dataset defines the conformational landscape of the 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014; 111 (15): 5544–9 doi.

22. Parry M.A., Jacob U., Huber R., Wisner A., Bon C., Bode W. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. *Structure.* 1998; 6 (9): 1195–1206.

23. Патент KHP № CN104372054A: «The cod skin collagen source chelating peptide and its preparation method».

Определение острой токсичности и негативного воздействия высоких доз аскорбата лития при длительном применении на крысах линии Вистар

**Остренко К.С.¹, Сардарян И.С.², Громова О.А.³, Колоскова Е.М.¹,
Пронин А.В.³, Торшин И.Ю.⁴**

¹ – ФГБНУ «ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных», Калужская обл., г. Боровск

² – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург

³ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

⁴ – ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Долгопрудный

Резюме. Исследование показателей острой токсичности на самцах белых крыс линии Вистар показало, что аскорбат лития составляет 6,334 г/кг. Субстанция относится к соединениям 5-го класса токсичности, т.е. практически нетоксичным. Коэффициент кумуляции составил 14,8, что свидетельствует о низком кумулятивном эффекте и низкой токсичности. При исследовании хронической токсичности у животных, получавших аскорбат лития ежедневно, в дозах от 1/10 LD₅₀ (630 мг/кг), в течение 30 дней, данные гистологического исследования указывают на то, что происходит функциональное перенапряжение нейроэндокринного аппарата (гетерогенность клеточных элементов, признаки дистрофических изменений в коре головного мозга) и, в меньшей степени, внутренних органов (печени, половых органов, почек).

Ключевые слова: острая токсичность, субхроническая токсичность, крысы Вистар, аскорбат лития

Determination of acute toxicity and adverse effects of high doses of prolonged use of lithium ascorbate on Wistar rats

Ostrenko K.S.¹, Sardaryan I.S.², Gromova O.A.³, Koloskov E.M.¹, Pronin A.V.³, Torshin I.Yu.⁴

¹ – FGBNU «Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals», Kaluga region, Borovsk

² – VPO «Saint Petersburg State Pediatric Medical University», St. Petersburg

³ – FSBEI HE IvSMA Russian, Ivanovo

⁴ – FSBEI HE Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

Abstract. Toxicity study in male Wistar albino rats showed that the LD₅₀ of lithium ascorbate is 6,334 g/kg which refers the substance to grade 5 toxicity (practically non toxic). Accumulation ratio of lithium ascorbate was found to be 14,8 thus indicating a low cumulative effect and confirming low toxicity. Histological findings in animals treated with lithium ascorbate daily for 30 days in doses close to LD₅₀ indicate that an excess strain is exerted upon the neuroendocrine system (heterogeneity of cell elements, signs of dystrophic changes) and, to a lesser extent, upon the internal organs. At the same time, after the subtoxic doses were ceased a partial restoration of functional activity of the organs involved was observed.

Keywords: acute toxicity, subchronic toxicity, Wistar rats, lithium ascorbate

Автор, ответственный за переписку:

Остренко Константин Сергеевич — к.б.н., докторант лаборатории Иммунобиотехнологии ФГБНУ «ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных»; 249010, Калужская обл., г. Боровск, п. Институт; тел. +7 (910) 916-66-58; e-mail: ostrenkoks@gmail.com

Введение

Значительная распространённость пограничных нервно-психических расстройств и особенно невротических нарушений является проблемой первостепенного значения в развитых странах мира. Совокупность неудовлетворённостей от воздействия стрессоров различной этиологии приводят к возникновению и обострению депрессивных состояний. От 45 до 60% всех суицидов на планете совершают психически здоровые люди с поверхностными моно- и биполярными аффективными расстройствами, что является первой стадией маниакально-депрессивного

психоза [1]. Депрессия — психическое расстройство, характеризующиеся «депрессивной триадой»: (1) снижение настроения и утрата способности переживать радость, (2) нарушения мышления, (3) двигательная заторможенность. Депрессией страдает 10% населения в возрасте 40 лет из них две трети женщины. Среди лиц старше 65 лет депрессия встречается в три раза чаще, а общая распространённость в юношеском возрасте составляет от 15 до 40% [2].

Препараты лития являются эффективным средством для лечения моно- и биполярных аффективных расстройств. Для лечения монополярного расстройства препараты лития имеют преимущества

по сравнению с антидепрессантами. В последние годы в США и Европе наблюдается более широкое применение препаратов лития у детей. Так, в крупных эпидемиологических исследованиях было показано, что частота назначения лития детям с психическими расстройствами (преимущественно в возрастной группе 10–14 лет) за последнее десятилетие возросла в 2 раза. Клиническое руководство CANMAT подтверждает эффективность и хорошую переносимость лития у детей при лечении биполярного расстройства. Литий и другие нормотимики являются препаратами первого выбора при лечении биполярной депрессии лёгкой и средней тяжести.

При всех положительных эффектах использования карбоната лития, отношение к нему неоднозначно. Основным недостатком применения является высокая доза ведения для достижения стойкого положительного эффекта. Применение карбоната лития при психотических расстройствах обычно начинают с 0,6–0,9 г/сут. При хорошей переносимости на второй день назначают 1,2 г и ежедневно повышают дозу на 0,3 г до суточной дозы 1,5–2,1 г. Пожилым пациентам карбонат лития назначают не в меньших дозах, чем молодым. Ещё одним недостатком карбоната лития является необходимость пациента знать о необходимости соблюдения диеты: следует исключить потребление больших количеств жидкости и соли, ограничении пищи, богатой литием (копчёностей, некоторых видов твёрдых сыров, красного вина). Перед назначением долговременной терапии карбонатом лития желательно располагать данными следующих обследований, во избежание токсических эффектов: клинический анализ крови и мочи. Такие сложности препятствуют широкому и эффективному использованию препаратов лития. В связи с этим поиск, изучение и внедрение новых соединений лития с низкой токсичностью и высокой эффективностью в малых дозах является перспективным направлением в психиатрии и неврологии.

Материалы и методы

Целью данной работы было определить безопасность новой соли лития — аскорбата лития; определить основные токсикологические параметры, негативное воздействие высоких доз на органы и системы органов, согласно руководству по доклиническому изучению лекарственных средств [6]. Работа выполнена на крысы линии Wistar, полученных из питомника лабораторных животных «Пушино».

Содержание животных. Животные содержались в комнате барьерного типа в условиях, соответствующих стандартам, указанным в руководстве *The Guide for Care and Use of Laboratory Animals* (ILAR publication, 1996, National Academy Press, 1996). Животных кормили стандартным кормом для лабораторных грызунов «Чара» (Ассортимент Агро, Россия, ГОСТ ПК-120,

Россия) *ad libitum*, с сертификатом контроля производителя на содержание пищевых компонентов.

Острая токсичность. В качестве модельного объекта были использованы 2-месячные самцы белых крыс линии Вистар массой 180–200 г ($n = 48$, 8 групп по 6 животных в каждой). Все процедуры и опыты на крысах проводились в соответствии с международными правилами обращения с животными. Перед началом исследований животных выдерживали на карантине в течение 12 дней, до введения препарата они подвергались суточной депривации. Животные были подобраны и распределены по группам по принципу парных аналогов, содержались в идентичных условиях кормления (ежедневно комбикормом из расчёта 40–50 г на особь) и содержания (в клетках по 6 крыс в каждой, при температуре 19–21 °С). В первой серии опытов острая токсичность лития аскорбата определялась при пероральном способе введения. LD_{50} рассчитывался по методу Кербера. Субстанцию вводили однократно внутрь в дозах 1 000, 2 000, 3 000, 4 000, 5 000, 6 000, 7 000, 8 000 мг/кг массы тела. Объём введения составлял 2,0 мл на крысу (дозы являются предельно допустимыми по объёму для перорального введения) внутрижелудочно специальным металлическим зондом. Объём вводимого животным лития аскорбата довели водой для инъекций. Критериями оценки токсичности служил летальный исход и характер клинической картины.

Подострая токсичность. **Подострая (субхроническая) токсичность** — совокупность функциональных и/или морфологических нарушений органов и систем подопытного животного после повторного введения. Продолжительность введения 3 недели [6]. В исследовании использовались крысы аналогичные предыдущему эксперименту. Было сформировано две группы животных по принципу парных аналогов, 10 животных контрольной группы, 20 животных опытной группы. Аскорбат лития вводили ежедневно в дозе $1/3 LD_{50}$ 20 крысам линии Вистар в течение 21 дня, контрольная группа препарат не получала. Оценка токсического действия при многократном введении определялась по изучению массы тела животных и выживаемости. Расчёт коэффициента кумуляции ($K_{кум}$) при определении подострой токсичности проводили по формуле (К.К. Сидоров, 1976).

Субхроническая системная токсичность. Субхроническая системная токсичность — неблагоприятный эффект, возникающий после ежедневного введения однократной или многократных доз исследуемой пробы в течение части общей продолжительности жизни. Животные были подобраны и распределены по группам по принципу парных аналогов, содержались в идентичных условиях кормления и содержания. Перед началом исследований животных выдерживали на карантине в течение 12 дней до введения аскорбата лития [3]. Для определения коэффициентов кумуляции аскорбата лития проводили опыты по определению

субхронической токсичности (по Лимму). В исследовании использовались крысы самцы [4]. Суть метода заключалась в увеличении дозы препарата каждые 4 дня на 50%, что позволяет проследить реакцию крыс в течение 28 дней на введение от 0,1 до 1,12 LD₅₀. LD₅₀ аскорбата лития, что составляет 6,333 г/кг массы тела. В опыте использовано 10 крыс, получавших перорально лития аскорбат и 5 intactных животных.

Хроническая токсичность. Это совокупность токсических эффектов, вызываемых повторным введением того или иного токсического вещества в одинаковой дозе, в течение периода. Испытуемое соединение вводят на протяжении 30 дней, наблюдение за животными осуществляется периодически. **Исследования проводилось на крысах.** Для определения опасности повторного применения препарата (хронической токсичности при длительном введении аскорбат лития вводили в течение 30 дней. Вводимые дозы составили 630 мг/кг массы, что составляет 1/10 от LD₅₀. Объектом исследования были лабораторные 2-месячные крысы обоего пола линии Вистар, средней массой 150–170 г.

В опыте использовано 10 крыс, получавших перорально литий и 10 intactных животных.

Результаты и обсуждения

Сравнивая результаты двух методов определения LD₅₀, можно подтвердить возможность использования любого из них, т. к. различия не превышают 0,1% в зависимости от метода, взятого за эталон [7]. Формула расчёта LD₅₀ следующая:

$$LD_{50} = LD_{100} - \Sigma(Z \times D)/n,$$

где LD₁₀₀ — доза препарата, которая вызвала эффект у всех тест-объектов в группе; D — интервал между двумя смежными дозами; Z — среднее арифметическое из двух значений числа тест-объектов, у которых проявился положительный эффект при воздействии каждой из двух смежных доз; n — число тест-объектов в группе.

Полученные данные позволили определить параметры острой токсичности лития аскорбата. Так для белых крыс линии Вистар LD₅₀ — 6 334 мг/кг, LD₁₀₀ — 8 000 мг/кг. Таким образом, по таблице распределения лекарственных средств аскорбат лития относится к 5 классу «практически нетоксичных» LD₅₀ ≥ 5 000 мг/кг. Данные полученные в ходе опыта на лабораторных животных представлены в табл. 1–2.

Клиническая и патологоанатомическая картина острого отравления крыс аскорбатом лития. При пероральном введении аскорбата лития в токсических дозах клиническая картина отравления проявилась через сутки. При введении токсических доз аскорбата лития снижалось потребление корма и увеличивалось потребление воды. Учащались акты дефекации, помёт становился жидким с большим количеством слизи. Желудок быстро переполнялся водой и его жидким содержимым. Животные становились малоподвижными, предпочитали сидеть группами рядом с поилкой. По мере развития отравления крысы лежали с закрытыми глазами, движения были скованные, каловые массы беловато-водянистого, в поздние сроки, не

Таблица 1

Определение среднесмертельной дозы аскорбата для крыс (по Керберу)

Доза, мг/кг	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000	7 000	8 000
Выжило	6	6	6	6	5	3	3	6
Пало	0	0	0	0	1	3	3	6
Z	0	0	0	0,5	2	3	4,5	
D	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000	1 000
(Z · D)	0	0	0	500	2 000	3 000	4 500	
$\Sigma (Z \cdot D) = 10\,000$								

Таблица 2

Определение среднесмертельной дозы лития аскорбата для крыс линии Вистар (по Першину)

Доза, мг/кг	1 000	2 000	3 000	4 000	5 000	6 000	7 000	8 000
Пало/выжило	0/6	0/6	0/6	0/6	1/5	3/3	3/3	6/0
% погибших	0	0	0	0	16,6	50	50	100
Сумма доз рядом стоящих, A	3 000	5 000	7 000	9 000	11 000	13 000	15 000	
Разность % умерших, B	0	0	0	16,6	33,4	0	50	
(A · B)	0	0	0	149 400	367 400	0	750 000	
$\Sigma (A \cdot B) = 1\,266\,840$								

содержали остатков корма. Слизистые глаз, ротовой полости бледно-розовые. Дыхание учащённое. Общее угнетение нарастало, крысы переставали реагировать на внешние раздражители. Температура тела снижается за 2–3 ч до смерти на несколько градусов.

