

2019 Том / Volume VII

№ 4

Научно-практический журнал
Scientific and Practical Journal

ISSN 2307-9266
e-ISSN 2413-2241

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

PHARMACY & PHARMACOLOGY



Обзоры, лекции
Reviews, Lectures

Фармакогнозия, ботаника
Pharmacognosy, Botany

**Фармацевтическая технология
и биотехнология**
Pharmaceutical Technology
and Biotechnology

**Фармацевтическая
и токсикологическая химия**
Pharmaceutical and Toxicological
Chemistry

**Фармакология и клиническая
фармакология**
Pharmacology and Clinical
Pharmacology

**Информационные технологии
в фармации**
Information Technologies in Pharmacy

**Организация и экономика
фармацевтического дела**
Organization and Economy
of Pharmacy

**Экономика и менеджмент
медицины**
Economy and Management
of Medicine

Фармацевтическое образование
Pharmaceutical Education

Краткие сообщения
Brief Reports

**Дискуссии, рецензии, юбилеи,
научные школы, история
фармации и фармакологии**
Discussions, Referee Reports,
Anniversaries, Schools
of Thought, History
of Pharmacy and
Pharmacology

Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 7, Выпуск 4, 2019

Свидетельство регистрации СМИ:
ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016 г.

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Главный редактор

Петров Владимир Иванович академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Заместитель главного редактора

Озеров Александр Александрович доктор химических наук, профессор, г. Волгоград, Россия

Редакционная коллегия

Фармакогнозия, ботаника

Куркин Владимир Александрович доктор фармацевтических наук, профессор, г. Самара, Россия

Зилфикаров Ифрат Назимович профессор РАН, доктор фармацевтических наук, г. Москва, Россия

Фармацевтическая технология и биотехнология

Саканян Елена Ивановна доктор фармацевтических наук, профессор, г. Москва, Россия

Фармацевтическая и токсикологическая химия / Информационные технологии в фармации

Вавер Ивона PhD, профессор, г. Варшава, Польша

Фармакология и клиническая фармакология

Ханферьян Роман Авакович доктор медицинских наук, профессор, г. Москва, Россия

Буске Паскаль MD, профессор, г. Страсбург, Франция

Кампизи Коррадино профессор, MD, PhD, г. Генуя, Италия

Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины

Наркевич Игорь Анатольевич доктор фармацевтических наук, профессор, г. Санкт-Петербург, Россия

Сомасундарам Субраманиан MD, Россия/Индия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / Краткие сообщения / Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии** могут быть рассмотрены любыми членами редакционной коллегии.

Ответственный секретарь: Корянова Ксения Николаевна, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

Переводчик: Давыденко Любовь Григорьевна, кандидат филологических наук, доцент, г. Пятигорск, Россия

Технический редактор: Доценко Марина Александровна, г. Пятигорск, Россия

Учредитель: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России.

400131, Россия, г. Волгоград, площадь Павших Борцов, д. 1

Адрес издательства: 357532, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России

Телефон: +7 (8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Объединенный каталог. Пресса России. Газеты и журналы. Индекс 94183

Формат А4, тираж 1000 экз. Цена свободная.

Журнал «Фармация и фармакология» включен в перечень рецензируемых научных изданий, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования, и в соответствии с пунктом 5 правил формирования перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук (Перечень ВАК), Scopus, Web of Science (ESCI), РИНЦ, eLibrary, ВИНТИ, РГБ, Киберленинка, Соционет, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами в ООО «Амирит», 410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.

© ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, 2019
© Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2019
© Авторы, 2019

Scientific and Practical Journal

PHARMACY & PHARMACOLOGY

Scientific and practical journal

Volume VII, Issue 4, 2019

The mass media registration certificate:
ПИ №ФС77–67428 от 13.10.2016

ISSN 2307-9266 e-ISSN 2413-2241

Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov Academician RAS, PhD (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Aleksandr A. Ozerov PhD (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

Editorial Board

Pharmacognosy, Botany

Vladimir A. Kurkin PhD (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Ifrat N. Zilfikarova PhD (Pharmacy), Professor of the RAS, Moscow, Russia

Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Elena I. Sakanyan PhD (Pharmacy), Professor, Moscow, Russia

Pharmaceutical and Toxicological Chemistry / Information Technologies in Pharmacy

Iwona Wawer PhD, Professor, Warsaw (Poland)

Pharmacology and Clinical Pharmacology

Roman A. Khanfer`yan PhD (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet MD, PhD Professor, Strasbourg, France

Campisi Corradino Professor, MD, PhD, Genoa, Italy

Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Igor A. Narkevich PhD (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Somasundaram Subramanian MD, Russia/India

Manuscripts presented in sections **Reviews, Lectures / Pharmaceutical Education / Brief Reports / Discussions, Referee Reports, Anniversaries, School of Thought, History of Pharmacy and Pharmacology** can be considered by any members of the editorial board.

Executive Editor: Koryanova Ksenia N., PhD (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Translator: Davydenko Lubov G., PhD (Philology), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Technical editor: Dotsenko Marina A., Pyatigorsk, Russia

Founder: Volgograd State Medical University. 1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

Editors office address: 11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University

Phone number: +7(8793) 32-44-74. E-mail: pharmjournal@mail.ru

www.pharmpharm.ru

Union catalogue. Russian Press / Newspapers and journals. Code 94183

A4 size, 1000 issues circulation. Price free

Journal "Pharmacy & Pharmacology" is recommended International Committee Of Medical Journal Editors and included in Higher Attestation Commission, Scopus, Web of Science (ESCI), Russian citation database, eLibrary, ARISTI (All-Russian Institute of Scientific and Technical Information), RSL (Russian State Library), CyberLeninka, Socionet, EMBASE, Chemical Abstracts (CAS), Directory of Open Access Journals (DOAJ), EBSCO Discovery Service, RNMJ, University of CAMBRIDGE, Ulrich'sWeb, Google Scholar, Biefeld Academic Search Engine (BASE), Directory of Open Access Scholarly Resources (ROAD), Research Bible, Open Archives Initiative, Academic Keys, JournalTOCs, WorldCat, OpenAIRE, University of Oxford, The British Library, Universitait Gent, Université de Montréal, University of Saskatchewan.

Printed in the LLC "Amirit" in accord with provided materials, 410004, Saratov, 88, Chernishevsky Str.

© Volgograd State Medical University, 2019

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2019

©Authors, 2019

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS**Оригинальные статьи / Research Articles****Фармацевтическая и токсикологическая химия / Pharmaceutical and Toxicological Chemistry**

<i>С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гофенберг, А.В. Лабутин, А.Б. Мелентьев</i>	<i>S.S. Kataev, O.N. Dvorskaya, M.A. Gofenberg, A.V. Labutin, A.B. Melentyev</i>
АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИМИМЕТИКА MDMB(N)-073F И ЕГО МАРКЕРОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ184	ANALYTICAL FEATURES OF SYNTHETIC MDMB(N)-073F CANNABIMIMETICS AND ITS MARKERS IN BIOLOGICAL MATERIAL184

Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

<i>А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.Л. Аджиахметова, Н.М. Червонная, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.И. Шерешкова</i>	<i>A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.L. Adzhiakhmetova, N.M. Chervonnaya, K.A. Miroshnichenko, A.V. Sosnovskaya, E.I. Chereshkova</i>
ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ТЫКВЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (CUCURBITA PEPO L.) И ЭКСТРАКТА БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ (TAGETES PATULA L.) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ГИПОМЕТАБОЛИЗМА ГОЛОВНОГО МОЗГА.....198	EFFECT OF PUMPKIN (CUCURBITA PEPO L.) AND MARIGOLD (TAGETES PATULA L.) EXTRACTS ON HIPPOCAMPAL MITOCHONDRIA FUNCTIONAL ACTIVITY WITHIN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ACUTE BRAIN HYPOMETABOLISM198
<i>М.Г. Ляпина, М.С. Успенская, Е.С. Майстренко, М.Д. Калугина</i>	<i>M.G. Lyapina, M.S. Uspenkaya, E.S. Maistrenko, M.D. Kalugina</i>
ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНОИДА ИЗ ПИОНА (PAEONIA LACTIFLORA) НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ПРЕДТРОМБОЗА.....208	INFLUENCE OF HEPARINOID FROM PAEONIA LACTIFLORA ON HEMOSTATIC SYSTEM WITHIN CONDITIONS OF PRETHROMBOSIS.....208
<i>А.В. Матвеев, А.Е. Крашенинников, Е.А. Егорова, Е.И. Коняева</i>	<i>A.V. Matveev, A.E. Krashennnikov, E.A. Egorova, E.I. Konyeva</i>
ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ ПРОБЛЕМ, СВЯЗАННЫХ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ (DRUG-RELATED PROBLEMS), НА ПРИМЕРЕ ГРУППЫ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ.....215	APPLICATION OF DRUG-RELATED PROBLEMS APPROACH TO ANALYSIS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS' SAFETY215
<i>М.А. Самоотруева, А.Л. Ясенявская, О.А. Башкина, Н.Ф. Мясоедов, Л.А. Андреева</i>	<i>M.A. Samotrueva, A.L. Yasenyavskaya, O.A. Bashkina, N.F. Myasoedov, L.A. Andreeva</i>
ГЛИПРОЛИНЫ КАК МОДУЛЯТОРЫ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ «СОЦИАЛЬНОГО» СТРЕССА224	GLYPROLINES AS MODULATORS OF IMMUNOREACTIVITY WITHIN CONDITIONS OF "SOCIAL" STRESS224
<i>М.В. Черников, М.А. Оганова, А.С. Герасименко, Е.А. Артемьев</i>	<i>M.V. Chernikov, M.A. Oganova, A.S. Gerasimenko, E.A. Artemyev</i>
ИЗУЧЕНИЕ АНТИСЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ДИНИТРАТА 2-ФЕНИЛ-9-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛИМИ- ДАЗО[1,2-А]БЕНЗИМИДАЗОЛА МЕТОДОМ НЕПРЕРЫВНОЙ ПЕРФУЗИИ ЖЕЛУДКА КРЫС231	STUDY OF ANTISECRETORY ACTIVITY OF DINITRATE 2-PHENYL-9-DIETHYLAMINOETHYLIMIDAZO[1,2-A] BENZIMIDAZOLE BY METHOD OF CONTINUOUS PERFUSION OF RATS' STOMACHS.....231

УДК 340.67:543.51/544.43:615.074



АНАЛИТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ СИНТЕТИЧЕСКОГО КАННАБИМИМЕТИКА MDMB(N)-073F И ЕГО МАРКЕРОВ В БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

С.С. Катаев¹, О.Н. Дворская², М.А. Гофенберг^{4,5}, А.В. Лабутин⁶, А.Б. Мелентьев⁷

¹ Государственное казенное учреждение здравоохранения особого типа Пермского края «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». 614077, Россия, г. Пермь, ул. Старцева, 61

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 614990, Россия, г. Пермь, ул. Полевая, 2

³ Государственное автономное учреждение здравоохранения Свердловской области «Областная наркологическая больница». 620030, Россия, г. Екатеринбург, ул. Халтурина, 44А

⁴ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Свердловской области «Свердловская областная клиническая психиатрическая больница». 620034, Россия, г. Екатеринбург, Сибирский тракт, 8 км

⁵ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 620028, Россия, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3

⁶ Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Томский областной наркодиспансер». 634061, Россия, г. Томск, ул. Лебедева, 4

⁷ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Челябинское областное бюро судебно-медицинской экспертизы». 454080, Россия, Челябинская обл., г. Челябинск, ул. Варненская, 4Б

E-mail: dvoksnik@gmail.com

Получено 29.06.2019

Рецензия (1) 07.08.2019

Рецензия (2) 15.08.2019

Принята к печати 20.08.2019

Целью исследования является изучение аналитических характеристик синтетического каннабимиметика группы индазолкарбоксамидов MDMB(N)-073F методами газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) и жидкостной хроматографии с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), а также характеристик главного метаболита MDMB(N)-073F, его глюкуронида и дериватов с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в моче для целей экспертной практики, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Материалы и методы. Объекты растительного происхождения с нанесенными на них наркотическими средствами, изъятые в нелегальном обороте. Образцы мочи, поступившие на химико-токсикологическое и судебно-химическое исследование. Для пробоподготовки использовались патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* – 200 мг-3 мл (*Agilent*, США), для ферментативного гидролиза использовалась β -глюкуронидаза, *Type HP-2, From Helix Pomatia*, 100000 ЕД/мл (*Sigma-ALDRICH CHEMI*, Германия). ГХ-МС/МС анализ проводили на газовом хроматографе *Agilent 7890* с тандемным квадрупольным масс-спектрометром *Agilent 7000* (*Agilent*, США); ГХ-МС анализ выполнен на газовом хроматографе *Agilent 7820* с масс-селективным детектором *Agilent 5975* (*Agilent*, США); ВЭЖХ-МСВР исследование проводили на жидкостном хроматографе *Agilent 1260* с тандемным гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения *Agilent 6540* (*Agilent*, США); ВЭЖХ-МС/МС исследование выполнено на жидкостном хроматографе *Agilent 1260* с тандемным масс-спектрометром *Agilent 6460* (*Agilent*, США).

Результаты. В результате исследования, проведенного методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР, подтверждена структура соединения MDMB(N)-073F, определена точная масса протонированной молекулы, соответствующая брутто-формуле $C_{19}H_{27}FN_2O_3$. Приведены спектральные характеристики MDMB(N)-073F. Методами ГХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС установлено, что одним из направлений биотрансформации MDMB(N)-073F в организме человека является гидролиз сложноэфирной связи с последующей конъюгацией образующейся кислоты. Установлено, что конъюгатом главного метаболита MDMB(N)-073F фазы I биотрансформации является продукт взаимодействия с глюкуроновой кислотой. Метаболиты, образующиеся в результате гидролиза сложноэфирной связи, и его конъюгат с глюкуроновой кислотой рекомендованы в качестве маркеров употребления синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F при анализе хроматографическими методами они могут быть использованы при систематическом аналитическом скрининге биологических образцов.

Заключение. Приведены аналитические характеристики синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F методами газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) и жидкостной хроматографии гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), а также характеристики главного метаболита MDMB(N)-073F, его глюкуронида и дериватов с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в моче для целей экспертной практики, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

Ключевые слова: MDMB(N)-073F, каннабимиметики, метаболизм, газовая хроматография – масс-спектрометрия, высокоэффективная жидкостная хроматография, тандемная масс-спектрометрия, гибридная квадруполь-времяпролетная масс-спектрометрия высокого разрешения
Список сокращений: ГХ-МС/МС – газовая хроматография с тандемной масс-спектрометрией, ВЭЖХ-МСВР – жидкостная хроматография с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения, ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием

Для цитирования: С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гофенберг, А.В. Лабутин, А.Б. Мелентьев. Аналитические характеристики синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F и его маркеров в биологическом материале. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4): 184-197. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-184-197

© С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гофенберг, А.В. Лабутин, А.Б. Мелентьев, 2019

For citation: S.S. Kataev, O.N. Dvorskaya, M.A. Gofenberg, A.V. Labutin, A.B. Melentyev. Analytical features of synthetic MDMB(N)-073F cannabinoids and its markers in biological material. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(4): 184-197. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-184-197

ANALYTICAL FEATURES OF SYNTHETIC MDMB(N)-073F CANNABIMIMETICS AND ITS MARKERS IN BIOLOGICAL MATERIAL

S.S. Kataev¹, O.N. Dvorskaya², M.A. Gofenberg^{4,5}, A.V. Labutin⁶, A.B. Melentyev⁷

¹ Perm Regional Bureau of Forensic-Medical Expertise, 61, Startsev Str, Perm, Russia, 614077

² Perm State Pharmaceutical Academy, 2, Polevaya Str., Perm, Russia, 614990

³ Sverdlovsk Regional Narcological Hospital, I44 A, Khalturin Str., Yekaterinburg, Russia, 620030

⁴ Yekaterinburg State Publicly Funded Health Facility "Regional Clinical Psychiatric Hospital", 8km, Sibirsky Trakt, Yekaterinburg, Russia, 620034

⁵ Ural State Medical University, 3, Repin Str., Yekaterinburg, Russia, 620028

⁶ Tomsk Regional Drug Abuse Clinic, 4, Lebedev Str., Tomsk, Russia, 634061

⁷ Chelyabinsk Regional Bureau of Forensic-Medical Expertise, 4b, Varna Str., Chelyabinsk, Russia, 454076

E-mail: dvoksnik@gmail.com

Received 29 June 2019

Review (1) 7 August 2019

Review (2) 15 August 2019

Accepted: 20 August 2019

The aim of the research is to study both analytical features of synthetic MDMB(N)-073F cannabimimetics of indazole carboxamides group by gas chromatography methods combined with tandem mass spectrometry (GC-MS) and high performance liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry (HPLC-HRMS) as well as characteristics of the major MDMB(N)-073F metabolite, its glucuronide and derivatives, using gas chromatography with mass-spectrometric (GC-MS) detection and high-performance liquid chromatography (HPLC) with MS/MS mass spectrometry (HPLC-MS/MS) in urine samples to be applied in expert practice, chemical-toxicological and forensic and chemical analyses.

Materials and methods. To carry out the study, the following materials were used: plant-based objects with narcotic drugs withdrawn from illegal trafficking and applied to them; urine samples to be studied under chemical-toxicological and forensic and chemical analyses. For solid-phase epitaxy, SampliQ EVIDEX TFE cartridges – 200 mg-3 ml (Agilent, USA) were used for sample preparation; β -glucuronidase, Type HP-2, From Helix Pomatia, 100000 UA/ml (Sigma-ALDRICH CHEMI, Germany) was used for enzymatic hydrolysis. GC-MS/MS analysis was made using Agilent 7890 gas chromatograph with a tandem quadrupolar mass-spectrometer Agilent 7000 (Agilent, США); GC-MS analysis was carried out using gas chromatograph Agilent 7820 with mass-selective detector Agilent 5975 (Agilent, USA); HPLC-HRMS research was made on liquid chromatograph Agilent 1260 with tandem hybrid high-resolution quadrupole-time-of-flight detector Agilent 6540 (Agilent, США); liquid chromatograph Agilent 1260 with Agilent 6460 (Agilent, USA) with tandem mass-spectrometer were used for making HPLC-MS/MS research.

Results. The structure of MDMB(N)-073F compound has been confirmed and an exact mass of the protonated molecule corresponding to the chemical formula $C_{19}H_{27}FN_3O_3$ fixed by GC-MS/MS and HPLC-HRMS methods. Spectral characteristics of MDMB(N)-073F have been given. One of the branches in MDMB(N)-073F biotransformation in the human body found out by GC-MS and HPLC-MS/MS methods, is the ester decomposition with further conjugation of the resulting acid. The product interacting with glucuronic acid, is found to be the conjugate of major MDMB(N)-073F metabolite of the 1st phase in biotransformation. Metabolites appearing due to the ester decomposition and its conjugate with glucuronic acid, are recommended to be used as markers for synthetic MDMB(N)-073F cannabimimetics in the analysis by chromatographic methods; they can be used for regular screening of biological samples.

Conclusion. The research results presented here, are the following: the analytical features characteristic for synthetic MDMB(N)-073F cannabimimetics found out by gas chromatography methods combined with tandem mass spectrometry (GC-MS/MS) and liquid chromatography of hybrid high-resolution quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (HPLC-HRMS), as well as characteristics of major MDMB(N)-073F metabolite, its glucuronide and derivatives with the use of gas chromatography with mass-spectrometric detection (GC-MS) and liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) in urine samples to be applied in expert practice, chemical-toxicological, forensic and chemical analyses.

Keywords: MDMB(N)-073F, cannabimimetics, gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS), high performance liquid chromatography (HPLC), high-resolution mass spectrometry (HRMS), hybrid high-resolution quadrupole-time-of-flight mass spectrometry

Abbreviations: MRM – multiple reaction monitoring, GC – gas chromatography, MS mass spectrometry, HPLC – high performance liquid chromatography, HRMS – high-resolution mass spectrometry, a.u. – antitoxic unit.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из важных аспектов судебной и токсикологической химии является изучение свойств токсикантов и процессов их метаболизма в организме человека, способов их выделения и идентификации.

Это особенно актуально в отношении новых потенциально опасных психоактивных веществ, периодически появляющихся в незаконном обороте, в том числе синтетических каннабимиметиков.

Разнообразие имеющейся в экспертных учреж-

денях приборной базы и отсутствие единых методических подходов к анализу синтетических каннабимиметиков в биологическом материале, отсутствие аналитических стандартов, вносят определенные трудности при интерпретации и сравнении результатов, полученных из разных источников.

В лабораторной практике Российской Федерации широкодоступным и используемым методом анализа является газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС), однако его применение сопряжено с необходимостью длительной и трудоемкой пробоподготовки для получения качественных проб образца. При исследовании мочи на наличие метаболитов каннабимиметиков в этом случае необходимы деконъюгация метаболитов, экстракция и дериватизация [1, 2]. Применение жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) является более предпочтительным, так как позволяет упростить процесс подготовки проб для выявления метаболитов синтетических каннабимиметиков за счет отказа от проведения деконъюгирования и дериватизации [3-5].

В данной работе приведены результаты изучения аналитических характеристик синтетического каннабимиметика группы индазолкарбоксамидов MDMB(N)-073F методами газовой хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ГХ-МС/МС) и жидкостной хроматографии с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МСВР), а также характеристик главного метаболита MDMB(N)-073F, его глюкуронида и дериватов с использованием газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС) в моче для целей экспертной практики, химико-токсикологического и судебно-химического анализа.

ОБЪЕКТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты растительного происхождения с нанесенными на них наркотическими средствами, изъятые в нелегальном обороте.

Образцы мочи, поступившие на химико-токсикологическое и судебно-химическое исследование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Обнаружение и идентификацию синтетического каннабимиметика в растительных объектах проводили методами газожидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией и высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения.

Методы газожидкостной хроматографии с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором и высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemным масс-спектрометром были использованы

для определения маркеров и метаболитов каннабимиметика в биологическом материале.

Оборудование

- газовый хроматограф Agilent 7890 (колонка капиллярная – DB-5MS, аналогичная (5% фенил)-метилполисилоксану), внутренний диаметр 0,25 мм, длина колонки 30 м, толщина пленки неподвижной фазы 0,25 мкм) с tandemным квадрупольным масс-спектрометром Agilent 7000 (Agilent, США);
- газовый хроматограф Agilent 7820 (капиллярная колонка HP-5MS (5% фенил)-метилполисилоксан), внутренний диаметр 0,25 мм, длина 30 м, толщина пленки 0,25 мкм) с масс-селективным детектором Agilent 5975 (Agilent, США);
- жидкостный хроматограф Agilent 1260 (хроматографическая колонка Zorbax Extend C-18 2,1*50мм, диаметр зерна сорбента 1,8 мкм) с tandemным гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения Agilent 6540 (разрешение не менее 40000) (Agilent, США);
- жидкостный хроматограф Agilent 1260 (хроматографическая колонка 3*150 мм с обращено-фазным сорбентом Poroshell 120 EC-C18, размер зерна 2,7 мкм) с tandemным масс-спектрометром Agilent 6460 (Agilent, США);
- система с вакуумной камерой (12 позиций) (Supelco);
- насос низкого вакуума KNF lab LABOPORT (Франция);
- термоблок ПЭ-4030 (ОАО «Экрос», Россия);
- одноканальный испаритель ПЭ-2300 (ОАО «Экрос», Россия);
- микровстряхиватель ПЭ-2 (ОАО «Экрос», Россия);
- бытовая микроволновая печь Supra MWS-1824SW (Россия);
- патроны для ТФЭ SampliQ EVIDEX – 200 мг-3 мл (Agilent, США);
- полуавтоматические пипетки-дозаторы (для отбора объемов жидкостей: 4-40, 40-200 мкл и 0,2–1, 1–5 мл).

Материалы

Бис-триметилсилил-трифторацетамид (BSTFA), содержащий 1% триметилхлорсилана; 2,2,3,3,3-пентафторпропанол, 2,2,3,3,3-пентафторпропионовый ангидрид, йодистый метил, β-глюкуронидаза, Type HP-2, From Helix Pomatia, 100000 ЕД/мл (Sigma-ALDRICH CHEMI, Германия). Используемые в исследовании реактивы и растворители марки «х.ч.». Хранение проб мочи до исследования осуществляли при + 4°С.

Подготовка проб

Подготовка растительных объектов (для ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР исследования)

Навеску растительного объекта массой 10 мг экстрагировали 10 мл этанола в течение 5 минут. Полу-

ченный экстракт отделяли центрифугированием от растительной матрицы, разбавляли в 10 раз этанолом и исследовали методами ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МСВР.

Подготовка образцов мочи (с применением ферментативного гидролиза, для ГХ-МС исследования)

К пробе мочи объемом 1 мл добавляли 50 мкл спиртового раствора внутреннего стандарта (гексенал 0,2 мг/мл), 250 мкл 1/15М фосфатного буфера pH 6 и 50 мкл β-глюкуронидазы. Флакон закупоривали и выдерживали при 45°C в течение 2 часов. После охлаждения добавляли 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8). Содержимое флаконов центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут, центрифугат отделяли от осадка.

Для экстракции использовали патроны для ТФЭ *SampliQ EVIDEX* (200 мг/3 мл) со смешанной фазой. Кондиционирование сорбента осуществляли путем последовательного пропускания через картридж 2 мл 95% этанола и 2 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8). Далее загружали образец со скоростью 1 мл/мин. Промывку проводили последовательно: 1 мл 1/15 М фосфатного буфера (pH 4.8) и 1 мл 10% этанола. Сушку патрона производили под вакуумом в течение 20 минут. Элюат получали двукратным пропусканием через патрон смеси *n*-гексан–этилацетат (2:1) по 2 мл. Элюат испаряли в токе азота при 45°C.

Дериватизация Метилирование

К сухому остатку элюата прибавляли 500 мкл безводного ацетона, 40 мкл йодистого метила и 20-25 мг безводного карбоната калия, герметично закрывали и нагревали при 60°C в течение 60 минут в термоблоке. Флакон охлаждали, отбирали жидкую фракцию реакционной смеси, переносили в чистую виалу и испаряли в токе азота при 40°C. Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель газового хроматографа.

Этерификация с 2,2,3,3,3-пентафторпропанолом

К сухому остатку элюата прибавляли 20 мкл 2,2,3,3,3-пентафторпропанола и 60 мкл 2,2,3,3,3-пентафторпропионового ангидрида (замывая стенки виалы), виалу плотно закупоривали и обрабатывали микроволновым излучением в СВЧ-печи с мощностью 560 Вт в течение 5 минут. После охлаждения флакон вскрывали и выпаривали избыток реагентов в токе азота (не выше 40°C). Сухой остаток растворяли в 100 мкл безводного этилацетата и 1 мкл вводили в испаритель ХМС.

Получение триметилсилиловых эфиров

К сухому остатку элюата прибавляли 100 мкл BSTFA, содержащего 1% триметилхлорсилана, герметично закрывали, перемешивали на микровстряхивателе и нагревали при 80°C в течение 60 минут в термоблоке. Виалу охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

хивателе и нагревали при 80°C в течение 60 минут в термоблоке. Виалу охлаждали и 2 мкл вводили в инжектор хромато-масс-спектрометра.

Подготовка образцов мочи (без применения гидролиза, для ВЭЖХ исследования)

К пробе мочи (0,05 мл) в пробирке Эппендорфа добавляли 0,45 мл смеси внутренних стандартов в ацетонитриле (с концентрацией по 0,03 мкг/мл этилморфина и циклизина). Пробирку центрифугировали 15 мин при 10000 об/мин, надосадочный слой переносили в виалу для автосамплера, 2 мкл полученного раствора вводили в хроматограф.

Условия проведения ГХ-МС/МС исследования (газовый хроматограф Agilent 7890 с tandemным квадрупольным масс-спектрометром Agilent 7000)

- температура испарителя хроматографа – 280°C;
- режим работы испарителя split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин после ввода пробы);
- температура интерфейса детектора – 280°C;
- начальная температура термостата колонки – 220°C;
- конечная температура термостата колонки – 300°C;
- температура колонки изменялась со скоростью 20 град/мин;
- выдержка при конечной температуре 5 мин.;
- газ-носитель – гелий, скорость потока через колонку 1 мл/мин.;
- объем вводимой пробы – 1 мкл;
- газ ячейки соударений – азот, 1,5 мл/мин.;
- «охлаждающий» газ – гелий, расход 2,25 мл/мин.;
- энергия соударений 10–20 эВ.

Условия проведения ВЭЖХ-МСВР исследования жидкостный хроматограф Agilent 1260 с гибридным квадруполь – времяпролетным детектором высокого разрешения Agilent 6540)

- градиентное элюирование с фазами А (0,1% раствор муравьиной кислоты в деионизированной воде) и В (ацетонитрил) при увеличении содержания фазы В от 1% до 100% за 10 минут;
- объем вводимой пробы 1 мкл;
- скорость потока 0,3 мл/мин.;
- температура колонки 45°C;
- ионизация электрораспылением в режиме получения положительных ионов;
- температура осушающего газа (азот) 350°C;
- поток осушающего газа (азот) 8 л/мин.;
- давление газа распылителя (азот) 20 psi;
- напряжение капилляра 3500 В;
- напряжение фрагментатора 100 и 180 В;
- режим работы масс-спектрометра: Auto MS/MS
- калибровка прибора и коррекция точности измерения масс в ходе анализа осуществлялась с

использованием стандартных калибровочных растворов, рекомендованных производителем оборудования.

Для проведения исследования часть полученного ранее спиртового экстракта исследуемого вещества, разбавляли водой и исследовали в указанных выше условиях.

Условия проведения ГХ-МС исследования (газовый хроматограф Agilent 7820 с масс-селективным детектором Agilent 5975)

- скорость потока газа-носителя (гелий) через колонку 1,5 мл/мин.;
- режим работы испарителя split/splitless (деление потока 15:1, с задержкой включения 1 мин. после ввода пробы);
- температура испарителя хроматографа и интерфейса детектора задавалась 250 и 280°C;
- температура колонки: начальная 70°C в течение 2 мин и прогрев до 280°C со скоростью программирования 20 град/мин., выдержка при конечной температуре 8 мин.;
- температуры источника ионов и квадруполя устанавливали 230 и 150°C, соответственно;
- напряжение на умножителе масс-селективного детектора устанавливали равной величине автоматической настройки детектора.

Регистрация масс-спектров для метильных производных в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 42–450 а.е. Регистрация масс-спектров триметилсилильных производных и пентафторпропиловых эфиров в режиме полного сканирования ионов в интервале масс 43–650 а.е.

Долю конъюгирования главного метаболита MDMB(N)-073F фазы I биотрансформации в моче определяли по отношению площади пиков метиловых эфиров для иона с величиной m/z : 219 и площади пика иона m/z 235 для *N*-метилгексенала (внутренний стандарт) в элюате мочи с ферментативным гидролизом и аналогичной методике без гидролиза.

Условия проведения ВЭЖХ-МС/МС исследования (жидкостный хроматограф Agilent 1260 с тандемным масс-спектрометром Agilent 6460)

- градиентное элюирование с фазами А (10 мМ

раствор формиата аммония и 0,1% муравьиной кислоты в деионизированной воде) и В (0,01% муравьиной кислоты в метаноле);

- скорость подачи элюента составляла 0,6 мл/мин.;
- температура колонки 50°C;
- градиентный режим: 0 – 1,0 мин. 95% фаза А, к 5 мин. доля фазы А составляла 50%, к 15 мин. – 2%, к 17 мин. – 2%, к 17,1 мин. – 95% и регенерация колонки в течение 3,0 мин. 95% фаза А;
- объем вводимой пробы 2 мкл;
- ионизация электрораспылением в режиме получения положительных ионов;
- поток газа-осушителя (азот) в источник ионов 6 л/мин.;
- давление газа-распылителя (азот) 40 psi;
- температура осушающего газа 300°C;
- напряжение на капилляре 3500 В;
- напряжение на фрагменторе 125 В;
- режимы работы масс-спектрометра: динамический MRM и Product Ion Scan (диапазон масс 100–550 Da).

Обработку хроматограмм с целью идентификации компонентов проб проводили с использованием программ *MSD ChemStation E.02.01.1177 (Agilent)*, *MassHunter B.08.02 (Agilent)* и *AMDIS (The Automatic Mass Spectral Deconvolution and Identification System, NIST)*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как было показано ранее, из относительного содержания метаболитов в образцах мочи, основным направлением метаболизма каннабимиметика MDMB(N)-073F является гидролиз сложноэфирной связи MDMB(N)-073F с последующей конъюгацией образующегося продукта (рисунок 1). Данный метаболит фазы I биотрансформации имеет наибольшую интенсивность сигнала на хроматограммах потребителей MDMB(N)-073F и характерный масс-спектр, что позволяет использовать его в качестве маркера употребления этого каннабимиметика [6,7]. При этом следует учитывать, что в моче данный метаболит фазы I биотрансформации в значительной степени находится в конъюгированном виде (таблица 1), поэтому в случае применения для исследования метода ГХ-МС требуется проведение гидролиза конъюгатов.