У павших крыс при наружном осмотре шерсть была мокрая, взъерошенная, вокруг ануса — испачкано каловыми массами. Слизистая оболочка анального отверстия бледно-розового цвета, влажная. Из носовых отверстий выделялась пенная жидкость розоватого цвета. Из ротовой полости стекали водянисто-мутноватая жидкость со слизью. При вскрытии отмечалось правильное положение грудобрюшной полости. Сердце — округлой формы, коронарные сосуды кровенаполнены, сердечная сорочка блестящая бледно-розового цвета. Эпикард, эндокард без видимых изменений, миокард серого цвета, дряблой консистенции. Печень дряблая, темно-коричневого цвета с сероватым оттенком, края округлые. Дольчатый рисунок сглажен. С поверхности разреза стекает кровь. Желчный пузырь наполнен желчью зеленого цвета. Слизистая оболочка бархатистая, оранжевого цвета. Проприодность желчного протока сохранена. Селезёнка без видимых изменений. Почки неравномерно окрашенные, пёстрые, сосуды кровенаполнены. Коровый слой утолщён, дряблой консистенции. Границы между корковым и мозговым слоем стёрты. В полости трахеи содержалась пенная масса бело-розового цвета. Лёгкие красного цвета, тестоватой консистенции, на разрезе при надавливании вытекает пенная масса красного цвета и кровь. Кусочки лёгкого тяжело плавают в воде. В ротовой полости и пищеводе водянистая мутная жидкость с наличием слизи. Слизистая оболочка без видимых изменений. В пищеводе вода со слизью. Слизистая оболочка местами покрасневшая. Желудок имел покрасневшую слизистую оболочку, содержал небольшое количество корма зеленоватого цвета. Кутикула снималась с усилием, слизистые без видимых изменений. В кишечнике слизистая оболочка бледно-розовая, местами покрасневшая, содержимое кишечника жидкое. Головной мозг серого цвета, сосуды мозговых оболочек расширены и наполнены кровью. Кости, суставы, мускулатура без видимых изменений.

Патологоанатомический диагноз: острое отравление, гиперемия и отёк лёгких; белковая дистрофия почек, печени, миокарда; острая застойная гиперемия почек, печени и мозговых оболочек; слизистый

катар желудочно-кишечного тракта. Смерть крыс при остром отравлении аскорбатом лития наступила от сердечно-лёгочной недостаточности при атрофии выделительной системы.

В ходе исследований подострой токсичности установили, что на третий день отмечено снижение суточного потребления корма опытной группы по сравнению с контролем. Крысы опытной группы больше потребляли воды, были менее подвижны. Сниженное суточное потребление корма крысами опытной группы оставалось в течение 2 недель наблюдения. Это не могло не отразиться на приросте массы тела. За первые трое суток крысы контрольной группы прибавили в массе 59,1 г, а крысы опытной группы потеряли в среднем 68 г. У опытной группы крыс выделялись разжиженные каловые массы, температура тела составляла 39,7–40,8 °С. Три крысы пали на 6-й день опыта, потеряв до 80 г. Две крысы пали на 8- и 9-й день опыта, потеряв 84 и 76 г. Две крысы пали на 12-й день, потеряв в среднем 94 г. Одна крыса пала на 13-й день, потеряв 102 г. Пять крыс пали на 14-е сутки, потеряв за время опыта в среднем 94,7 г. За 2 ч до гибели температура тела снижалась до 37,6 °С. Данные представлены в табл. 3.

Семь животных адаптировались в разной степени к подострой интоксикации лития аскорбатом и выжили, но в характере их реакции были существенные отличия. Крысы на протяжении 21 дня не прибавляли в массе тела, трудно приспособлялись. Четыре животных в первые 2 дня потеряли в среднем 27 г, в последующие двое суток одна из них прибавила 2 г, остальные по 4–6 г. Это минимальное увеличение позволило к 21 дню увеличить массу тела на 38–43 г. Оставшиеся 3 крысы отличались лучшими адаптационными возможностями. Одна крыса только первые 4 дня имела снижение массы тела. У одной особи из опытной группы фиксировалось постоянное увеличение массы тела и её прирост за время опыта составил 79 г. Расчёт коэффициента кумуляции ($K_{\text{кум}}$) при определении подострой токсичности проводили по формуле (К.К. Сидоров) [8]:

$$K_{\text{кум}} = \frac{D_{\text{к}}}{LD_{50}},$$

где: $D_{\text{к}}$ — суммарная доза, полученная крысой; LD_{50} —

среднелетальная доза; $K_{\text{кум}} = \frac{93,58}{6,33} = 14,8$.

Таблица 3

Динамика изменения массы тела крыс в тесте подострой токсичности (контроль, $n = 10$; опыт, $n = 20$)

Группы	Масса до введения	День введения			
		через 3 дня	через 7 дней	через 14 дней	через 21 день
Контрольная	189,20±7,35	248,30±6,6	283,20±9,6	317,20±7,87	349,50±5,95
Опытная	189,35±8,59	136,50±27,71	137,71±49,09	168,92±66,58	245,29±16,53*

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

Таблица 4

Динамика изменения массы тела крыс в тесте субхронической токсичности (контроль, $n = 10$; опыт, $n = 20$)

Группы	Масса до введения	День введения					
		через 5 дней	через 10 дней	через 15 дней	через 20 дней	через 25 дней	через 30 дней
Контрольная	200,80±4,6	232,00±6,04	262,80±17,58	275,40±39,87	331,40±13,90	361,00±15,28	391,40±15,57
Опытная	199,40±5,1	223,90±7,34*	223,90±15,79	275,40±19,90	331,40±26,64	184,00±16,35*	193,40±17,66

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

Исследование субхронической токсичности (по Лимму). Введение лития аскорбата в течение 2–3 дней не влияло на поведение животных. С 5-го дня уменьшилось потребление корма и увеличилось потребление воды на 25–30%. Отдельные особи животных были взъерошены, малоподвижны, каловые массы неоформленные. С десятого дня (с увеличением дозы до $0,4 LD_{50}$) кал становится жидким, так как крысы опытной группы потребляли на 50% больше воды при сниженном потреблении корма, по сравнению с контрольной группой. Так, на 16-й день в опытной группе крысы съели лишь 48% от массы потреблённого корма в контрольной группе.

Наряду со снижением потребления корма и увеличением приёма воды была замечена потеря массы тела. Так, на 16-й день эта потеря составляла: у 3 крыс — 1–2%, у 2 — 4–5%, у 4 — 8–12%. У одной особи живая масса увеличилась на 1,58%. Прирост массы тела у контрольной группы за это время увеличился от 80 до 100%. На 20-й день у 8 крыс опытной группы потеря массы составляла до 21%, одна крыса пала от суммарной дозы $4,24 LD_{50}$ на 24-й день, потеряв 87 г м. т. Данные представлены в табл. 4.

Расчёт коэффициента кумуляции ($K_{\text{кум}}$) в опыте по определению субхронической токсичности (по Лиму) определяли по той же формуле, что и в предыдущем опыте:

$$K_{\text{кум}} = \frac{D_{\text{к}}}{LD_{50}},$$

где: $D_{\text{к}}$ — суммарная доза, полученная крысой; LD_{50} —

среднелетальная доза; $K_{\text{кум}} = \frac{93,58}{6,333} = 14,8$.

Негативное воздействие на органы и ткани при длительном применении аскорбата лития. При использовании дозы $1/10 LD_{50}$ в течение месяца мы не отмечали существенных отклонений в поведении крыс, в потреблении корма, приросте массы тела. Увеличения потребления и выведения воды крысами не наблюдалось.

Крысы опытной группы нормально развивались и прибавляли в массе наравне с контролем. Резких отклонений не наблюдалось. Животные были подвижны, шерстный покров и видимые слизистые чисты.

На вскрытии расположение органов и их строение от нормы не отличались, лёгкие чистые. В фиксатор взяты следующие органы: мозг (фронтальный срез через гиппокамп, таламус и гипоталамус), гипофиз, печень, почки, надпочечник, гонады.

Мозг животных. В коре головного мозга контрольных животных хорошо определялась стратификация слоев с некоторым разрежением нейронов ганглионарного слоя в соматосенсорной зоне. В гиппокампе пирамидные клетки в зонах СА-2 и переходе СА-2 в СА-3 расположены несколько неравномерно с выходом отдельных или небольших групп нейронов в молекулярный слой. В таламусе нейроны имели ядра разной величины с чёткой кариолеммой и узким ободком слабо или умеренно базофильной цитоплазмы. В гипоталамусе дорсолатеральные ядра содержали более мелкие нейроны по сравнению с вентролатеральными и латеральными ядрами. Для нейронов гипоталамической области характерны небольшие цитоплазмы, чётко отграниченные ядра с умеренно базофильной кариоплазмой и небольшим ядрышком (рис. 1). Нейроны супраоптического ядра небольшие по сравнению с остальными нейронами гипоталамуса, имели гиперхромные ядра и базофильное содержимое, расположенное по периферии цитоплазмы (рис. 2).

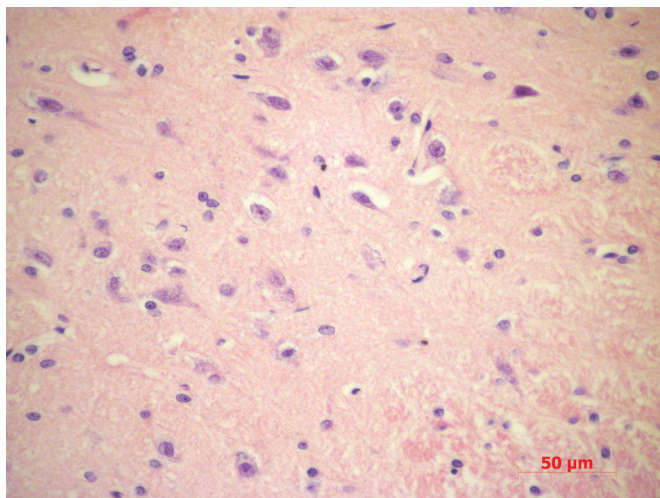


Рис. 1. Нейроны перифорникулярной зоны гипоталамуса интактной крысы-самки. Окраска гематоксилин-эозином (г-э). Об. 40, ок. 10

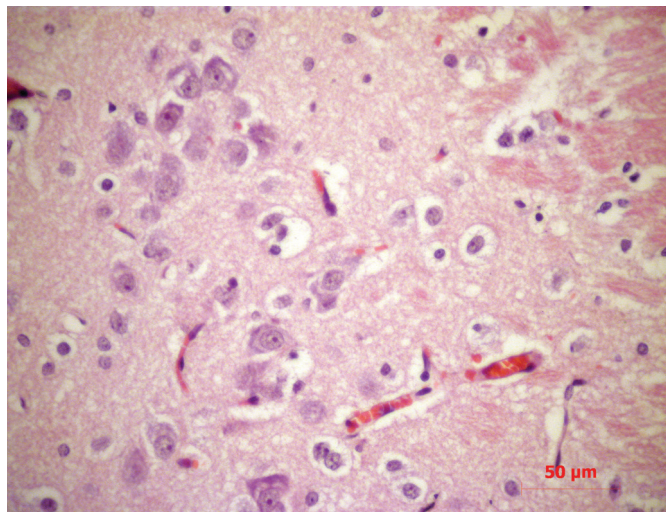


Рис. 2. Гистоструктура супраоптического ядра гипоталамуса интактной крысы-самки. Окраска г-э. Об.40, ок. 10

У животных, получавших аскорбат лития структура мозга не изменена. Отмечалось некоторое усиление базофилии нейронов 2-го и 3-го слоев коры головного мозга, пирамидального слоя гиппокампа. Эти признаки активации нейронов несколько больше выражены у самцов. В гипоталамусе, в области дорсомедиальных ядер и в парафорикулярной области, отмечалось присутствие отдельных или небольших групп нейронов с увеличенной базофильной цитоплазмой, содержащей зернистый или гомогенный материал (рис. 3). Кроме того, у некоторых животных в супраоптических ядрах (рис. 4) нейросекреторные клетки гетерогенные: разной величины, в их цитоплазме содержание базофильного вещества значительно колебалось, часть нейронов уменьшены в размерах, имели гиперхромное ядро и цитоплазму.