Таблица 1 – Значение конъюгации маркера в 10 образцах мочи потребителей каннабимиметика MDMB(N)-073F

Образец	561	663	717	721	722	224	705	752	754	756	Медиана, %
Конъюгация маркера, %	96	0	49	98	97	97	99	99	99	100	97.5

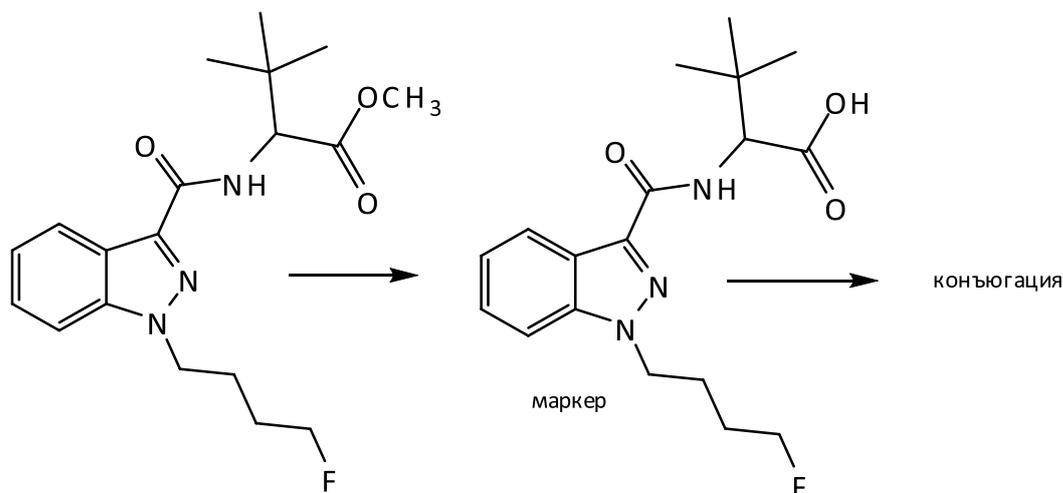


Рисунок 1 – Схема основного направления метаболизма MDMB(N)-073F.

Наиболее распространенными вариантами дериватизации в скрининге маркеров каннабимиметиков в биологическом материале с использованием газовой хроматографии с квадрупольным масс-спектрометрическим детектором являются получение метиловых, триметилсилильных и 2,2,3,3,3-пентафторпропиловых эфиров.

При метилировании происходит образование метилового эфира маркера MDMB(N)-073F соответствующего исходному соединению (рисунок 2), что упрощает идентификацию соединения. На рисунках 3 и 4 приведены масс-спектры, индексы удерживания и структуры триметилсилильного и 2,2,3,3,3-пентафторпропилового эфиров маркера MDMB(N)-073F, соответственно.

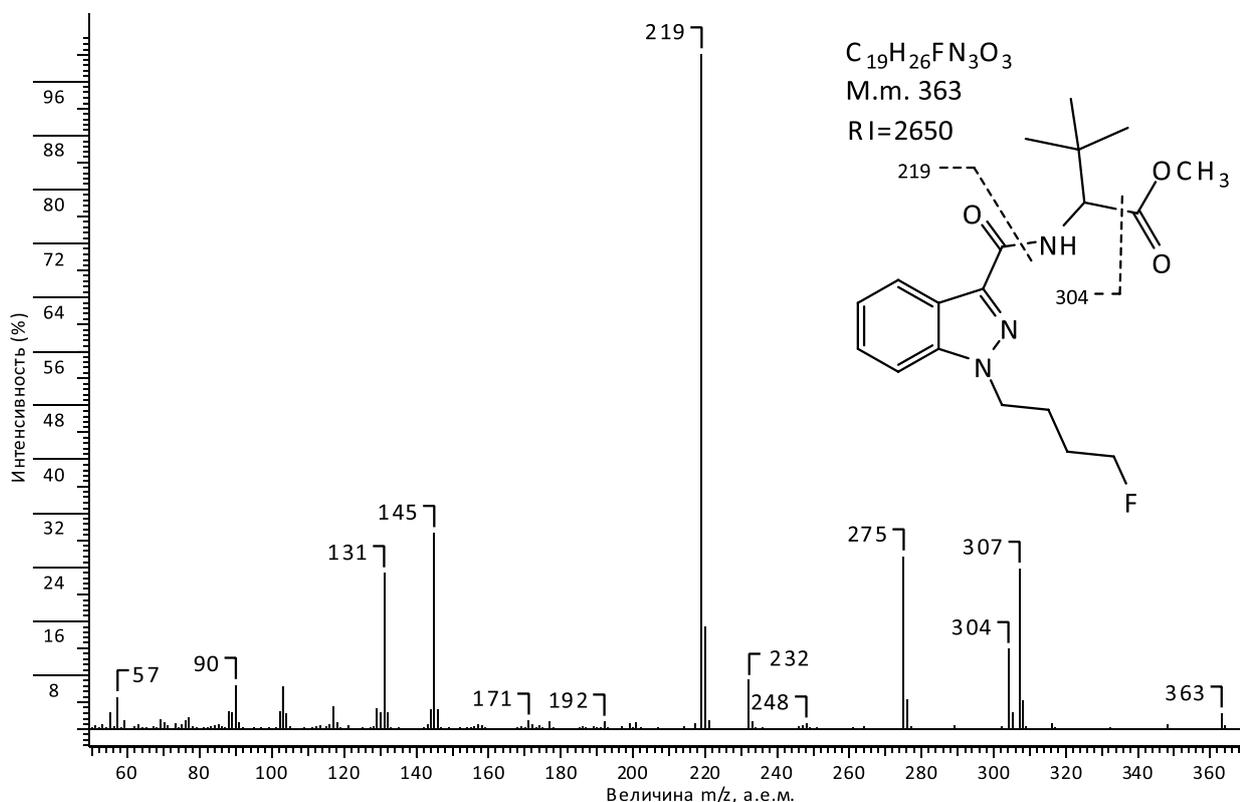


Рисунок 2 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура метилового эфира маркера MDMB(N)-073F.

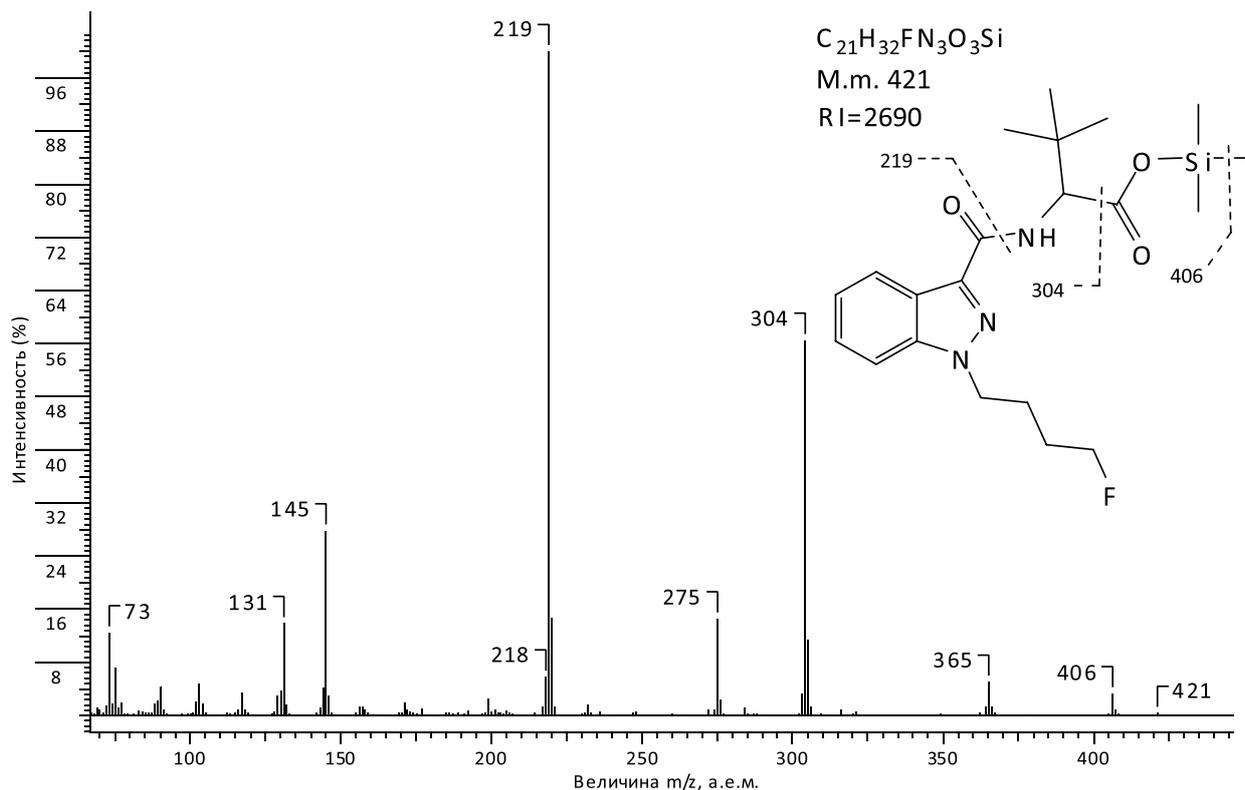


Рисунок 3 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура триметилсилильного эфира маркера MDMB(N)-073F.

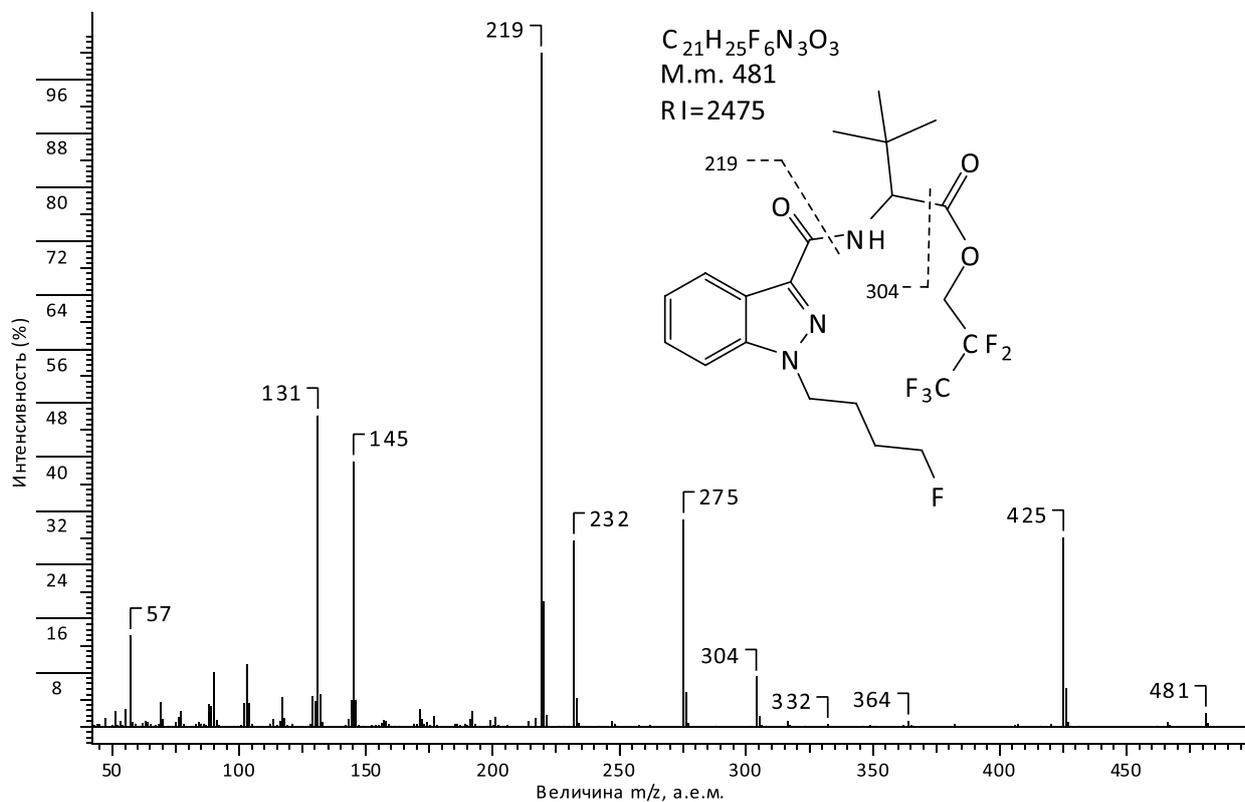


Рисунок 4 – Масс-спектр, индекс удерживания и структура 2,2,3,3,3-пентафторпропилового эфира маркера MDMB(N)-073F.

С учётом идентичной структуры MDMB(N)-073F и метилового деривата его основного метаболита (рисунок 1) для изучения свойств был проведен анализ исходного каннабимиметика MDMB(N)-073F с использованием методов ГХ-МС/МС и ВЭЖХ-МС/МС.

При исследовании методом газовой хроматографии с tandemным масс-спектрометрическим детектором трехквadrupольного типа была проанализирована фрагментация основных ионов, образующихся при ионизации электронным ударом из MDMB(N)-073F (рисунки 5 – 10).

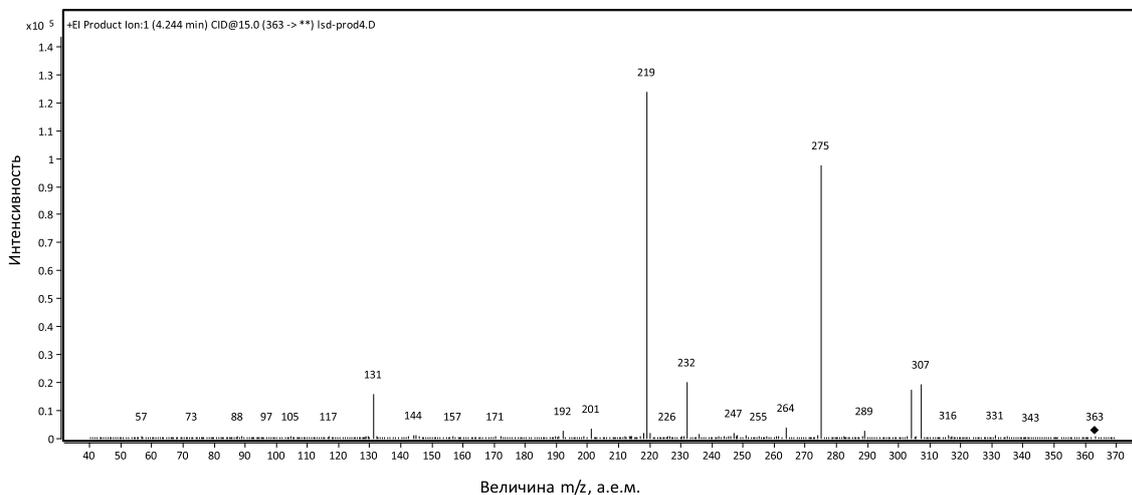


Рисунок 5 – Мс-мс спектр иона с m/z 363 (энергия соударения 15 эВ).

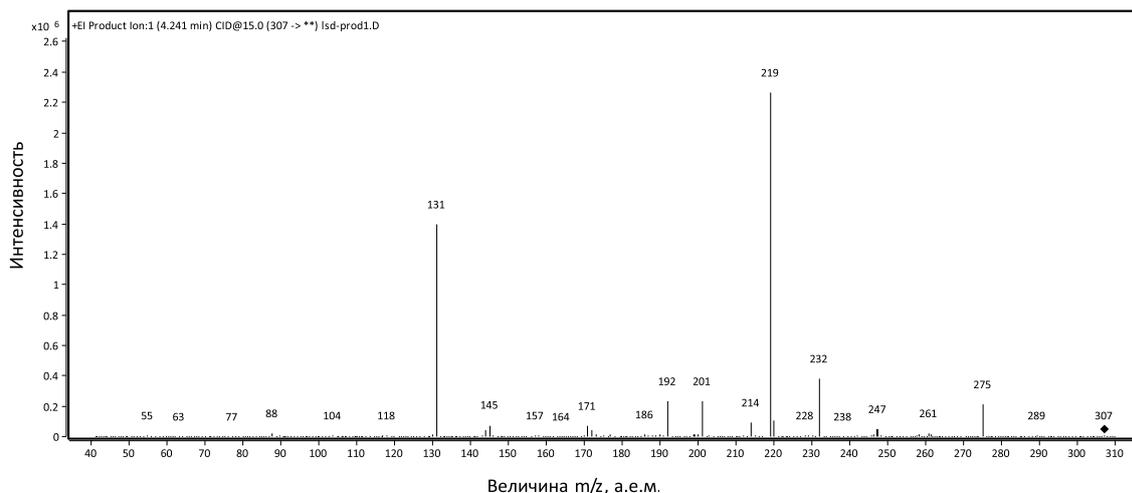


Рисунок 6 – Мс-мс спектр иона с m/z 307 (энергия соударения 15 эВ).

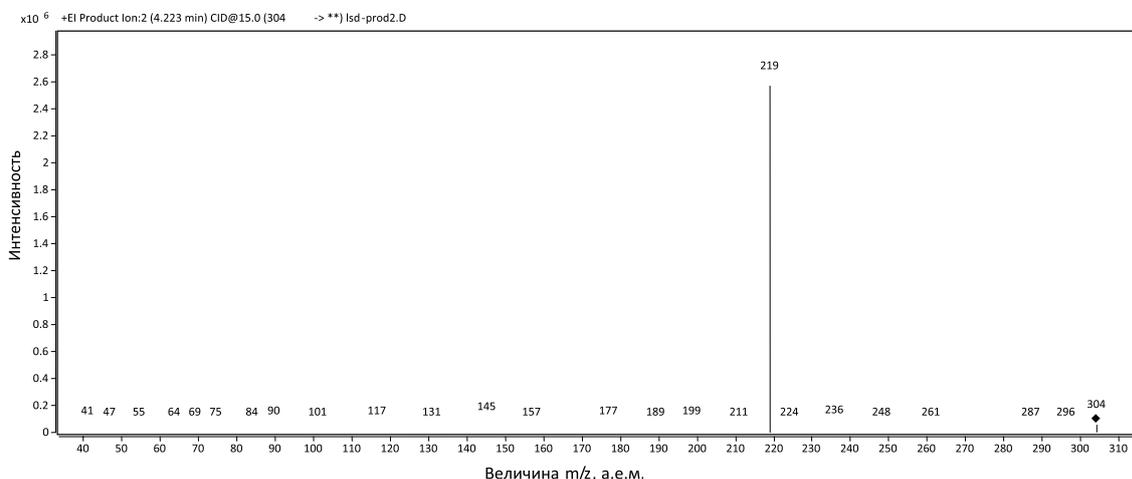


Рисунок 7 – Мс-мс спектр иона с m/z 304 (энергия соударения 15 эВ).

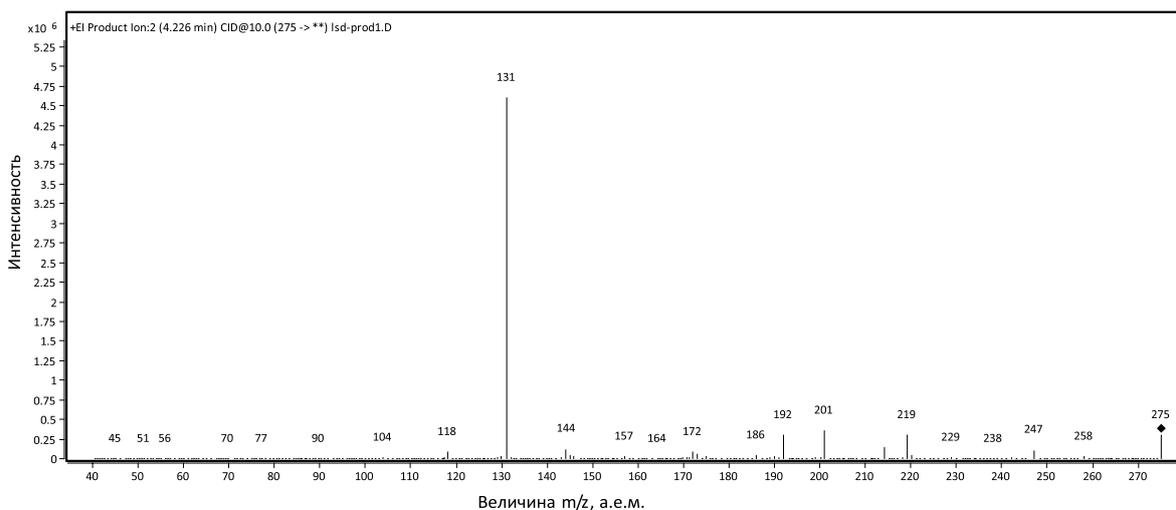


Рисунок 8 – Мс-мс спектр иона с m/z 275 (энергия соударения 10 эВ).

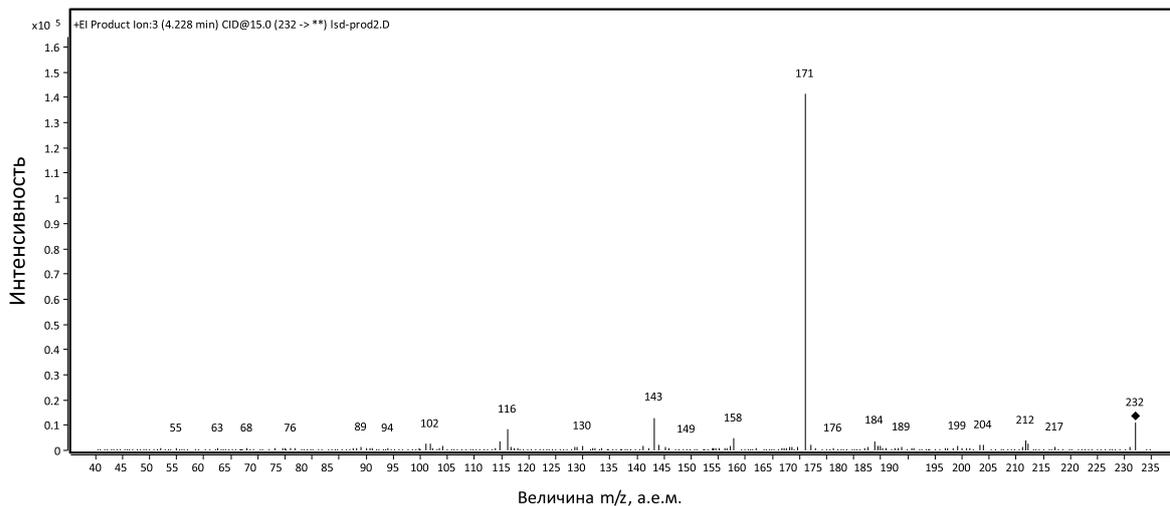


Рисунок 9 – Мс-мс спектр иона с m/z 232 (энергия соударения 15 эВ).

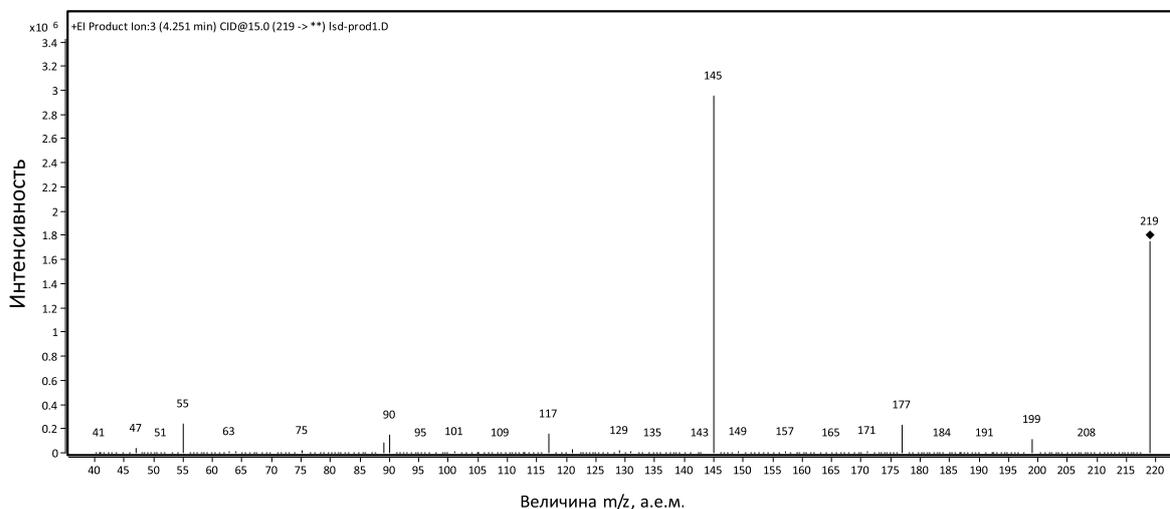


Рисунок 10 – Мс-мс спектр иона с m/z 219 (энергия соударения 15 эВ).

Из представленных на рисунках 5 – 10 масс-спектрах индивидуальных ионов видно, что все эти ионы структурно связаны между собой. Так в состав иона с m/z 304 а.е.м. входят ионы 219 и 145, в состав иона

219 входит ион с m/z 145 а.е.м., а в состав иона с m/z 307 а.е.м. – ионы 232, 275 и 131. Полученные данные соответствуют приведенной ниже схеме фрагментации под действием электронного удара (рисунок 11).

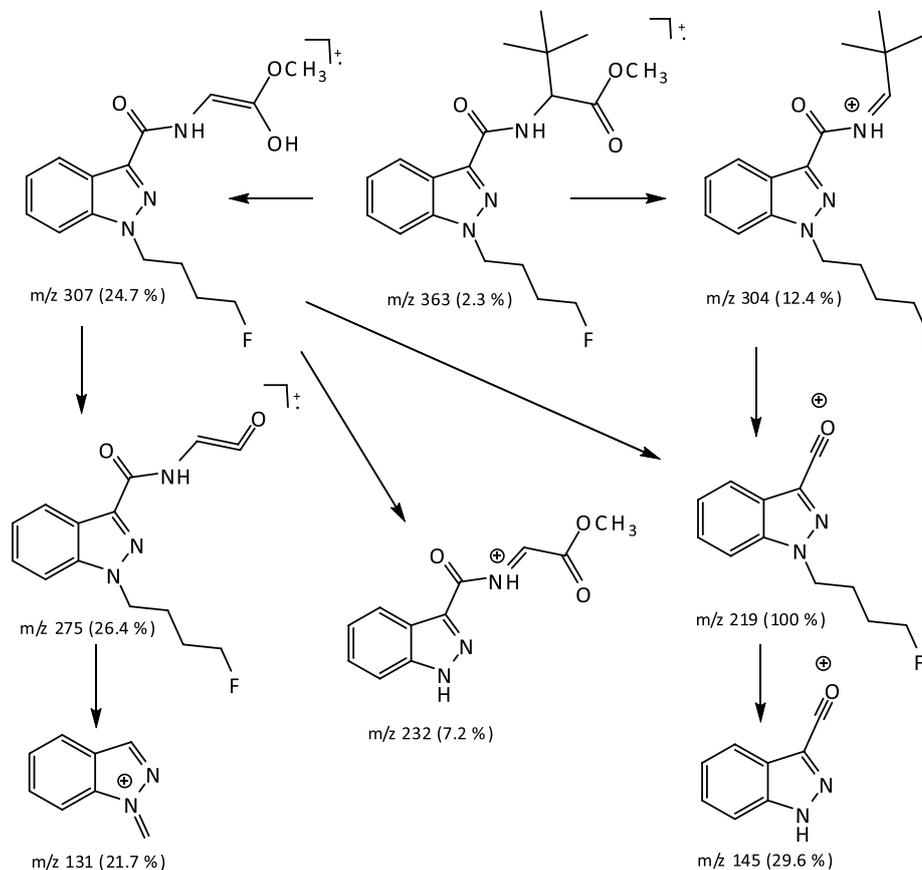


Рисунок 11 – Предполагаемая схема фрагментации MDMB(N)-073F.

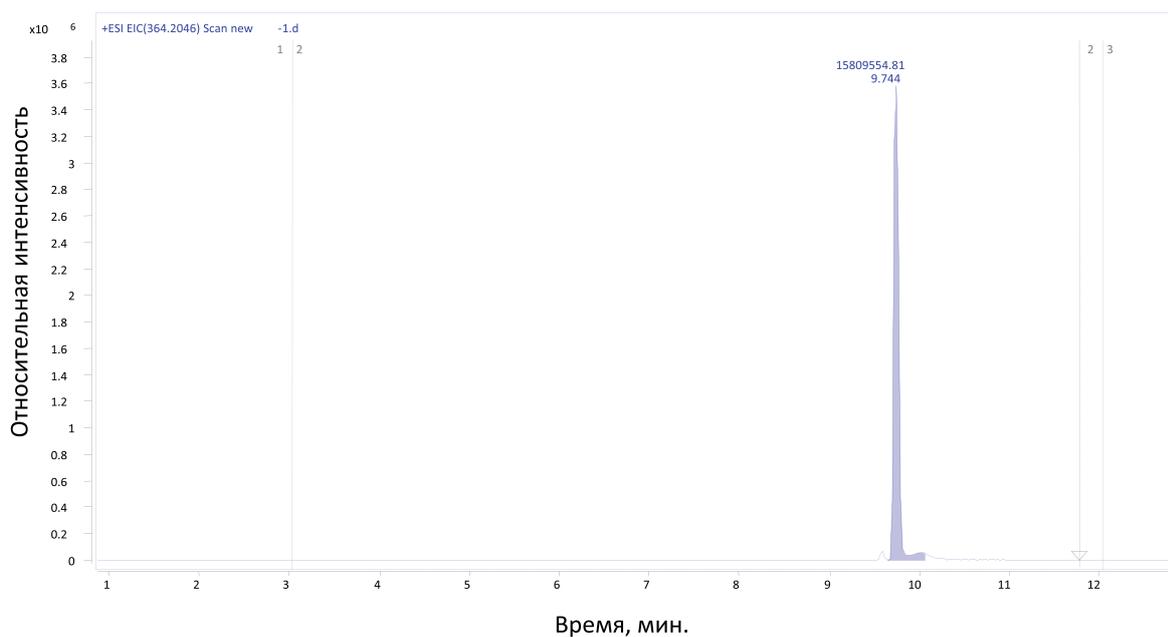


Рисунок 12 – Хроматограмма растительного объекта MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МСВР, m/z 364.203, диапазон отображения ± 5 mDa).

При ВЭЖХ-МС/МС исследовании MDMB(N)-073F, содержащегося в растительном объекте, были проанализированы данные по фрагментации основных ионов при учете точных масс. Полученные при анализе растительного объекта хроматограмма и спектр

MDMB(N)-073F приведены на рисунках 12 и 13, соответственно. В таблице 2 приведены теоретические и полученные экспериментальным путем точные массы протонированной молекулы и фрагментных ионов MDMB(N)-073F, а так же вычисленная ошибка.

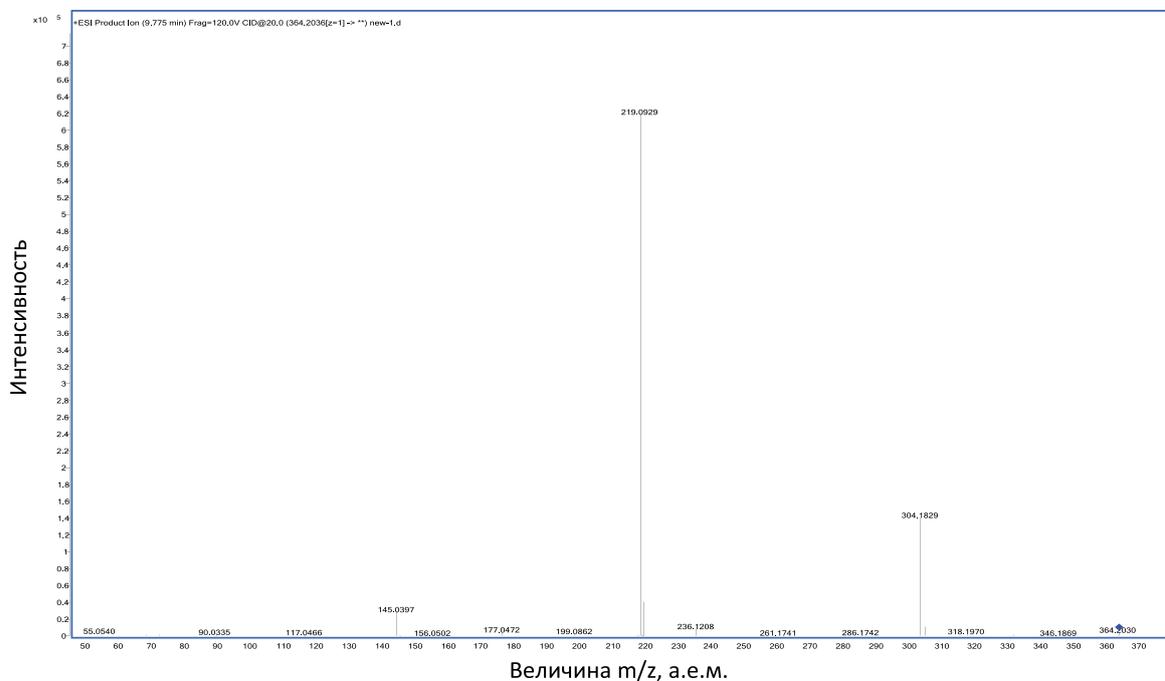


Рисунок 13 – Мс-мс спектр иона с m/z 364.203.

Как известно, в условиях ионизации положительным электрораспылением, в основном, образуются ионы, соответствующие протонированным молекулам исходного вещества. Для соединения со структурой MDMB(N)-073F, это должен быть ион с брут-

то-формулой $C_{19}H_{27}FN_3O_3$ и точной массой 364,2031 Da. Измеренная в ходе эксперимента точная молекулярная масса иона отличается от рассчитанной на 0,27 ppm, что доказывает правильность предположенной брутто-формулы.

Таблица 2 – Определение точных масс протонированной молекулы и фрагментных ионов MDMB(N)-073F.

Формула иона	Теоретическая масса, Da	Найденная масса, Da	Ошибка, ppm
$C_{19}H_{27}FN_3O_3$	364.2031	364.2030	0.27
$C_{17}H_{23}FN_3O$	304.1852	304.1829	7.56
$C_{12}H_{15}FN_3O$	236.1193	236.1208	6.35
$C_{12}H_{12}FN_2O$	219.0928	219.0929	0.46
$C_8H_5N_2O$	145.0396	145.0397	0.69
C_4H_7	55.0542	55.0540	3.63

Исследование мочи потребителя MDMB(N)-073F методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием регистрации множественных реакций (MRM) показало, что

помимо маркера, с мочой экскретируется его конъюгат с глюкуроновой кислотой. Хроматограммы приведены на рис. 14–17.

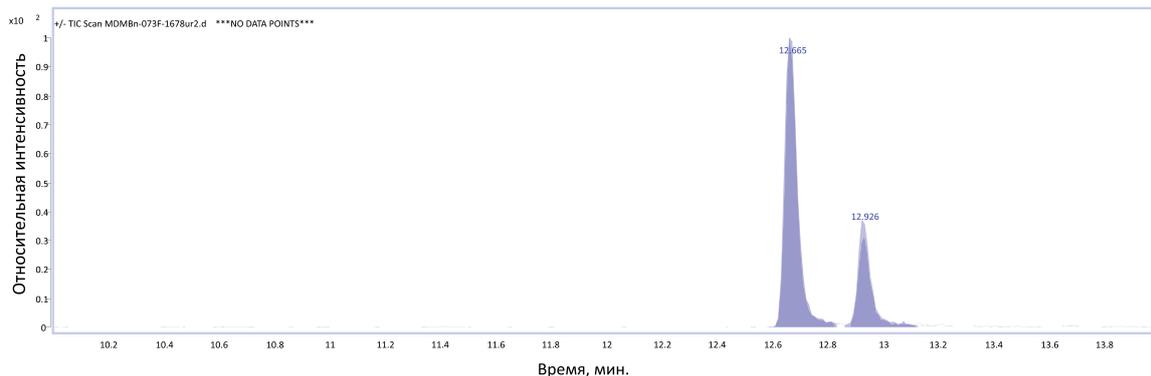


Рисунок 14 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС, общий ионный ток для MRM переходов 350.1 > 145.0 и 350.1 > 219.0). Времена удерживания маркера MDMB(N)-073F и его глюкуронида 12.926 и 12.665 мин., соответственно.

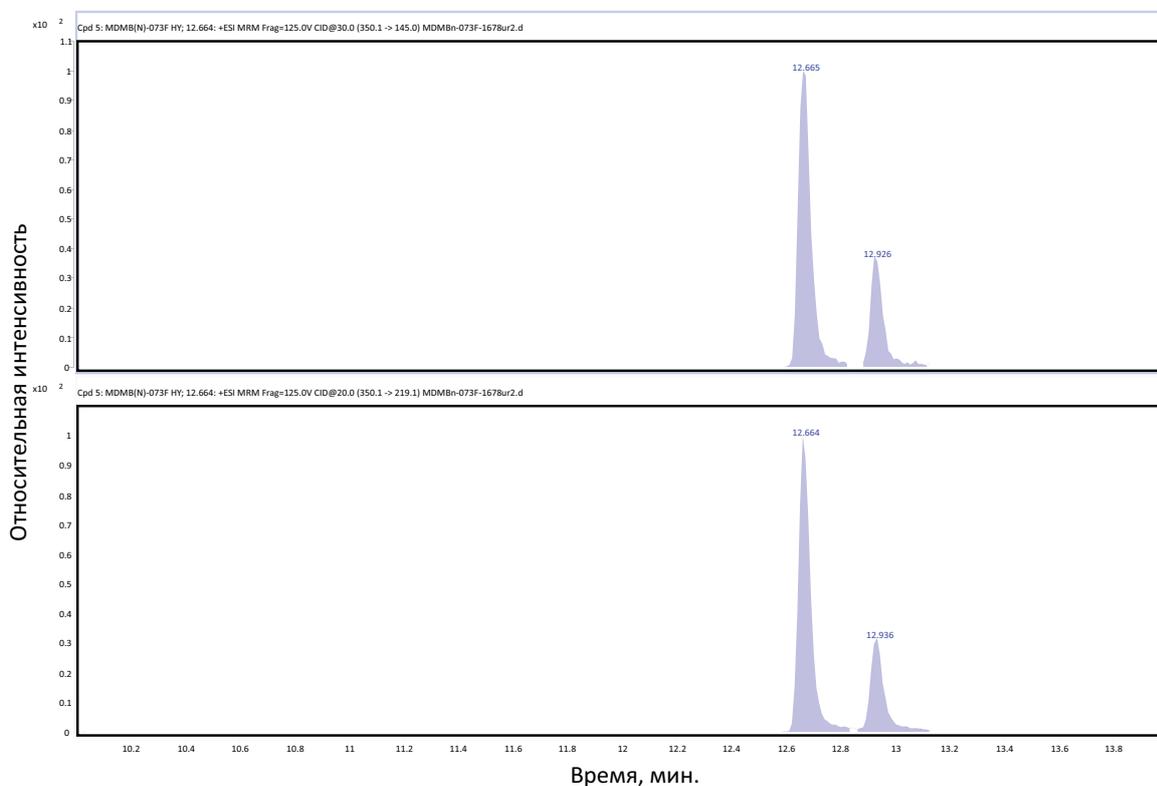


Рисунок 15 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС; MRM переходы: сверху 350.1 > 145.0, снизу 350.1 > 219.0).

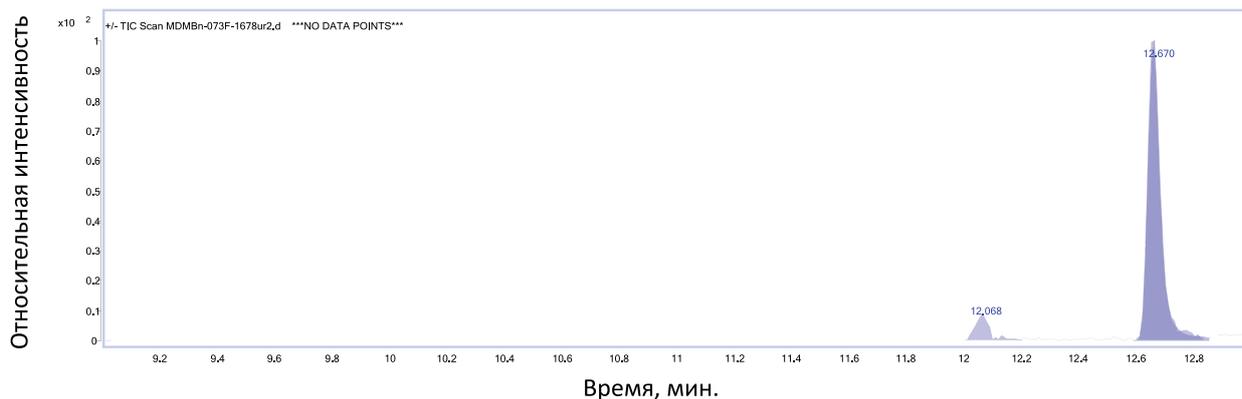


Рисунок 16 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС, общий ионный ток для MRM переходов 526.3 > 145.0 и 526.3 > 219.0). Время удерживания глюкуронида маркера MDMB(N)-073F 12,670 мин.

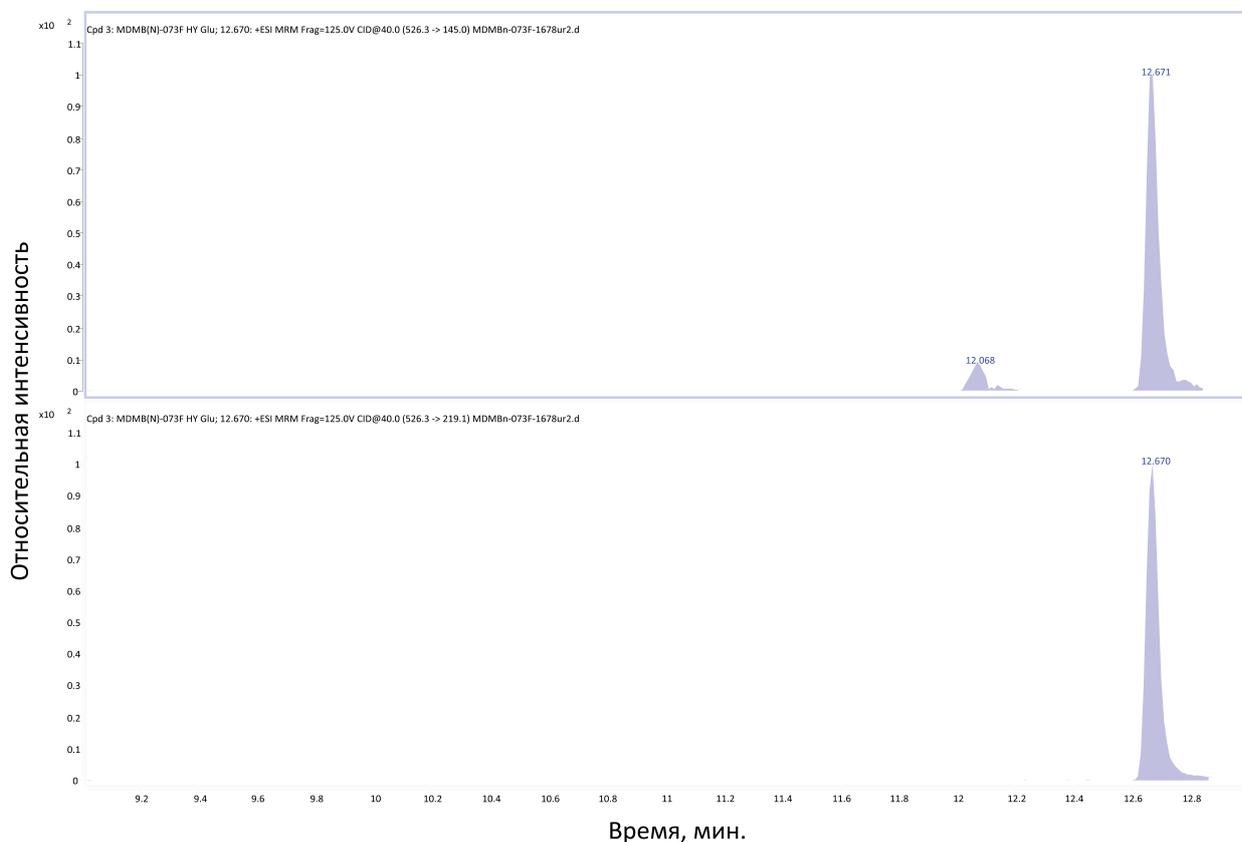


Рисунок 17 – Хроматограмма мочи потребителя MDMB(N)-073F (ВЭЖХ-МС/МС, MRM переходы: сверху 526.3 > 145.0, снизу 526.3 > 219.0).

Масс-спектр ионов-продуктов маркера MDMB(N)-073F с m/z 350 для протонированной молекулы подобен спектру неизмененного соединения (рис. 13), и в нем присутствуют ионы с m/z 219 и 145 (рис. 14, 15). Спектр ионов-продуктов глюкуронида маркера MDMB(N)-073F (m/z 526 для протонированной молекулы) также содержит эти ионы (рис. 16, 17), что позволяет использовать их при регистрации MRM переходов для обоих соединений.

Глюкуронид маркера MDMB(N)-073F является сложным эфиром. Это обуславливает его частичную фрагментацию в ионном источнике жидкостных масс-спектрометров при положительной ионизации [3]. Фрагментация глюкуронида в источнике, в основном, заключается в элиминировании остатка глюкуроновой кислоты. Образующийся ион с m/z 350 соответствует протонированной молекуле самого маркера MDMB(N)-073F. Нестабильность глюкуронида мар-

кера MDMB(N)-073F дает возможность использовать ион с m/z 350 в качестве прекурсора при обнаружении обоих соединений (рис. 14, 15). Представленные данные подтверждают, что значительная доля маркера MDMB(N)-073F находится в моче его потребителей в виде конъюгата с глюкуроновой кислотой.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования, проведенного методами газовой хроматографии с тандемной масс-спектрометрией и жидкостной хроматографии с гибридной квадруполь-времяпролетной масс-спектрометрией высокого разрешения, подтверждена структура соединения MDMB(N)-073F. Приведены масс-спектральные характеристики MDMB(N)-073F.

Установлено, что одним из направлений биотрансформации MDMB(N)-073F в организме человека является гидролиз сложноэфирной связи с последующей конъюгацией образующейся кислоты. Конъюгатом метаболита MDMB(N)-073F фазы I биотрансформации является продукт взаимодействия с глюкуроновой кислотой.

Метаболит, образующийся в результате гидролиза сложноэфирной связи, и его конъюгат с глюкуроновой кислотой рекомендованы в качестве маркеров употребления синтетического каннабимиметика MDMB(N)-073F при анализе хроматографическими методами; они могут быть использованы в систематическом аналитическом скрининге биологических образцов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Дворская, О.Н. Маркеры новых синтетических каннабимиметиков в моче / О.Н. Дворская, С.С. Катаев, А.Б. Мелентьев, Л.Н. Курдина // Наркология. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 55–65.
2. Мелентьев, А. Б. Дизайнерские наркотики. Метаболизм и подходы к анализу в биологических средах / А.Б. Мелентьев, С.С. Катаев, О.Н. Дворская. – Москва: Изд-во «Перо», 2016. – 326 с.
3. Заикина, О.Л. Особенности обнаружения глюкуронированных метаболитов синтетических каннабимиметиков методом ЖХ-МС/МС в моче / О.Л. Заикина, А.В. Кинд, И. Л. Гринштейн, А.М. Григорьев // Наркология. – 2015. – Т. 14, № 9. – С. 77–82.
4. Заикина, О.Л. Метаболиты фазы II синтетических каннабимиметиков в моче: нужна ли пробоподготовка? / О.Л. Заикина, А.М. Григорьев // Судебная медицина. – 2015. – Т. 1, № 2. – С. 66–67.
5. Лабутин, А.В., Темердашев А.З. Нецелевой скрининг маркеров синтетических каннабиноидов в моче методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / А.В. Лабутин, А.З. Темердашев // Масс-спектрометрия. – 2015. – Т. 12, № 1. – С. 30–38.
6. Катаев, С.С. Идентификация метаболитов каннабимиметика MDMB(N)-073F в моче методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием / С.С. Катаев, О.Н. Дворская, М.А. Гофенберг // Фармация и фармакология. 2019. – Т. 7, № 2. – С. 70–83. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-2-70-83э.
7. Haschimi, B. Detection of the recently emerged synthetic cannabinoid 4F-MDMB-BINACA in 'legal high' products and human urine specimens / B. Haschimi, L. Mogler, S. Halter, A. Giorgetti, B. Schwarze, F. Westphal, S. Fischmann, V. Auwärter // Drug Test Anal. – 2019. – Jun 22. doi: 10.1002/dta.2666.

АВТОРЫ

Катаев Сергей Сергеевич – заведующий судебно-химическим отделением ПКБСМЭ, кандидат химических наук ГКУЗОТ «Пермское краевое бюро судебно-медицинской экспертизы». ORCID 0000-0001-6742-2054. E-mail: forenschemist@narod.ru

Дворская Оксана Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры токсикологической химии, ФГБОУ ВО Пермская государственная фармацевтическая академия Министерства здравоохранения Российской Федерации. ORCID 0000-0003-4774-8887. E-mail: dvoksnik@gmail.com

Гофенберг Мария Александровна – заведующий химико-токсикологической лабораторией ГАУЗ СО

«ОНБ», провизор-аналитик химико-токсикологической лаборатории ГБУЗ СО «СОКПБ», ассистент кафедры фармации и химии ФГБОУ ВО УГМУ Минздрава России. ORCID: 0000-0003-2877-1301. E-mail: Hoffenberg@yandex.ru

Лабутин Андрей Валерьевич – химик-эксперт химико-токсикологической лаборатории ОГБУЗ «Томский Областной наркологический диспансер». ORCID 0000-0002-2719-1578. E-mail: lav877@rambler.ru

Мелентьев Алексей Борисович – заведующий судебно-химическим отделением ЧОБСМЭ, кандидат химических наук. ORCID 0000-0003-0470-1114. E-mail: melentjev-a@yandex.ru

УДК 576.308(343)



ВЛИЯНИЕ ЭКСТРАКТА ТЫКВЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*CUCURBITA PEPO L.*) И ЭКСТРАКТА БАРХАТЦЕВ РАСПРОСТЕРТЫХ (*TAGETES PATULA L.*) НА ФУНКЦИОНАЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ МИТОХОНДРИЙ ГИППОКАМПА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОСТРОГО ГИПОМЕТАБОЛИЗМА ГОЛОВНОГО МОЗГА

А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.Л. Аджиахметова, Н.М. Червонная,
К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.И. Шерешкова

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России
Россия, 357532, г. Пятигорск, пр. Калинина, д. 11

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Получено 09.07.2019

Рецензия (1) 31.07.2019

Рецензия (2) 08.08.2019

Принята к печати 15.08.2019

Цель исследования. Оценить влияние экстракта тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo L.*) и экстракта бархатцев распростертых (*Tagetes patula L.*) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

Материалы и методы. Работа выполнена на 50 крысах-самцах линии *Wistar*, которым моделировали острое гипометаболическое состояние путем введения 3М раствора натрия азида в гиппокамп ($n=40$ и $n=10$ – группа ложнопериоперированных животных). Исследуемые экстракты и препарат сравнения – EGb 761 вводили в дозе 100 мг/кг *per os*, профилактически на протяжении 10 дней. Через 24 часа после введения натрия азида осуществляли забор головного мозга, выделяли гиппокамп с получением супернатанта и определением в нем параметров митохондриального дыхания, интенсивности анаэробных процессов, концентрации апоптоз-индуцирующего фактора, эндонуклеазы G и β -амилоида.

Результаты исследования. В ходе исследования было установлено, что профилактическое введение изучаемых экстрактов тыквы и бархатцев способствовало восстановлению митохондриальной функции и снижению интенсивности анаэробных процессов. При этом в группах крыс, получавших экстракт тыквы и бархатцев, отмечено повышение концентрации АТФ в супернатанте гиппокампа относительно животных без фармакологической поддержки на 65,7% ($p<0,002$) и 66,2% ($p<0,002$); соответственно. Также при введении крысам экстрактов тыквы и бархатцев наблюдалось снижение концентрации апоптоз-индуцирующего фактора (на 33 % ($p<0,002$) и 38,3% ($p<0,002$) соответственно) и эндонуклеазы G (в 3,6 раза ($p<0,002$) и в 4,4 раза ($p<0,002$) соответственно). При применении исследуемых экстрактов тыквы и бархатцев отмечено снижение концентрации амилоидного β -пептида в гиппокампе крыс на 54,4% ($p<0,0002$) и 54,4% ($p<0,0002$) соответственно. При этом исследуемые экстракты обладали эквивалентной терапевтической эффективностью с препаратом сравнения.

Заключение. На основании полученных данных можно предположить перспективность дальнейшего изучения экстрактов тыквы и бархатцев как средств целенаправленной коррекции церебрального гипометаболизма.

Ключевые слова: растительные экстракты, гипометаболизм, гиппокамп, митохондрии

Для цитирования: А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.Л. Аджиахметова, Н.М. Червонная, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.И. Шерешкова. Влияние экстракта тыквы обыкновенной (*cucurbita pepo l.*) и экстракта бархатцев распростертых (*tagetes patula l.*) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4): 198-207. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-198-207

©А.В. Воронков, Д.И. Поздняков, С.Л. Аджиахметова, Н.М. Червонная, К.А. Мирошниченко, А.В. Сосновская, Е.И. Шерешкова, 2019

For citation: A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.L. Adzhiakhmetova, N.M. Chervonnaya, K.A. Miroshnichenko, A.V. Sosnovskaya, E.I. Chereschkova. Effect of pumpkin (*cucurbita pepo l.*) and marigold (*tagetes patula l.*) extracts on hippocampal mitochondria functional activity within conditions of experimental acute brain hypometabolism. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(4): 198-207. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-198-207

EFFECT OF PUMPKIN (*CUCURBITA PEPO L.*) AND MARIGOLD (*TAGETES PATULA L.*) EXTRACTS ON HIPPOCAMPAL MITOCHONDRIA FUNCTIONAL ACTIVITY WITHIN CONDITIONS OF EXPERIMENTAL ACUTE BRAIN HYPOMETABOLISM

A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.L. Adzhiakhmetova, N.M. Chervonnaya,
K.A. Miroshnichenko, A.V. Sosnovskaya, E.I. Cheresheva

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University
11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Received 9 July 2019

Review (1) 31 July 2019

Review (2) 8 August 2019

Accepted: 15 August 2019

The aim of the study is to evaluate the effect of pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) and marigold extracts (*Tagetes patula L.*) on the hippocampal mitochondria functional activity within the conditions of experimental acute brain hypometabolism.

Materials and methods. The work was performed on 50 male Wistar rats, which reproduced an acute brain hypometabolic state by administration of a 3M sodium azide solution in hippocampus ($n = 40$ and $n = 10$ – a group of sham-operated animals). The test extracts and the reference drug – EGb 761 – were prophylactically administered at the dose of 100 mg/kg *per os* for 10 days. 24 hours after the last administration, sodium azide was injected, the brain was taken, the hippocampus was isolated to obtain a supernatant and determine the parameters of mitochondrial respiration, the intensity of anaerobic processes, the concentration of the apoptosis-inducing factor, endonuclease G, and β -amyloid.

Results. The carried out study established that the prophylactic administration of pumpkin and marigold extracts contributed to the restoration of a mitochondrial function and a decrease in the intensity of anaerobic processes. In the group of the rats treated with pumpkin and marigold extracts, an increase of ATP concentration in the hippocampal supernatant by 65.7% ($p < 0.002$) was observed; it was 66.2% ($p < 0.002$) relative to the animals deprived of pharmacological support. When the rats were treated with pumpkin and marigold extracts, a decrease in the concentration of apoptosis-inducing factor (by 33% ($p < 0.002$) and 38.3% ($p < 0.002$), respectively) and endonuclease G (by 3.6 times ($p < 0.002$) and 4.4 times ($p < 0.002$), respectively) was also noted. The administration of pumpkin and marigold extracts reduced the amyloid β -peptide concentration in the rats' hippocampus by 54.4% ($p < 0.0002$) and 54.4% ($p < 0.0002$), respectively. The test-extracts had an equivalent therapeutic efficacy with the reference drug.

Conclusion On the basis of the obtained data, it is possible to suggest the prospect of a further study of pumpkin and marigold extracts as the drugs of a targeted correction of cerebral hypometabolism.

Keywords: plant extracts, hypometabolism, hippocampus, mitochondria

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Альцгеймера (БА) является прогрессирующим нейродегенеративным заболеванием на долю которого приходится 50–70% случаев деменции, что составляет более 12 млн. человек [1]. Как правило клинические проявления БА отмечаются на поздних этапах заболевания и ассоциируются с отложением в структурах головного мозга цитотоксического β -амилоида [2]. Амилоидный β -пептид образуется в результате протеолиза трансмембранного белка – белка предшественника амилоида (APP) при участии ферментов группы секретаз. На сегодняшний день установлено, что накопление β -амилоида является одним из наиболее достоверных и ранних признаков необратимой нейродегенерации [3]. В процессах деградации нейронов различные изоформы β -амилоида, которые образуют два типа цитотоксичных конгломератов: агрегаты, не стабилизированные ионами металлов (как правило, растворимы в воде и имеют незначительный цитотоксический потенциал

и ассоциаты, в которых присутствуют двухвалентные ионы металлов (данные конгломераты образуют ковалентно сшитые олигомеры, которые затем откладываются в цитоплазме нейронов (преимущественно гиппокампа) в виде амилоидных бляшек) [4]. Избыток амилоидного β -пептида в клетках головного мозга приводит к необратимому фосфорилированию тау-протеина, в результате чего увеличивается продукция 4-гидроксинонана – мембранотоксичного альдегида, который в свою очередь инициирует окислительные процессы в нейрональных мембранах, сопровождающихся ухудшением функции ион-транспортных АТФаз, транспортеров глюкозы и глутамата [5]. В итоге описанные процессы приводят к ухудшению синаптической передачи и прогрессированию БА.

Исследователями *Del Prete D, et al., 2017* установлено, что белок предшественник амилоидного β -пептида может локализоваться на мембранах митохондрий, кроме того на митохондриальных мем-

бранах обнаруживается секретазный комплекс, преимущественно представленный γ -секретазой, что в свою очередь обеспечивает быстрый синтез β -амилоида из его предшественника [6]. При этом в ряде работ отмечается, что митохондриальный β -амилоид, может играть решающую роль в патологическом каскаде, приводящим к ранней гибели нейронов при БА. Так исследование *Lustbader J. W. et al., 2004*. показало, что имеется прямая связь между митохондриальной дисфункцией и гипометаболическим состоянием головного мозга с одной стороны и увеличением цитотоксичности β -амилоида с другой [7]. В дальнейшем *Chen X. et al. 2006* установили, что в условиях БА возникающий при увеличении концентрации амилоидного β -пептида гипометаболизм головного мозга связан со сбоем реакций электронного транспорта в митохондриальной дыхательной цепи, активацией анаэробных окислительных процессов и интенсификацией внутреннего пути апоптоза (эфektor – эндонуклеаза G) [8]. Однако, следует отметить, что активация митохондриального γ -секретазой комплекса отмечается только при снижении интенсивности метаболических реакций – гипометаболического состояния [9]. Таким образом, можно предположить, что целенаправленная фармакологическая коррекция церебрального гипометаболизма может являться перспективным методом раннего лечения БА. В связи с этим **ЦЕЛЬЮ** данного исследования являлась оценка влияния экстракта тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.) и экстракта бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Экспериментальные животные

В эксперименте использовались 50 крыс-самцов линии Wistar (половозрелые с массой тела 220–240 г.), полученные из питомника лабораторных животных «Рапполово» (д. Рапполово, Ленинградская обл.). На время проведения исследования крысы содержались в стандартных условиях вивария при температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$, относительной влажности $60 \pm 5\%$ и естественной смене суточного цикла. Животные размещались по 10 особей в макролоновых клетках, где в качестве подстилочного материала применяли гранулированную бумажную фракцию. Экструдированный корм и воду водопроводную крысы получали *ad libitum*. Содержание и манипуляции, проводимые с животными, соответствовали общепринятым этическим нормам экспериментальной работы (Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986 г.)).

Исследуемые объекты

Дизайн эксперимента

В качестве изучаемых объектов в данной работе выступали густой экстракт тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.) и густой экстракт бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.). Соцветия бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) сорта «Carmen» были собраны в ботаническом саду Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Плоды тыквы (*Cucurbita pepo* L.) сорта «Атлант среднепоздний» собраны на территории Ставропольского края Александровского района. Образцы сырья для исследования были заготовлены в период с июня по сентябрь 2016–2018 гг. В качестве сырья использовали свежие плоды тыквы и соцветия бархатцев, высушенные воздушно-теневым способом.

Препаратом сравнения служил EGb761 (стандартизованный экстракт гинкго билоба производства *Hunan Warrant Pharmaceuticals.*, КНР). Референтный препарат вводили *per os* в дозе 100 мг/кг [10] на протяжении 10 дней до оперативного вмешательства. Исследуемые объекты вводили аналогично препарату сравнения (профилактически, 10 дней в дозе 100 мг/кг). В ходе эксперимента были сформированы следующие экспериментальные группы животных: ложнооперированные крысы (ЛО, $n=10$); группа крыс негативного контроля, лишенная фармакологической поддержки (НК, $n=10$); группы животных, получавшие препарат сравнения и исследуемые соединения ($n=10$ каждая экспериментальная группа). Дизайн исследования представлен на рисунке 1.

Экспериментальная модель

гипометаболизма головного мозга

Церебральный гипометаболизм моделировали путем интрагиппокампального введения 3М раствора натрия азида, для чего животных наркотизировали (хлоралгидрат 350 мг/кг интраперитонеально), голову крыс фиксировали, удаляли шерстяной покров и скальпировали черепную коробку. Далее в левом и правом полушариях бором проделывали отверстия диаметром 1 мм со стереотаксическими координатами P: -3.0 ; ML: ± 3.0 , V: -3.0 (от Bregma), что соответствовало дорсальной части гиппокампа [11]. Затем иглу 30G медленно вводили в трепанационное отверстие на глубину 1,5 мм и осуществляли введение 3М раствора натрия азида (pH=7,4) в объеме 0,5 мкл, чередуя правое и левое полушария (всего было произведено 4 инъекции). Иглу вынимали по истечении 30 сек. с момента введения. Рану ушивали, шов обрабатывали 5% раствором йода. Забор биоматериала осуществляли через 24 часа после операции [12].

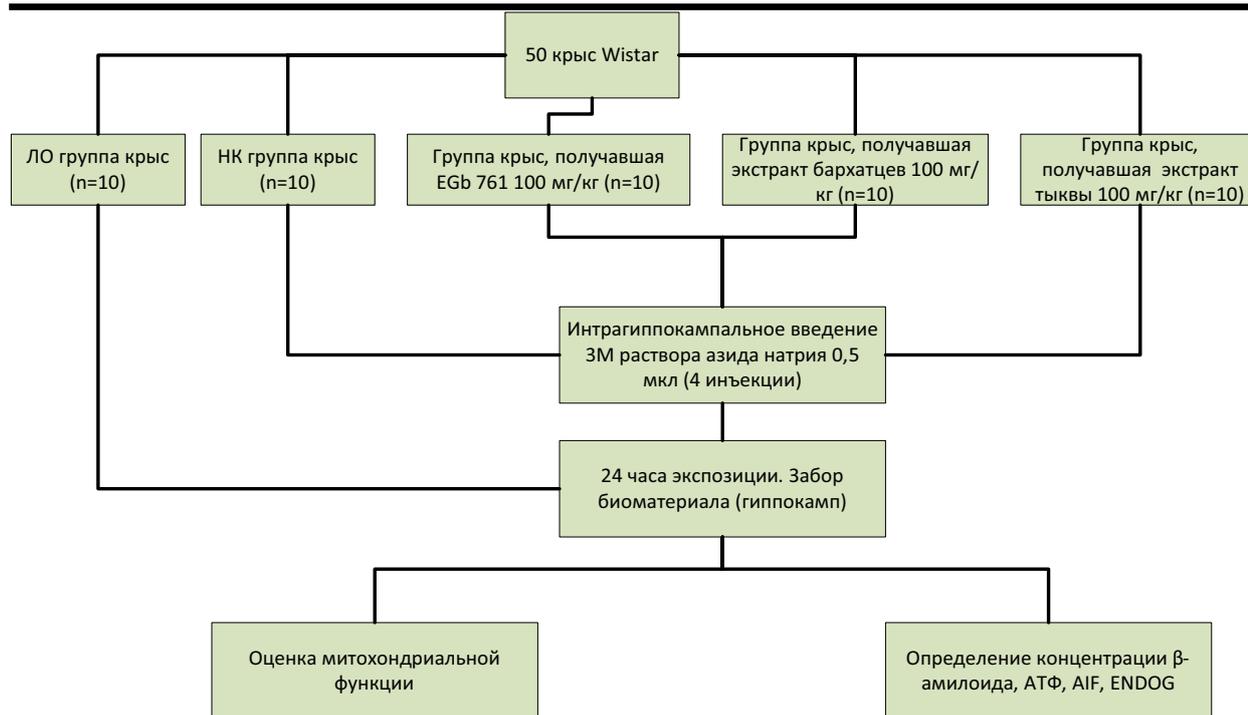


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента.

Примечание: ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа животных негативного контроля; АТФ – аденозинтрифосфат; АИФ – апоптоз-индуцирующий фактор; ENDOG – эндонуклеаза G.

Забор и подготовка биоматериала

В качестве биоматериала в работе использовали гиппокамп крыс. Извлечение гиппокампа проводили согласно стандартной процедуре. Далее гиппокамп делили на 2 части: первую гомогенизировали в среде: 1 ммоль ЭДТА+ 215 ммоль маннита+ 75 ммоль сахарозы+ 0,1% раствор БСА (бычий сывороточный альбумин)+ 20 ммоль HEPES (pH 7,2), с последующим двукратным центрифугированием в режимах: 1,400 g → 3 мин. при 4°C (удаляется супернатант) и 13000g → 10 мин. Полученный вторичный супернатант удаляли для проведения респирометрического анализа. Вторую часть гиппокампа гомогенизировали в PBS с pH 7,4 в соотношении 1:7 и центрифугировали в режиме 10000g → 5 мин, затем образовавшийся супернатант брали на ИФА-исследование.