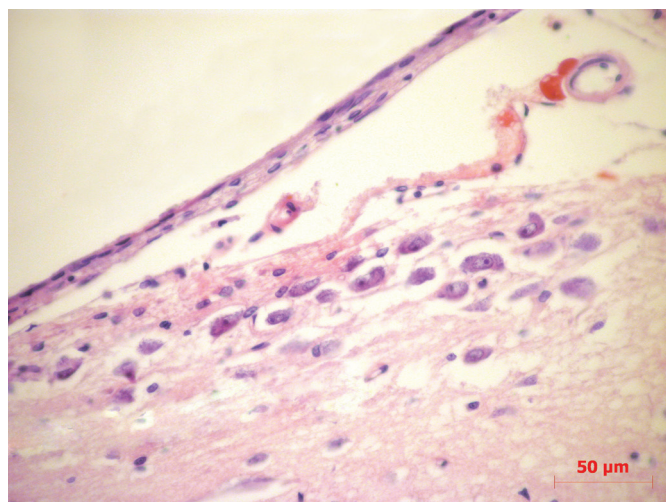


Рис. 3. Нейроны перифорикулярной зоны гипоталамуса после введения аскорбата лития. Нейроны гипертрофированы. Окраска г-э. Об.40, ок.10

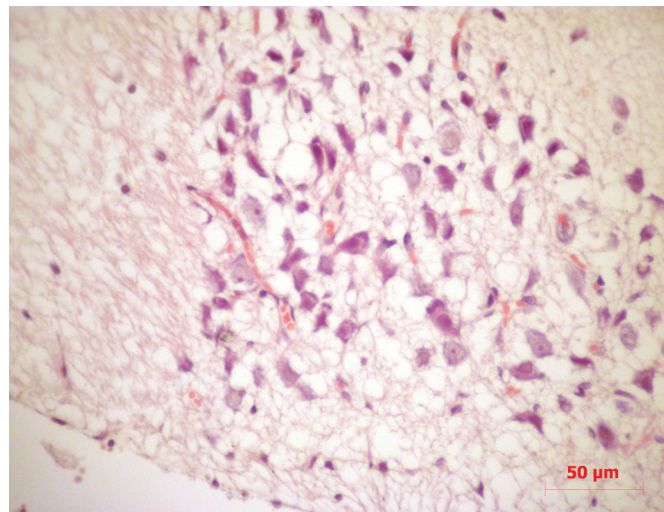
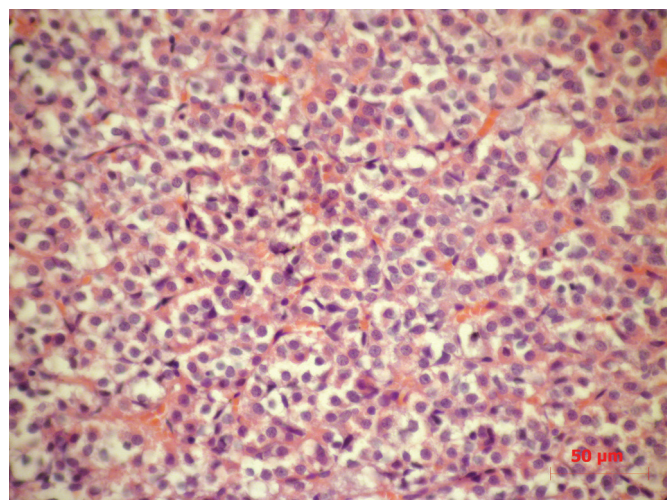


Рис. 4. Супраоптическое ядро гипоталамуса крысы-самки после введения аскорбата лития. Нейроны гетерогенны. Окраска г-э. Об.40, ок.10

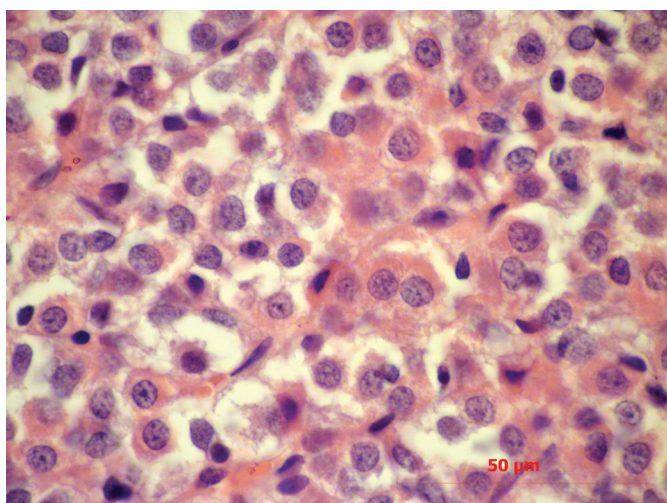
Таким образом, гистологическая картина мозга на уровне гипоталамуса свидетельствовала о повышении функциональной активности нейронов, ответственных по своему расположению за синтез рилизинг-факторов для гипофизарных клеток. В нейронах супраоптических ядер повышение их функциональной активности сопровождалось дистрофическими изменениями в отдельных клеточных элементах, что свидетельствовало об их функциональном перенапряжении.

Гипофиз. У контрольных животных гипофиз состоял из трёх частей: передней части (аденогипофиза), задней части (нейрогипофиза) и расположенной между ними узкой промежуточной части, относящейся по генезу к аденогипофизу. Клетки аденогипофиза играли важную роль в регуляции функции гормональных органов-мишеней и, в свою очередь, находились под регулирующим влиянием ядерных образований гипоталамуса. При окрашивании гематоксилином и эозином различали эозинофильные и базофильные эндокринные клетки гипофиза, которые выполняли различные функции. Передняя и задняя части гипофиза содержали хорошо развитую и полнокровную сеть кровеносных капилляров. В аденогипофизе были видны эозинофильные и базофильные клетки с зернистой цитоплазмой полигональной формы, округлым ядром, умеренно базофильным с пылевидным хроматином и мелким ядрышком. Визуально у самцов количество эозинофилов было больше (рис. 5а, 5б), чем у самок. У самок и самцов цитоплазма эозинофильных клеток имела разную степень насыщенности гранулярным материалом, особенно меньше гранул было в клетках, расположенных на периферии аденогипофиза.

Задняя часть гипофиза имела рыхлое волокнисто-ячеистое строение, в основном, представленное пучками аксонов и, разбросанными среди них, глияльными элементами. Среди описанных структур выявлялись везикулы с зернистым эозинофильным



а



б

Рис. 5. Гистоструктура аденогипофиза интактной крысы-самца. а — окраска г-э. Об.40, ок.10; б — большое увеличение. Эозинофильные клетки преобладают. Окраска г-э. Об.100, ок.10

содержимым, которые зачастую непосредственно контактировали с кровеносными сосудами. Необходимо отметить, что у самцов количество везикул с зернистым содержимым было меньше, а сами везикулы выглядели более мелкими. Сопоставляя эти данные с данными гистологического строения аденогипофиза, можно предположить, что у самцов система выработки и реализации нейрогормональных продуктов функционировала более активно, чем у самок.

Самки (опытная группа). Дистрофических и некротических изменений в клетках аденогипофиза не отмечалось. Клеточные элементы располагались более плотно, чем у интактных животных, их ядра выглядели несколько увеличенными, а цитоплазмы было меньше, чем в контроле. В задней доле везикулы (булавовидные образования) с зернистым содержимым практически не выявлялись. Встречались отдельные везикулярные образования с плотным гомогенным содержимым (рис. 6а).

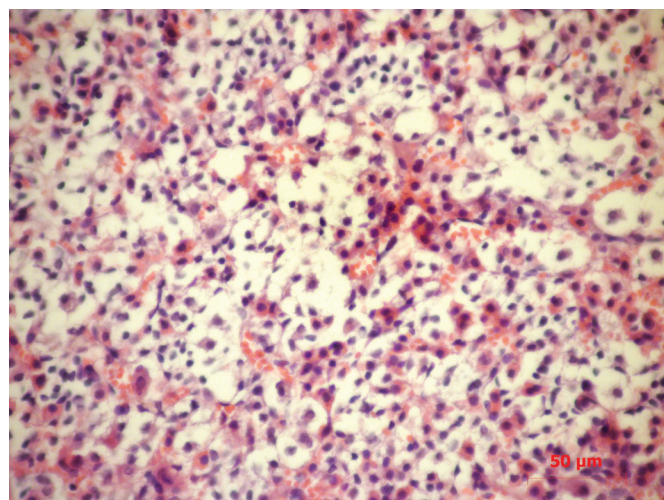


Рис. 6а. Аденогипофиз крысы-самца после введения аскорбата лития при большом увеличении. Клетки аденогипофиза с признаками дистрофии. Окраска г-э. Об.100, ок.10

Самцы (опытная группа). У одного животного в аденогипофизе эозинофильно окрашенные клетки были представлены, в основном, в виде небольших групп, имели признаки дистрофических изменений: их цитоплазма и ядра были уплотнены, базофильные клетки содержали скудное количество цитоплазматических гранул. У других животных эти изменения были выражены слабо и по своей гистоструктуре орган приближался к контролю. В задней доле гипофиза гистологическая картина мало отличалась от нормы. Рыхлая волокнисто-ячеистая структура доли содержала редкие булавовидные образования с зернистым содержимым (рис. 6б).

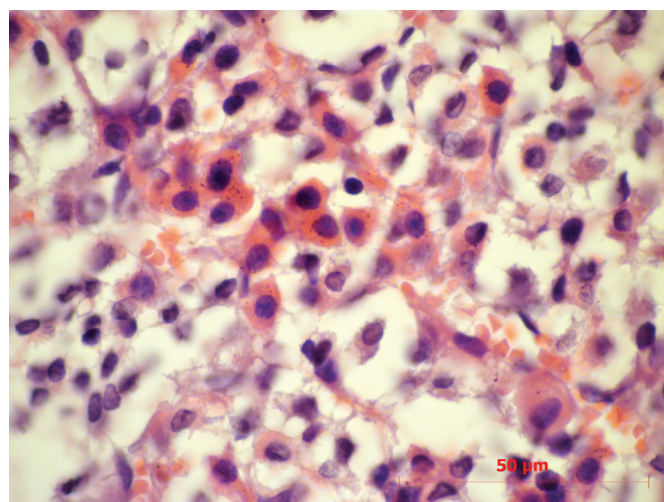


Рис. 6б. Аденогипофиз крысы-самца после введения аскорбата лития. Эндокринные клетки гетерогенны. Окраска г-э. Об.40, ок.10

Заключение. Общая структура органа не изменена. У части животных признаки функциональной нагрузки на гормональные клетки к этому сроку

были сохранены. У самок умеренная репаративная гиперплазия в этот срок была выражена ярче. При введении аскорбата лития восстановительные процессы в клетках аденогипофиза при его использовании протекали быстрее, и процессы активного выброса гормональных препаратов более длительны, что особенно выражено у самок.

Надпочечники. У контрольных интактных крыс гистоструктура органа представлена корковым и мозговым веществом. В корковом веществе (рис. 7) присутствовали несколько различных по своим морфофункциональным особенностям зон. Узкий подкорковый слой (клубочковый) включал в себя клетки с плотным ядром неправильной формы и вакуолизированной цитоплазмой. Мозговое вещество надпочечников (рис. 8) состояло из плотно прилегающих друг к другу клеток, имеющих светлую цитоплазму со скудной зернистостью и небольшое по отношению к цитоплазме круглое ядро с мелко-

зернистым хроматином. В толще мозгового вещества присутствовали кровеносные сосуды с просветами полигональной формы. Клетки мозгового вещества содержали небольшое количество секреторных зерен и вырабатывали адреналин и норадреналин. При возникновении стрессовых ситуаций эти гормоны поступают в кровь в увеличенном количестве.

У крыс-самок, получавших препарат аскорбат лития изменения со стороны клеток клубочкового слоя были умеренные и связаны с неравномерностью его толщины, структура коркового вещества была в пределах нормы (рис. 9). В мозговом веществе клетки гетерохромны за счёт того, что одни из них выглядели опустошенными, другие, наоборот, имели слабобазофильную, заполненную зернистым веществом, цитоплазму. У некоторых животных этой группы ядра клеток мозгового вещества гетерогенны: разной величины, в одних ядрах происходит хроматолитиз, другие гиперхромны.