Респирометрический анализ

В работе использовался ранее описанный подход к оценке респирометрической функций митохондрий. Исследование выполнено по протоколу SEAHORSE на лабораторном респирометре АКПМ-01Л (Альфа-Бассенс, РФ). В ходе анализа оценивали изменение потребления кислорода в среде, содержащей нативные митохондрии, на фоне введения разобщителей митохондриального дыхания: олигомицин 1 мкг/мл; 4 – (трифлуорометокси)фенилгидразоно)малонитрил (FCCP – 1 мМ); ротенон – 1 мМ; натрия азид – 20 ммоль. Субстратом окисления

при изучении интенсивности анаэробных процессов служила глюкоза (15 ммоль). При этом рассчитывали следующие показатели, характеризующие дыхательную функцию митохондрий: АТФ-генерирующую способность; максимальный уровень дыхания, респираторную емкость. Также определяли интенсивность гликолиза, гликолитическую емкость и гликолитический резерв [13].

ИФА-исследование

В работе использовали стандартные наборы ИФА реактивов производства компании *Cloud clone* (США). При проведении исследования оценивали изменение следующих параметров: концентрация β-амилоида, апоптоз-индуцирующего фактора (АИФ), эндонуклеазы G (ENDOG) и АТФ. Ход анализа соответствовал рекомендациям производителя (инструкция с протоколом анализа прилагалась к каждому набору). Считывание результатов осуществляли на микропланшетном ИФА-ридере *Infinite F50* (Tecan, Австрия).

Методы статистического анализа

Статистическую обработку полученных результатов производили в прикладном программном пакете STATISTICA 6.0 (StatSoft, США). Данные выражали в виде M±SEM. Сравнение групп средних осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа с апостериорным критерием Ньюмена-Кейсла.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение концентрации β -амилоида в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга**

В ходе данного блока работы было установлено, что концентрация β -амилоида (рис. 2) у ЛО группы крыс составляла $9,46 \pm 0,09$ пг/мл. В то же время у НК группы животных в условиях экспериментального церебрального гипометаболизма

отмечено повышение концентрации амилоидного β -пептида в сравнении с ЛО группой животных в 9 раз ($p < 0,0001$). Применение EGb761 способствовало снижению содержания цитотоксичного β -амилоида в гиппокампе крыс по отношению к НК группе животных на 54,4% ($p < 0,0002$). На фоне введения исследуемого экстракта тыквы и экстракта бархатцев концентрация β -амилоида уменьшилась по отношению к НК группе животных на 54,4% ($p < 0,0002$) и 49% ($p < 0,0002$) соответственно (рис. 2).

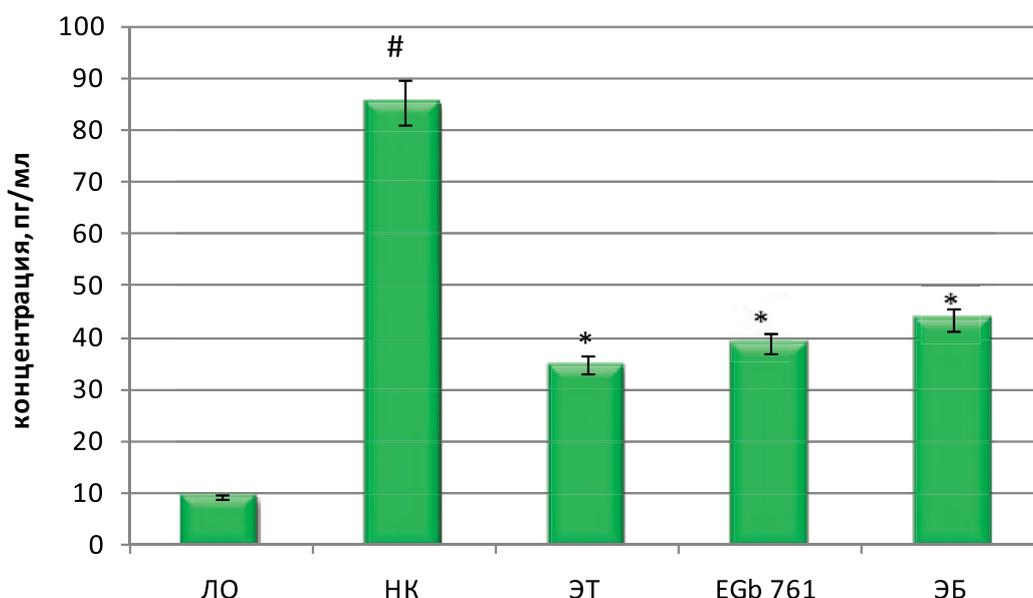


Рисунок 2 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение концентрации β -амилоида в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

Примечание. ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,0001$); * – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,0002$).

Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение респирометрической функций митохондрий гиппокампа крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга

При оценке влияния исследуемых экстрактов и EGb 761 на изменение респирометрической функции митохондрий гиппокампа установлено, что у животных НК в условиях экспериментального гипометаболизма головного мозга в сравнении с ЛО группой крыс отмечено снижение АТФ-генерирующей способности

в 10,8 раза ($p < 0,0001$), максимального уровня дыхания в 19,4 ($p < 0,0001$) раза и респираторной емкости в 9,9 раза ($p < 0,0001$) (рис. 3). При этом у животных, лишенных фармакологической поддержки, по отношению к ЛО группе крыс интенсивность гликолиза увеличилась в 8,5 раз ($p < 0,0001$), а гликолитическая емкость и гликолитический резерв уменьшились в 5,8 раза ($p < 0,0001$) и 6,1 раза ($p < 0,0001$) соответственно (рис.4). В итоге концентрация АТФ в супернатанте гиппокампа крыс НК группы снизилась в 2,2 раза ($p < 0,0001$) относительно ЛО группы крыс (рис. 5).

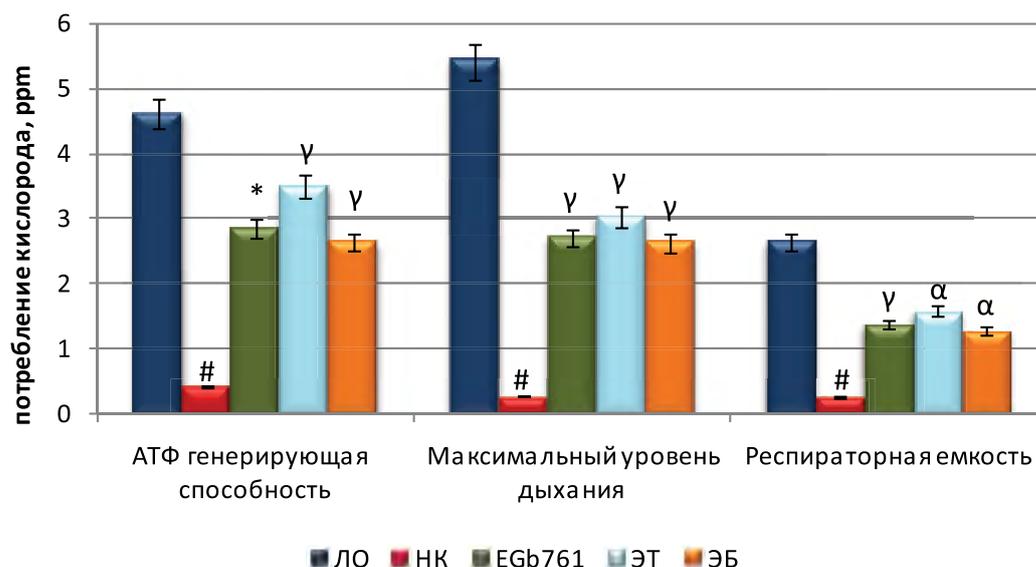


Рисунок 3 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение митохондриального дыхания в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

Примечание. ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,0001$); статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла* – $p < 0,02$; γ – $p < 0,001$; α – $p < 0,004$)

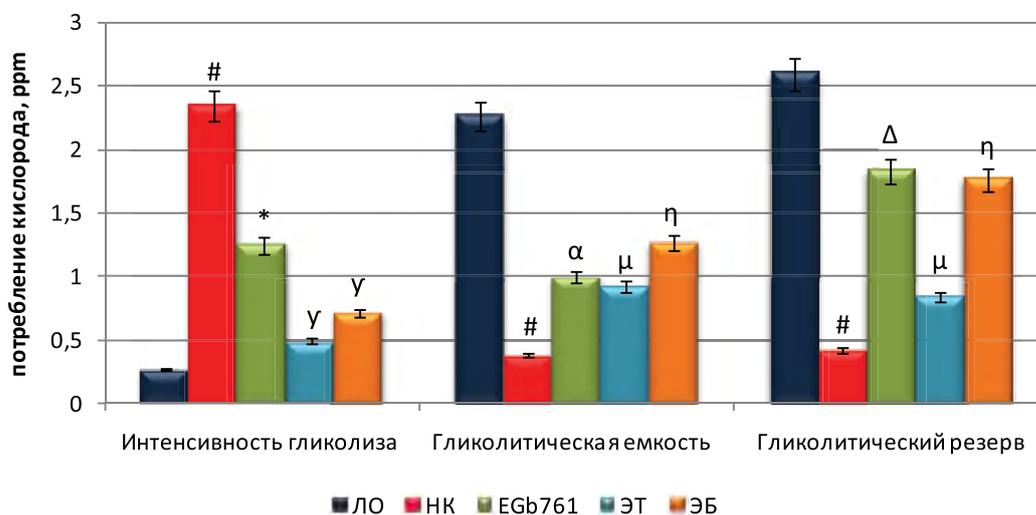


Рисунок 4 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение активности анаэробных процессов в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

Примечание. ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,0001$); * – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, * – $p < 0,005$; γ – $p < 0,002$; α – $p < 0,007$; Δ – $p < 0,03$; μ – $p < 0,01$; η – $p < 0,004$)

На фоне введения крысам EGb 761 наблюдалось увеличение (относительно НК группы животных) АТФ-генерирующей способности (рис.3) – в 6,7 раза ($p < 0,002$), максимального уровня дыхания – в 9,7 раза ($p < 0,001$) и респираторной емкости – в 5,1 раза ($p < 0,001$). Также у крыс, получавших EGb 761, отмечено повышение гликолитической емкости и гликолитического резерва (рис. 4) в сравнении с аналогичными показателями НК группы животных в 2,6 раза ($p < 0,007$) и 4,3 раза ($p < 0,03$) соответственно, при этом интенсивность гликолиза уменьшилась в 1,9 раза ($p < 0,005$). Кроме того, концентрация АТФ у животных, которым вводили EGb 761 была на 65,7% ($p < 0,002$) выше таковой у крыс без фармакологической коррекции.

У животных, получавших экстракт тыквы, отно-

сительно НК группы крыс наблюдалось увеличение АТФ-генерирующей способности – в 8,2 раза ($p < 0,001$); максимального уровня дыхания – в 10,9 раза ($p < 0,001$) и респираторной емкости – в 5,9 раза ($p < 0,004$) (рис. 3). В тоже время интенсивность гликолиза у животных, которым вводили экстракт тыквы была в 4,7 раза ($p < 0,002$) меньше таковой у НК группы крыс, при этом гликолитическая емкость и гликолитический резерв (рис. 4) у животных, получавших исследуемый экстракт тыквы, увеличилась в сравнении с крысами, лишенными фармакологической поддержки в 2,4 раза ($p < 0,01$) и 2 раза ($p < 0,004$) соответственно. Также введение животным экстракта тыквы способствовало увеличению содержания АТФ (рис. 5) в гиппокампе на 66,2% ($p < 0,002$) по отношению к НК группе крыс.

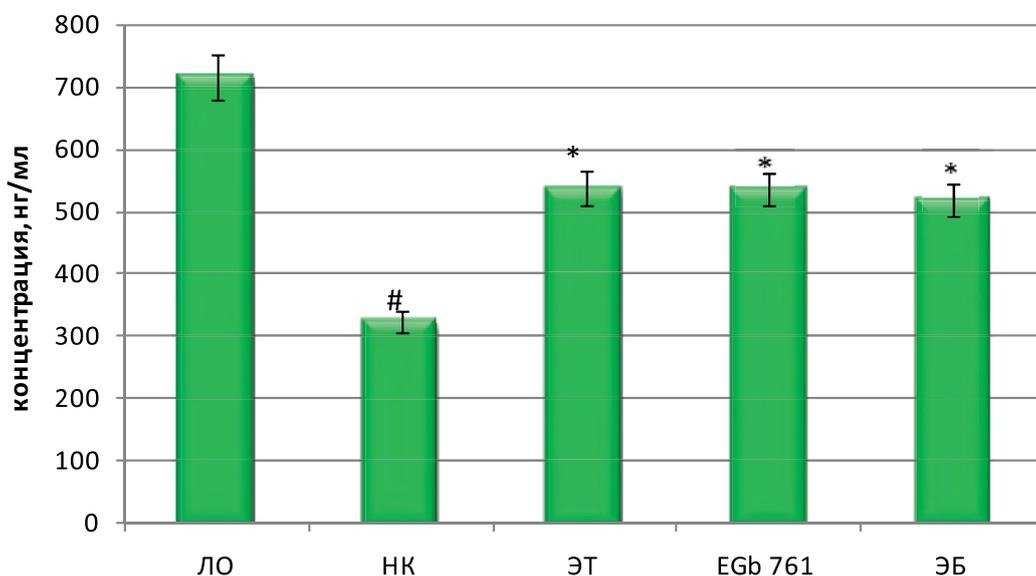


Рисунок 5 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение концентрации АТФ в гиппокампе крыс в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга.

*Примечание. ЛО – ложнооперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла $p < 0,0001$); * – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,002$)*

При применении экстракта бархатцев у животных отмечено увеличение (относительно НК группы крыс) АТФ-генерирующей способности, максимального уровня дыхания и респираторной емкости (рис. 3) в 6,2 раза ($p < 0,001$); 9,4 ($p < 0,001$) и 4,7 раза ($p < 0,004$) соответственно. Кроме того, интенсивность гликолиза у животных, получавших экстракт бархатцев была в 3,3 раза ($p < 0,002$) ниже таковой у НК группы крыс, при этом гликолитическая емкость и гликолитический резерв (рис.4) у животных, которым вводили экстракт бархатцев увеличились в сравнении с крысами, лишенными фармакологической поддержки в 3,3 ($p < 0,01$) и 4,2 раза ($p < 0,004$) соответственно. В итоге концентрация АТФ в гиппокампе

животных, получавших экстракт бархатцев, на 60,7% ($p < 0,002$) превосходила аналогичный показатель НК группы крыс (рис.5).

Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение активности внутреннего пути апоптоза в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга

В ходе проведения данного блока исследования установлено, что концентрация AIF и ENDOG у животных НК группы превосходила аналогичные значения ЛО группы крыс в 3 ($p < 0,0001$) и 21,7 раза ($p < 0,002$) соответственно (табл.1). В тоже вре-

мя у животных, получавших EGb 761, наблюдалось снижение концентрации AIF – на 36,8% ($p < 0,002$) и ENDOG – в 2,7 раза ($p < 0,0001$) по сравнению с группой крыс, лишенных фармакологической поддержки (табл.1). На фоне применения исследуемого экстракта тыквы у животных отмечено уменьшение (по отношению к НК группе крыс) содержания AIF и ENDOG в гиппокампе на 33% ($p < 0,002$) и в 3,6 раза

($p < 0,002$) соответственно. Также снижение концентрации проапоптотических маркеров внутреннего пути апоптоза наблюдалось при применении экстракта бархатцев. Так у животных, которым вводили изучаемый экстракт бархатцев, концентрация AIF и ENDOG была ниже аналогичных параметров НК группы крыс на 38,3% ($p < 0,002$) и в 4,4 раза ($p < 0,002$) соответственно (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние исследуемых объектов и препарата сравнения на изменение активности внутреннего пути апоптоза в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга

Группа	ЛО	НК	EGb761	ЭТ	ЭБ
AIF, нг/мл	6,16±0,413	18,69±0,04#	11,81±0,043*	12,61±0,426*	11,54±0,446*
ENDOG, нг/мл	72,03±1,069	1564,42±63,59#	578,41±60,45*	433,09±42,41*	352,35±10,796*

Примечание. AIF – апоптоз-индуцирующий фактор; ENDOG – эндонуклеаза G; ЛО – ложнопериоперированная группа крыс; НК – группа крыс негативного контроля; ЭТ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт тыквы; ЭБ – группа крыс, получавшая исследуемый экстракт бархатцев; EGb 761 – группа крыс, получавшая EGb 761; # – статистически значимо относительно ЛО группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,0001$); * – статистически значимо относительно НК группы животных (критерий Ньюмена-Кейсла, $p < 0,0002$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время установлено, что церебральный гипометаболизм является одним из предрасполагающих факторов развития БА. В экспериментальной работе Riha *et al.*, 2008 приводятся данные, что гипометаболизм задней поясной коры способствует отложению в данной структуре мозга токсичного амилоидного β -пептида, в результате чего у животных наблюдались характерные клинические проявления БА: снижение когнитивных функций, активация перекисного окисления липидов и снижение плотности синаптической передачи [14]. Данное исследование было дополнено Scheltens *et al.*, 2018, где было доказано, что помимо ухудшения памяти и сопряженных с ней функций головного мозга снижение интенсивности метаболических процессов способствует развитию неврологической симптоматики, моторной и сенсорной арефлексии [15]. Гипометаболизм головного мозга во многом связан с ухудшением клеточных биоэнергетических процессов, зависящих от функциональной активности митохондрий [16]. Исследования с использованием *in vitro* и *in vivo* подходов продемонстрировали, что снижение митохондриальной функции наблюдается до развития глубоких структурных изменений головного мозга, характерных для патологии Альцгеймера, и включают снижение митохондриального дыхания, экспрессии и активности метаболических ферментов, увеличение окислительного стресса и экспрессии проапоптотического сигнала [17]. При этом активация апоптотического каскада происходит в основном за счет увеличения интенсивности реакций внутреннего пути апоптоза (зависящий от митохондрий) с повышенным релизингом апоптоз-индуцирующего фактора и активацией эндонуклеазы G [18]. Индукция апоптоза в условиях развившейся патологии усиливает цитотоксичность β -амилоида, что ускоряет гибель нейронов и соответственно ухудшает течение заболеваний [19]. Ранее было установлено, что у по-

рядка 90% пациентов с БА отмечают явления гипометаболизма гиппокампа, при этом клинические симптомы БА сильно варьировались: от незначительных неврологических нарушений до диффузного когнитивного дефицита, сопровождаемого моторными флуктуациями и потерей сенсорного восприятия [20]. Кроме того, лица с церебральным гипометаболизмом, как правило, являются β -амилоид-позитивными пациентами, прогноз течения заболевания у которых наиболее неблагоприятный [21].

В связи с этим можно предположить, что коррекция гиппокампального гипометаболизма, может являться перспективным подходом к превентивной фармакотерапии БА, что частично было подтверждено в работе Villain *et al.*, 2008 [22]. Однако, несмотря на вероятную целесообразность ранней коррекции метаболических нарушений, при условии своевременной их диагностики, существующие в настоящее время, средства лечения БА, направлены на снижение цитотоксичности β -амилоида, а спектр соединений, применение которых способно восстановить метаболическую активность клеток, достаточно ограничен [23]. Кроме того, разрабатываемые средства целенаправленной коррекции БА зачастую обладают неблагоприятным токсикологическим профилем использования. Примером подобного средства может служить семагестат – ингибитор γ -секретазы, потенциально эффективный препарат для лечения БА, снижающий токсичность β -амилоида, обладающий, однако, высоким онкогенным потенциалом, в силу чего дальнейшее его изучение было остановлено [24].

В этой связи было проведено исследование посвященное изучению влияния экстракта тыквы обыкновенной (*Cucurbita pepo* L.) и экстракта бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) на функциональную активность митохондрий гиппокампа в условиях экспериментального острого гипометаболизма головного мозга. Так в ходе исследования было установлено, что профилактическое введение изучаемых

экстрактов тыквы и бархатцев способствовало восстановлению митохондриальной функции и снижению интенсивности анаэробных процессов в равной степени с препаратом сравнения – стандартизованным экстрактом гинкго билоба EGb 761. При этом в группах крыс, получавших экстракт тыквы бархатцев и EGb 761, отмечено повышение концентрации АТФ в супернатанте гиппокампа по сравнению с аналогичным показателем группы крыс, лишенных фармакологической поддержки на 65,7% ($p < 0,002$); 66,2% ($p < 0,002$); и 60,7% ($p < 0,002$) соответственно, что может свидетельствовать о нормализации биоэнергетических процессов в гиппокампе в условиях острого церебрального гипометаболизма при применении изучаемых экстрактов и препарата сравнения [25]. Кроме того, восстановление оптимального синтеза АТФ, может препятствовать дестабилизации митохондриальных мембран, что предотвращает их распад и высвобождение АИФ, угнетая тем самым внутренний апоптотический каскад реакций [26], что также было установлено в ходе данного исследования. Так при введении животным экстрактов тыквы и бархатцев наблюдалось снижение концентрации АИФ (на 33 % ($p < 0,002$) и 38,3% ($p < 0,002$) соответственно) и ENDOG (в 3,6 раза ($p < 0,002$) и в 4,4 раза ($p < 0,002$) соответ-

ственно). Также на фоне применения исследуемых экстрактов и EGb 761 отмечено снижение концентрации амилоидного β -пептида в гиппокампе крыс на 54,4% ($p < 0,0002$); 54,4% ($p < 0,0002$) и 49% ($p < 0,0002$) соответственно, что в совокупности со снижением интенсивности апоптоза может предотвращать нейрональную деструкцию [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных данных можно предполагать, что профилактическое введение экстракта тыквы и экстракта бархатцев способствует нормализации биоэнергетических процессов, снижению концентрации проапоптотических маркеров и β -амилоида в гиппокампе крыс в условиях острого гипометаболизма, вызванного интрагиппокампальным введением 3М раствора натрия азида. При этом исследуемые экстракты проявляли эквивалентную терапевтическую эффективность с референтным препаратом – стандартизованным экстрактом гинкго билоба (EGb 761), что делает данные экстракты перспективными объектами для дальнейшего изучения с целью создания средств целенаправленной коррекции БА на раннем гипометаболическом этапе течения заболевания.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность доценту кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов ПМФИ-филиала ВолгГМУ Серебряной Ф.К. за помощь в определении подлинности растительного сырья.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Gao C., Chang P., Yang L. Neuroprotective effects of hydrogen sulfide on sodium azide-induced oxidative stress in PC12 cells. // *Int J Mol Med.* – 2018. – Т. 41, №1. – С. 242–250. doi:10.3892/ijmm.2017.3227
- Takahashi R.H., Nagao T., Gouras G.K. Plaque formation and the intraneuronal accumulation of β -amyloid in Alzheimer's disease // *Pathol Int.* – 2017. – №67. – С. 185–193. doi: 10.1111/pin.12520.
- Chen G.F., Xu T.H., Yan Y. Amyloid beta: structure, biology and structure-based therapeutic development // *Acta Pharmacol Sin.* – 2017. – Т. 38, №9. – С. 1205–1235. doi:10.1038/aps.2017.28
- Lesné S.E., Sherman M.A., Grant M. Brain amyloid- β oligomers in ageing and Alzheimer's disease // *Brain.* – 2013. – Т. 136, ч. 5. – С. 1383–1398. doi:10.1093/brain/awt062
- Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease // *Nature.* – 2004. – Т. 430, №7000. – С. 631–639. doi:10.1038/nature02621.
- Del Prete D., Suski J.M., Oulès B. Localization and Processing of the Amyloid- β Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes // *J Alzheimers Dis.* – 2017. – Т. 55, №4. – С. 1549–1570. doi:10.3233/JAD-160953
- Lustbader J.W., Cirilli M., Lin C., Xu H.W., Takuma K., Wang N., Caspersen C., Chen X., Pollak S., Chaney M., et al. Abad directly links a beta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease // *Science.* – 2004. – № 304. – С. 448–452. doi: 10.1126/science.1091230.
- Chen X., Yan S.D. Mitochondrial abeta: A potential cause of metabolic dysfunction in Alzheimer's disease // *IUBMB Life.* – 2006. – №58. – С. 686–694. doi: 10.1080/15216540601047767.
- De Strooper B., Iwatsubo T., Wolfe M.S. Presenilins and γ -secretase: structure, function, and role in Alzheimer Disease // *Cold Spring Harb Perspect Med.* – 2012. – Т. 2, №1. – С. a006304. doi:10.1101/cshperspect.a006304
- Zhao Y., Zhang Y., Pan F. The effects of EGb761 on lipopolysaccharide-induced depressive-like behaviour in C57BL/6J mice // *Cent Eur J Immunol.* – 2015. – Т. 40, №1. – С. 11–17. doi:10.5114/cej.2015.49427
- Гордон, Р.Я., Капралова, М.В., Годухин, О.В., Архипов, В.И. Особенности нарушений памяти у крыс после повреждения поля СА3 дорсального гиппокампа каиновой кислотой // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2013. – Т. 155, №6. – С. 771–775.
- Brouillet E., Hyman B.T., Jenkins B.G., Henshaw D.R., Schulz J.B., Sodhi P., Rosen B.R., Beal M.F. Systemic or

- local administration of azide produces striatal lesions by an energy impairment-induced excitotoxic mechanism // *Experimental Neurology*. – 1994. – №129. – С. 175–182.
13. Воронков А.В., Поздняков Д.И., Нигарян С.А., Хури Е.И., Мирошниченко К.А., Сосновская А.В., Олохова Е.А. Оценка респирометрической функции митохондрий в условиях патологий различного генеза // *Фармация и фармакология*. – 2019. – Т. 7, №1. – С. 20–31. doi:10.19163/2307-9266-2019-7-1-20-31
 14. Riha P.D., Rojas J.C., Colorado R.A., Gonzalez-Lima F. Animal model of posterior cingulate cortex hypometabolism implicated in amnesic MCI and AD // *Neurobiol Learn Mem*. – 2008. – Т. 90, №1. – С. 112–124. doi:10.1016/j.nlm.2008.01.011
 15. Scheltens N.M.E., van der Weijden K., Adriaanse S.M. Hypometabolism of the posterior cingulate cortex is not restricted to Alzheimer's disease // *Neuroimage Clin*. – 2018. – №19. – С. 625–632. doi:10.1016/j.nicl.2018.05.024
 16. Nicholson R.M., Kusne Y., Nowak L.A., LaFerla F.M., Reiman E.M., Valla J. Regional cerebral glucose uptake in the 3xTG model of Alzheimer's disease highlights common regional vulnerability across AD mouse models // *Brain Res*. – 2010. – №1347. – С. 179–185. doi:10.1016/j.brainres.2010.05.084
 17. Chou J.L., Shenoy D.V., Thomas N., Choudhary P.K., Laferla F.M., Goodman S.R. Early dysregulation of the mitochondrial proteome in a mouse model of Alzheimer's disease // *Journal of Proteomics*. – 2011. – Т. 74, №4. – С. 466–479. doi: 10.1016/j.jprot.2010.12.012.
 18. Li Z., Chen X., Lu W. Anti-Oxidative Stress Activity Is Essential for Amanita caesarea Mediated Neuroprotection on Glutamate-Induced Apoptotic HT22 Cells and an Alzheimer's Disease Mouse Model. // *Int J Mol Sci*. – 2017. – Т. 18, №8. – С. 1623. doi:10.3390/ijms18081623
 19. Obulesu, M., Jhansi Lakshmi M. Apoptosis in Alzheimer's disease: an understanding of the physiology, pathology and therapeutic avenues // *Neurochemical research*. – 2014. – Т. 39, №12. – С. 2301–2312.
 20. Chételat G., Ossenkoppele R., Villemagne V.L. Atrophy, hypometabolism and clinical trajectories in patients with amyloid-negative Alzheimer's disease // *Brain*. – 2016. №139, ч. 9. С. 2528–2539. doi:10.1093/brain/aww159
 21. Sperling R., Mormino E., Johnson K. The evolution of preclinical Alzheimer's disease: implications for prevention trials // *Neuron*. – 2014. – Т. 84, №3. – С. 608–622. doi:10.1016/j.neuron.2014.10.038
 22. Villain N., Desgranges B., Viader F. Relationships between hippocampal atrophy, white matter disruption, and gray matter hypometabolism in Alzheimer's disease // *J Neurosci*. – 2008. – Т. 28, №24. – С. 6174–6181. doi:10.1523/JNEUROSCI.1392-08.2008
 23. Cummings J., Aisen P.S., DuBois B. Drug development in Alzheimer's disease: the path to 2025 // *Alzheimers Res Ther*. – 2016. – № 8. – С. 39–51. doi:10.1186/s13195-016-0207-9.
 24. Henley D.B., Sundell K.L., Sethuraman G., Dowsett S.A., May P.C. Safety profile of semagacestat, a gamma-secretase inhibitor: IDENTITY trial findings // *Curr Med Res Opin*. – 2014. – № 10. – С. 2021–2032. doi: 10.1185/03007995.2014.939167.
 25. Frenguelli B.G. The Purine Salvage Pathway and the Restoration of Cerebral ATP: Implications for Brain Slice Physiology and Brain Injury // *Neurochem Res*. – 2019. Т. 44, №3. – С.661–675. doi:10.1007/s11064-017-2386-6
 26. Farina B., Di Sorbo G., Chambery A. Structural and biochemical insights of CypA and AIF interaction // *Sci Rep*. – 2017. – Т. 7, №1. – С. 1138. doi:10.1038/s41598-017-01337-8
 27. Masters C.L., Selkoe D.J. Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2012. – Т. 2, №6. – С. a006262. doi:10.1101/cshperspect.a006262

АВТОРЫ

Воронков Андрей Владиславович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6638-6223. E-mail: prohor77@mail.ru.

Поздняков Дмитрий Игоревич – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-0889-7855. E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Аджиаметова Симилла Леонтьевна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолГМУ Минздрава России. E-mail: similla503@mail.ru

Червонная Надежда Михайловна – кандидат фармацевтических наук, старший преподаватель кафедры

органической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ВолГМУ Минздрава России. E-mail: nadezhda.chervonnaya@yandex.ru

Мирошниченко Кирилл Александрович – студент 5 курса фармацевтического факультета Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9811-1678. E-mail: K220436@yandex.ru

Сосновская Анастасия Викторовна – студентка 4 курса фармацевтического факультета Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5037-994X. E-mail: 88misi88@yandex.ru

Шерешкова Елизавета Ивановна – студентка 4 курса фармацевтического факультета Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7854-5401. E-mail: elizaveta.shereshkova@yandex.ru.

УДК: 612.115.3-612.115.064



ВЛИЯНИЕ ГЕПАРИНОИДА ИЗ ПИОНА (*PAEONIA LACTIFLORA*) НА СИСТЕМУ ГЕМОСТАЗА В УСЛОВИЯХ ПРЕДТРОМБОЗА

М.Г. Ляпина, М.С. Успенская, Е.С. Майстренко, М.Д. Калугина

Московский государственный университет им.М.В. Ломоносова
119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

E-mail: lyapinal@mail.ru

Получено 23.05.2019

Рецензия (1) 04.07.2019

Рецензия (2) 02.08.2019

Принята к печати 15.08.2019

Поиск и разработка антикоагулянтов прямого и быстрого действия, применяемых пероральным методом, является актуальной задачей физиологической и медицинской науки. Ряд растений содержит гепариноподобные компоненты с положительным влиянием на систему гемостаза как в норме, так и при некоторых патологических состояниях организма.

Цель исследования – изучение комплексного воздействия на фибринолитическую, антикоагулянтную системы организма и процессы полимеризации фибрина гепариноподобного вещества (гепариноида) из корней пиона молочнокветкового при его пероральном введении животным в норме и при моделировании состояния предтромбоза.

Материалы и методы. Корни пиона молочнокветкового, произрастающего в Ботаническом саду МГУ. Использовались лабораторные животные – крысы-самцы линии Wistar. Для изучения противотромботических эффектов экстракта из корней, содержащего гепариноид, моделировали у крыс состояние предтромбоза. Определяемыми параметрами гемостаза служили антикоагулянтная активность по тестам активированного частичного тромбопластинового времени и тромбинового времени, фибринолитическая активность по тесту суммарной фибринолитической активности, полимеризации фибрина по тесту фибриндеполимеризационной активности плазмы крови,

Результаты. При многократном (в течение 3-х сут. через каждые 24 ч.) пероральном введении животным в норме и при предтромбозе экстракта, содержащего гепариноид, в крови установлены противосвертывающие эффекты: повышение антикоагулянтной, фибриндеполимеризационной и фибринолитической активности плазмы. Описаны возможные механизмы активирующего действия гепариноида на фибринолиз и антикоагулянтные свойства плазмы вследствие экскреции в кровоток из эндотелия тканевого активатора плазминогена, ингибирования тромбина и полимеризации фибрина. При этом антикоагулянтный эффект от применения экстракта из корней пиона был равноценен таковому у препарата сравнения низкомолекулярного гепарина фирмы Celsus (США). Впервые выявлено, что при моделировании экспериментального предтромбоза введение крысам гепариноида в дозе 37,5 МЕ/кг массы тела восстанавливало нарушенную функцию гемостаза, что требует дальнейшего его изучения.

Заключение. Установлена способность гепариноида из корней пиона нормализовать функциональное состояние противосвертывающей системы при развитии предтромбоза у животных. Выявлено ограничение процесса полимеризации фибрина при пероральном введении животным гепариноида из пиона путем увеличения ферментативной фибринолитической и фибриндеполимеризационной активности плазмы крови. В перспективе гепариноид может применяться как антитромботический агент.

Ключевые слова: экстракт пиона, система гемостаза, предтромбоз, антикоагулянт, гепариноид

Список сокращений: АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; ГАГ – гликозаминогликаны; ГП – гепариноводобное вещество (гепариноид); МЕ – международная единица гепарина; НМГ – низкомолекулярный гепарин; ПСС – противосвертывающая система; СЛК – сулодексид; СФА – суммарная фибринолитическая активность; ТАП – тканевой активатор плазминогена; ТВ – тромбиновое время; ФДПА – фибриндеполимеризационная активность

Для цитирования: М.Г. Ляпина, М.С. Успенская, Е.С. Майстренко, М.Д. Калугина. Влияние гепариноида из пиона (*paeonia lactiflora*) на систему гемостаза в условиях предтромбоза. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4):208-214. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-208-214

© А.В. Воронков, А.Д. Геращенко, Д.И. Поздняков, Д.В. Хусаинов, 2019

For citation: M.G. Lyapina, M.S. Uspenkaya, E.S. Maistrenko, M.D. Kalugin Influence of heparinoid from *paeonia lactiflora* on hemostatic system within conditions of prethrombosis. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(4): 208-214. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-208-214

INFLUENCE OF HEPARINOID FROM *PAEONIA LACTIFLORA* ON HEMOSTATIC SYSTEM WITHIN CONDITIONS OF PRETHROMBOSIS

M.G. Lyapina, M.S. Uspenkaya, E.S. Maistrenko, M.D. Kalugina

Lomonosov Moscow State University,
Block 12, 1, Leninskie Gory, Moscow, Russia, 119234

E-mail: lyapinal@mail.ru

Received 23 May 2019

Review (1) 4 July 2019

Review (2) 2 August 2019

Accepted: 15 August 2019

The search and development of direct and rapid anticoagulants used *per os*, is an urgent problem in physiological and medical science. A number of plants contain heparin-like components with a positive effect on the hemostatic system, both within normal and in some pathological conditions of the body.

The aim of the work was to study the complex effect of fibrin, a heparin-like substance (heparinoid) from the roots of *Paeonia lactiflora*, on fibrinolytic, anticoagulant systems of the body and polymerization processes, when it is administered *per os* in animals within normal conditions and when modeling the state of prethrombosis.

Materials and methods. To carry out the research, the roots of *Paeonia lactiflora* growing in the Botanical Garden of Moscow State University, and laboratory animals – male Wistar rats – were used. To study the antithrombotic effects of the extract from roots containing heparinoid, the state of prethrombosis was modeled in rats. The determined parameters of hemostasis were: anticoagulant activity according to the tests of activated partial thromboplastin time and thrombin time, fibrinolytic activity according to the test of total fibrinolytic activity, fibrin polymerization according to the test of fibrindepolymerization activity of blood plasma.

Results. With repeated (every 24 hours within 3 days) oral administration of the extract containing heparinoid, in animals within normal conditions and with prethrombosis, the following anticoagulant effects were established in the blood: an increase in anticoagulant, fibrindepolymerization and fibrinolytic plasma activity. Possible mechanisms of the activating effect of heparinoid on fibrinolysis and anticoagulant properties of plasma due to the excretion of tissue plasminogen activator into the bloodstream from the endothelium, thrombin inhibition, and fibrin polymerization are described. Moreover, the anticoagulant effect of the use of the extract from the peony roots was equivalent to that of the reference drug of low molecular weight heparin from Celsus (USA). For the first time, it was revealed that when modeling experimental prethrombosis, the administration of heparinoid in rats at the dose of 37.5 IU/kg ME/kr body weight restored impaired hemostasis, which requires a further study.

Conclusion. The ability of heparinoid from peony roots to normalize the functional state of the anticoagulant system during the development of prethrombosis in animals has been established. The restriction of fibrin polymerization during oral administration of heparinoid from peony in animals by increasing the enzymatic fibrinolytic and fibrindepolymerization activity of blood plasma was revealed. In the future, heparinoid can be used as an antithrombotic agent.

Keywords: *Paeonia lactiflora*, peony extract, hemostatic system, prethrombosis, anticoagulant, heparinoid

List of abbreviations: CLA – conjugated linoleic acid; TFA – total fibrinolytic activity; GAGs – glycosaminoglycans; LMWH – low molecular weight heparin; PTT – partial thromboplastin time; FDPA – fibrindepolymerization activity; TT – thrombin time; TFA – total fibrinolytic activity, ACS – anticoagulative system; TTPA – tissue-type plasminogen activator

ВВЕДЕНИЕ

Поиск и разработка антикоагулянтов прямого и быстрого действия, применяемых оральным способом, является актуальной задачей физиологической и медицинской науки. В настоящее время широко используют для профилактики тромбозов и интенсивной терапии без лабораторного контроля новые оральные антикоагулянты [1], которые по скорости действия уступают низкомолекулярным гепаринам. Препараты НМГ имеют общепризнанные преимущества, к числу которых относятся: 1) удобство назначения – 1 раз в сут.; 2) отсутствие необходимости в лабораторном мониторинге; 3) относительная безопасность без побочных отрицательных эффектов в виде кровоточивости [2]. Несмотря на создание все

новых средств для антикоагулянтной терапии, НМГ остаются препаратами выбора для профилактики и долгосрочного лечения тромбозов. Традиционно НМГ рассматривают как множество однотипно взаимозаменяемых препаратов. Однако, их относительная антитромбиновая активность различается в зависимости от средней молекулярной массы. Известно, что препараты НМГ применяют лишь подкожно или внутривенно [3]. Из всех используемых в клинике препаратов, содержащих НМГ, только Сулодексид может вводиться перорально. Он является высокоочищенной смесью гликозаминогликанов, состоящей из НМГ (80%) и дерматан-сульфата (20%). Низкий молекулярный вес обеих фракций СЛК обеспечивает высокую абсорбцию препарата при пероральном

приеме [4]. Фармакологические свойства СЛК существенно отличаются от других ГАГ и характеризуются длительным периодом полувыведения и ограниченным влиянием на параметры системы гемостаза. Благодаря наличию двух фракций ГАГ, СЛК потенцирует активность антитромбина III и кофактора гепарина II одновременно. При пероральном приеме СЛК дополнительно обнаруживает фибринолитическую активность за счет высвобождения из сосудистого эндотелия тканевого активатора плазминогена [5]. Антитромботическая и антитромбиновая активность СЛК представляет значительный фармакологический интерес и обуславливает возможность его применения для профилактики и лечения заболеваний, осложняющихся тромбозами [6, 7]. Однако, данный препарат получают из тканей животного происхождения, а именно, из слизистой оболочки тонкого кишечника свиньи. В то же время несомненный интерес представляет поиск препаратов подобного действия растительной природы. Многие растения служат источником лекарственного сырья для выделения антикоагулянтов, фибринолитиков и тромболитиков [8–11].

Ранее было установлено, что в ряде растений содержатся компоненты, являющиеся составной частью гепарина и других ГАГ [12, 13] с положительным воздействием на систему гемостаза как в норме, так и при некоторых патологических состояниях организма [14]. Из коры березы было получено антикоагулянтное средство гепариновой природы, обладающее ингибиторной активностью по отношению к фактору Ха и тромбину [15]. В корнях травянистых пионов обнаружено гепариноподобное вещество, которое оказывает противосвертывающие эффекты в условиях *in vitro* и при внутривенном введении животным [16].

Цель работы – установление комплексного воздействия на фибринолитическую и антикоагулянтную системы организма, а также на процессы полимеризации фибрина гепариноподобного вещества из корней пиона молочнокветкового при его пероральном введении животным в норме и при моделировании состояния предтромбоза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Эксперименты проведены на 66 лабораторных белых крысах-самцах линии Wistar массой тела 190–210 г. Животные были получены из питомника станции Столбовой Московской области. До начала экспериментов и в период проведения опытов крысы находились на обычном лабораторном рационе и содержались в стандартных условиях вивария биологического факультета МГУ со свободным доступом к воде и пище и соблюдением 12-часового светового режима дня. Все эксперименты на животных осуществлялись в соответствии с этическими принци-

пами и документами, рекомендованными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных (Страсбург 15.06.2006), Базельской и Хельсинской декларацией о гуманном отношении к животным.

Сырье

Корни пиона (*Paeonia lactiflora*) были получены из экологически чистых растений, произрастающих в Ботаническом саду МГУ. (Москва, Россия). Вид пиона определяли сотрудники Ботанического сада МГУ под руководством М.С.Успенской. Сырье заготавливали в осенний период (с конца августа до середины октября 2016 г.) и хранили при температуре +3–5°C. Для экспериментов готовили исходный 5%-ый экстракт из сухих чистых корней, которые растирали в фарфоровой ступке до порошкообразного состояния. В экстракте определяли наличие ГП [16] с использованием фотоэлектроколориметрического метода при применении Азура А (красителя на гепарин) и протаминсульфата (ингибитора гепарина). ГП в количестве 0,5 мг, растворенный в 0,5 мл физиологического раствора натрия хлорида, содержал 37,5 МЕ гепарина.

Дизайн исследования

ГП в указанной дозе (0,5 мг) и объеме (0,5 мл) вводился перорально ежедневно подопытным крысам массой 200 г.

Первая серия экспериментов

Исследования проведены на здоровых крысах, содержащихся в стандартных условиях вивария. Крысы были разделены на три группы: 1-я группа получала однократно ГП, 2-я – ГП в течение 3-х сут. через каждые 24 ч. и 3-я (контрольная) – 0,85%-ый раствор натрия хлорида.

Вторая серия экспериментов

Исследования осуществлялась в условиях экспериментального предтромбоза. Состояние предтромбоза у крыс моделировали путем создания депрессии функции ПСС введением 2,5%-го раствора аминазина (0,06 мл/200 г массы тела) для выключения вегетативной нервной системы с последующей (через 30-40 мин) внутривенной инъекцией крысам 1%-го раствора коагулянта – тканевого (мозгового) тромбопластина в объеме 0,6 мл/200г массы тела.

Крысы с экспериментальным предтромбозом были разделены на 3 группы: 1-я группа (опытная) предварительно получала трехкратно ГП в указанной дозе и объеме, 2-я (контрольная) – в те же сроки и в том же объеме – 0,85%-ый раствор натрия хлорида; 3-я (группа сравнения) – трехкратно коммерческий НМГ фирмы «Celsus» (дата выпуска 2016 г. с антифакторной Ха активностью) – в те же сроки и в том же объеме (37,5 МЕ гепарина на 200 г массы тела крыс). Одновременно в этой серии экспериментов использовали для сравнения 2 группы здоровых крыс, одна

из которых не получала никаких препаратов (группа Норма), а вторая – только трехкратно ГП.

Проведение исследований

Кровь брали из яремной вены (*vena jugularis*) через 20 ч после последнего введения препаратов с использованием в качестве консерванта 3,8%-го цитрата натрия в соотношении 9: 1 и центрифугировали при 3000g в течение 10–12 мин для получения бедной тромбоцитами плазмы крови.

Для характеристики параметров фибринолитического звена ПСС крови готовили фибриновые пластины двух типов: 1) нестабилизированные фактором XIIIa, характеризующиеся наличием водородных связей в растворимом фибрин-полимере; 2) стабилизированные фактором XIIIa, имеющие прочные ковалентные связи в нерастворимом фибрин-полимере. В плазме крови определяли следующие биохимические параметры гемостаза: на нестабилизированных фибриновых пластинах – СФА, включающую активность комплексов гепарина с компонентами плазмы крови и активность плазмина, а также ФДПА, отражающую процессы деполимеризации фибрина; на стандартных стабилизированных фибриновых пластинах – активность ТАП и фермента плазмина. Об антикоагулянтной активности плазмы судили по тесту АЧТВ, характеризующему внутренний механизм свертывания крови, и ТВ, отражающему общий путь свертывания крови. Кроме того, проводили измерение концентрации фибриногена [17].

Статистическая обработка результатов

Все данные обработаны статистически с помощью непараметрического критерия Вилкоксона и t-критерия Стьюдента (пакет программ *Statistica 7.0*).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии экспериментов при однократном пероральном применении ГП через 20 ч установлено достоверное повышение антикоагулянтной активности (по тесту АЧТВ) на 28%, увеличение СФА на нестабилизированном фибрине за счет суммарной активности комплексов гепарина и активности плазмина – на 37%. Процесс полимеризации фибрина значительно снижался, о чем свидетельствовало повышение ФДПА на 56% по сравнению с контролем. Дополнительным подтверждением ингибирования процесса полимеризации фибрина служило уменьшение концентрации фибриногена на 33% по сравнению с контролем.

Через 20 ч. после трехкратного перорального применения ГП наблюдалось еще более резкое изменение исследуемых параметров в сторону гипокоагуляции. Так, антикоагулянтная активность увеличилась на 50% (по тесту АЧТВ) и на 23% (по тесту ТВ) по сравнению с контролем и превысила те же показатели в остром эксперименте на 22–13% соответственно. При этом СФА увеличилась на 52%, а деполимеризация фибрина по тесту ФДПА повысилась на 49% сравнительно с контролем (табл. 1).

Таблица 1 – Антикоагулянтная, фибринолитическая, фибриндеполимеризационная, активности; концентрация фибриногена через 20 ч после одно- и трехкратного перорального применения гепариноида из корней пиона (ГП) молочнокветкового здоровым животным ($M \pm m$)

Показатели крови	Перорально введены			
	ГП однократно (группа 1)	ГП трехкратно (группа 2)	0,85%-ый раствор на- трия хлорида однократно Контроль 1	0,85%-ый раствор натрия хлорида трехкратно Контроль 2
Антикоагулянтная активность, с (%)	39,7 ± 0,4**	46,6 ± 2,7**	30,6 ± 1,7	31,0 ± 0,7
– по тесту АЧТВ	(128%)	(150%)	(100%)	(100%)
– по тесту ТВ	29,0 ± 0,6	34,5 ± 1,4**	28,0 ± 1,1	28,0 ± 1,1
	110%	(123%)	(100%)	(100%)
СФА, мм ² (%)	55,3 ± 1,3**	61,6 ± 1,1**	40,5 ± 1,0	40,3 ± 1,5
	(137%)	(152%)	(100%)	(100%)
ФДПА, мм ² (%)	36,0 ± 1,1**	38,9 ± 1,3**	23,0 ± 0,9	26,0 ± 0,9
	(156%)	(149%)	(100%)	(100%)
ТАП, мм ² (%)	40,1 ± 1,3**	42,3 ± 1,3**	9,5 ± 0,8	9,7 ± 1,0
	(413%)	(436%)	(100%)	(100%)
Активность плазмина, мм ² (%)	20,2 ± 1,5**	24,2 ± 1,1**	9,0 ± 0,6	8,8 ± 0,8
	(230%)	(275%)	(100%)	(100%)
Концентрация фибриногена, мг%	187,0 ± 13,2*	210,0 ± 9,8	305,0 ± 10,0	308,0 ± 11,3
	(67%)	(70%)	(100%)	(100%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Как видно из табл. 1, наиболее значительные изменения после воздействия ГП по сравнению с контролем отмечались в ферментативном фибринолизе плазмы крови крыс. Так, через 20 ч. после перорального применения ГП однократно или трехкратно активность плазмينا заметно повысилась на 130–175% соответственно. Но особенно значительные отличия от контроля в этих условиях обнаружены по активности ТАП, которая превысила контрольный уровень при однократном и трехкратном применении ГП на 313 и 336% соответственно.

Вторая серия экспериментов предусматривала создание модели крыс с состоянием предтромбо-

за на фоне депрессии функции ПСС. Показано при предтромбозе (группа Контроль) резкое угнетение по сравнению с группой Норма антикоагулянтной активности плазмы (по тесту АЧТВ) на 21,4%, снижение СФА – на 65%, ФДПА – на 155%, активности ТАП – на 115%, уровня плазмينا – на 69%. При этом при предтромбозе концентрация фибриногена была повышена на 30% по сравнению с группой Норма. В опытной группе крыс, у которых через 20 ч. после последнего трехкратного применения ГП, моделировали состояние предтромбоза, спустя 30 мин после введения крысам тканевого тромбoplastина (табл.2) установлен защитный противотромботический эффект.

Таблица 2 – Антикоагулянтная, фибринолитическая, фибриндеполимеризационная активности; концентрация фибриногена через 30 мин после моделирования предтромбоза у крыс на фоне трехкратного перорального применения гепариноида из пиона ($M \pm m$)

Показатели крови	ГП введен трехкратно (группа 1 – до пред-тромбоза)	Через 30 мин после моделирования экспериментального предтромбоза на фоне трехкратно введенных			Здоровые крысы (группа Норма)
		ГП – Опыт	0.85%-го натрия хлорида – Контроль	НМГ (Celsus) – препарат сравнения	
Антикоагулянтная активность, с (%) по тесту АЧТВ	39,7 ± 0,4** (163%)	30,0 ± 1,7 (123%)	24,3 ± 2,2 (100%)	28,9 ± 0,7 (122%)	31,0 ± 0,7 (121.4%)
СФА, мм ² (%)	55,3 ± 1,3** (229%)	41,5 ± 1,0** (173%)	23,9 ± 2,1 (100%)	30,0 ± 1,1* (125%)	40,3 ± 1,5 (169%)
ФДПА, мм ² (%)	36,0 ± 1,1** (400%)	26,0 ± 0,9** (279%)	9,0 ± 1,5 (100%)	–	23,0 ± 0,9 (255%)
ТАП, мм ² (%)	40,1 ± 1,3** (817%)	8,3 ± 0,8** (184%)	4,5 ± 0,1 (100%)	–	9,7 ± 1,0 (215%)
Активность плазмينا, мм ² (%)	20,2 ± 1,5** (348%)	9,0 ± 0,6** (161%)	5,5 ± 0,2 (100%)	–	8,8 ± 0,8 (160%)
Концентрация фибриногена, мг%	187,0 ± 13,2 ** (45%)	326,0 ± 12,0** (78%)	415,0 ± 15,3 (100%)	400,0 ± 12,0 (96%)	308,0 ± 11,3 (70%)

Примечание: статистические показатели рассчитаны относительно соответствующих проб контроля, принятых за 100%. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Так, у подопытных крыс (Опыт) антикоагулянтная активность по тесту АЧТВ увеличилась на 23% по сравнению с контролем и приблизилась к тому же показателю у здоровых крыс (группа Норма). При этом СФА повысилась на 73% по сравнению с контролем и также практически соответствовала нормальному уровню (группе Норма). Деполимеризация фибрина по тесту ФДПА повысилась на 179% под влиянием ГП, в то время как в группе Норма эта величина превышала контрольный уровень на 155%. ТАП в опыте увеличилась на 84% сравнительно с Контролем, однако, не достигала (на 31%) уровня, отмечаемого у группы Норма. Активность плазмينا в группах Норма и Опыт превышала контрольный уровень на 60–61%. Концентрация фибриногена после воздействия ГП соответствовала нормальным значениям (табл. 2). В группе сравнения (введен коммерческий НМГ) установлено повышение антикоагулянтной и

суммарной фибринолитической активности на 22 и 25% соответственно.

Анализируя полученные результаты, необходимо отметить, что экстракт из корней пиона молочнокветкового, как и СЛД [5], оказывает не только антикоагулянтный эффект, подобно гепарину [18] и препарату сравнения (табл. 2), но и широкий спектр фибринолитического действия при пероральном введении в организм. Он более чем в 4 раза усиливает активность тканевого активатора плазминогена в кровотоке, причем как при однократном, так и при трехкратном применении, что указывает на его высокую афинность к клеткам эндотелия и свидетельствует о его способности взаимодействовать с рецепторами эндотелия, экспрессируя в кровотоке из стенки сосуда активаторы плазминогена, как это было показано в других работах при действии других растительных антикоагулянтов [19]. Выявлено также,

что этот процесс связан и с усилением под влиянием ГП активности плазмينا. Нами впервые установлен факт, что растительный гепариноид при пероральном применении препятствует полимеризации фибрина, вследствие чего увеличивается его ФДПА в плазме крови более чем на 50–60%. Ранее [20] сообщалось об ограничении взаимодействия тромбина с фибриногеном под влиянием ингибиторов растительного происхождения, что мы и наблюдали в наших исследованиях.

Заслуживает внимания факт выявления у ГП защитного антитромботического эффекта, что обнаружено при моделировании состояния предтромбоза у животных. Исследованный нами при пероральном приеме ГП, подобно перорально примененному СЛК [6], обладает как антитромбиновой, так и антитромботической активностью. ГП, как и СЛК, представляет фармакологический интерес в плане его применения для профилактики заболеваний, осложняющихся тромбозами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного исследования эффектов растительного гепариноида из пиона показан его противосвертывающий эффект даже при однократном пероральном введении, который усиливается при введении в течение 3-х сут. через каждые 24 ч. в ежедневной дозе 37,5 МЕ (по содержанию гепарина) на 200г массы тела крыс. Установлена его защитная и корректирующая роль в восстановлении нарушенной функции противосвертывающей системы при развитии состояния предтромбоза у животных. Вы-

явлено, что гепариноид при пероральном введении уменьшает плазменную концентрацию фибриногена, ограничивает процесс полимеризации фибрина, увеличивает ферментативную фибринолитическую активность плазмы за счет повышения уровня плазмина и активности тканевого активатора плазминогена, усиливает суммарную фибринолитическую активность, а также фибриндеполимеризационную активность, обусловленную действием возникающих в крови комплексов гепарина с белками, пептидами, аминокислотами крови. Растительный гепариноид имеет функциональное сходство с низкомолекулярным гепарином по механизму антитромботического действия. При этом антикоагулянтный эффект от применения экстракта из корней пиона не уступал таковому у препарата сравнения низкомолекулярного гепарина фирмы "Celsus" (США). Исследованный нами препарат из корней пиона является комплексным агентом с антикоагулянтными, фибринолитическими, фибриндеполимеризационными свойствами, защищающим организм от развития тромбоопасных состояний. Он может обеспечить лизис свежих только что появляющихся в кровотоке фибриновых сгустков как за счет своего прямого действия на полимеризующийся фибрин, так и путем опосредованного влияния на процессы плазменного гемостаза. Все указанные эффекты растительного гепариноида позволяют говорить об эффективности и перспективности изучения этого агента в целях предупреждения и лечения тромбоэмболических заболеваний и тромботических осложнений.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена по теме госбюджетного НИОКР «Физиологические регуляторы свертывающей и противосвертывающей систем организма в норме и при патологии (Physiological regulators of coagulation and anticoagulation systems of the body in health and disease)» № ЦИТИС АААА-Ф16-116021660094-0.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени принимали участие в проведении физиологических экспериментов и в определении параметров гемостаза. Ляпина М.Г. – стратегия экспериментов, Успенская М.С. – определение вида пиона, сбор, хранение сырья; Майстренко Е.С. – приготовление экстракта из пиона, проведение статистической обработки результатов; Калугина М.Д. – поиск литературы.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Buerke M., Hoffmeister H.M. Management of NOAK administration during invasive or surgical interventions. When and how to pause and when to restart? // *Med Klin Intensivmed Notfmed.* – 2017. – V. 112, N 2. – P. 105–110. doi: 10.1007/s00063-016-0240-2
2. Кричевский Л.А. Низкомолекулярные гепарины в современной системе управления свертываемостью крови // *Доктор.Ру.* – 2015. – Т. 117, №16. – С.42–48.
3. Xiao C., Lian W., Zhou L., Gao N., Xu L., Chen J., Wu M., Peng W., Zhao J. Interactions between depolymerized fucosylated glycosaminoglycan and coagulation proteases or inhibitors // *Thromb Res.* – 2016. – V. 146. – P. 59–68. doi: 10.1016/j.thromb.2016.08.027.
4. Hoppensteadt D.A., Fareed J. Pharmacological profile of sulodexide // *Int Angiol.* – 2014. – V. 33, N3. – P. 229–235.
5. Milani M. Sulodexide: Review of recent clinical efficacy data // *Online J. Medicine and Medical Science Research.* – 2013. – V. 2, N5. – P. 57–61.
6. González-Larrocha O., Salazar-Tafur M.F., Romero-Rojano P., Arízaga-Maguregui A. Sulodexide: a new antithrombotic agent. // *Rev. Esp. Anestesiol. Reanim.* – 2017. – V. 64, N2: – P. 116. doi: 10.1016/j.rev.2016.09.007. Epub 2016
7. Serra R, Gallelli L, Conti A, De Caridi G, Massara M, et al.

- The effect of sulodexide on both clinical and molecular parameters in patients with mixed arterial and venous ulcers of the lower extremities // *Preparation Des Devel Ther.* – 2014. – V. 8. – P. 519–527. doi: 10.2147 / DDDT. S61770. eCollection 2014.
8. Ustyuzhanina N.E., Bilan M.I., Gerbst A.G., Ushakova N.A., Tsvetkova E.A., Dmitrienko A.S., Usov A.I., Rifantiev A.E. Anticoagulant and antithrombotic activity of modified xylophone sulfate from the brown Alga *Punctaria plantaginea* // *Carbohydr. Polym.* – 2016 – V. 136. – P. 826–833. doi: 10.1016 / j.carboh .2015.09.102. Epub 2015.
 9. Bilan M.I., Shashkov A.S., Usov A.I. Structure of a sulfated xylofucan from the brown alga *Punctaria plantaginea* // *Carbohydr Res.* – 2014. – V. 393. – P. 1–8. doi: 10.1016/j.carres.2014.04.022
 10. Wu M., Xu L., Zhao L., Xiao C., Gao N., Luo L., Yang L., Li Z., Chen L., Zhao J. Structural analysis and anticoagulant activities of the novel sulfated fucan possessing a regular well-defined repeating unit from sea cucumber // *Mar. Drugs.* – 2015. – V. 13, N 4. – P. 2063–2084. doi: 10.3390 / md13042063.
 11. Zhang S.B. In vitro antithrombotic activities of peanut protein hydrolysates // *Food Chem.* – 2016. – V. 202. – P. 1–8. doi: 10.1016 / j.foodchem.2016.01.108. Epub 2016 27 yanv.
 12. Pomin V.H., Mourão P.A. Specific sulfation and glycosylation-a structural combination for the anticoagulation of marine carbohydrates // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2014. – V. 4, N33. doi: 10.3389/ fcomb.2014.00033.
 13. Криштанов Н.А., Сафонова М.Ю., Болотова В.Ц., Павлова Е.Д., Саканян Е.И. Перспективы использования растительных полисахаридов в качестве лечебных и лечебно-профилактических средств // *Вестник ВГУ, сер. Биология. Химия. Фармация.* – 2005. – Т. 1. – С. 212–221.
 14. Michel P., Owczarek A., Matczak M., Kosno M., Szymański P., Mikiciuk-Olasik E., Kilanowicz A., Wesolowski W., Olszewska M.A. Metabolite profiling of eastern teaberry (*Gaultheria procumbens* L.) lipophilic leaf extracts with hyaluronidase and lipoxygenase inhibitory activity // *Molecules.* – 2017. – V. 22, N 3. – P. E412–E414. doi: 10.3390/molecules22030412.
 15. Кузнецова С.А., Дрозд Н.Н., Кузнецов Б.Н., Макаров В.А., Левданский В.А., Мифтаков Н.Т. Антикоагулянтное средство // Патент № 2399377. Россия. 2009.
 16. Ляпина М.Г., Успенская М.С., Майстренко Е.С. О механизме антикоагулянтного действия экстракта из корней пиона молочноцветкового // *Межд. журн. прикл. и фундамент. исследований.* – 2016. – № 11. – С. 1091–1093.
 17. Ляпина Л.А., Григорьева М.Е., Оберган Т.Ю., Шубина Т.А. Теоретические и практические вопросы изучения функционального состояния противосвертывающей системы крови. М. Адвансед Солюшнз. – 2012. – 160 с.
 18. Van Montfoort M L., Meijers J.C. Anticoagulation beyond direct thrombin and factor Xa inhibitors: indications for targeting theintrinsic pathway // *Thromb. Haemost.* – 2013. – V. 110, N 2. – P. 223–232. doi: 10.1160 / TH12-11-0803. Epub 2013 6 Jun..
 19. Nsimba M.M., Yamamoto C., Lami J.N., Hayakawa Y., Kaji T. Effect of a Congolese herbal medicine used in sickle cell anemia on the expression of plasminogen activators in human coronary aortic endothelial cells culture // *J. Ethnopharmacol.* – 2013. – V. 146, № 2. – P. 594–599. doi: 10.1016 / j.Ethnoph.2013.01.031. Epub 2013.
 20. Бышевский А.Ш., Галян С.Л., Калинин Е.П., Карпова И.А., Русакова О.А., Самойлов М.А., Созонюк А.Д., Сулкарнаева Г.А., Тарасов Д.Б., Чирятьев, Е.А., Шаповалов П.Я., Шаповалова Е.М. Ингибиторы самосборки фибрина растительного происхождения // *Медицинская наука и образование Урала.* – 2012. – Т. 13, № 1. – С. 163–170.

АВТОРЫ

Ляпина Маргарита Григорьевна – ведущий специалист лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. ORCID 0000-0001-6039-5161. E-mail: lyapinal@mail.ru.

Успенская Марианна Сергеевна – кандидат биологических наук, доцент, старший научный сотрудник Ботанического сада биологического факультета МГУ. ORCID 0000-0002-5368-4026. E-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru

Майстренко Евгения Семеновна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. ORCID ID: 0000-0003-3227-1465. E-mail: ms-uspenskaya@yandex.ru

Калугина Марина Дмитриевна – научный сотрудник лаборатории защитных систем крови имени проф. Б.А. Кудряшова кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Istin ResearchID (IRID) 8945687. E-mail: laboratory7@mail.ru

УДК 615.065



ПРИМЕНЕНИЕ СИСТЕМЫ ПРОБЛЕМ, СВЯЗАННЫХ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ПРЕПАРАТАМИ (DRUG-RELATED PROBLEMS), НА ПРИМЕРЕ ГРУППЫ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ

А.В. Матвеев^{1,2}, А.Е. Крашенинников¹, Е.А. Егорова², Е.И. Коняева²

¹ Автономная некоммерческая организация «Национальный научный центр Фармаконадзора», 127051, Российская Федерация, Москва, ул. Малая Сухаревская площадь, д. 2, корп. 2

² Медицинская академия им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского», 295051, Российская Федерация, г. Симферополь, бул. Ленина, 5/7

E-mail: elena212007@rambler.ru

Получено 15.06.2019

Рецензия (1) 03.08.2019

Рецензия (2) 14.08.2019

Принята к печати 20.08.2019

Проблемы, связанные с лекарственными препаратами (drug-related problems, DRP), – это события или изменения, связанные с фармакотерапией, которые реально или потенциально препятствуют достижению желаемых результатов в процессе лечения.

Цель – анализ случаев нежелательных реакций (НР) на препараты группы нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) с помощью квалификационной системы DRP PCNE V5.01.

Материалы и методы. Объектами исследования стали 415 карт-извещений о нежелательных реакциях НПВС, зарегистрированные в региональной базе спонтанных сообщений ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomic Database) за период 2009–2018 гг. Изучение и анализ проблем, связанных с лекарственными препаратами, проводился с использованием квалификационной системы DRP PCNE V5.01 (Pharmaceutical Care Network Europe) 2006 г. в модификации А.Б. Зименковского.

Результаты. «Лидерами» по частоте развития НР среди отдельных представителей группы НПВС стали препараты ибупрофен и диклофенак. Частота встречаемости случаев НР для ибупрофена составила 142 случая (34,22% от всего количества случаев НР на НПВС), а для диклофенака – 90 случаев (21,69%). Расчет значений DRP для каждого из представленных случаев НР позволил определить, что в 81 (19,51%) и 91 (21,9%) случае значение DRP было равно 6 и 7 соответственно. Значения DRP в пределах значений 8–10 встречались в 92 случаях. Наиболее высокие значения DRP наблюдались при назначении парекоксиба – 13 проблем (зарегистрирован 1 случай), декскетопрофена – 12,5 DRP (95% ДИ: 7–17) и комбинированных препаратов, содержащих диклофенак – 10 DRP (95% ДИ: 5–17 DRP). Минимальные значения DRP были выявлены при назначении напроксена, рофекоксиба и эторикоксиба.

Заключение. Использование системы проблем, связанных с лекарственными препаратами (DRP), для проведения анализа нежелательных реакций препаратов группы НПВС позволило выделить отдельных представителей группы, обладающих высоким риском развития неблагоприятных последствий при их применении в практической медицине. Среди таких препаратов стоит отметить парекоксиб, декскетопрофен и комбинированные препараты, содержащие диклофенак. Назначение представленных выше препаратов должно проводиться со строгим учетом показаний и противопоказаний к применению, дозы и курса лечения, а также вероятности возможного взаимодействия этих препаратов с сопутствующими лекарственными средствами.