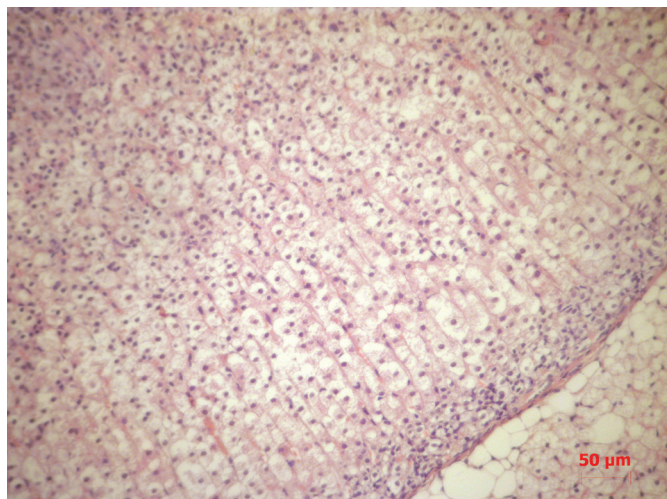


Рис. 7. Гистоструктура коры надпочечника интактной крысы-самки. Окраска г-э. Об.20, ок.10

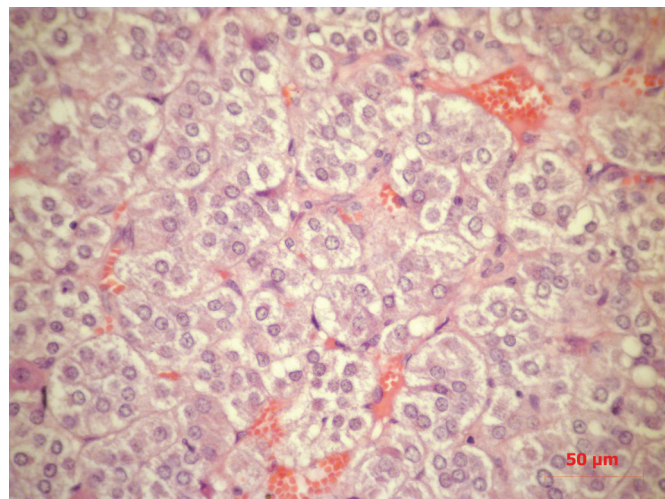


Рис. 9. Гистоструктура мозгового вещества надпочечника интактной крысы-самца. Окраска г-э. Об.40, ок.10

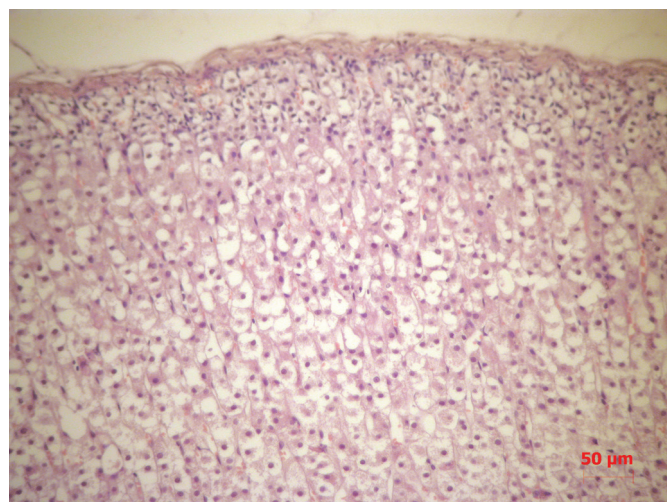


Рис. 8. Гистоструктура коры надпочечника крысы-самки после введения аскорбата лития. Окраска г-э. Об.20, ок.10

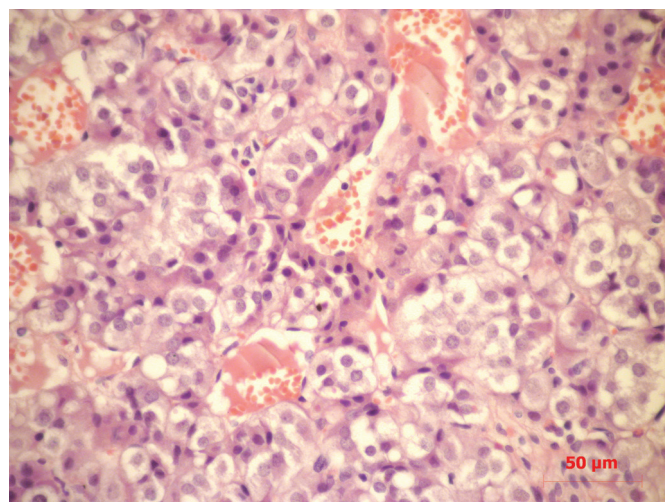


Рис. 10. Надпочечник крысы-самца после введения аскорбата лития. Клетки мозгового вещества гетерогенны. Окраска г-э. Об.40, ок.10

У крыс самцов, получавших препарат аскорбат лития, гистоструктура надпочечников была близка к норме (рис. 10). Кортиковое вещество выглядело не изменённым. Так же как и у самок отмечалось умеренное накопление зернистого вещества в клетках мозгового слоя, при этом циклический процесс синтеза и освобождения гормона у разных животных выражен в разной степени. У одних клетки по своему строению мало отличались от контроля, опустошённые и тёмные клетки были лишь единичные. В одном случае процесс активации клеток мозгового вещества значительно был выражен.

Таким образом, по морфологическим признакам изменения со стороны коркового вещества были незначительные. В мозговом веществе надпочечников морфологические изменения в клетках свидетельствовали о пролонгировании процессов синтеза и выделения гормонов в кровь. По-видимому, клетки мозгового вещества самок реагировали подобным образом более интенсивно, чем у самцов.

Яичники. У контрольных крыс яичники представляют собой бугристые образования, состоящие из коркового и мозгового вещества (рис. 11). В корковом веществе присутствует значительное количество фолликулов в разной стадии созревания и жёлтые тела в различной стадии их инволюции вплоть до белых тел. Кроме того, среди фолликулов и жёлтых тел присутствует небольшое количество атретических фолликулов. Количество созревающих фолликулов и жёлтых тел при максимальной площади среза яичников приблизительно одинаково.

У крыс-самок, получавших препарат аскорбат лития, гистоструктура яичников практически не отличалась от таковой животных контрольной группы (рис. 12). Отмечалось явное преобладание в них жёлтых тел над фолликулами. Количество последних несколько больше, по сравнению с предыдущей группой, но и они при достижении крупных размеров



Рис. 11. Максимальный срез через яичник интактной крысы. Окраска г-э. Об.2,5, ок.10



Рис. 12. Максимальный срез через яичник крысы после введения аскорбата лития. Яичник увеличен, отмечается атрезия фолликулов. Окраска г-э. Об.2,5, ок.10

также подвергались атрезии. В некоторых фолликулах яйцеклетка была представлена в виде недоразвитого бугорка, подвергающегося пикнозу.

Закключение. В яичниках опытных крыс, получавших аскорбат лития, происходило накопление жёлтых тел, атрезия фолликулов на разных стадиях развития. Эти данные позволяют предположить, что под воздействием аскорбата лития у крыс-самок происходит преобладание выработки прогестерона над фолликулином.

Семенники. Семенники у интактных крыс-самцов состояли из многочисленных извитых канальцев, в которых происходит процесс сперматогенеза (рис. 13). Пёстрая гистологическая картина последнего связана с асинхронностью сперматогенеза на различных уровнях срезов канальцев. Для всех канальцев характерно присутствие на их базальной мембране спермато-

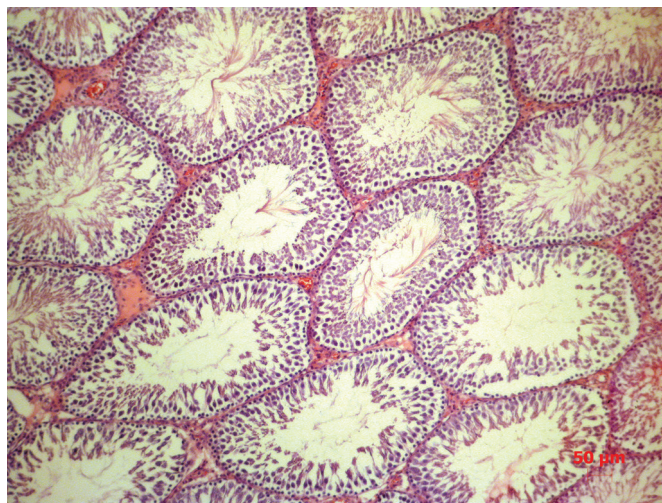


Рис. 13. Семенник интактной крысы. Окраска г-э. Об.10, ок.10

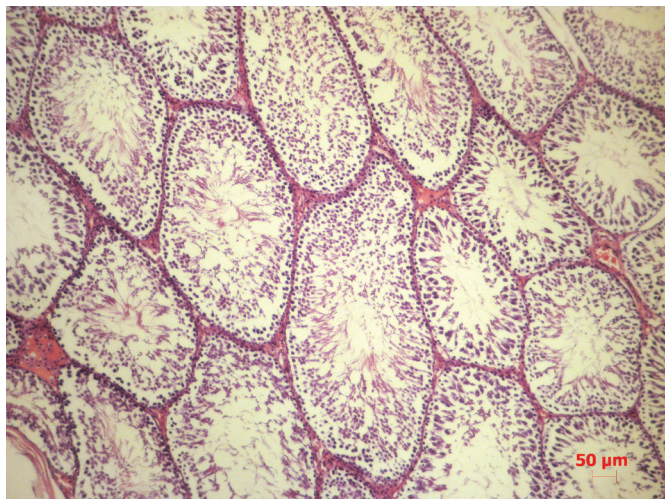


Рис. 14. Семенник крысы после введения аскорбата лития. Гистоструктура органа не изменена. Окраска г-э. Об.10, ок.10

ниев — стволовых клеток, одни из которых находятся в покое, другие активно делятся. Проходя через фазы сперматоцитов 1-го и 2-го порядка, сперматиды, клетки постепенно превращаются в зрелые сперматозоиды.

У крыс-самцов, получавших аскорбат лития, гистоструктура семенников сохранена, патологических изменений со стороны канальцев, их содержимого и стромальных элементов не было отмечено (рис. 14).

Заключение. Полученные морфологические данные позволили сказать, что аскорбат лития не оказывал на семенники крыс-самцов каких-либо видимых изменений.

Печень. Контроль. У крыс обоего пола строение органа было типичное, соединительнотканые прослойки тонкие, триады и печёночные балки просматривались чётко (рис. 15). Ядра гепатоцитов с чёткими контурами и хорошо выраженным ядрышком, цитоплазма содержала умеренное количество базофильных гранул рибонуклеопротеидов (РНП),

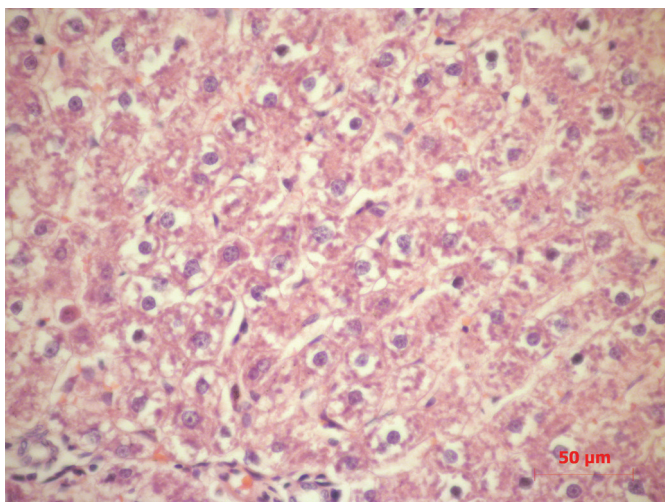


Рис. 15. Печень intactной крысы-самца. Окраска г-э. Об.40, ок.10

у центральных вен были видны единичные гепатоциты в состоянии цитолиза. Ядра клеток Купфера овальные гиперхромные, умеренно выступали в просвет синусов, имели слабо окрашенную с нечёткими контурами цитоплазму.

Самки опытной группы. Гистоструктура органа по сравнению с контрольной не изменена.

Самцы опытной группы. Гистоструктура печени от нормы не отличалась. Отмечалось некоторое увеличение гранул РНП в цитоплазме гепатоцитов по сравнению с контролем и печенью самок (рис. 16).

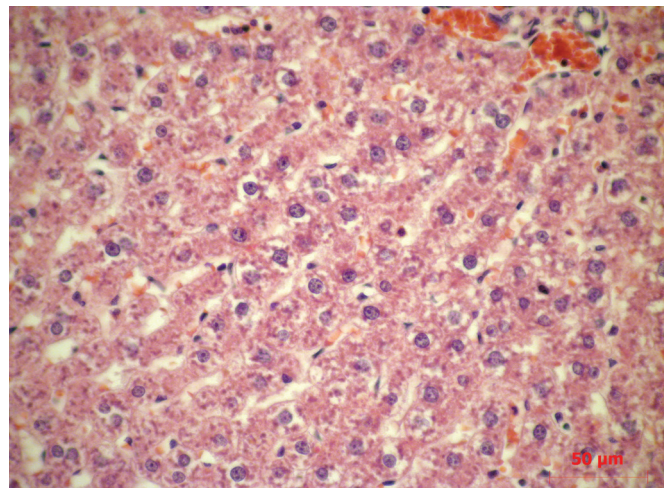


Рис. 16. Печень крысы-самца после введения аскорбата лития. Отмечается умеренное увеличение гранул РНП в гепатоцитах. Окраска г-э. Об.40, ок.10

Заключение. По морфологическим признакам у крыс-самцов, получавших аскорбат лития, присутствовали признаки умеренной функциональной нагрузки на гепатоциты, связанной с функцией синтеза белка.