Ключевые слова: проблемы, связанные с лекарственными препаратами, DRP, нестероидные противовоспалительные средства

Список сокращений: DRP – проблемы, связанные с лекарственными препаратами; ЛП – лекарственные препараты; ЛС – лекарственные средства; НР – нежелательные реакции; НПВС – нестероидные противовоспалительные средства; ЦОГ – циклооксигеназа; АТХ-код – код лекарственного препарата в соответствии с анатомо-терапевтически-химической классификацией ЛС.

Для цитирования: А.В. Матвеев, А.Е. Крашенинников, Е.А. Егорова, Е.И. Коняева. Применение системы проблем, связанных с лекарственными препаратами (drug-related problems), на примере группы нестероидных противовоспалительных средств. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4): 215-223. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-215-223

© А.В. Матвеев, А.Е. Крашенинников, Е.А. Егорова, Е.И. Коняева, 2019

For citation: A.V. Matveev, A.E. Krashenninikov, E.A. Egorova, E.I. Konyayeva. Application of drug-related problems approach to analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs' safety. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(4): 215-223. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-215-223

APPLICATION OF DRUG-RELATED PROBLEMS APPROACH TO ANALYSIS OF NON-STEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS' SAFETY

A.V. Matveev^{1,2}, A.E. Krasheninnikov¹, E.A. Egorova², E.I. Konyaeva²

¹ National Pharmacovigilance Research Center,
2/2, Malaya Sukharevskaya sq., Moscow, Russia, 127051

² Medical Academy n. a. S.I. Georgievsky of Vernadskiy CFU,
5/7, Lenin Avenue, Simferopol, Republic of Crimea, Russia, 295051

E-mail: elena212007@rambler.ru

Received 15 June 2019

Review (1) 3 August 2019

Review (2) 14 August 2019

Accepted: 20 August 2019

Summary. A Drug-Related Problem is an event or circumstance involving drug therapy that actually or potentially interferes with desired health outcomes.

The aim of the study was the analysis of the adverse drug reactions (ADR) associated with prescription of the non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) using the DRP PCNE V5.01 qualification system.

Materials and methods. The objects of the study were 415 notification forms about adverse drug reactions of NSAIDs recorded in the regional database of spontaneous reports and called ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomic Database) for the period from 1 January 2009 to 31 December of 2018. The study and analysis of the problems associated with drugs were carried out using the qualification system DRP PCNE V5.01 (Pharmaceutical Care Network Europe) 2006 in the modification of Prof. Zimenkovsky.

Results. Among other representatives of the NSAID group, Ibuprofen and Diclofenac became the "leaders" in the incidence of ADR. The frequency of ADR cases for Ibuprofen was 142 reports (34.22% of the total number of ADR for NSAIDs), and for Diclofenac it was 90 cases (21.69%). The calculation of DRP values for each of the presented cases made it possible to determine that in 81 (19.51%) and 91 (21.9%) cases, the DRP value was 6 and 7, respectively. DRP values in the range of 8–10 were found in 92 reports. The highest DRPs value was observed after the administration of Parecoxib (13 problems but only one case was found in the database), the DRPs value of Dexketoprofen was 12.5 (95% CI: 7–17) and the DRPs value of Diclofenac combinations was 10 DRPs; 95% CI: 5–17 DRP). The minimum DRPs values were associated with Naproxen, Rofecoxib, and Etoricoxib prescriptions.

Conclusion. Using the DRP system in the analysis of NSAIDs, ADRs allow to identify the medicines which have a high risk of causing safety problems, such as Parecoxib, Dexketoprofen and Diclofenac combinations. The prescription of these drugs should be carried out with special cautions and control to the indications and contraindications, the dose and duration of treatment, as well as to a possible interaction of them with concomitant drugs.

Keywords: drug-related problems (DRPs), non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), adverse drug reactions (ADRs)

List of abbreviations: DRP – drug-related problems; MP – medicinal products; ADRs – adverse drug reactions; NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs; COX – cyclooxygenase; ATC-code – code of product according to Anatomical Therapeutic Chemical (ATC) classification system.

ВВЕДЕНИЕ

Проблемы, связанные с применением лекарственных препаратов (drug-related problems, DRP), определяют как «любое обстоятельство, связанное с употреблением пациентом лекарственного средства, которое фактически или потенциально препятствует получению пациентом предполагаемой пользы от лекарственного средства» [1, 2]. Такие нежелательные последствия, обусловленные приемом лекарственных препаратов (ЛП), являются обычным явлением в лечебно-профилактических учреждениях как на этапе первичной медицинской помощи, на госпитальном этапе её предоставления, так и на этапе амбулаторного лечения пациентов. Большая часть таких проблем регистрируется на этапе назначения, дозирования или непосредственного приема лекарственных пре-

паратов пациентами. Потенциальными причинами возникновения DRP является одновременное назначение пяти и более ЛП (полипрагмазия), сложные схемы применения ЛП, а также использование новых лекарственных препаратов в клинической практике, что связано с высоким риском развития нежелательных реакций при их применении [3, 4]. Не менее важной причиной развития DRP у пациентов является отсутствие информированности ими врачей об использовании сопутствующих лекарственных препаратов или альтернативных методов лечения [5].

Заболевания, возникающие при проявлении DRP, являются серьезной проблемой для пациентов и общества, а страдания больных и затраты со стороны государства и самих пациентов, вызванные этими ошибками, являются значительными [6–8]. Так, еже-

годные экономические последствия DRP в Соединенных Штатах Америки (США) оценивают более, чем в 150 млрд долларов [9]. При этом оценка затрат, связанных с медицинскими ошибками, при применении лекарственных препаратов только в амбулаторных условиях, варьирует от 30,1 до 136,8 млрд долларов США [10, 11].

Среди основных причин возникновения DRP выделяют следующие: назначение и применение лекарственных препаратов вне одобренных показаний, расхождения между назначенными и фактическими режимами применения лекарственных средств (ЛС), нерациональный выбор ЛП, плохая приверженность пациентов к лечению, взаимодействие лекарственных препаратов между собой, а также с компонентами пищи, побочные реакции, передозировка, использование субтерапевтических доз лекарственных средств и необходимость в дополнительной медикаментозной терапии [12–15]. Согласно данным систематического обзора Krähenbühl Melcher et al., около 8% госпитализированных пациентов сталкиваются с нежелательными реакциями при применении лекарственных препаратов и 5–10% от всех назначений лекарств при этом являются ошибочными [16]. Результаты изучения частоты возникновения нежелательных реакций при применении ЛП, проведенные Forster AJ и коллегами, выявили следующие показатели: НР возникали у 15% пациентов, находящихся на этапе госпитализации, и у 12–17% пациентов после выписки из лечебно-профилактического учреждения [17–19].

Выявление и изучение проблем, связанных с применением лекарственных препаратов, а также определение основных групп и отдельных представителей лекарственных препаратов, обладающих высоким риском развития DRP, являются важнейшими этапами лечения пациентов, позволяющими снизить заболеваемость, смертность и повысить их приверженность к лечению [20].

Согласно проведенному нами поиску в специализированной отечественной литературе, методика учета DRP практически не используется в российской практике, а количество исследований лекарственных проблем единично [21, 22].

Цель – анализ случаев НР на препараты группы нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) с помощью квалификационной системы DRP PCNE V5.01.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования случаев развития НР при применении препаратов группы НПВС являлись карты-извещения о нежелательных реакциях ЛС, зарегистрированные в региональной базе спонтанных сообщений ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomic Database) за период 2009–2018 гг. За со-

ответствующий период было отобрано 415 карт-извещений, содержащих информацию о НР различной степени тяжести при применении представленной группы ЛП у пациентов, получавших лечение в медицинских учреждениях, использующих ЛС амбулаторно или в виде самолечения.

Выявление случаев развития НР при применении препаратов группы НПВС проводился с учетом кодов Анатомо-терапевтически-химической (АТХ) классификации лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения [23], данных инструкций Государственных реестров лекарственных средств Российской Федерации и Украины (для случаев, зарегистрированных до вступления Республики Крым в состав Российской Федерации).

Изучение частоты и тяжести DRP и анализ проблем, связанных с лекарственными препаратами, проводился с использованием квалификационной системы DRP PCNE V5.01 (Pharmaceutical Care Network Europe) 2006 г. в модификации А.Б. Зименковского [24]. В основе данной системы лежит кодирование DRP по 4 основным категориям: Р (Problems) – проблемы, С (Causes) – причины, I (Interventions) – вмешательства и О (Outcomes) – последствия. DRP по коду «Р» делятся на следующие группы: проявления нежелательной реакции ЛП (аллергические/неаллергические), рациональность выбора подозреваемого и сопутствующих ЛП, режима их дозирования и лекарственной формы, ошибки, возникающие в процессе приема ЛП пациентами, вероятность взаимодействия лекарственных средств и иные проблемы. Причины DRP стандартизированные по коду «С» классифицируются следующим образом:

- ✓ DRP, обусловленные выбором подозреваемого лекарственного средства и его дозы;
- ✓ DRP, вызванные применением сопутствующих лекарственных средств и возможностью взаимодействия лекарственных препаратов между собой;
- ✓ пациенто-ориентированные психологические факторы появления случаев DRP (невозможность пациентом принять подозреваемое и/или сопутствующее лекарственное средство);
- ✓ DRP, возникающие в результате низкой информированности врачей и пациентов о рациональном применении ЛС (незнание инструкции к медицинскому применению ЛП и/или протоколов лечения пациентов);
- ✓ DRP, связанные с фармацевтической логистикой (доступностью ЛП).

Вмешательства врача или клинического провизора, обозначенные кодом «I», рассматриваются на 3 уровнях: I уровень – уровень специалиста, назначившего ЛП, II уровень – уровень пациента, III уровень – уровень ЛП. Среди таких вмешательств можно

выделить отмену подозреваемого ЛП, отмену сопутствующих лекарственных средств, а также назначение ЛП для коррекции последствий, вызванных нежелательной реакцией ЛС. Среди последствий DRP (код «О») выделяют 2 основных варианта: проблема DRP полностью решена и проблема DRP не решена [24–27].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью изучения проблем, связанных с применением лекарственных препаратов (DRP), из региональной базы спонтанных сообщений о нежелательных реакциях лекарственных средств ARCADE (Adverse Reactions in Crimea, Autonomic Database) за период 2009-2018 гг. нами было отобрано 415 карт-извещений, соответствующих коду M01 АТХ-классификации

ЛС, что составило 5,96% от общего количества случаев НР за соответствующий период (6960 карт-извещений).

Первый этап работы был посвящен выявлению частоты развития НР при применении отдельных представителей группы НПВС. «Лидерами» по частоте развития НР стали препараты ибупрофен и диклофенак. Частота встречаемости случаев НР для ибупрофена составила 142 случая (34,22% от всего количества случаев НР на НПВС), а для диклофенака – 90 случаев (21,69%). Значительно реже НР возникали при назначении пациентам нимесулида (45 случаев, 10,84%), кеторолака (44 случая, 10,6%) и мелоксикама (23 случая, 5,54%). Частота развития НР при применении других представителей группы M01 представлена в таблице 1.

Таблица 1 – Частота развития нежелательных реакций при применении препаратов группы НПВС, зарегистрированных в Республике Крым за период 2009–2018 гг.

Представители группы НПВС	АТХ-код	Количество карт-извещений, абсолютное значение	Количество карт-извещений от общего количества случаев НР на НПВС, %
Ибупрофен	M01AE01	142	34,22
Диклофенак	M01AB05	90	21,69
Нимесулид	M01AX17	45	10,84
Кеторолак	M01AB15	44	10,60
Мелоксикам	M01AC06	23	5,54
Декскетопрофен	M01AE17	14	3,37
Диклофенак в комбинации с другими препаратами	M01AB55	14	3,37
Лорноксикам	M01AC05	9	2,17
Нимесулид в комбинации	M01AX67	5	1,20
Эторикоксиб	M01AH05	5	1,20
Ацеклофенак	M01AB16	5	1,20
Целекоксиб	M01AH01	3	0,72
Рофекоксиб	M01AH02	3	0,72
Напроксен	M01AE02	2	0,48
Парекоксиб	M01AH04	2	0,48
Комбинации НПВС	M01BX	2	0,48
Ибупрофен комбинации	M01AE51	1	0,24
Мефенамовая кислота	M01AG01	1	0,24
Глюкозамин	M01AX05	1	0,24
Хондроитина сульфат	M01AX25	1	0,24
Комбинация глюкозамина и хондроитина сульфата	M09AX	1	0,24
Кетопрофен	M01AE03	1	0,24
Индометацин	M01AB01	1	0,24

Расчет значений DRP для каждого из представленных случаев НР позволил определить, что в 81 (19,51%) и 91 (21,9%) случае значение DRP был равен 6 и 7 соответственно. Значения DRP в пределах значений 8–10 встречались в 92 случаях (8 DRP – 38 случаев (9,16%), 9 DRP – 20 случаев (4,8%), 10 DRP – 34 случая (8,2%)). Особое внимание стоит уделить картам-извеще-

ниям, значения DRP для которых составило более 10 баллов (124 карты-извещения о НР, 29,9%). Такие высокие показатели вероятнее всего свидетельствуют о нерациональном выборе препарата, дозы НПВС или возможном взаимодействии их с сопутствующими лекарственными препаратами. Распределение частоты отдельных значений DRP для препаратов группы

НПВС представлено на рис. 1. Общее количество DRP для всех случаев развития НР на НПВС составило 3785 (среднее значение составило 9 DRP/пациента).

Следующий этап работы был посвящен изучению значений DRP для отдельных представителей препаратов группы НПВС. Анализ случаев развития

НР НПВС показал, что наиболее высокие значения DRP наблюдались при назначении парекоксиба – 13 проблем (зарегистрирован 1 случай), декскетопрофена – 12,5 DRP (95%ДИ: 7 – 17) и комбинированных препаратов, содержащих диклофенак – 10 DRP (95% ДИ: 5 – 17 DRP).

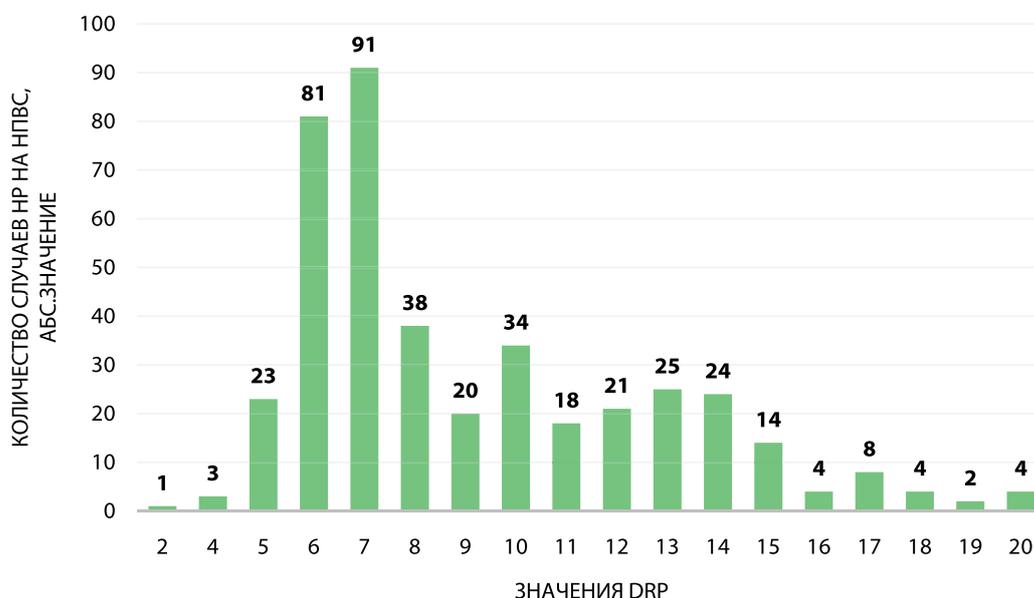


Рисунок 1 – Распределение частоты встречаемости значений DRP в картах-извещениях о НР НПВС.

Средние значения DRP/случай в пределах 9–9,5 наблюдались при применении кеторолака, мелоксикама и ацеклофенака. Обращают на себя внимание высокие показатели максимальных значений DRP для кеторолака и мелоксикама (20 и 19 DRP соответственно), что свидетельствует о нера-

циональном назначении препаратов и высоком риске развития серьезных НР при их применении. Распределение основных представителей группы НПВС по значениям медианы, максимального и минимального значений DRP представлено в таблице 2.

Таблица 2 – Показатели медианы, максимальных и минимальных значений DRP для случаев развития НР при применении препаратов группы НПВС

Представители НПВС	Максимальное значение DRP	Минимальное значение DRP	Медиана DRP	Размах
Декскетопрофен	17	7	12,5	10
Диклофенак комбинации	17	5	10	12
Кеторолак	20	5	9,5	15
Мелоксикам	19	5	9	10
Ацеклофенак	12	5	9	7
Диклофенак	19	6	8	13
Ибупрофен	16	4	7	12
Лорноксикам	10	6	7	4
Нимесулид	17	2	7	15
Целекоксиб	13	6	7	7
Нимесулид комбинации	14	4	7	10
Напроксен	7	5	6	2
Рофекоксиб	8	6	6	2
Эторикоксиб	11	6	6	5

Представленные выше результаты свидетельствуют, что препараты напроксен (неселективный ингибитор циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2)), рофекоксиб и эторикоксиб (представители высокоселективных ингибиторов ЦОГ-2) обладают более высоким профилем безопасности по сравнению с другими представителями группы [28]. Количество DRP при применении данных препаратов было значительно ниже, чем у других представителей группы.

Четвертый этап исследования был посвящен из-

учению путей введения НПВС, вызвавших НР, а также анализу значений DRP при местном, ректальном, внутривенном, внутримышечном и пероральном путях введения лекарственных препаратов. Результаты анализа показали, что наиболее часто НР возникали при приеме НПВС внутрь (per os). Частота таких случаев составила 270 случаев (65%). Значительно реже НР наблюдались при внутримышечном (125 случаев, 30,1%), внутривенном (9 случаев, 2,2%), ректальном (9 случаев, 2,2%) и местном (2 случая, 0,5%) путях введения (рис. 2).

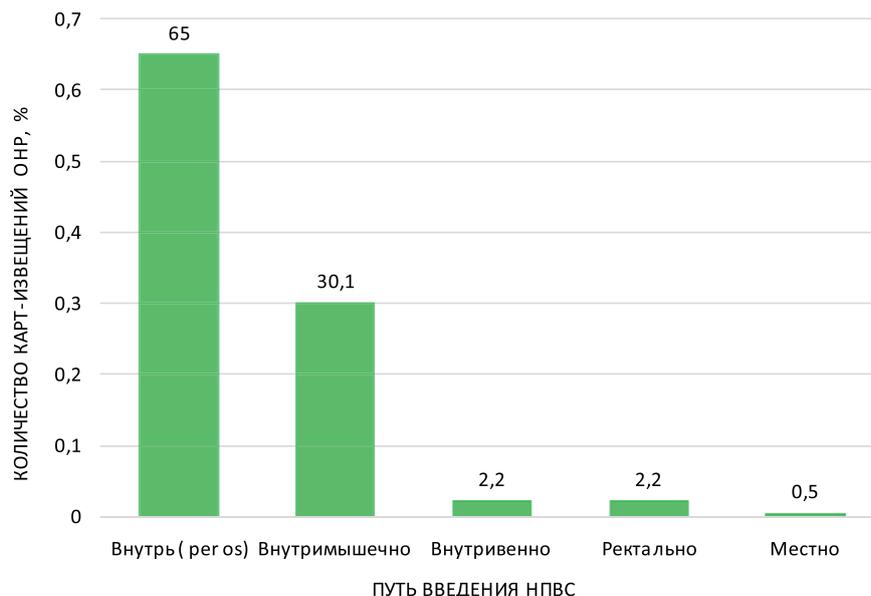


Рисунок 2 – Распределение карт-извещений о НР НПВС по пути введения

Анализ значений DRP для каждого из представленных путей введения позволил выявить, что наибольшая частота высоких значений DRP наблюдалась при ректальном (4 случая НР со значениями DRP более 11, что составило 44,4% от всех случаев НР при данном пути введения) и внутримышечном путях введения НПВС (50 случаев НР со значениями

DRP более 11, что составило 40% от всех случаев НР при внутримышечном применении НПВС). Для перорального приема такие показатели DRP ($DRP \geq 11$) наблюдались в 64 случаях, что составило 23,7% от всего количества карт-извещений с указанным приемом НПВС внутрь. Распределение значений DRP для всех путей введения представлено в таблице 3.

Таблица 3 – Распределение значения DRP при различных путях введения НПВС

Путь введения	Значения DRP	Количество случаев НР, абс. значение	Количество случаев НР, выраженное в %, по отношению ко всем случаям НР при данном пути введения
Внутрь (per os) 270 случаев НР	0-5	23	8,5
	6-10	183	67,8
	11-15	55	20,4
	16-20	9	3,3
Внутримышечно 125 случаев НР	0-5	3	2,4
	6-10	72	57,6
	11-15	37	29,6
Внутривенно 9 случаев НР	6-10	6	66,7
	11-15	3	33,3
	0-5	1	11,1
Ректально 9 случаев НР	6-10	5	55,5
	11-15	4	44,4
	0-5	1	11,1
Местно 2 случая НР	6-10	2	100

Полученные показатели свидетельствуют о более высоком риске развития DRP при использовании парентеральных путей введения, что обусловлено, в первую очередь, особенностями фармакокинетики препаратов при внутримышечном и внутривенном путях введения.

Отдельное внимание было уделено анализу всех случаев НР с показателями DRP равными 18–20. Общее количество таких НР составило 10:5 случаев – при применении кеторолака, 3 и 2 случая НР при применении мелоксикама и диклофенака соответственно. Причинами таких высоких показателей DRP в 8 случаях НР была нерациональная комбинация двух и более НПВС, в 3 – наблюдалось превышение разовых и/или суточных доз подозреваемого лекарственного препарата и в 3 клинических ситуациях имело место превышение указанного в инструкции курса лечения НПВС. Для некоторых случаев НР было характерно одновременное выявление двух и более причин высоких показателей DRP.

По нашему мнению, особый интерес представляет показатель размаха, т.е. разницы между максимальным и минимальным значениями DRP. Он может отражать потенциальный риск возникновения лекарственной проблемы для каждого включенного в анализ препарата, вследствие совершения врачебной ошибки, неопределенности рекомендаций по применению

и т.д. Как следует из представленной выше таблицы 2, с наиболее высоким риском совершения ошибки, определяемой по размаху значений, ассоциируется нимесулид, кеторолак и диклофенак. Без сомнения, итоговый индекс «проблематичности» должен включать не только диапазон значений от минимального к максимальному, но и значения минимума.

Научный интерес представляет также анализ частоты нарушений режима дозирования НПВС (доза низкая или режим дозирования продлен/доза превышена или режим дозирования очень частый), что априори могло быть определяющим фактором возникновения проблем, связанных с лекарственными препаратами. Соответствующая информация о нарушении режима дозирования представлена в категории «Р» квалификационной системы DRP PCNE V5.01, что позволило нам на основании анализа карт-извещений о НР НПВС получить данные по частоте таких нарушений. Результаты анализа свидетельствуют, что превышение дозы подозреваемого лекарственного средства встречалось в 23 случаях (5,53% от общего количества НР на препараты группы НПВС), а случаи назначения ЛС в дозах ниже минимальных терапевтических – в 16 случаях (3,85%). Общее распределение случаев нарушения режима дозирования при назначении препаратов группы НПВС представлено на рисунке 3.

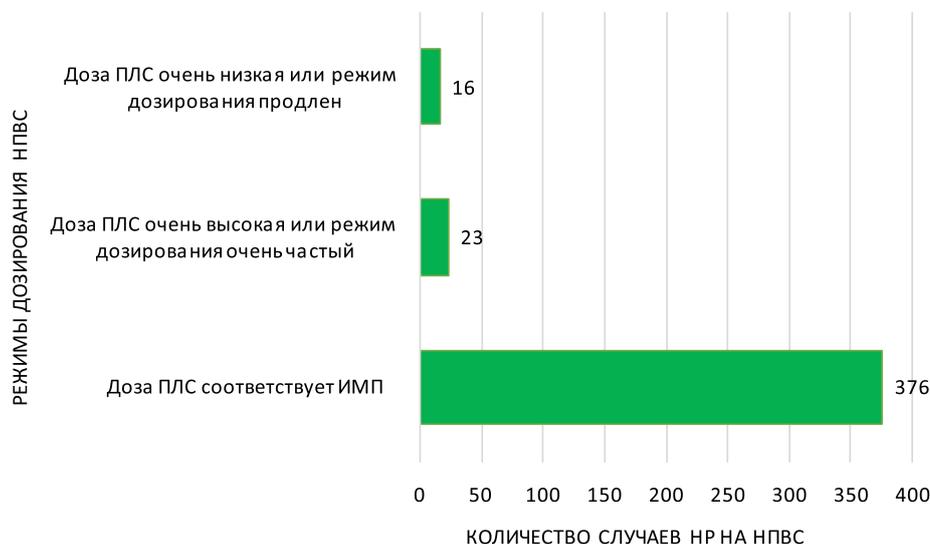


Рисунок 3 – Распределение карт-извещений по количеству случаев НР с нарушениями режима дозирования НПВС.

Стоит отметить, что использование системы выявления DRP в практике врачей, клинических фармакологов и провизоров является важным и перспективным инструментом повышения качества фармакотерапии пациентов и их приверженности к лечению. Для специалистов по безопасности лекарственной терапии показатель DRP позволяет определить приоритетные направления осуществления фармаконадзора.

Результаты анализа позволили выявить отдельных представителей группы НПВС, при назначении которых возможно стоит учитывать высокие риски развития проблем, ассоциированных с применением данных лекарственных препаратов (парекоксиб, декскетопрофен, нимесулид, комбинированные препараты, содержащие диклофенак, кеторолак).

Кроме того, проведение анализа показателей

DRP с помощью квалификационной системы DRP PCNE V5.01 позволило нам определить представителей группы НПВС, обладающих наиболее высоким профилем безопасности. Среди таких препаратов стоит выделить напроксен, рофекоксиб и эторикоксиб, что позволяет использовать эти препараты с наименьшим риском развития DRP.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование системы проблем, связанных с лекарственными препаратами (DRP), для проведения анализа нежелательных реакций препаратов

группы НПВС позволило выделить отдельных представителей группы, которые могут обладать высоким риском развития неблагоприятных последствий при их применении в практической медицине. Среди таких препаратов стоит отметить парекоксиб, декскетопрофен и комбинированные препараты, содержащие диклофенак. Назначение представленных выше препаратов должно проводиться со строгим учетом показаний и противопоказаний к применению, дозы и курса лечения, а также вероятностью возможного взаимодействия этих препаратов с сопутствующими лекарственными средствами.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело какой-либо финансовой поддержки от сторонних организаций.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Binu K.M., Nimmy N.J., Varghese G.P. A survey of Drug related problems identified by community pharmacy in South India // *International Journal of Pharmaceutical, chemical and biological sciences.* – 2012. – Vol. 2, №2. – P. 368–374.
- van Mil J.W., Westerlund L.O., Hersberger K.E., Schaefer M.A. Drug-related problem classification systems // *Ann Pharmacother* – 2004. – Vol. 38, №5. – P. 859–67.
- Roberts M.S., Stokes J.A., King M.A., Lynne T.A., Purdie D.M., Glasziou P.P., Wilson D.A., McCarthy S.T., Brooks G.E., de Looze F.J., Del Mar C.B. Outcomes of a randomized controlled trial of a clinical pharmacy intervention in 52 nursing homes // *Br J Clin Pharmacol.* – 2001. – Vol. 51. – P. 257–265.
- Shareef J., Sandeep B., Shastry C.S. Assessment of Drug related problems in patients with cardiovascular diseases in a Tertiary care teaching hospital // *Journal of Pharmaceutical Care.* – 2014. – Vol. 2, №2. – P. 71–76.
- Adepu R., Adusumilli P.K. Assessment of Drug related problems in patients with chronic diseases through Health Status Survey in a South Indian Rural Community setting // *Indian J Pharm Sci.* – 2016. – Vol. 78, №4. – P. 537–542.
- Eichenberger P.M., Lambert M.L., Kahmann I.V., van Mil J.W., Hersberger K.E. Classification of drug-related problems with new prescriptions using a modified PCNE classification system // *Pharmacy World & Science.* – 2010. – Vol. 3, №32. – P. 362–372. doi: 10.1007/s11096-010-9377-x.
- Pfister B., Jonsson J., Gustafsson M. Drug-related problems and medication reviews among old people with dementia // *BMC Pharmacol Toxicol.* – 2017. – № 8. – P. 52. doi: 10.1186/s40360-017-0157-2.
- Fog A.F., Kvalvaag G., Engedal K., Straand J. Drug-related problems and changes in drug utilization after medication reviews in nursing homes in Oslo, Norway // *Scand J Prim Health Care.* – 2017. – Vol. 35, №4. – P. 329–335. doi: 10.1080/02813432.2017.1397246.
- Hong K., Hong Y.D., Cooke C.E. Medication errors in community pharmacies: The need for commitment, transparency, and research // *Res Social Adm Pharm.* – 2019. – Vol. 15, №7. – P. 823–826. doi: 10.1016/j.sapharm.2018.11.014.
- Hammerlein A., Griese N., Schulz M. Survey of Drug-Related Problems Identified by Community Pharmacies // *The Annals of Pharmacotherapy.* – 2007. – №11. – P. 1852.
- Борецька О.Б. Використання системи ліко-пов'язаних проблем (drug-related problems, DRP) для оцінки якості рецептурних призначень в аптечних закладах // *Управління якістю медичної та фармацевтичної допомоги.* – 2012. – №3. – С. 31–37.
- Adusumilli P.K., Adepu R. Drug related problems: An overview of various classification systems // *Asian J Pharm Clin Res.* – 2014. – Vol. 7, №4. – P. 7–10.
- Wilmer C.M., Huiskes V.J.B., Natsch S., Rennings A.J.M., van den Bemt B.J.F., Bos L.M. Drug-related problems in a clinical setting: a literature review and cross-sectional study evaluating factors to identify patients at risk // *European Journal of Hospital Pharmacy.* – 2015. – Vol. 22, №4. – P. 229–235. Available at: <https://ejhp.bmj.com/content/22/4/229.full>.
- Parthasarathi G., Ramesh M., Kumar J.K., Madaki S. Assessment of Drug Related Problems and Clinical Pharmacists' Interventions in an Indian teaching hospital // *J Pharm Pract Res.* – 2003. – №33. – P. 272–274. doi: 10.1002/jppr2003334272.
- Abraham R.R. Drug Related Problems and Reactive Pharmacist Interventions for inpatients Receiving Cardiovascular Drugs // *IJBMSF.* – 2013. – Vol. 3, №2. – P. 42–48.
- Krähenbühl-Melcher A., Schlienger R, Lampert M, Haschke M., Drewe J., Krähenbühl S. Drug-related problems in hospitals: a review of the recent literature // *Drug Saf.* – 2007. – Vol. 30, №5. – P. 379–407.
- Forster A.J., Murff H.J., Peterson J.F., Gandhi T.K., Bates D.W. The incidence and severity of adverse events affecting patients after discharge from the hospital // *AnnInternMed.* – 2003. – Vol. 138, №3. – P. 161–7.

18. Schlienger R.G., Luscher T.F., Schoenenberger R.A., Haefeli W.E. Academic detailing improves identification and reporting of adverse drug events // *Pharm World Sci.* – 1999. – Vol. 21, №3. – P. 110–5.
19. Greeshma M., Lincy S., Maheswari E., Tharanath S., Viswam S. Identification of Drug-related problems by Clinical Pharmacist in Prescription with Polypharmacy: a prospective interventional study // *J Young Pharm.* – 2018. – Vol. 10, №4. – P. 460–465. doi:10.5530/jyp.2018.10.100.
20. Ayalew M.B., Megersa T.N., Mengistu Y.T. Drug-related problems in medical wards of Tikur Anbessa specialized hospital, Ethiopia // *J ResPharmPract.* – 2015. – Vol. 4, №4. – P. 216–21. doi: 10.4103/2279-042X.167048.
21. Чернов А.А., Клейменова Е.Б., Сычев Д.А., Абыльмажинова А.А., Яшина Л.П., Отделенов В.А., Пающик С.А. Причины геморрагических осложнений у пациентов стационара, получающих лечебные дозы антикоагулянтов // *Клиническая фармакология и терапия.* – 2018. – Т. 27, №5. – С. 23–29. doi: 10.32756/0869-5490-2018-5-23-29.
22. Matveev A.V., Egorova E.A., Matveeva N.V., Krashenninikov A.E., Dormidor A.G. Adverse reactions of ACE inhibitors. Retrospective analysis of spontaneous reports in local database // *The New Armenian Medical Journal.* – 2019. – Vol. 13, №2. – P. 10–17. doi:10.1371/journal.pone.0155385.
23. ATC/DDD Index 2019. Available at: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/
24. Eichenberger P.M., Lampert M.L., Kahmann I.V. Classification of drug-related problems with new prescriptions using a modified PCNE classification system // *Pharm World Sci.* – 2010. – №32. – P. 362–372.
25. Зіменковський А.Б., Ривак Т.Б., Ханик Н.Л. Ліко-пов'язані проблеми фармакотерапії (DRP) та методологія їх оцінки і стандартизації // *Раціональна фармакотерапія.* – 2011. – №1–2. – С. 16–22.
26. Зіменковський А.Б., Ривак Т.Б., Ханик Н.Л. Концепція DRP як частина філософії раціональної фармакотерапії, інтегрованої з системою фармацевтичної опіки // *Раціональна фармакотерапія.* – 2011. – №1–2. – С. 23–29.
27. Classification for Drug related problems. V 6.2. 14.01.2010. Pharmaceutical Care Network Europe Foundation. «The PCNE Classification V 6.2».
28. Воронков А.В., Дьякова И.Н., Огурцов Ю.А., Жидкова Ю.Ю., Гамзелева О.Ю. Изучение влияния оригинальных многокомпонентных гелей на формирование патологического рубца с использованием нового методического подхода // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2014. – Т. 77, №9. – С. 38–42.

АВТОРЫ

Матвеев Александр Васильевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренней медицины №1 с курсом клинической фармакологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского»; исполнительный директор АНО «Национальный научный центр фармаконадзора». ORCID 0000-0002-6636-3950. E-mail: avmcsmu@gmail.com

Крашенинников Анатолий Евгеньевич – кандидат фармацевтических наук, генеральный директор АНО «Национальный научный центр фармаконадзора». ORCID 0000-0002-7791-6071. E-mail: anatoly.krashenninikov@drugsafety.ru

Егорова Елена Александровна – кандидат фармацевтических наук, ассистент кафедры внутренней медицины №1 с курсом клинической фармакологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». ORCID 0000-0003-4012-2523. E-mail: elena212007@rambler.ru

Коняева Елена Ивановна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры внутренней медицины №1 с курсом клинической фармакологии Медицинской академии им. С.И. Георгиевского ФГАОУ ВО «КФУ им. В.И. Вернадского». E-mail: konyaeva.simferopol@gmail.com

УДК: 616.45-001.1.3



ГЛИПРОЛИНЫ КАК МОДУЛЯТОРЫ ИММУНОРЕАКТИВНОСТИ В УСЛОВИЯХ «СОЦИАЛЬНОГО» СТРЕССА

М.А. Самотруева¹, А.Л. Ясенявская¹, О.А. Башкина¹,
Н.Ф. Мясоедов², Л.А. Андреева²

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Астраханский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Россия, 414000, г. Астрахань, ул. Бакинская, д. 121

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики Российской академии наук, Россия, 123182, г. Москва, площадь академика И.В. Курчатова, д. 2

E-mail: yasen_9@mail.ru

Получено 21.06.2019

Рецензия (1) 08.08.2019

Рецензия (2) 14.08.2019

Принята к печати 20.08.2019

Важнейшим направлением развития современной медицинской науки является изучение защитных, компенсаторных и патологических реакций организма, возникающих в ответ на действие различных стрессогенных факторов с целью последующей разработки способов фармакологической коррекции. В качестве перспективных средств коррекции стресс-индуцированных нарушений иммунитета интерес представляют представители группы глипролинов: лекарственный препарат Селанк и пептидное соединение Pro-Gly-Pro.

Цель исследования – изучение иммуномодулирующего действия глипролинов на модели «социального» стресса.

Материалы и методы. Эксперимент выполнен на нелинейных крысах-самцах (6–8 мес.). В качестве экспериментального «социального» стресса использовали модель сенсорного контакта. Животные были разделены на группы (n=10): группа «контроль»; группа животных с агрессивным и субмиссивным типами поведения, сформированные в условиях экспериментального «социального» стресса в течение 20 дней и 2 опытные группы – животные, которым на фоне «социального» стресса внутрибрюшинно вводили Селанк (100 мкг/кг) и Pro-Gly-Pro (100 мкг/кг) 1 раз в сутки в условиях стрессорного воздействия в течение 20 дней. Функциональную активность иммунной системы изучали с помощью стандартных иммунофармакологических методов: реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), реакции прямой гемагглютинации (РПГА), латексного теста по изучению фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови и оценки лейкоцитарной формулы.

Результаты. Установлено, что в условиях «социального» стресса изменения иммунного реагирования имеют разнонаправленный характер, что подтверждает теорию «иммунного дисбаланса» при действии стрессирующих факторов. В результате изучения влияния глипролинов в условиях «социального» стресса было установлено, что Селанк и Pro-Gly-Pro проявили себя как эффективные иммунокорректоры, восстанавливая клеточную и гуморальную реакции иммуногенеза, а также фагоцитарную активность нейтрофилов и показатели лейкоцитарной формулы.

Заключение. Данное исследование расширяет представление об общих закономерностях иммунореагирования в условиях стресс-индуцированных состояний с целью последующей разработки фармакологической стратегии коррекции выявленных нарушений посредством веществ нейропептидной структуры.

Ключевые слова: глипролины, Селанк, Pro-Gly-Pro, «социальный» стресс, реакция гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ), реакция прямой гемагглютинации (РПГА), фагоцитарный индекс (ФИ), фагоцитарное число (ФЧ), лейкоцитарная формула

Список сокращений: РГЗТ – реакция гиперчувствительности замедленного типа, РПГА – реакция прямой гемагглютинации, ФИ – фагоцитарный индекс, ФЧ – фагоцитарное число

Для цитирования: М.А. Самотруева, А.Л. Ясенявская, О.А. Башкина, Н.Ф. Мясоедов, Л.А. Андреева. Глипролины как модуляторы иммунореактивности в условиях «социального» стресса. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4):224-230. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-224-230

© М.А. Самотруева, А.Л. Ясенявская, О.А. Башкина, Н.Ф. Мясоедов, Л.А. Андреева, 2019

For citation: M.A. Samotrueva, A.L. Yasenyavskaya, O.A. Bashkina, N.F. Myasoedov, L.A. Andreeva. Glyprolines as modulators of immunoreactivity within conditions of "social" stress. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(4):224-230. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-224-230

GLYPROLINES AS MODULATORS OF IMMUNOREACTIVITY WITHIN CONDITIONS OF “SOCIAL” STRESS

M.A. Samotrueva¹, A.L. Yasenyavskaya¹, O.A. Bashkina¹, N.F. Myasoedov², L.A. Andreeva²

¹ Astrakhan State Medical University,
121, Bakinskaya Str., Astrakhan, Russia, 414000

² Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,
2, Academician Kurchatov Square, Moscow, Russia, 123182

E-mail: yasen_9@mail.ru

Received 21 June 2019

Review (1) 8 August 2019

Review (2) 14 August 2019

Accepted: 20 August 2019

The most important direction in the development of modern medical science is the study of protective, compensatory and pathological reactions of the organism that occur in response to various stress factors. The aim of the study is the subsequent development of methods for pharmacological correction of these reactions. The remedies for the correction of stress-induced immunity disorders are represented by the glyprolin group – the Selank drug and the Pro-Gly-Pro peptide compound – and are of particular interest.

The aim of the experiment was to study the immunomodulating effect of glyprolines on the basis of the “social stress” model.

Materials and methods. The experiment was performed on non-linear male rats aged 6-8 months. A model of a sensor contact was used as a model of the experimental “social stress”. The animals were divided into groups (n = 10): a “control” group was represented by individuals with aggressive and submissive types of behavior, formed within the conditions of the experimental “social stress” for 20 days; and 2 experimental groups in which the animals were intraperitoneally administered Selank (100 µg/kg) and Pro-Gly-Pro (100 µg/kg) against the background of the experimental “social” stress once a day for 20 days. A functional activity of the immune system was studied on the basis of standard immunopharmacological tests: a delayed-type hypersensitivity test (DTH test), a direct agglutination test (DAT), a latex test for studying the Neutrophil phagocytic rate of peripheral blood, and the assessment of the leucogram.

Results. It has been established, that within the conditions of the “social” stress, the changes in the immune response are multidirectional. That fact confirms the theory of “the immune disbalance” caused by the action of stressors. As a result of studying the effect of glyprolines within the conditions of “the social stress”, Selank and Pro-Gly-Pro proved to be effective immunocorrectors, restoring cellular and humoral immunogenesis reactions as well as the phagocytic activity of neutrophils and leucogram indices.

Conclusion. The carried out study expands understanding of the immunoreaction pathogenesis within the stress-induced conditions in order to further develop a pharmacological strategy for correcting the revealed disorders through the substances of the neuropeptide structure.

Keywords: glyprolines, Selank, Pro-Gly-Pro, social stress; delayed-type hypersensitivity (DTH) test; direct agglutination test (DAT); phagocytic index (Phi); phagocytic number (PhN), leucogram

ВВЕДЕНИЕ

Исследования, посвященные изучению механизмов развития дисфункциональных изменений со стороны иммунной системы в условиях стресса, а также разработка способов их коррекции, представляют собой одно из основных направлений развития современной иммунологии и фармакологии. Действие стрессогенных факторов, вне зависимости от их природы, способствует «напряжению» гомеостаза организма в целом и иммунной системы в частности, что подтверждено многими работами по изучению адаптационного синдрома, в которых, например, процессы инволюции тимико-лимфатического аппарата, рассматриваются, как обязательная часть стрессовой триады. Стресс-индуцированные иммунные нарушения могут развиваться на любой стадии стрессорной реакции, способствуя снижению адаптивных возможностей организма и развитию, например,

вторичных иммунодефицитных состояний, аутоиммунных и аллергических процессов [1–3].

В последнее время значительно повысился интерес к исследованиям, направленным на поиск средств коррекции изменений иммунного ответа, морфофункциональных нарушений в иммунокомпетентных клетках и органах на фоне воздействия различных факторов стресса [4, 5]. Величайшим достижением молекулярной биологии и медицины стала возможность синтеза биорегуляторов, в частности пептидной природы, и создание на их основе новых высокоэффективных лекарств, проявляющих в том числе и стресспротекторные свойства [6–8]. В результате исследований последних лет выделен новый класс регуляторных пептидов — глипролинов, большинство из которых перспективны в качестве терапевтических агентов [9]. Следует отметить, что на данный момент в клинической медицине активно используется представитель

данной группы – Селанк, синтезированный в Институте молекулярной генетики Российской академии наук. Данный лекарственный препарат был создан путем присоединения трипептида Pro-Gly-Pro к С-концам нестабильного регуляторного пептида – тафтсина, что позволило решить проблему стабилизации *in vivo* и дополнить его эффектами самого Pro-Gly-Pro [10]. Наряду с уже зарегистрированным препаратом Селанк, существенный интерес с позиций перспективности практического внедрения в клиническую фармакологию представляет и сам трипептид Pro-Gly-Pro. Этот пептид является структурным фрагментом Селанка, и кроме того обладает своей собственной физиологической активностью [9, 11]. Анализ экспериментальных данных подтверждает уникальность свойств препаратов глипролиновой структуры, заключающейся в сочетании психо-, нейро- и иммуностропной активности [9, 12, 13], и делает перспективным изучение различных аспектов фармакологического действия глипролинов с целью расширения возможностей практического применения.

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ: изучение иммуномодулирующего действия глипролинов на модели «социального» стресса.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Лабораторные исследования

Исследование выполнено на 70 белых нелинейных крысах (самцы, 6–8-месячного возраста), полученных из вивария лаборатории физиологии, морфологии, генетики и биомедицины ФГБОУ ВО «Астраханский государственный университет» (Россия, Астрахань). Крысы на протяжении всего эксперимента содержались в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВО «Астраханский ГМУ» Минздрава России. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Директивы Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях (2010/63/EU), правилами, принятым «Международной конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей» (Страсбург, 1986), Приказом Министерства здравоохранения РФ № 199н от 01.04.2016г. «Об утверждении Правил лабораторной практики» и протоколу Этического комитета ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России № 8 от 24 ноября 2015 г.

Экспериментальная модель

В качестве экспериментальной модели был выбран «социальный» стресс. Основным методическим приемом данной экспериментальной модели является постоянное проживание партнеров в условиях сенсорного контакта, который формирует у животных агрессивный и субмиссивный типы поведения [14–17]. Эта модель широко используется для

изучения различных аспектов влияния хронического опыта агрессии на нейрохимию мозга, физиологические функции, поведение и состояние животных, и является высокопродуктивной в плане получения новых и оригинальных данных и возможностей их интерпретации, что позволяет говорить о релевантности данного состояния животных тому, что наблюдается у людей.

Самцов в условиях эксперимента попарно помещали в клетки, разделенные перегородкой, препятствующей физическому контакту, но имеющей отверстия, обеспечивающие сенсорный контакт. Каждый день перегородку снимали на 10 мин, что приводило в подавляющем большинстве к агонистическим столкновениям (конфронтациям) [14]. Были сформированы группы животных с альтернативными типами поведения: агрессивным типом – в случае повторного опыта побед (победитель, агрессор), и субмиссивным – в случае поражений (жертва). Проявление агрессии у экспериментальных животных выражалось в виде вертикальных и боковых стоек («угроза») или атаки. Социальная пассивность проявлялась различными актами индивидуального поведения: локомоцией, обнюхиванием, аутогрумингом, движениями на месте, вертикальными «защитными» стойками, неподвижностью.

Экспериментальные группы

Лабораторные животные с агрессивным и субмиссивным типом поведения были разделены на группы по 10 особей:

- группа интактных самцов;
- группа животных, которые на протяжении 20 дней подвергались стрессорному воздействию (сенсорный контакт);
- группа особей, получавших внутривентриально Селанк в дозе 100 мкг/кг/сут с 1-го дня стрессорного воздействия (сенсорный контакт) курсом 20 дней;
- группа крыс, получавших внутривентриально Pro-Gly-Pro в дозе 100 мкг/кг/сут с 1-го дня стрессорного воздействия (сенсорный контакт) курсом 20 дней.

Методы

Изучение функциональной активности иммунной системы животных проводили согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» с использованием стандартных иммунофармакологических методов [18]: реакции гиперчувствительности замедленного типа (РГЗТ) с определением индекса реакции, реакции прямой гемагглютинации (РПГА) с определением титра антител, латексного теста по изучению фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови. Кроме того, определяли общее количество лейкоцитов в крови и лейкоцитарную

формулу. Важно отметить, что при формировании специфического иммунного ответа у лабораторных животных в условиях эксперимента при постановке РГЗТ и РПГА в качестве антигенного стимула применяли корпускулярный Т-зависимый антиген – эритроциты барана.

Для определения фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови применяли латексный тест с использованием гепаринизированной крови животных. В качестве тест-объекта использовали меланово-формальдегидные латексы. Активность нейтрофилов определяли по следующим показателям: фагоцитарный индекс или % фагоцитоза (количество нейтрофилов с латексом из 100); фагоцитарное число (кол-во частиц латекса/100).

Для определения содержания количества лейкоцитов крови исследуемых животных осуществляли забор крови при выведении животных из эксперимента из крупных сосудов шейной области. Подсчет осуществляли в камере Горяева. Процентное соотношение отдельных форм лейкоцитов оценивали в мазках крови, окрашенных по Романовскому-Гимзе.

Статистическая обработка результатов

Результаты эксперимента статистически обрабатывали с использованием программ: Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft, США), BIOSTAT 2008 Professional 5.1.3.1. Для обработки полученных результатов использовали параметрический метод с определением t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе проведенных экспериментов было установлено, что длительные межсамцовые конфронтации вызывали подавление РГЗТ и РПГА у животных и с агрессивным и с субмиссивным типами поведения по сравнению с контрольными животными. Индекс реакции гиперчувствительности замедленного типа у агрессоров снизился более чем на 45% ($p < 0,01$), у жертв – более чем на 30% ($p < 0,05$). В отношении гуморального звена иммунитета у животных-агрессоров наблюдались более выраженные изменения показателей: снижение титра антител у агрессоров – более чем на 80% ($p < 0,001$), у жертв – более чем на 50% ($p < 0,001$) по сравнению с контрольными показателями (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние глипролинов на формирование РГЗТ и РПГА в условиях «социального» стресса

Экспериментальные группы (n=10)	Показатели (M ± m)	Индекс РГЗТ, %	Титр антител в РПГА, Ig
Животные с агрессивным типом поведения			
Контроль		30,83 ± 3,52	224,77 ± 23,27
«Социальный» стресс		16,57 ± 1,75**	40,46 ± 5,81***
Селанк (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		30,38 ± 3,48##	210,56 ± 22,54###
Pro-Gly-Pro (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		29,40 ± 3,63##	253,21 ± 23,27###
Животные с субмиссивным типом поведения			
Контроль		30,83 ± 3,52	224,77 ± 23,27
«Социальный» стресс		20,78 ± 2,54*	103,55 ± 11,64***
Селанк (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		28,26 ± 2,66#	231,19 ± 34,91##
Pro-Gly-Pro (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		28,57 ± 2,55#	138,71 ± 12,84#

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – относительно контроля; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – относительно группы «стресс» (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений).

Как видно из представленных в таблице 1 результатов, глипролины способствовали сохранению показателей обоих звеньев иммунитета. Индекс РГЗТ у агрессоров был выше в условиях введения Селанка и Pro-Gly-Pro в среднем на 80% ($p < 0,01$), у жертв – в среднем на 30% ($p < 0,05$) относительно стрессированных животных. Что касается образования антиэритроцитарных антител в РПГА, то показатели титра геагглютининов также оставались выше значений группы «стресс» у животных с агрессивным типом поведения в среднем более чем в 5 раз ($p < 0,001$). У животных с субмиссивным типом поведения при введении Селанка показатель был выше, чем в группе «стресс» в 2,2 раза, а в группе,

получавшей Pro-Gly-Pro – в 1,3 раза ($p < 0,05$, $p < 0,01$) (табл. 1).

При изучении показателей фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови животных, подверженных действию «социального» стресса, было выявлено повышение фагоцитарного индекса (ФИ) и фагоцитарного числа (ФЧ) у крыс как с агрессивным, так и с субмиссивным типами поведения. Отмечалось увеличение фагоцитарного индекса на 18% у агрессоров ($p > 0,05$) и практически на 30% у жертв ($p < 0,05$), фагоцитарного числа – на 40% у агрессоров и на 20% у жертв ($p > 0,05$), что свидетельствует о гиперреактивности неспецифического звена иммунной системы (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние глипролинов на фагоцитарную активность нейтрофилов в условиях «социального» стресса

Экспериментальные группы (n=10)	Показатели (M ± m)	Фагоцитарный индекс	Фагоцитарное число, %
Животные с агрессивным типом поведения			
Контроль		17,7 ± 1,68	53,3 ± 3,66
«Социальный» стресс		21,0 ± 1,85	74,3 ± 7,37*
Селанк (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		16,3 ± 1,87	57,6 ± 4,23
Pro-Gly-Pro (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		15,9 ± 1,74#	58,7 ± 3,23
Животные с субмиссивным типом поведения			
Контроль		17,7 ± 1,68	53,3 ± 3,66
«Социальный» стресс		22,9 ± 1,61*	63,7 ± 4,73
Селанк (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		18,4 ± 1,58	50,5 ± 4,65
Pro-Gly-Pro (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		20,2 ± 1,83	54,0 ± 3,72

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – относительно контроля; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – относительно группы «стресс» (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений).

При оценке показателей фагоцитоза в группе животных, получавших глипролины (Селанк, Pro-Gly-Pro) на фоне воздействия «социального» стресса, было установлено, что введение данных соединений приводит к сохранению параметров неспецифической иммунореактивности. Снижение фагоцитарного числа отмечалось у агрессоров и жертв в среднем на 20% ($p > 0,05$) по сравнению со стрессированными животными. При оценке фагоцитарного индекса у агрессоров наблюдалось незначительное снижение данного показателя, у жертв – его сохранение на уровне интактных животных. При этом хотелось бы отметить, что наиболее выраженные изменения исследуемых показателей были отмечены в условиях введения трипептида Pro-Gly-Pro у агрессоров, но менее выражены у жертв (табл. 2).

Важным этапом нашей работы было определение общего количества лейкоцитов, а также изучение показателей лейкоцитарной формулы. В условиях «социального» стресса отмечалось снижение общего количества лейкоцитов ($p < 0,05$) как у агрессоров (–29,1%), так и у жертв (–28,2%) по отношению к показателям контрольной группы. В лейкоцитарной формуле у стрессированных животных отмечалось снижение процентного содержания эозинофилов на 28,6% ($p < 0,05$) у агрессоров и более чем на 40% ($p < 0,01$) у жертв. Также следует отметить статистически значимое увеличение сегментоядерных нейтрофилов в среднем в 2 раза ($p < 0,001$), палочкоядерных – более чем на 50% ($p < 0,01$) у агрессоров и практически в 2 раза у жертв ($p < 0,01$) (табл. 3).

Установлено, что в группе животных, которым вводили глипролины на фоне стресса, показатель общего количества лейкоцитов был выше относительно зна-

чений контрольных значений. Введение данных препаратов у стрессированных животных способствовало увеличению общего количества лейкоцитов относительно группы «стресс»: в группе агрессоров введение Селанка и Pro-Gly-Pro – практически в 2 раза ($p < 0,001$ и $p < 0,01$ соответственно); в группе жертв Селанк – более чем в 1,5 раза ($p < 0,01$), при введении Pro-Gly-Pro отмечались незначительные изменения ($p > 0,05$).

Количество эозинофилов у агрессоров под воздействием Селанка понижалось меньше, чем у животных без фармакологической поддержки. Введения Pro-Gly-Pro стрессированным животным способствовало сохранению и было выше относительно группы «стресс» на 30% ($p < 0,05$). В лейкоцитарной формуле у крыс с субмиссивным типом поведения определены изменения процентного содержания эозинофилов в сторону увеличения, что составило в среднем 31% ($p < 0,05$) относительно стрессированных особей. Кроме того, у особей с агрессивным типом поведения введение Селанка на фоне стресса приводило к сохранению содержания палочкоядерных форм нейтрофилов относительно интактных животных, что было ниже на 12% ($p < 0,05$) относительно стрессированных животных. В условиях введения Pro-Gly-Pro отмечалось повышение, однако менее выраженное, чем в группе негативного контроля по сравнению с контрольными показателями. При введении Селанка и Pro-Gly-Pro у животных с субмиссивным типом поведения количество палочкоядерных нейтрофилов было ниже значений группы «стресс» в среднем на 50% ($p < 0,01$ и $p < 0,01$ соответственно). Процентное содержание сегментоядерных форм нейтрофилов было ниже во всех группах более чем на 40% относительно стрессированных животных (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние глипролинов на показатели лейкоцитарной формулы животных в условиях «социального» стресса

Экспериментальные группы (n=10)	Показатели (M ± m)	Общее количество лейкоцитов, $\times 10^9/\text{л}$	Эозинофилы, %	Палочкоядерные нейтрофилы, %	Сегментоядерные нейтрофилы, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %
Животные с агрессивным типом поведения							
Контроль		11,7 ± 0,93	2,8 ± 0,33	2,2 ± 0,23	12,7 ± 1,59	81,5 ± 5,95	0,83 ± 0,15
«Социальный» стресс		8,3 ± 0,82*	2,0 ± 0,21*	3,4 ± 0,25**	26,7 ± 1,81***	67,1 ± 4,27	0,71 ± 0,10
Селанк (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		15,7 ± 1,24###	2,4 ± 0,20	2,1 ± 0,36#	16,0 ± 2,10##	78,7 ± 4,87	0,86 ± 0,11
Pro-Gly-Pro (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		15,9 ± 1,54##	2,6 ± 0,21#	3,0 ± 0,60	16,1 ± 1,52##	77,0 ± 3,81	0,86 ± 0,11
Животные с субмиссивным типом поведения							
Контроль		11,7 ± 0,93	2,8 ± 0,33	2,2 ± 0,23	12,7 ± 1,59	81,5 ± 5,95	0,83 ± 0,15
«Социальный» стресс		8,4 ± 0,77*	1,6 ± 0,11**	4,1 ± 0,40**	27,1 ± 2,11***	66,4 ± 4,77	0,71 ± 0,10
Селанк (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		13,1 ± 0,58###	2,1 ± 0,22#	2,1 ± 0,37##	16,1 ± 2,57##	78,9 ± 4,87	0,86 ± 0,11
Pro-Gly-Pro (100 мкг/кг/сут) + «социальный» стресс		9,7 ± 0,69	2,1 ± 0,22#	2,0 ± 0,30##	15,0 ± 1,51###	79,9 ± 5,01	1,0 ± 0,10#

Примечание: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$; *** – $p < 0,001$ – относительно контроля; # – $p < 0,05$; ## – $p < 0,01$; ### – $p < 0,001$ – относительно группы «стресс» (t-критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони для множественных сравнений).

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного эксперимента было установлено, что под воздействием «социального» стресса изменения иммунореактивности имеют разнонаправленный характер, что свидетельствует о формировании иммунного дисбаланса, проявляющегося активацией одних и подавлением других звеньев иммунитета. Так, стрессирование животных с агрессивным и субмиссивным типами поведения сопровождалось подавлением показателей клеточного и гуморального звеньев иммунитета, на фоне увеличения фагоцитарного индекса и фагоцитарного числа. Кроме этого, выявлены характерные проявления стресс-реакций со стороны системы крови: снижение общего количества лейкоцитов и эозинофилов, а также увеличение нейтрофилов.

В результате изучения активности глипролинов в условиях «социального» стресса было установлено, что применяемые соединения в опытных группах проявили себя как эффективные иммунокорректоры, сохраняя реакции иммуногенеза (клеточную и гуморальную) и показатели фагоцитарной актив-

ности, а также оказывая на лейкоцитарные ростки крови протекторный эффект. Полученные данные свидетельствуют о наличии у изучаемых соединений иммуномодулирующих свойств. Важно отметить, что влияние глипролинов на иммунную систему наблюдали и ранее [19, 20, 21], но в данном аспекте действие пептидов изучается впервые.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, данное исследование актуализирует поиск новых иммунокорректоров среди представителей нового класса регуляторных пептидов – глипролинов, большинство из которых перспективны в качестве терапевтических агентов. Фундаментальный подход данной работы подчеркивает важность научных изысканий в области иммунореагирования в условиях стресс-индуцированных состояний, в частности «социального» стресса, с целью последующей разработки фармакологической стратегии коррекции посредством Селанка и его фрагментов, как представителей глипролинов, характеризующихся широким спектром действия, а также высокой степенью безопасности.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант РФФИ № 19-04-00461.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Булгакова О.С. Иммунитет и различные стадии стрессорного воздействия // Успехи современного естествознания. – 2011. – № 4. – С. 31–35.
2. Хныченко Л.К., Сапронов Н.С. Стресс и его роль в развитии патологических процессов // Обзоры по клин. фармакол. и лек. терапии. – 2003. – Т. 2, № 3. – С. 2–15.
3. Deak T., Quinn M., Cidlowski J.A., Victoria N.C., Murphy

- A.Z., Sheridan J.F. Neuroimmune mechanisms of stress: sex differences, developmental plasticity, and implications for stress-related disease // *Stress*. – 2015. – Vol. 18, № 4. – P. 367–380. DOI: 10.3109/10253890.2015.1053451
4. Титов В.Н. Биологическая функция стресса, врожденный иммунитет, реакция воспаления и артериальная гипертензия // *Клиническая лабораторная диагностика*. – 2008. – № 12. – С. 3–16.
 5. Федорова О.В., Краюшкина Н.Г., Шефер Е.Г. Постстрессовая модуляция органов иммуногенеза // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета*. – 2010. – Т. 3, № 35. – С. 8–12.
 6. Хавинсон В.Х., Кветной И.М., Ашмарин И.П. Пептидергическая регуляция гомеостаза // *Успехи современной биологии*. – 2002. – Т. 122, № 2. – С. 190–203.
 7. Smith E.M. Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis // *Brain, Behavior, and Immunity*. – 2008. – Vol. 22, № 1. – P. 3–14. DOI: 10.1016/j.bbi.2007.08.005
 8. Ашмарин И.П., Королева С.В. Закономерности взаимодействия и функциональный континуум нейропептидов (на пути к единой концепции): Обзор // *Вестник РАМН*. – 2002. – № 6. – С. 40–48.
 9. Ляпина Л.А., Мясоедов Н.Ф., Григорьева М.Е., Шубина Т.А., Андреева Л.А. Современная концепция регуляторной роли пептидов глипролинового ряда в коррекции функции системы гемостаза при развитии сахарного диабета // *Известия Российской академии наук, серия биологическая*. – 2013. – № 4. – С. 453–462.
 10. Телешова Е.С., Бочкарев В.К., Сюняков Т.С., Бугаева Т.П., Незнамов Г.Г. Результаты клинико-фармакологического исследования пептидного анксиолитика селанка. // *Психиатрия*. – 2010. – Т. 46, №4. – С. 26–35.
 11. Сторожевых Т.П., Тухбатова Г.Р., Сенилова Я.Е., Пинелис В.Г., Андреева Л.А., Мясоедов Н.Ф. Влияние семакса и его фрагмента Pro-Gly-Pro на кальциевый гомеостаз нейронов и их выживаемость в условиях глутаматной токсичности // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2007. – Т. 143, № 5. – С. 538–541.
 12. Копылова Г.Н., Бакаева З.В., Бадмаева С.Е., Умарова Б.А., Самонина Г.Е., Гусева А.А. Терапевтические эффекты глипролинов (PGP, GP, PG) в отношении стрессогенных нарушений поведения крыс // *Бюлл. Эксперим. биологии и медицины*. – 2007. – Т.143, №2. – С. 124–127.
 13. Скребицкий В.Г., Касян А.П., Поваров И.С., Кондратенко П.В., Сломинский П.А. Нейропептидный препарат Селанк: биологическая активность и фундаментальные механизмы действия // *Нервные болезни*. – 2016. – № 4. – С. 52–56.
 14. Кудрявцева Н.Н. Серотонергический контроль агрессивного поведения: новые подходы – новые интерпретации (обзор) // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. – 2015. – Т. 65, № 5. – С. 546. DOI: 10.7868/S0044467715050081
 15. Avgustinovich D.F., Kovalenko I.L., Kudryavtseva N.N. A model of anxious depression: persistence of behavioral pathology // *Neurosci and Behav Physiol*. – 2005. – Vol. 35, № 9. – P. 917–924. DOI: 10.1007/s11055-005-0146-6
 16. Grippo A.J., Wu K.D., Hassan I., Carter C.S. Social isolation in prairie voles induces behaviors relevant to negative affect: toward the development of a rodent model focused on co-occurring depression and anxiety // *Depression and Anxiety*. – 2008. – №25. – P. 17–26. DOI: 10.1002/da.20375
 17. Koolhaas J.M., de Boer S.F., Buwalda B., Meerlo P. Social stress models in rodents: Towards enhanced validity // *Neurobiol Stress*. – 2017. – Feb; 6: P. 104–112. DOI: 10.1016/j.ynstr.2016.09.003
 18. Миронов Н.А., Бунятян Н.Д., Васильев Н.А., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепехин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В., Утешев Д.Б., Яворский А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К; 2013. – 944 с.
 19. Snelgrove R.J. Targeting of a common receptor shared by CXCL8 and N-Ac-PGP as a therapeutic strategy to alleviate chronic neutrophilic lung diseases // *Eur. J. Pharmacol*. – 2011. – № 667. – P. 1–5. DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.05.073
 20. Kolomin T., Shadrina M., Morozova M., Volkova A., Andreeva L., Slominsky P. et al. The temporary dynamics of inflammation-related genes expression under tuftsin analog Selank action // *Molecular Immunology*. – 2014. – Vol. 58, № 1. – P. 50–55. DOI: 10.1016/j.molimm.2013.11.002.
 21. Volkova A., Shadrina M., Kolomin T., Andreeva L., Limborska S., Myasoedov N. et al. Selank administration affects the expression of some genes involved in gabaergic neurotransmission // *Frontiers in Pharmacology*. – 2016. – № 7. – P. 31.

АВТОРЫ

Самотруева Марина Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID: 0000-0001-5336-4455. E-mail: ms1506@mail.ru

Ясенявская Анна Леонидовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-2998-2864. E-mail: yasen_9@mail.ru

Башкина Ольга Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой

факультетской педиатрии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-4168-4851. E-mail: bashkina1@mail.ru

Мясоедов Николай Федорович – академик РАН, профессор, федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Российской академии наук. ORCID: 0000-0003-1294-102X. E-mail: nfm@img.ras.ru

Андреева Людмила Александровна – руководитель сектора, федеральное государственное бюджетное учреждение Институт молекулярной генетики Российской академии наук. ORCID: 0000-0002-3927-8590. E-mail: landr@img.ras.ru

УДК 615.243.4: 616.33: 547.785.51



ИЗУЧЕНИЕ АНТИСЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ДИНИТРАТА 2-ФЕНИЛ-9-ДИЭТИЛАМИНОЭТИЛИМИДАЗО[1,2-А] БЕНЗИМИДАЗОЛА МЕТОДОМ НЕПРЕРЫВНОЙ ПЕРФУЗИИ ЖЕЛУДКА КРЫС

М.В. Черников, М.А. Оганова, А.С. Герасименко, Е.А. Артемьев

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, Калинина, 11

E-mail: pharmax@list.ru

Получено 26.06.2019

Рецензия (1) 22.07.2019

Рецензия (2) 05.08.2019

Принята к печати 15.08.2019

Эффективная фармакотерапия кислотозависимых заболеваний ЖКТ на сегодняшний день остается актуальной проблемой современной гастроэнтерологии. В связи с этим, продолжается поиск новых лекарственных препаратов, обладающих выраженной антисекреторной активностью, с целью безопасного и эффективного контроля кислотопродукции.