Почки. Контроль. Гистоструктура почек intactных крыс соответствовала общепринятой (рис. 17а), строение нефронов типичное. Сосуды клубочков были расположены компактно, полнокровны, базальные мембраны капилляров выражены слабо, просветы капсул Шумлянско-Боумана свободные. Юктагломерулярный аппарат обычного строения, состоял из базофильного эндотелия, содержащего уплощённые гиперхромные ядра, плотное пятно содержало близко расположенные округлые ядра эпителия (рис. 17б). Ядра проксимальных и дистальных извитых канальцев были с чёткими контурами, содержали мелкозернистый хроматин, умеренно базофильную нуклеоплазму и мелкое плотное ядрышко. Цитоплазма канальцев, петель Генле и собирательных трубочек была эозинофильная.

У опытных животных как у самок, так и у самцов, гистоструктура органа была не изменена (рис. 18а). Отмечались умеренные изменения со стороны гломерулярного аппарата и дистальных извитых канальцев: часть клубочков имела гипертрофиро-

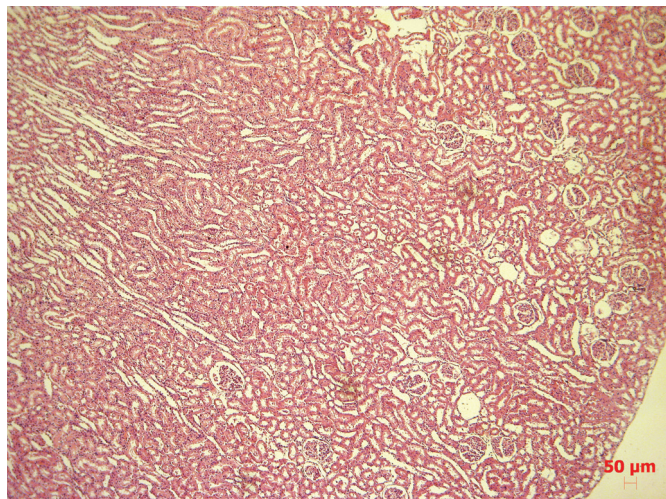


Рис. 17а. Почки intactной крысы-самки. Окраска г-э. Об.5, ок.10

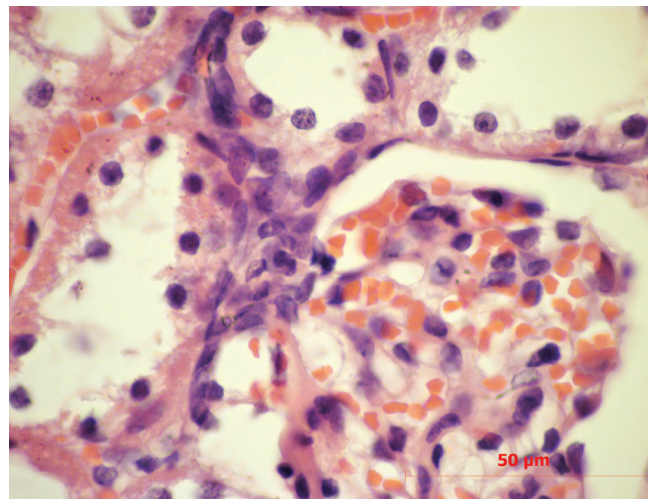


Рис. 18б. Гипертрофия юкстагломерулярного аппарата клубочка почки после введения аскорбата лития. Окраска г-э. Об.100, ок.10

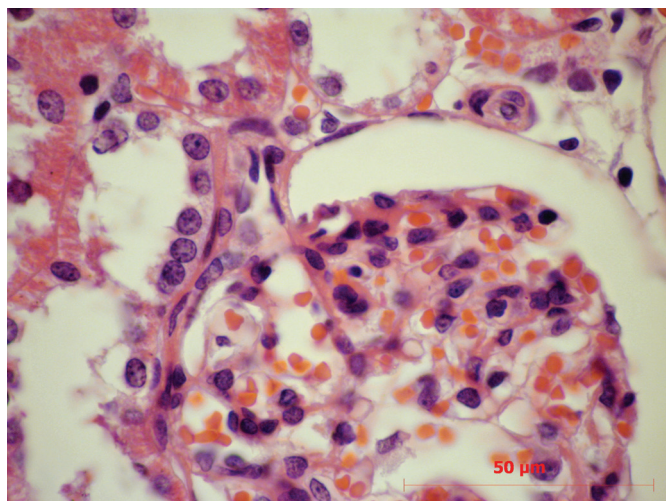


Рис. 17б. Юкстагломерулярный аппарат клубочка почки intactной крысы-самки. Окраска г-э. Об.100, ок.10

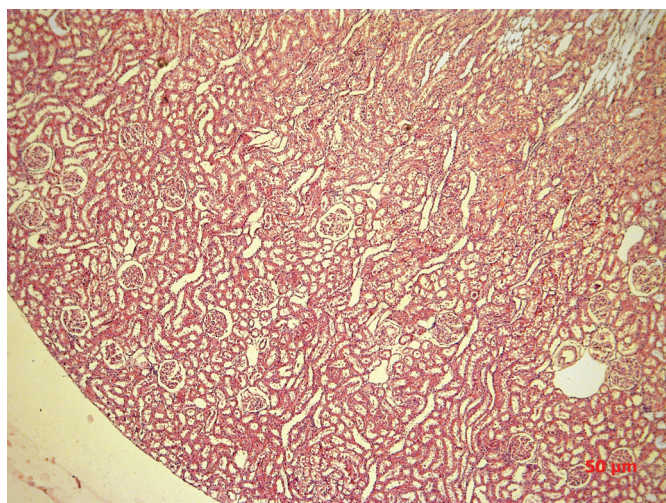


Рис. 18а. Почки крысы самки после введения аскорбата лития. Гистоструктура органа не изменена. Окраска г-э. Об.5, ок.10

ванный юкстагломерулярный аппарат (рис. 18б), в некоторых клубочках между висцеральным и париетальным листками капсулы Боумена—Шумлянського обнаруживались синехии, единичные клубочки были сморщены. Цитоплазма дистальных извитых канальцев в состоянии зернисто-вакуольной дистрофии. Цилиндры в просвете канальцев или собирательных трубочек отсутствовали.

Заключение. Данные гистологического строения почек свидетельствовали о сохранении их гистоструктуры. В то же время они позволили предположить перенесённую почками достаточно высокую функциональную нагрузку, связанную с интенсивным выделением белковых фракций из крови, повышением артериального давления в клубочках. Эти изменения компенсировались повышенной реабсорбцией белка в дистальных извитых канальцах почек.

Выводы

В результате проведённых исследований установлено, что LD_{50} аскорбата лития составляет 6,334 г/кг массы тела. Субстанция относится к соединениям 5-го класса токсичности — практически нетоксичным. Патологоанатомическая картина павших животных показывает симптомы острого отравления и наступление смерти от сердечно-лёгочной недостаточности при атрофии выделительной системы. Аскорбат лития в дозах $1/3 LD_{50}$ (2,11 г/кг) массы тела оказывал отрицательное воздействие на крыс. Расчёт коэффициента кумуляции равен 14,8, что говорит о низком кумулятивном эффекте и низкой токсичности. При n -кратном введении доз аскорбата лития (субхронической токсичности), превышающих многократно LD_{50} , часть из опытных животных адаптировалась и сохраняла жизнеспособность, что так же говорило о низкой токсичности. Данные гистологического исследования

свидетельствовали о том, что при сохранении общей гистоструктуры происходило функциональное перенапряжение нейроэндокринного аппарата и, в меньшей степени, органов выделения и размножения. Так как животные были забиты через 2 нед после окончания введения аскорбата лития, по-видимому, за этот период произошло частичное восстановление функциональной активности головного мозга, печени, почек,

семенников и яичников. Об этом говорит умеренная гиперплазия клеточных элементов пролиферативной зоны аденогипофиза. Необходимо отметить индивидуальную реакцию животных на аскорбат лития, так как выраженность описанных изменений у животных одной и той же группы была несколько разной. Аскорбат лития активирует нейроэндокринную систему сильнее у самок, чем у самцов.

Литература

1. *Балукова Е.В.* Депрессия как фактор риска соматической патологии. Психиатрия. 2008; 3: 36–43.
2. *Тювина Н.А.* Современные представления о патогенезе депрессий и подходы к антидепрессивной терапии (обзор литературы). Психиатрия и психофармакотерапия. 2009; 11: 4: 35–38.
3. *Андреева Н.И.* Методические указания по изучению антидепрессантной активности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ Минздрав РФ. ЗАО ИИА Ремедиум. 2000; 121–125.
4. *Chang C.M., Wu C.S., Huang Y.W., Chau Y.L., Tsai H.J.* Utilization of Psychopharmacological Treatment Among Patients With Newly Diagnosed Bipolar Disorder From 2001 to 2010. J Clin Psychopharmacol. 2016; 36 (1): 32–44.
5. *Машковский М.Д.* Лекарственные средства. Т. 1. Изд. 13-е. Торсинг. Харьков. 1997.
6. Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под ред. Миронова А.Н., Бунатян Н.Д. и др. М., ЗАО «Гриф и К», 2012, EPA Health Effects Test Guidelines OPPTS870.4100 Chronic Toxicity, ICH—S4;
7. *Березовская И.В.* Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения/Химико-фармацевтический журнал. 2003; 37: 3: 32.
8. *Сидоров К.К.* О классификации токсичности ядов при парентеральных способах введения. Токсикология новых промышленных химических веществ. М.: 1973; 13: 47.
9. *Lim R. K., Rink K.G., Glass H.G., Soaje-Echague E.* A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther. 1961; 130: 1: 336–353.

Здоровьесберегающие технологии поддержки микронутриентами функции зрения у студентов с миопией

Егорова Е.Ю.^{1,2}, Быков А.Т.³, Громова О.А.², Торшин И.Ю.²,
Слышалова Н.Н.², Хватова Н.В.²

¹ – ФГБОУ ВО «Ивановский государственный университет», г. Иваново

² – ФГОУ ВО «Ивановская Государственная медицинская академия» Минздрава РФ, г. Иваново

³ – ФГОУ ВПО «Кубанский Государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Краснодар

Резюме. Поддержка микронутриентами функции зрения у студентов с миопией малоиспользуемый резерв здоровьесберегающих технологий. У студентов миопия является одной из основных проблем, которая по мере учёбы только нарастает. В настоящей работе представлены результаты двухцентрового рандомизированного исследования эффективности использования витаминно-минерального комплекса «Фокус Форте» в группе 120 пациентов молодого возраста (16–19 лет, студенты ВУЗов дневной формы обучения в Иваново и Краснодаре) в контексте комплексной терапии в течение 2 мес. Пациенты прошли рандомизацию на приём препарата (n = 60) или в группу контроля (стандартная терапия, n = 60). На день «0» и день «60» проводились измерения более 80 параметров пространственно-контрастной чувствительности с использованием специального пакета компьютерных программ. Сравнение исследованных показателей зрения на день «60» показало ряд статистически значимых различий в электрочувствительности (О.Ш. 4,6, 95% ДИ 1,4–16, $p = 0,03$), пространственной контрастной чувствительности (О.Ш. 9,0, 95% ДИ 1,5–17, $p < 0,006$) и яркостной чувствительности (О.Ш. 5,6, 95% ДИ 1,7–19,0, $p = 0,003$). Приём препарата способствовал статистически значимому снижению клинической симптоматики гиповитаминозов и дефицита цинка ($p < 0,001$). Коррекция микронутриентов, ориентированных на поддержку функции зрения, способствует нормофизиологическому протеканию процессов зрения, улучшению зрительных функций и компенсации явлений астенопии у студентов.

Ключевые слова: миопия, студенты, витаминно-минеральный комплекс «Фокус Форте»

Health-saving technologies of supporting micronutrients functions of eye-sight at students with myopia

Egorova E.Yu.^{1,2}, Bykov A.T.³, Gromova O.A.², Torshin I.Yu.²,
Slushalova N.N.², Khvatova N.V.²

¹ – FGOU VO «Ivanovo state University»

² – FSBEI HE IvSMA Russian, Ivanovo

³ – FGOU VPO "The Kuban State medical University" of the RF Ministry of Health

Abstract. TSupport with micronutrients functions of vision in students with myopia underutilized reserve of health-saving technologies. Students myopia is one of the major problems that at the school is only growing. This paper presents the results two centers randomized trial of the effectiveness of the usage of vitamin-mineral complex "Focus Forte" in the group of 120 young patients at the age of (16–19 years, students of full-time education in Ivanovo and Krasnodar) in the context of integrated therapy for 2 months. Patients were randomized to receive drug (n = 60) or control group (standard therapy, n = 60). On day "0" day and "60" were measured more than 80 parameters of a spatial-contrast sensitivity with the use of special computer software package. The comparison of the investigated indicators of view on the day "60" showed a number of statistically significant differences in electroacoustically (O.S. 4,6, 95% DI 1,4-16, $p = 0,03$), spatial contrast sensitivity (O.S. 9,0, 95% DI 1,5-17, $p < 0,006$) and brightness sensitivity (O.S. 5,6, 95% DI 1,7-19,0; $p = 0,003$). The drug contributed to a statistically significant reduction of clinical symptoms of hypovitaminosis, and zinc deficiency ($p < 0,001$). Correction of micronutrients designed to support your eyesight, promotes normaphysiological processes of vision, improve visual function and compensation phenomena of asthenopia among students.

Keywords: myopia, students, vitamin-mineral complex «Focus Forte»

Автор, ответственный за переписку:

Егорова Евгения Юрьевна — к.м.н., доцент кафедры безопасности жизнедеятельности и общемедицинских знаний ФГБОУ ВО ИвГУ; докторант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153025, Иваново, ул. Ермака, 39; тел. +7 (4932) 370157; e-mail: egorovaevgenia@inbox.ru

Введение

Основная причина ухудшения здоровья подрастающего поколения россиян заключается в интенсификации процесса обучения, нарастании психоэмоционального напряжения, плохой экологии, сниженной

физической активности, неправильного питания [1]. При этом формируется стойкое нарушение той или иной гомеостатической функции, наступает дезадаптация. Стресс является причиной многих психосоматических заболеваний [16]. Применение различных по содержанию здоровьесберегающих и здоровьес-

укрепляющих технологий способствует реальному решению задач охраны здоровья студентов через повышение функциональных резервов и адаптивных возможностей, предупреждение заболеваний. Здоровьесберегающие технологии реализуются на основе личностно-ориентированного подхода. Медицинские технологии осуществляют профилактику заболеваний; коррекцию и реабилитацию соматического здоровья пациентов. При этом главное место принадлежит использованию данных мониторинга о состоянии здоровья учащихся. В среднем по России у студентов за время обучения частота хронической патологии увеличивается с 49 до 69%, показатель общей патологии возрастает на 38%, между тем здоровье выступает как ведущий фактор, определяющий не только гармоническое развитие личности студента, но и успешность освоения профессии, плодотворность его будущей профессиональной деятельности. Фактически, можно говорить о том, что период студенчества в жизни современного молодого человека является тем последним отрезком времени, когда без особых усилий и затрат ещё возможно скорректировать имеющиеся недостатки здоровья и даже создать принципиально новую модель жизнедеятельности и миропонимания.

С целью создания «портрета здоровья» студента на базе Центров здоровья Кубанского государственного медицинского университета и Ивановского государственного университета был проведён анализ заболеваемости, по данным обследования и медицинской документации, студентов очной формы обучения 1–4 курсов в количестве 2 000 человек. На основании рейтинга основных групп заболеваний по распространённости у студентов были выделены следующие группы: студенты, болеющие более 4 раз в год острыми респираторными инфекциями верхних дыхательных путей (МКБ — X: J06) — 27%, студенты с миопией (МКБ — X: H 52.1) — 19%, студенты с СВД с пониженным давлением (МКБ — X: G.90.9) — 21%. Диагностика проводилась по программам Центра здоровья для выявления психофизиологической дезадаптации, микро- и макроэлементоза, системных дисфункций как предикторов существующей патологии с целью сохранения здоровья и восстановления адаптационных резервов.

Прогрессирующая миопия является одной из ведущих проблем современной офтальмологии. Актуальность и социальная значимость углубленного изучения её патогенеза и разработки новых методов лечения неоспоримы. В нашей стране в структуре инвалидности вследствие офтальмопатологии миопия занимает третье место, а в структуре детской инвалидности — второе место [2, 3]. Дефицит эссенциальных микронутриентов, таких как витамины и микроэлементы оказывают значительное влияние на протекание глазной патологии [4]. В связи с повсеместной распространённостью дефицита витаминов и минералов у россиян [5], дефицит микронутриентов представляет

собой значительный фактор риска глазной патологии в молодом возрасте. Поэтому, необходима профилактика заболеваний глаз посредством использования специализированных витаминно-минеральных комплексов.

Лютеин и зеаксантин — каротиноиды, составляющие основу макулярного пигмента, предохраняющего глаз от оптического и оксидативного стресса, особенно в центральной части макулы. С обнаружением у лютеина и зеаксантина оптико-протекторных свойств возникло новое течение в нутрициологической поддержке функции зрения. Продолжается поиск наиболее эффективных комплексов каротиноидов (бета-каротина, лютеина, зеаксантина) и флавоноидов по качественному и количественному составу. В частности, наблюдается тенденция к повышению дозы лютеина в комплексах; при использовании флавоноидов на основе экстракта черники вводится стандартизация по антоцианам.

Например, исследование 44 здоровых добровольцев показало, что приём смеси 11,8 мг зеаксантина и 5,9 мг лютеина 1 раз в сутки в течение 6 мес приводил к достоверному увеличению оптической плотности пигмента в центральной области макулы (0,25; $p = 0,001$; 0,5; $p = 0,001$) [5]. Другой пример: в группе 100 пожилых пациентов (72±7 лет) с возрастной дегенерацией макулы производился приём смеси из 12 мг лютеина, 1 мг зеаксантина, 120 мг витамина С, 17,6 мг витамина Е, 10 мг цинка и 40 мг селена 1 раз в сутки в течение 6 мес. В ходе исследования было отмечено статистически значимое возрастание оптической плотности макулярного пигмента по сравнению с группой плацебо (0,1 [±0,009]; $p < 0,0008$), причём наиболее заметен был эффект у пациентов с исходно низкой оптической плотностью пигмента [6].

Следует отметить, что эти и другие исследования [8–10] проведены, преимущественно, в группах пациентов пожилого и, реже, среднего возраста. Значительно меньше исследований по нутрициологической поддержке зрительной функции, проведённых в группах подростков и людей молодого возраста. Тем не менее, именно этот возраст характеризуется колоссальной нагрузкой на зрительную функцию, что подтверждается ростом офтальмологической заболеваемости в этой возрастной группе. Очевидно, что отсутствие должных профилактических мероприятий, направленных на поддержку функции зрения в молодом возрасте, приведёт к росту и утяжелению офтальмологической заболеваемости и в среднем, и в пожилом возрасте.

Исследуемый в настоящей работе новый витаминно-минеральный комплекс «Фокус Форте» содержит микронутриенты, необходимые для поддержания процессов зрения. В состав препарата входят: флавоноиды (стандартизованный экстракт черники, 44 мг, в т. ч. антоцианы, 11 мг), каротиноиды (бета-каротин, 1,5 мг; зеаксантин, 0,4 мг; лютеин, 3 мг), витамины (витамины

А, 0,4 мг (1 333 МЕ); В₂ (рибофлавин), 1,44 мг; витамин С (аскорбиновая кислота), 70 мг; витамин Е (альфа-токоферол), 10 мг) и минералы (медь, 0,5 мг; селен, 21 мкг; цинк, 9 мг). Приём микронутриентов входящих в состав «Фокус Форте» способствует улучшению зрительных функций и, в частности, снижает утомляемость глаз при повышенных зрительных нагрузках.

Препараты серии «Фокус» успешно применяются в терапии возрастной макулярной дегенерации и глаукомной оптической нейропатии у пациентов пожилого возраста [8–10]. Ранее, было проведено исследование эффективности препарата «Фокус» в динамике применения у лиц молодого возраста в течение 3 мес [11]. Представляет интерес проведения рандомизированного исследования терапевтических эффектов нового препарата «Фокус Форте» в группе молодых пациентов с миопией, испытывающих повышенные зрительные нагрузки (студенты). В настоящей работе изучалась эффективность применения биологически активной добавки «Фокус Форте» в комплексной терапии миопии.

Материалы и методы

Исследование соответствовало этическим стандартам комитетов по биомедицинской этике, разработанным в соответствии с Хельсинкской декларацией с поправками от 2000 г. и «Правилами клинической практики в РФ» от 1993 г. Все наблюдаемые были подробно информированы о проводимом исследовании, его целях, безопасности применения препарата, исходя из данных о его составе.

Исследуемая группа пациентов

Исследование проводилось в 2 городах (Иваново и Краснодар) у студентов Ивановского государственного университета, Ивановской государственной медицинской академии и Кубанского государственного медицинского университета. С информированного согласия в исследование была отобрана группа из 120 студентов (17–19 лет, ИМТ 22 ± 2 кг/м²) очной формы обучения первого, второго и третьего курсов, прошедших плановое обследование и профилактическое лечение, а также дополнительное обследование в связи с диспансерным наблюдением по поводу миопии и с жалобами на повышенную зрительную утомляемость.

Всем отобраным в группу пациентам был поставлен офтальмологический диагноз «миопия»: миопия слабой степени (48 человек), миопия слабой степени со спазмом аккомодации (25 человек), миопия средней степени (36 человек), миопия высокой степени (11 человека). Критериями исключения являлись тяжёлые органические заболевания (гломерулонефрит, последствия ЧМТ и др.) и терапия витаминно-минеральными комплексами в течение последних 6 мес.

Из 120 наблюдаемых (63 девушки, 57 юноши) 5 человек обучалось на математическом факультете, 7 — на биолого-химическом, 11 — на экономическом, 9 — на историческом, 11 — на юридическом факультете ИВГУ; 7 — на стоматологическом факультете, 10 — на лечебном факультете ИвГМА; 31 — на лечебном факультете, 29 — педиатрическом факультете Куб ГМУ. Все включённые в исследование студенты были иногородними и проживали в общежитиях ИВГУ, ИвГМА и Куб ГМУ. Все обследуемые по роду своей деятельности проводили перед экраном монитора более 6 ч в день, имели большую умственную нагрузку, испытывали зрительное утомление, много читали — т. е. испытывали зрительное утомление (астенопию).

Всем пациентам проводилось полное диагностическое обследование, которое включало тщательный сбор анамнеза и жалоб, визометрию с коррекцией и без, определение резерва относительной аккомодации по методу Аветисова Э.С. и объёма абсолютной аккомодации проксиметрическим способом. Была проведена оценка состояния глазного дна, оценка центрального поля зрения с помощью компьютерной программы «Окуляр» путём исследования порога яркостной чувствительности (цветовой и световой), электрочувствительности, электролабильности, измерения пространственной контрастной чувствительности.

Дополнительно, всем студентам проводилось полное диагностическое обследование на базах лечебно-диагностического центра клиники ИвГМА и центра здоровья клиники КубГМУ. Были установлены следующие сопутствующие патологии: «вегето-сосудистая дистония» (80 человек), «затруднение венозного оттока» (27), «избыточная масса (ИМТ >25–29 кг/м²)» (6), «хронический пиелонефрит» (6), «хронический гастрит» (5), «хронический гастродуоденит» (3), «дискинезия желчевыводящих путей» (2). Отметим, что все эти сопутствующие патологии ассоциированы с дефицитом тех или иных витаминов и микроэлементов [4, 11].

Пациенты были рандомизированы на 4 группы: 2 основных (1-я — Иваново и 3-я — Краснодар), принимающих «Фокус Форте» (Иваново, $n^1 = 30$, Краснодар, $n^3 = 30$, $n^{1+3} = 60$) и группы контроля (Иваново, $n^2 = 30$; Краснодар, $n^4 = 30$, $n^{2+4} = 60$). Все пациенты проходили стандартную терапию, включавшую регулярное выполнение упражнений для глаз, нормализацию режима дня (включая дозированное чтение с регулярными промежутками для отдыха зрения, рациональное освещение рабочего места, соблюдение правильного фокусного расстояния до книги и монитора компьютера) и питания. Пациенты основных групп принимали витаминно-минеральный комплекс «Фокус Форте» по 1 таблетке 1 раз в сутки (утром) непрерывно, в течение 2 мес в период осеннего семестра. Оценки зрительной функции и симптоматики гиповитаминозов проводились в начале исследования (день «0») и в конце исследования (день «60»).

Оценка клинической симптоматики гиповитаминозов

Состояние пациентов до терапии (день «0») и после терапии (день «60») оценивалось по разработанной нами регистрационной карте, включающей оценку физикальных данных, функции зрения, признаков гиповитаминозов и дисмикроэлементозов. Оценку симптоматики гиповитаминозов и дефицита обеспеченности микроэлементами (цинк, селен и медь) проводили в баллах по результатам клинко-симптоматического анкетирования с использованием верифицированных шкал гиповитаминозов [12].

К примеру, для оценки дефицита цинка кроме снижения остроты зрения принимались во внимание характерные для дефицита цинка состояния не только со стороны органов зрения (сухой конъюнктивит, кератит), но и со стороны кожи и её придатков (сухость кожи, чешуйчатые высыпания на коже, угри, фурункулёз, экзема, дерматит, расслаивание ногтей, появление белых пятен на ногтевых пластинках, тусклый цвет волос, перхоть, замедление роста волос, выпадение волос, гипопигментация волос, замедленное заживление ссадин и ран, сухость и трещины на коже губ). Обязательно учитывались такие параметры как изменение вкусовых ощущений, стоматит, снижение аппетита, гипоацидный гастрит, аллергические заболевания, частые и длительные простудные заболевания, а также раздражительность, утомляемость, снижение памяти, нарушение сна и гиперактивность.

Измерение пространственно-контрастной чувствительности

Определение остроты зрения с помощью таблицы дало возможность врачам количественно измерять зрительные функции. Однако многие пациенты жалуются на зрительный дискомфорт даже при нормальной остроте зрения. Тестирование контрастной чувствительности стало не только способом оценки нормального развития зрительных функций, но и средством выявления начальных стадий различных заболеваний зрительной системы. Поэтому особое внимание было уделено исследованию пространственно-контрастной чувствительности, проводимому с использованием метода оценки функции контрастной чувствительности, разработанного в ООО «Астроинформ-СПЕ» (автор А.Е. Белозеров). Метод осуществляется с помощью специального пакета программ. На дисплее компьютера предъявлялась решётка, яркость которой менялась в направлении перпендикулярном её ориентации. Контраст решётки плавно менялся вдоль линии ориентации от минимума 0,25% до максимума 100% (в расчёте от контраста, обеспечиваемого данным монитором в принятых условиях адаптации), при этом средняя яркость решётки оставалась постоянной. Пространственная частота определялась количеством

циклов черно-белых полос (решёток) на один угловой градус поля зрения и измерялась в циклах на градус. Контрастная чувствительность определяется как величина обратная минимальному контрастному порогу решётки, при которой она была различима при данной пространственной частоте. Функция контрастной чувствительности определялась как логарифм контрастной чувствительности для 12 пространственных частот 0,5–16 цикла на градус угла зрения.

Измерение проводилось монокулярно при средней освещённости комнаты 10–12 кд/м² при освещённости экрана 40–60 кд/м². Поле стимуляции составляло 6 °С, при расстоянии 2 м до экрана. Использованы ахроматическая и хроматические (красно/чёрная, зелёно/чёрная и сине/чёрная) решётки, как для исследования функции контрастной чувствительности, так и для выявления доли участия фоторецепторов в формировании контрастной цветовой чувствительности. Исследование проводилось с оптимальной для каждого пациента очковой коррекцией. Время исследования одной решётки 2–5 мин. Длительность предъявления стимула не ограничивалась. Для исключения ошибок восприятия контраста испытуемому предъявлялся весь экран, на котором появлялась шторка, закрывавшая область с более высоким контрастом. В сомнительных случаях или при неуверенности пациента предлагалось повторять процедуру три раза, закрывая шторкой области с более высоким контрастом, смещаясь к минимальному контрасту и наоборот. Предъявление решёток происходит последовательно от низких к высоким частотам с предъявлением всего паттерна в начале исследования для более адекватного понимания испытуемым задачи исследования, для адаптации зрительной системы. По результату исследования строится кривая пороговой частотно-контрастной характеристики, где величина чувствительности откладывается в дБ.

Контрастная чувствительность у обследованных студентов была не одинакова в пределах различных пространственных частот. Более низкий уровень пространственной чувствительности в области низких и высоких частот по сравнению с областью средних пространственных частот обусловлен разрешающей способностью нервных элементов сетчатки, различием в величине рецептивных полей ганглиозных клеток сетчатки в центральных и периферических отделах, а также разрешающей способностью оптики глаза.

Высокочастотная составляющая графика пространственной контрастной чувствительности в значительной мере определяется установкой глаза, поэтому многие исследователи стали использовать эту составляющую для определения качества и оптимальности различных форм оптической коррекции при аномальных рефракциях. В целом, исследование функции контрастной чувствительности может предоставить информацию о состоянии фоторецепторов сетчатки, межнейронных взаимодействиях, рецептивных полях,

о работе высших отделов зрительного анализатора, что позволяет использовать эту методику в комплексном исследовании особенностей органа зрения, в оценке работы цветовых, световых и контрастных каналов.

Для статистической обработки использовались методы математической статистики, включающие параметрические и непараметрические критерии. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости признаков проводилось с помощью критерия χ^2 и гетероскедастического двустороннего теста Стьюдента. Для сравнения зависимых переменных использовался Т-критерий (Вилкоксона). В таблицах приведены, как правило, значения Р, соответствующие гетероскедастическому тесту Стьюдента.

Результаты наблюдения

Применение витаминно-минерального комплекса «Фокус Форте» не вызывало побочных явлений и аллергических реакций в течение всего курса приёма. Большинство пациентов (51 из 60 чел.) принимавших «Фокус Форте, уже на 30-й день применения отметили субъективное уменьшение зрительной утомляемости, а 16 из 60 человек дополнительно отметили и улучшение цветовосприимчивости. Следует отметить, что снижение утомляемости наблюдалось и при стандартной терапии (контрольная группа), в то время как в контрольной группе ни один из обследованных не отмечал изменений в цветовосприимчивости.

В ходе проведённого лечения у пациентов, принимавших «Фокус Форте» отмечалась положительная динамика зрительных функций и работы аккомодационного аппарата глаза по сравнению с контрольной группой. Для каждого пациента был собран массив из 84 параметров зрения и 20 параметров клинической симптоматики гиповитаминозов, всего 104 параметра исследования. Были проанализированы архивные данные на студентов в виде выписки из формы № 112/у («История развития ребёнка»), данные формы № 025/у (Медицинской карты амбулаторного больного).

Сравнение исследованных показателей зрения выявило ряд статистически значимых различий, относящихся к остроте зрения, резервам относительной и абсолютной аккомодации, пространственной контрастной чувствительности и пороге яркостной чувствительности. Улучшение показателей зрения у обследуемых пациентов на день «60» сопровождалось значительным снижением баллов дефицита витаминов.

Сравнение по группам средних значений исследуемых показателей на день «0» позволило установить статистически значимые отличия между группами только для 7 из 104 исследованных параметров (табл. 1). При этом 3 из 7 параметров соответствовали низкочастотной части спектра пространственной контрастной чувствительности (ПКЧ, 0,5 Гц). Существование различий между ограниченным числом параметров указывает на приемлемое качество рандомизации групп. Поправки на эти отличия между группами на день «0» вносились при мультипараметрическом анализе различий между группами на день «60».

Приём препарата приводил к значительному снижению клинической симптоматики гиповитаминозов и проявлений дефицита цинка, на что указывало снижение числа баллов по шкалам микронутриентных дефицитов (рис. 1). Все зарегистрированные изменения в витаминном статусе пациентов были статистически значимы ($p < 0,001$). Таким образом, приём «Фокус Форте» в течение 2 мес способствует существенной компенсации дефицита витаминов А, В₂, С, Е и цинка — микронутриентов, активно участвующих в поддержании функции зрения.

Например, проявлениями дефицита цинка со стороны кожи и её придатков являются сухость кожи, чешуйчатые высыпания на коже, угри, фурункулёз. В настоящем исследовании было выявлено, что приём препарата «Фокус Форте» способствовал снижению интенсивности проявления угревой сыпи в группе 1 (16 чел. — на день «0», 10 чел. — на день «60»), но не в контрольной группе (15 чел. — на день «0», 14 чел. — на день «60»).

Таблица 1

Статистически значимые отличия в показателях зрения между основной и контрольной группами на день «0»

Показатель	Группа 1, «Фокус Форте» (Иваново), n = 30	Группа 2, контрольная (Иваново), n = 30	Группа 3, «Фокус Форте» (Краснодар), n = 30	Группа 4, контрольная (Краснодар), n = 30	Значение p *1 и 2 группа **3 и 4 группа
ПКЧ, кр.фон,0,5, OS	19±2,7	21±3,8	18,9±2,7	20,9±3,8	* 0,06; **0,05
ПКЧ, бел.фон, 0,5, OD	13,6±4,1	17,7±7,5	13,1±3,7	17,8±7,5	* 0,05; **0,04
ПКЧ, бел.фон, 0,5, OS	16,3±3,1	19,8±4,6	15,9±3,1	19,6±4,5	* 0,02; **0,01
ПКЧ, бел.фон,2, OS	27±3,5	31±6,9	26,4±3,4	31,2±6,9	* 0,02; **0,01
Порог ярк. чувствит., min	12,5±0,8	12,1±0,3	12,1±0,8	11,9±0,3	* 0,05; **0,04
СВКТ	13,7±0,8	13,1±0,4	13,9±0,8	13,2±0,4	* 0,02; **0,01
СЗ 0—5	14,2±1,5	13,1±0,7	14,5±1,5	13,2±0,7	* 0,05; **0,04

Примечание: ПКЧ — пространственная контрастная чувствительность; OD — правый глаз; OS — левый глаз; СВКТ — среднее по внутреннему кольцу точек; СЗ 0—5 — среднее в зоне 0—5 градусов.

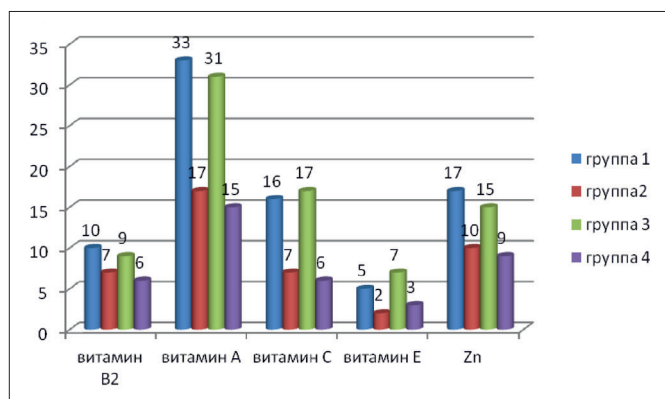


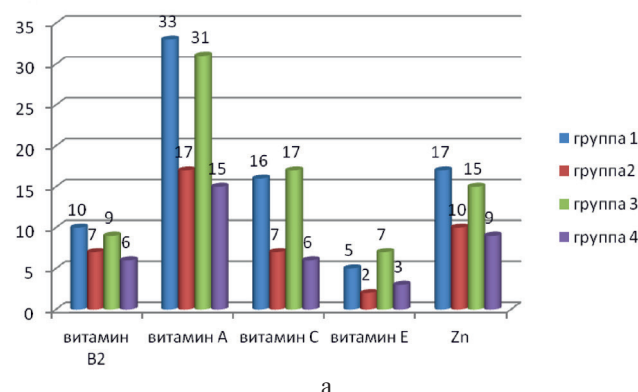
Рис. 1. Снижение симптоматики дефицита микронутриентов. Сравнение 4 групп:

1-я — основная и 2-я — контрольная (Иваново); 3-я — основная и 4-я — контрольная (Краснодар) на день «60»

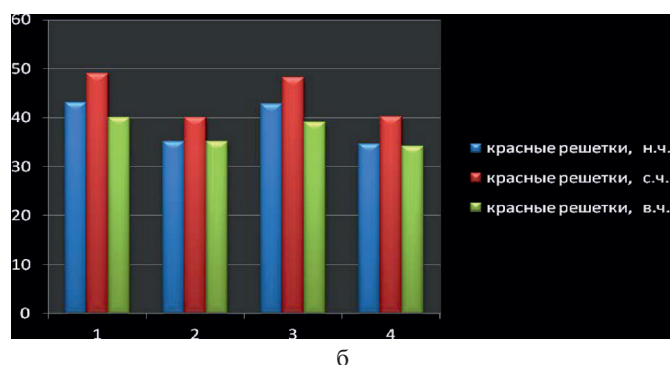
Отмечено улучшение функционального состояния аккомодационного аппарата глаза. По сравнению с контрольной группой запас относительной аккомодации повысился, в среднем, на +1,4 дптр, а объём абсолютной аккомодации увеличился с $7,8 \pm 0,2$ дптр до $9,6 \pm 0,3$ дптр ($p < 0,05$). По данным анкетирования участников исследования, уменьшение зрительного утомления (астенопии, улучшение чёткости, яркости изображения, повышение зрительной работоспособности) определялось в 80% случаев в группе 1 и в 52% случаев в группе 2 ($p < 0,02$): отношение шансов (О.Ш.) составило 3,9, 95% достоверный интервал (95% ДИ) — 1,2–12.

После курса приёма биологически активной добавки «Фокус Форте», в группе 1 наблюдались статистически значимые снижение порога электрочувствительности и повышение порога электролабильности (табл. 2). Например, при приёме препарата порог электрочувствительности правого глаза снижался до 30 ± 3 мкА (53 ± 29 мкА — в контрольной группе). Порог электрочувствительности снизился в 80% случаев в группе 1 и в 45% случаев в группе 2 ($p = 0,05$); порог электролабильности увеличился в 85% случаев в группе 1 и в 55% случаев в группе 2 (О.Ш. 4,6, 95% ДИ 1,4–16, $p = 0,03$).

При анализе показателей пространственной контрастной чувствительности данные для левого и правого глаза были объединены, поскольку в исследованной выборке не наблюдалось значительных дисбалансов



а



б

Рис. 2. Сравнение показателей пространственной чувствительности на зелёной решётке (а) и красной решётке (б) в группах:

1 — основная и 2 — контрольная (Иваново); 3 — основная и 4 — контрольная (Краснодар)

в стереоскопическом зрении. При сравнении данных до и после лечения выяснилось, что статистически значимые отличия наблюдались практически по всему спектру частот (табл. 3, рис. 2). Кроме того, усреднённый спектр контрастной чувствительности имел выраженное плато в районе средних частот («2–8»). Поэтому, в табл. 3 проводится сравнение данных отдельно для низких частот (н. ч., 0,4–1), средних частот (с. ч., 2–8) и высоких частот (в. ч., 11–16). Следует подчеркнуть, что положительная динамика пространственной контрастной чувствительности наблюдалась у 83% пациентов в группе 1 (25 чел.) и только у 50% (15 чел.) в группе 2 (О.Ш. 9,0, 95% ДИ — 1,5–17, $p < 0,006$).

Отличия в характере изменений контрастной чувствительности, установленные в ходе исследо-

Таблица 2

Статистически значимые отличия в электрочувствительности (ЭЧ) и электролабильности (ЭЛ) зрительного нерва и сетчатки пациентов на день «60»

Показатель (мкА- микроампер, частота, Гц – герц)	Группа 1, «Фокус Форте» (Иваново), n = 30	Группа 2, контрольная (Иваново), n = 30	Группа 3, «Фокус Форте» (Краснодар), n = 30	Группа 4, контрольная (Краснодар), n = 30	Значение p *1 и 2 группа **3 и 4 группа
ЭЧ OD, мкА	30 ± 3	53 ± 29	$29,6 \pm 3$	$52,6 \pm 29$	*0,02; **0,03
ЭЧ OS, мкА	29 ± 2	52 ± 27	$29,3 \pm 2$	$51,3 \pm 27$	*0,02; **0,03
ЭЛ OD, Гц	35 ± 2	23 ± 5	$34,8 \pm 2$	$23,4 \pm 5$	*0,007; **0,006
ЭЛ OS, Гц	36 ± 2	22 ± 6	$35,8 \pm 2$	$22,7 \pm 6$	*0,001; **0,002

Таблица 3

Статистически значимые отличия в показателях пространственной контрастной чувствительности (ПКЧ, дБ)
у пациентов на день «60»

Показатель ПКЧ, дБ	Группа 1, «Фокус Форт» (Иваново), n = 30	Группа 2, контроль- ная (Иваново), n = 30	Группа 3, «Фокус Форт» (Краснодар), n = 30	Группа 4, контроль- ная (Краснодар), n = 30	Значение p *1 и 2 группа **3 и 4 группа
Стереопсис, с.ч.	75±40	45±35	74,8±40	44,5±35	*0,05; **0,04
Синие решётки, н.ч.	44±5	36±6	44,5±5	35,7±6	*0,01; **0,03
Синие решётки, с.ч.	41±5	37±3	41,6±5	36,6±3	*0,007; **0,03
Красные решётки, н.ч.	43±2	35±5	42,7±2	34,6±5	*6·10 ⁻⁵ ; **5·10 ⁻⁵
Красные решётки, с.ч.	49±5	40±8	48,1±5	40,1±8	*6·10 ⁻³ ; **5·10 ⁻³
Зелёные решётки, н.ч.	39±2	33±5	39,8±2	33,2±5	*1·10 ⁻⁴ ; **1·10 ⁻⁴
Зелёные решётки, с.ч.	51±3	42±7	50,6±3	41,9±7	*2·10 ⁻⁴ ; **1·10 ⁻⁴
Зелёные решётки, в.ч.	41±6	34±7	40,4±6	33,8±7	*7·10 ⁻³ ; **6·10 ⁻³
Белые решётки, н.ч.	41±4	38±4	40,6±4	37,5±4	0,06; **0,05
Белые решётки, с.ч.	50±2	41±5	49,3±2	40,5±5	*4·10 ⁻⁶ ; **3·10 ⁻⁶
Белые решётки, в.ч.	44±3	37±5	43,4±3	36,7±5	*4·10 ⁻⁴ ; **3·10 ⁻⁴

Примечание: н.ч. — низкие частоты, с.ч. — средние частоты, в.ч. — высокие частоты, OD — правый глаз, OS — левый глаз.

вания, могут быть связаны с утомлением различных отделов головного мозга. Как известно, цветовое зрение человека определяется поглощением света тремя классами колбочек-фоторецепторов, имеющих максимальную чувствительность в области 560, 530 и 420 нм и перекрывающих друг друга спектрами поглощения. Эти спектры поглощения дают соответствующие названия максимально реагирующим на них классам колбочек — «красночувствительные» или чувствительные к длинным волнам (ДВ-колбочки), «зелёночувствительные» или чувствительные к средним волнам (СВ-колбочки) и «синечувствительные» или чувствительные к коротким волнам (КВ-колбочки). Согласно результатам многих психофизических исследований, зрительная система состоит из множества параллельных каналов — фильтров, каждый из которых чувствителен к определённым пространственным частотам, т. е. имеет свою полосу пропускания [13, 14]. Ряд микронутриентов, таких как витамин А, цинк, лютеин, зеаксантин, оказывают значительное влияние на процессы цветового зрения [15].

Одним из методических подходов, которые позволили бы объединить знания о нейрофизиологии зрительной системы и интегративной яркостной и цветовой чувствительности в единой форме эксперимента, является метод поточечного сканирования поля зрения мелкими световыми пятнами с их топографической локализацией на глазном дне. При анализе порога яркостной чувствительности данные для левого и правого глаза были объединены. Статистически значимые различия наблюдались для различных фоновых цветов (чёрного, жёлтого и синего); в табл. 4 приведены данные для чёрного цвета. Положительная динамика наблюдалась у 28 (93%) пациентов в группе 1 и у 14 (47%) пациентов в группе 2 (О.Ш. 5,6, 95% — ДИ 1,7–19,0, $p = 0,003$).

Сравнение параметров яркостной чувствительности в группах 1 и 2 на день «60» показало статистически значимое улучшение и минимального ($p < 10^{-10}$), и максимального ($p = 0,001$) значения порога чувствительности, среднего по наружному кольцу точек («СНКТ», $p = 5 \cdot 10^{-5}$), среднего в верхненазальном квадранте («СВНК», $p = 0,007$), среднего в нижненазальном квадранте («СННК», $p = 0,03$) и среднего в верхнетемпоральном квадранте («СВТК», $p = 0,03$) в группе принимавших «Фокус Форт» по сравнению с контролем. Эти изменения указывают на снижение порогов чувствительности, т. е. соответствуют улучшению светочувствительности зрения пациентов.

Выводы

Прогрессирующая миопия является одной из ведущих проблем современной офтальмологии. В частности, учёба на дневном отделении ВУЗов предъявляет серьёзные требования к зрительной функции. При правильной организации режима труда и отдыха, регулярном выполнении гимнастики для глаз и рациональном питании со специальной микронутриентной поддержкой, студенты способны переносить значительные зрительные нагрузки без ущерба для зрения. Как показало наше исследование, большинство студентов часто пренебрегают этими довольно простыми рекомендациями. Как результат, имеющаяся у студентов миопия усугубляется, развивается зрительное перенапряжение и т. н. «синдром информационной усталости». Исследования последних лет показывают, что в профилактике и терапии патологий зрения значительную роль также играет специальная нутриентная поддержка.

Проведённое в настоящей работе рандомизированное исследование эффективности применения

витамино-минерального комплекса «Фокус Форте» указало на эффективность и безопасность применения данного препарата в составе комплексной терапии для поддержки зрительных функций, особенно необходимых для пациентов с уже имеющейся миопией.

1. Приём «Фокуса Форте» не вызывал побочных явлений и аллергических реакций в течение 2-месячного курса и способствовал снижению симптоматики гиповитаминозов и дефицита цинка ($p < 0,001$).

2. Использование «Фокус Форте» достоверно способствовало улучшению объёма абсолютной аккомодации ($7,8 \pm 0,2$ дптр до $9,6 \pm 0,3$ дптр, $p < 0,05$).

3. Приём препарата способствовал улучшению электрочувствительности (О.Ш. 4,6, 95% ДИ — 1,4–16, $p = 0,03$).

4. «Фокус Форте» достоверно улучшал пространственную контрастную чувствительность зрения (О.Ш. 9,0, 95% ДИ — 1,5–17, $p < 0,006$).

5. Приём «Фокус Форте» приводил к значимому улучшению яркостной чувствительности (О.Ш. 5,6, 95% ДИ — 1,7–19,0, $p = 0,003$).

Таким образом, «Фокус Форте» улучшает основные зрительные функции, улучшает функциональное состояние зрительного анализатора, снижает утомляемость глаз, способствует профилактике прогрессирования миопии и астигматизма. Витаминно-минеральный комплекс «Фокус Форте» (по 1 таблетке в сутки в течение 2 мес) может быть рекомендован к использованию при миопии и астигматизме как в профилактических, так и лечебных целях в составе комплексной терапии.

Литература

1. Быков А.Т., Маляренко Т.Н. Роль нутриентов в профилактике и коррекции нарушений когнитивных функций при старении. Военная медицина: Белорусский государственный медицинский университет. 2016; 3 (40): 105–115.

2. Либман Е.С., Шахова Е.В. Тезисы докладов VIII Съезда офтальмологов России. М.: 2005; 78–79.

3. Хватова Н.В. Клинико-функциональные симптомы дисбинокулярной амблиопии и нейрофизиологические механизмы развития зрительных функций. Автореф. дисс. к. м.н., ФГУ Московский НИИ глазных болезней. М.: 2008; 20.

4. Громова О.А., Ребров В.Г. Витамины, макро- и микроэлементы в офтальмологии / ред. В.Н. Нероев. М.: 2008; 73.

5. Спиричев В.Б. Справочник по витаминологии. 2004; М.: Медицина, 456.

6. Connolly E.E., Beatty S., Loughman J., Howard A.N., Louw M.S., Nolan J.M. Supplementation with all three macular carotenoids: response, stability and safety. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011 Oct 6.

7. Trieschmann M., Beatty S., Nolan J.M., Hense H.W., Heimes B., Austermann U., Fobker M., Pauleikhoff D. Changes in macular pigment optical density and serum concentrations of its constituent carotenoids following supplemental lutein and zeaxanthin: the LUNA study. Exp Eye Res. 2007 Apr; 84 (4): 718–28. Epub 2006 Dec 19.

8. Алексеев И.Б., Шиналиева О.Н. Применение препарата Фокус у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией и глаукомной оптической нейропатией. Вестник оптометрии. 2009; 6: 40–42.

9. Егоров Е.А., Романенко И.А. Возрастная макулярная дегенерация. Вопросы патогенеза, диагностики и лечения. Клиническая офтальмология. 2009; 10 (1): 42–47.

10. Нестеров А.П., Теплинская Л.Е., Балашова Л.М., Попов А.В. Клинические и иммунологические аспекты воздействия ВМК Фокус на течение возрастной макулярной дистрофии. Офтальмология. 2008; 5 (4): 39–42.

11. Егорова Е.Ю., Юдина Н.В., Торшин И.Ю., Слышалова Н.Н., Громова О.А. Эффективность использования витаминно-минерального комплекса «Фокус» в комплексной терапии миопии. Вестник Оптикотриетрии. 2011; 2: 54–59.

12. Ребров В.Г., Громова О.А. Витамины, макро- и микроэлементы. М.: ГэотарМед, 2008; 960.

13. Шаповалов С.Л., Александров А.С. Материалы к проблеме зрительного утомления операторов видеодисплейных терминалов. М.: 1999; 174.

14. Максимов И.Б. Визоконтрастопериметрия в диагностике заболеваний глаз: методические рекомендации /С. А. Игнатьев и др. М.: ГВКГ им. Н. Н. Бурденко. 1999; 40.

15. Торшин И.Ю., Громова О.А. Двадцать пять мгновений молекулярной фармакологии. А-Гриф: 2012; 560.

16. Судаков К.В., Умрюхин П.Е. Системные основы эмоционального стресса Издательство: «Гэотар-медицина», 2011; 5–12.



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 (910) 400-88-87

✉ info@marketaccess.ru

🌐 www.Market-Access-Solutions.ru



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.clinvest.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: clinvest@mail.ru