Цель данного исследования – экспериментальное изучение антисекреторной активности субстанции и готовой лекарственной формы (ГЛФ) динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола.

Материалы и методы. Исследование антисекреторной активности выполняли методом непрерывной перфузии желудка крыс. Изучаемая субстанция вводилась в дозах 3, 10 и 30 мг/кг, а ГЛФ в дозах 13 и 26 мг/кг. В качестве объекта сравнения при исследовании антисекреторной активности исследуемого вещества была использована субстанция ранитидина (Sigma Aldrich, США), а в качестве препарата сравнения при изучении ГЛФ – Ранитидин (Хемофарм А.Д., Сербия). С целью определения стимулированной секреции непосредственно перед началом сбора образцов перфузата подкожно вводился гистамин в дозе 5 мг/кг. Содержание соляной кислоты в перфузате определялось титрованием 0,01M раствором натрия гидроксида. Величину кислотности определяли в пересчете на дебит-час соляной кислоты.

Результаты. Полученные экспериментальные данные показали, что изучаемая субстанция в дозе 30 мг/кг снижала базальную секрецию соляной кислоты на 54%, что достоверно превышало антисекреторное действие ранитидина в 1,8 раз. ГЛФ в дозе 26 мг/кг, достоверно относительно контроля и группы, получавшей ранитидин, снижала базальную секрецию желудочного сока на 33%. Субстанция в дозе 30 мг/кг достоверно подавляла стимулированную секрецию соляной кислоты на 80%, в то время как ранитидин на 56%. ГЛФ в дозе 26 мг/кг снижала стимулированную гистамином секрецию на 66%, а ранитидин на 52%, что статистически достоверно.

Заключение. Изучаемые субстанция и ГЛФ более эффективно подавляют базальную и превосходят антисекреторную активность H_2 -гистаминоблокатора ранитидина в условиях стимулированной гистамином секреции.

Ключевые слова: 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазол, антисекреторное действие, базальная секреция, стимулированная секреция, доклинические исследования

Для цитирования: М.В. Черников, М.А. Оганова, А.С. Герасименко, Е.А. Артемьев. Изучение антисекреторной активности динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола методом непрерывной перфузии желудка крыс. *Фармация и фармакология*. 2019;7(4):231-240. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-231-240

© М.В. Черников, М.А. Оганова, А.С. Герасименко, Е.А. Артемьев, 2019

For citation: M.V. Chernikov, M.A. Oganova, A.S. Gerasimenko, E.A. Artemyev. Study of antisecretory activity of dinitrate 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazole by method of continuous perfusion of rats' stomachs. *Pharmacy & Pharmacology*. 2019;7(4): 231-240. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-4-231-240

STUDY OF ANTISECRETORY ACTIVITY OF DINITRATE 2-PHENYL-9-DIETHYLAMINOETHYLIMIDAZO[1,2-A]BENZIMIDAZOLE BY METHOD OF CONTINUOUS PERFUSION OF RATS' STOMACHS

M.V. Chernikov, M.A. Oganova, A.S. Gerasimenko, E.A. Artemyev

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University
11, Kalinin ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

E-mail: pharmax@list.ru

Received 26 June 2019

Review (1) 22 July 2019

Review (2) 5 August 2019

Accepted: 15 August 2019

Nowadays, effective pharmacotherapy of acid-dependent gastrointestinal diseases remains an urgent problem of modern gastroenterology. In this regard, the search for new drugs with a pronounced antisecretory activity still continues; their aim is to keep the control over the acid production safe and effective.

The aim of this study was an experimental study of the antisecretory activity of the substance and the finished dosage form (FDF) of dinitrate 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazole.

Materials and Methods. The study of antisecretory activity was performed by method of a continuous perfusion of rats' stomachs. The studied substance was administered at the doses of 3, 10 and 30 mg/kg, and the FDF – at the doses of 13 and 26 mg/kg. The substance of Ranitidine (Sigma Aldrich, USA) was used as a reference object in the study of the antisecretory activity of the substance under study, and Ranitidine (Hemofarm A.D., Serbia) was used as a reference drug in the study of the FDF. In order to determine the stimulated secretion immediately before collecting the samples of the perfusate, histamine was administered subcutaneously at the dose of 5 mg/kg. The content of hydrochloric acid in the perfusate was determined by titration of a 0.01 M sodium hydroxide solution. The acidity value was determined in terms of the debit-hour of hydrochloric acid.

Results and discussion. The obtained experimental data showed that the studied substance at the dose of 30 mg/kg decreased the basal hydrochloric acid secretion by 54%, which significantly exceeded the antisecretory effect of Ranitidine by 1.8 times. The FDF at the dose of 26 mg/kg, statistically reliable relative to the control and the group treated with Ranitidine, decreased the basal secretion of gastric juice by 33%. The substance at the dose of 30 mg/kg reliably suppressed the stimulated secretion of hydrochloric acid by 80%, while Ranitidine did it by 56%. The FDF at the dose of 26 mg/kg decreased the histamine-stimulated secretion by 66%, and Ranitidine did it by 52%, which was statistically reliable.

Conclusions. The studied substance and its dosage form are more effective in suppressing basal activities and exceed the antisecretory activity of H₂-histamine antagonists of Ranitidine under the conditions of the secretion stimulated by histamine.

Keywords: dinitrate 2-phenyl-9-diethylaminoethylimidazo[1,2-a]benzimidazole, antisecretory effect, basal secretion, stimulated secretion, preclinical studies

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день актуальной проблемой современной клинической гастроэнтерологии представляется лечение кислотозависимых заболеваний, таких как гастро-эзофагеальная рефлюксная болезнь (ГЭРБ), язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки, функциональная диспепсия [1–4]. В терапии кислотозависимых заболеваний основным патогенетическим принципом является подавление секреции соляной кислоты париетальными клетками слизистой оболочки желудка, что позволяет устранить или ослабить основные клинические проявления вышеуказанных заболеваний [5, 6].

Угнетение секреции HCl также в значительной степени устраняет проявления гастроинтестинальных осложнений при приеме нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), антиагрегантов и антикоагулянтов, а при инфицировании *Helicobacter pylori* – повышать эффективность эрадикационной

терапии путем повышения антихеликобактерной активности антибактериальных препаратов [7, 8].

В качестве антисекреторных средств используются блокаторы водородно-калиевой АТФ-азы (ингибиторы протонной помпы), антагонисты гистаминовых H₂-рецепторов, селективные М-холиноблокаторы, антациды, а также отчасти блокаторы гастриновых и холецистокининовых ССК-2-рецепторов [2, 4, 5, 9].

Безусловно, положительные эффекты препаратов, перечисленных групп, неоспоримы и все они широко применяются в терапии кислотозависимых заболеваний, однако им свойственны определенные недостатки и побочные эффекты.

Антагонисты H₂-гистаминовых рецепторов до введения в клиническую практику ингибиторов протонной помпы являлись «золотым стандартом» антисекреторной терапии [9]. Однако, наряду с резистентностью к их применению примерно у 1/5 больных с кислотозависимыми заболеваниями, от-

мечаются быстрое развитие толерантности у прежде восприимчивых больных, синдром отмены. Помимо этого, побочные эффекты, характерные для этой группы препаратов, такие как снижение либидо, брадикардия, гепатотоксичность и другие, в значительной степени ограничивают прием и назначение этих средств [10–14].

Доказано, что долгосрочное лечение ингибиторами протонной помпы, может вызывать ряд нежелательных эффектов, таких как: дефицит магния, гипергастринемия и риск развития опухолей, дефицит витамина B₁₂, острый интерстициальный нефрит, остеопороз и повышенный риск возникновения переломов, синдром избыточного бактериального роста в кишечнике, риск сердечно-сосудистых катастроф [15].

M-холиноблокаторы, в том числе селективные, такие как пирензепин обладают всем спектром побочных эффектов, характерных для «классических» неселективных средств, хотя и менее выраженных, таких как сухость слизистых оболочек, тахикардия, нарушение аккомодации и светобоязнь, атония кишечника и мочевого пузыря, головокружение, головная боль [11, 16–18].

Антицидные средства в современных условиях можно рассматривать только как дополнительные средства вспомогательной терапии кислотозависимых заболеваний [11].

В связи с этим остается актуальным поиск новых средств лечения кислотозависимых заболеваний, более безопасных, эффективных в отношении подавления кислотности и в тоже время доступных для потребителя.

На сегодняшний день на фармацевтическом рынке представлен широкий спектр препаратов на основе производных бензимидазола, таких как противоязвенные средства, ингибиторы водородно-калиевой АТФазы – омепразол, лансопризол; антигистаминные средства – астемизол; антигипертензивные средства – телмисартан, кандесартан; противовирусные средства – энвиредин, марибавир; антипаразитарные средства – альбендазол, оксфендазол и многие другие [19–22]. Это свидетельствует о значительной медицинской ценности данной группы химических веществ и обеспечивает высокий интерес к ним.

ЦЕЛЬЮ данного исследования являлось экспериментальное изучение антисекреторной активности субстанции и готовой лекарственной формы динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазола методом непрерывной перфузии желудка крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные

Исследования антисекреторной активности выполнены на аутбредных крысах линии Wistar обоего пола (возраст 10–12 недель) весом 180,0–250,0 г. Раз-

брос по исходной массе животных в группе не превышал 10% [23]. Животные получены из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово».

Условия содержания животных соответствовали требованиям постановления Главного государственного санитарного врача РФ от 29.08.2014 №51 «Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Во время эксперимента животные содержались в контролируемых условиях: температура окружающего воздуха 20–26°C и 30–70% относительной влажности. Для размещения животных применяли макролоновые клетки, Т-3 (для крыс) оборудованные стальными решетчатыми крышками. В качестве подстилочного материала использовали древесные опилки. Животные находились на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к корму (Полнорационный комбикорм рецепт ПК-120 для содержания лабораторных животных, ГОСТ Р 50258-92, производитель ООО «Лабораторкорм») и воде. Подстил, клетки и аксессуары, поилки для питья, менялись еженедельно.

Манипуляции с экспериментальными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997) [24, 25].

Исследуемые вещества

Исследуемая фармацевтическая субстанция динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазола представляет собой мелкокристаллический порошок белого или светло-серого цвета. Умеренно растворим в воде. Для исследований в качестве растворителя навески субстанции при внутрижелудочном введении использовали воду очищенную.

Готовая лекарственная форма динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а] бензимидазола (ГЛФ) была представлена в виде таблеток, покрытых пленочной оболочкой, 60 мг, светло-зеленого цвета без запаха, двояковыпуклые.

Для исследований брали навеску предварительно растертой в порошок готовой лекарственной формы или препаратов сравнения и растворяли в воде очищенной. Полученную суспензию вводили внутрижелудочно с помощью атравматичного зонда. Максимальный объем для внутрижелудочного введения крысам не превышал 3,0 мл для животных массой до 200 г, 5,0 мл для животных от 200 до 240 г и 6,0 мл для животных массой более 240 г.

Препараты сравнения

В качестве препарата сравнения в экспериментах по изучению базальной и стимулированной секреции фармацевтической субстанции была выбрана субстанция ранитидина (SigmaAldrich, США). При исследовании антисекреторного действия готовой лекарственной формы использовали Ранитидин (Хемофарм А.Д., Сербия, серия М703084).

Дизайн исследования

В первой серии экспериментов проводилась оценка влияния изучаемой субстанции в дозах 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг на базальную и стимулированную гистамином секрецию соляной кислоты. В качестве объектов сравнения были использованы субстанция ранитидина 3 мг/кг, 10 мг/кг и 30 мг/кг (Sigma Aldrich, США). Полученные данные были использованы для расчета значения ED_{50} для субстанции динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо [1,2-а] бензимидазола. Далее при исследовании антисекреторной активности были использованы дозы ГЛФ, равные значениям ED_{50} , а расчет доз препарата сравнения производился относительно терапевтической дозы для человека с учетом коэффициента межвидового переноса и составил 28 мг/кг. Контрольная группа животных получала растворитель (воду очищенную) в эквивалентном вводимым препаратам количестве.

Перед началом эксперимента животные подвергались 24-часовой пищевой депривации со свободным доступом к воде. После наркотизации хлоралгидратом (350 мг/кг) выполнялась срединная лапаротомия. Желудок выводился в операционную рану. Через разрез в проксимальной части двенадцатиперстной кишки вводилась канюля до уровня пилорического сфинктера и фиксировалась лигатурой. Вторая канюля вводилась в просвет желудка через разрез в кардиальной части и фиксировалась к нижнему пищевому сфинктеру. Желудок перфузировался через пищеводную канюлю 0,1 М фосфатным буферным раствором (рН 7,4, температура 37°C, на 100 мл буфера 77,4 мл 1М динатрия гидрофосфата и 22,6 мл 1М натрия дигидрофосфата) с помощью перистальтического насоса с постоянной скоростью 0,5 мл/мин. Образцы перфузата собирали из пилорической канюли.

С целью исследования базальной секреции собиралось 3 образца перфузата с 20-минутным интервалом в течение 1 часа. Исследуемая субстанция вводилась через зонд внутрижелудочно за 1 час до начала сбора образцов. ГЛФ вводилась через зонд внутрижелудочно за 2 часа до начала сбора образцов.

Содержание кислоты в перфузате определялось титрованием 0,01М раствором натрия гидроксида. Величину кислотности определяли в пересчете на дебит-час хлористоводородной кислоты.

С целью определения стимулированной секреции непосредственно перед началом сбора образцов перфузата подкожно вводился гистамина дигидрохлорид в дозе 5 мг/кг. Подкожное введение осуществлялось стерильными шприцами. Исследуемая субстанция вводилась за 1 час до сбора образцов перфузата внутрижелудочно через зонд.

Содержание кислоты в перфузате определялось титрованием 0,01М раствором натрия гидроксида. Величину кислотности определяли в пересчете на дебит-час хлористоводородной кислоты.

Расчет дебит-часа хлористоводородной кислоты $Dч = V_1 * E_1 * 0,001 + V_2 * E_2 * 0,001 + V_3 * E_3 * 0,001$

где $Dч$ — дебит-час соляной кислоты, ммоль; V — объем порции желудочного содержимого, мл; E — концентрация свободной соляной кислоты той же порции в титрационных единицах; 0,001 — количество хлористоводородной кислоты в 1 мл желудочного содержимого при концентрации ее, равной 1 ммоль/л.

Определяемые показатели

Для оценки антисекреторного действия определяли содержание соляной кислоты желудочного сока в условиях базальной и стимулированной гистамином секреции (общая кислотность), расчет дебит-часа хлористоводородной кислоты. По результатам исследования рассчитаны величины ED_{50} для изучаемой субстанции, готовой лекарственной формы и ранитидина.

Статистическая обработка

Полученные экспериментальные данные анализировались с использованием метода вариационной статистики. В итоговых таблицах представлены средние значения по группе (M) и стандартная ошибка среднего значения (m). Межгрупповые различия анализировались с помощью непараметрического критерия — U -критерий Манна-Уитни. Различия определялись при 0,05 уровне значимости. Для статистической обработки результатов использовали пакет программ «StatPlus 2009».

Результаты

Анализ экспериментальных данных показал, что исследуемая субстанция в дозе 10 мг/кг и 30 мг/кг достоверно относительно контроля снижала базальную секрецию соляной кислоты на 35% и 54% соответственно. Введение субстанции в дозе 3 мг/кг достоверно не влияло на базальную секрецию соляной кислоты. Ранитидин, в аналогичных исследуемой субстанции дозах, также способствовал достоверному относительно контроля подавлению секреции на 22% и 29% соответственно. При этом субстанция исследуемого вещества в дозе 30 мг/кг достоверно более эффективно снижала базальную секрецию относительно ранитидина (табл. 1).

Таблица 1 – Влияние фармацевтической субстанции динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола на базальную желудочную секрецию

Вещество	Доза	Дебит-час соляной кислоты мг-экв/час	Процент подавления секреции (%)
Контроль Вода очищенная	–	0,27±0,010	–
исследуемая субстанция	3 мг/кг	0,22±0,023	–18
исследуемая субстанция	10 мг/кг	0,18±0,004*	–35
исследуемая субстанция	30 мг/кг	0,13±0,009*#	–54
Ранитидин	3 мг/кг	0,26±0,017	–4
Ранитидин	10 мг/кг	0,21±0,014*	–22
Ранитидин	30 мг/кг	0,19±0,007*	–29

Примечание: * – достоверность относительно контроля $P < 0,05$

– достоверность относительно группы, получавшей ранитидин $P < 0,05$

Данные, отражающие процент снижения базальной секреции относительно контроля позволили рассчитать значения ED_{50} для исследуемой субстанции и

ранитидина (Рис. 1, 2). Расчетные данные составили для исследуемой субстанции – 26 мг/кг, а для ранитидина – 54,0 мг/кг.

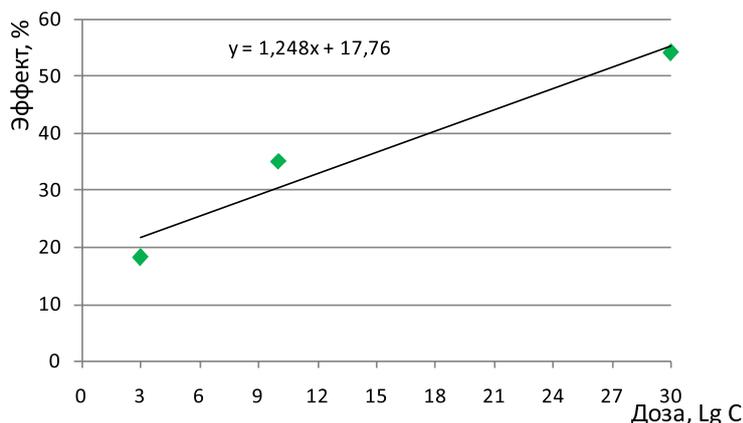


Рисунок 1 – Расчет значения ED_{50} подавления базальной секреции соляной кислоты субстанцией динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола.

Готовая лекарственная форма в дозе 26 мг/кг способствовала снижению базального уровня секреции достоверно относительно контроля на 33%. Получен-

ные результаты достоверны относительно контроля и значений группы, получавшей ранитидин в дозе 28 мг/кг (табл. 2).

Таблица 2 – Влияние готовой лекарственной формы динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола на базальную желудочную секрецию

Вещество	Доза	Дебит-час соляной кислоты мг-экв/час	Процент подавления секреции (%)
Контроль Вода очищенная	–	0,259±0,005	–
ГЛФ	26 мг/кг	0,172±0,004*#	–33
Ранитидин	28 мг/кг	0,207±0,007*	–20

Примечание: * – достоверность относительно контроля $P < 0,05$

– достоверность относительно группы, получавшей ранитидин $P < 0,05$

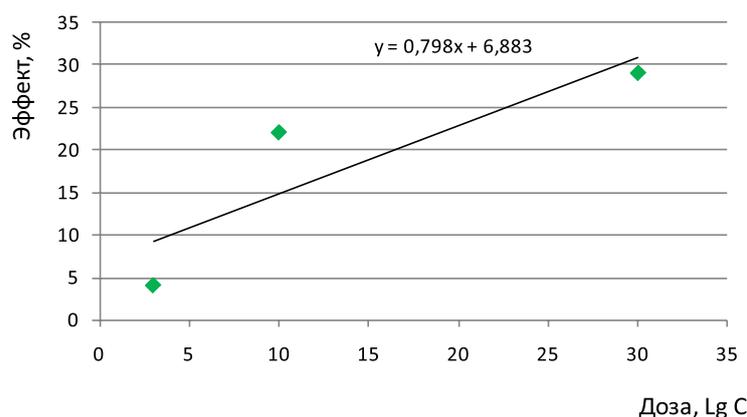


Рисунок 2 – Расчет значения ED50 подавления базальной секреции соляной кислоты субстанцией ранитидина.

По результатам исследования стимулированной гистамином секреции установлено, что введение гистамина увеличивало выработку соляной кислоты в 1,8 раз относительно базального уровня. Исследуемая субстанция достоверно подавляла секрецию соляной кислоты во всех изучаемых дозах, при этом, в дозе 30 мг/кг секреция снижалась на 80%, в то время как ранитидин ингибирова

л секретацию на 56%, что статистически достоверно. Изучаемая субстанция и ранитидин в дозе 10 мг/кг также способствовали достоверному относительно контроля подавлению кислотопродукции, однако достоверных межгрупповых различий не наблюдалось. Введение дозы 3 мг/кг не оказывало ожидаемого фармакологического эффекта как в опытной группе, так и в группе сравнения (табл. 3).

Таблица 3 – Влияние фармацевтической субстанции динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола на стимулированную гистамином желудочную секрецию

Вещество	Доза	Дебит-час соляной кислоты мг-экв/час	Процент подавления секреции (%)
Контроль	-	0,51±0,022	-
исследуемая субстанция	3 мг/кг	0,40±0,015*	-22
исследуемая субстанция	10 мг/кг	0,23±0,011*	-56
исследуемая субстанция	30 мг/кг	0,10±0,008*#	-80
Ранитидин	3 мг/кг	0,46±0,032	-10
Ранитидин	10 мг/кг	0,29±0,013*	-43
Ранитидин	30 мг/кг	0,22±0,013*	-56

Примечание: * – достоверность относительно контроля $P < 0,05$

– достоверность относительно группы, получавшей ранитидин $P < 0,05$

Значение ED_{50} рассчитывалось по уравнению тренда и для исследуемой субстанции составило 13,0

мг/кг (Рис. 3), а для ранитидина составило 23,6 мг/кг (Рис. 4).

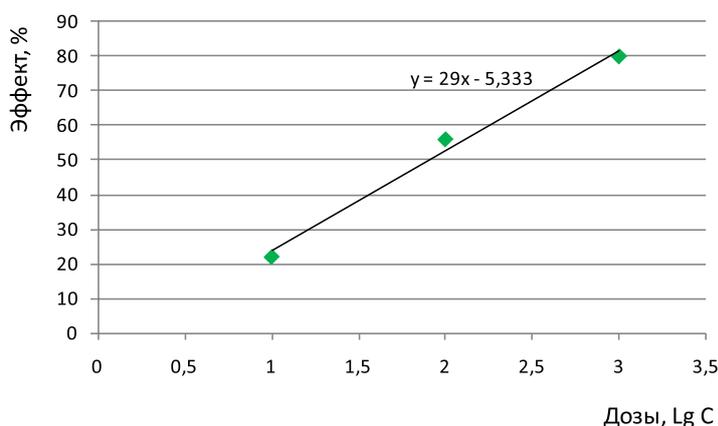


Рисунок 3 – Расчет значения ED50 для субстанции динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола в условиях стимулированной гистамином секреции.

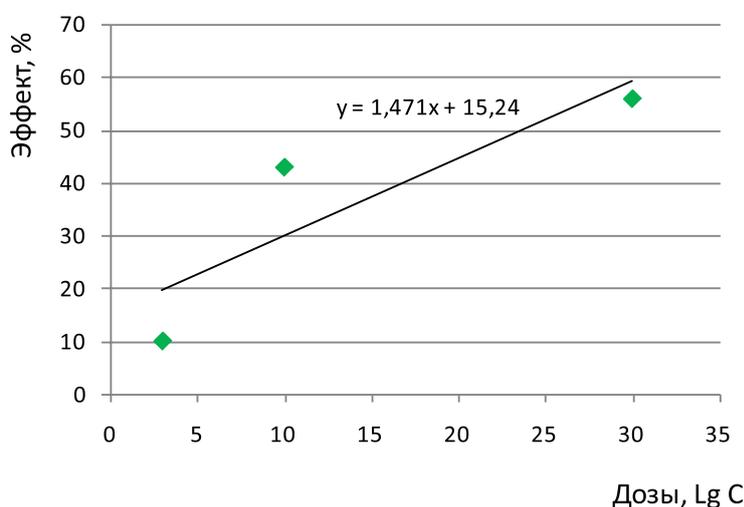


Рисунок 4 – Расчет значения ED50 для субстанции ранитидина в условиях стимулированной гистамином секреции.

По результатам исследования стимулированной гистамином секреции установлено, что ГЛФ динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бен-

зимидазола в дозе 26 мг/кг достоверно подавляла секрецию соляной кислоты на 66%, в то время как ранитидин на 52%. (Табл. 4).

Таблица 4 – Влияние готовой лекарственной формы динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола на стимулированную гистамином желудочную секрецию

Вещество	Доза	Дебит-час соляной кислоты мг-экв/час	Процент подавления секреции (%)
Контроль	–	0,522±0,010	–
ГЛФ	13 мг/кг	0,179±0,008*#	–66
Ранитидин	28 мг/кг	0,250±0,008*	–52

Примечание: * – достоверность относительно контроля P<0,05

– достоверность относительно группы, получавшей ранитидин P<0,05

ОБСУЖДЕНИЕ

Бензимидазол содержит два вида атомов азота (пиррольного и пиридинового типа), выступающих в роли как донора, так и акцептора протона, и существует в двух таутомерных формах. Бензимидазольный бицикл может не только присоединять или отдавать протон, но также легко вступать в различные невалентные взаимодействия (водородные связи, Ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, стэкинг-взаимодействия). Эти особенности строения бензимидазольной молекулы обуславливают возможность ее связывания с разнообразными терапевтическими мишенями, обеспечивая широкий спектр биологической активности производных бензимидазола.

Спектр биологической активности производных бензимидазолов включает противовирусную [26], противогрибковую [27], антимикробную [28], противораковую [29], антигельминтную [30], анальгетическую и жаропонижающую [31], антидиабетическую [32], антипротозойную [33], антиоксидантную [34], противоконвульсивную [27], антипсихотическую [35], противоязвенную [36], анестезирующую [37] и другие виды активности.

Значительная медицинская ценность бензимидазолсодержащих препаратов обеспечивает высокий интерес и интенсивное развитие данного направления в фармакологии.

Анализ полученных в ходе эксперимента данных позволил установить, что исследуемая субстанция динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола способна подавлять базальную и стимулированную гистамином секрецию соляной кислоты на модели непрерывной перфузии желудка.

Результаты согласуются с выявленным в про-

цессе комплексного исследования специфической фармакологической активности H_2 -гистаминоблокирующим действием изучаемого соединения при исследовании данного рецепторного эффекта на изолированных тканях предсердий. Однако, с учетом того, что рецепторный эффект не превосходил показатели ранитидина, полученные *in vivo* результаты, демонстрирующие более выраженное подавление кислотопродукции, могут быть связаны с наличием дополнительных механизмов влияния на секрецию соляной кислоты, что создает предпосылки для дальнейших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, субстанция динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола в дозе 30 мг/кг и готовая лекарственная форма в дозах, равных ED_{50} обладает антисекреторной активностью, статистически достоверно превосходящей эффект известного H_2 -гистаминоблокатора ранитидина в среднем в 2 раза, как на уровне базальной, так и стимулированной гистамином секреции. Готовая лекарственная форма в используемых дозах проявила в целом сопоставимый фармакологический эффект по сравнению с данными, полученными при исследовании субстанции, с поправкой на расчетный характер значений ED_{50} . Полученные результаты служат достаточным обоснованием для дальнейшего изучения возможности использования субстанции и готовой лекарственной формы динитрата 2-фенил-9-диэтиламиноэтилимидазо[1,2-а]бензимидазола в качестве эффективного фармакотерапевтического средства при кислотозависимых заболеваниях желудочно-кишечного тракта.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование выполнялось в рамках федеральной целевой программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу», Государственный контракт от 14.11.2017 №14.N08.11.1042.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Все авторы в равной степени внесли свой вклад в исследовательскую работу.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Фундаментальные основы кислотопродукции в желудке / И.В. Маев, Д. Н. Андреев, А.В. Заборовский // Медицинский совет. – 2018. – № 3. – с. 7–14. Doi: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2018-3-7-14>
2. Маев И.В., Самсонов А.А., Андреев Д.Н. Болезни желудка. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 563 с.
3. Руководство по внутренней медицине / под ред. Г.П. Арутюнова, А.И. Мартынова, А.А. Спасского. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 800 с.
4. Schubert M.L. Physiologic, pathophysiologic, and pharmacologic regulation of gastric acidsecretion // *Curr Opin Gastroenterol.* – 2017. – 33(6). – P. 430–438. doi: 10.1097/MOG.0000000000000392.
5. Перспективы лечения больных с кислотозависимыми заболеваниями / Кучерявый Ю.А., Андреев Д.Н. // Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии. – 2014. – № 2. – С. 15–24.
6. Lassen A.T. Acid-related disorders and use of antisecretory medication // *Dan Med Bull.* – 2007. – Т. 54, №1. – P. 18–30.
7. Дозозависимая антисекреторная активность эзомепразола: результаты длительного мониторинга

- внутрижелудочного pH / С.А. Курилович, Е.А. Чекалина, А.В. Белковец, Л.В. Щербакова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – №3. – с. 33–40.
8. НПВП-индуцированная гастропатия: от понимания механизмов развития к разработке стратегии профилактики и лечения / Г.А. Карасёва // Медицинские новости. – 2012. – № 8. – С. 21–26.
 9. Morgan D.R., Crowe S.E. Helicobacter pylori infection. In.: Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management / edited by Mark Feldman, Lawrence S Friedman, Laurence J Brandt. – 10th ed. 2015: 856–884.
 10. H2-блокаторы гистаминовых рецепторов в терапевтической практике / Ж.Л. Сухих // Рецепт. – 2006. – № 1 (45). – С. 61–63.
 11. Эволюция лечения кислотозависимой патологии / С.М. Ткач, А.Э. Дорофеев // Гастроэнтерология. – 2015. – №4 (58). – с. 94–100.
 12. Fandriks L. Can famotidine and omeprazole be combined on a once-daily basis? / Fandriks L., Lonroth H., Pettersson A., Vakili N // Scand. J. Gastroenterol. – 2007. – 42. – 689–694.
 13. Huang J.Q. Pharmacological and pharmacodynamic essentials of H2-receptor antagonists and proton pump inhibitors for the practising physician / Huang J.Q., Hunt R.H. // Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. – 2001. – 15. – 355–370.
 14. Scarpignato C. The role of H2-receptor antagonists in the era of proton pump inhibitors / Scarpignato C., Galmiche J.P. Edited by Lundell L // Guidelines for Management of Symptomatic Gastro-oesophageal Reflux Disease. – Science Press, 1998. – P. 55–66.
 15. Современные взгляды на безопасность длительной терапии ингибиторами протонной помпы. Обзор литературы / В.А. Ахмедова, В.А. Ноздряков // РМЖ. – 2017. – №10. – с. 765–768.
 16. Modlin I.M Edkins and a century of acid suppression / Modlin I., Sachs G., Wright N., Kidd M. // Digestion. – 2005. – № 72. – С. 129–145.
 17. Salahuddin A. Benzimidazoles: A biologically active compounds / A. Salahuddin, M. Shaharyar, A. Mazumder // Arabian J. Chem. – 2017. – V. 10, Suppl. 1. – P. S157–S173. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.017>
 18. Gaba M. Development of drugs based on imidazole and benzimidazole bioactive heterocycles: recent advances and future directions / M. Gaba, C. Mohan // Med. Chem. Res. – 2016. – № 25. – P. 173–210. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00044-015-1495-5>.
 19. Yadav G., Ganguly S. Structure activity relationship (SAR) study of benzimidazole scaffold for different biological activities: A mini-review / G. Yadav, S. Ganguly // Eur. J. Med. Chem. – 2015. – № 97. – P. 419–443. Doi: [10.1016/j.ejmech.2014.11.053](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.11.053).
 20. Keri R.S. Comprehensive Review in Current Developments of Benzimidazole-Based Medicinal Chemistry / R.S. Keri, A. Hiremathad, S. Budagumpi, B.M. Nagaraja // Chem. Biol. Drug. Des. – 2014. – V. 5, №2. – P. 1–47. doi: [10.1111/cbdd.12462](https://doi.org/10.1111/cbdd.12462).
 21. Липунова Г.Н. Фторсодержащие бензимидазолы и их [a]- и [b]гетероаннелированные производные: синтез и биологическая активность / Г.Н. Липунова, Э.В. Носова, В.Н. Чарушин // Химия гетероциклических соединений. – 2014. – №6. – С. 831–859.
 22. Bansal Y. The therapeutic journey of benzimidazoles: A review / Y. Bansal, O. Silakari // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2012. – № 20. – P. 6208–6236. doi: [10.1016/j.bmc.2012.09.013](https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.09.013).
 23. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, А.Н. Васильев и др. // М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
 24. ГОСТ Р 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. (OECD Guide 1:1998, IDT). – М.: Стандартинформ, 2015. – 11 с.
 25. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» (Зарегистрировано в Минюсте РФ 15 августа 2016 г. № 43232) // Бюллетень нормативных актов федеральных органов исполнительной власти, № 37, 12.09.16.
 26. Sherifa M. Abu-Bakr, Bassyouni F.A.; Rehim, M.A. Pharmacological evaluation of benzimidazole derivatives with potential antiviral and antitumor activity // Research on Chemical Intermediates. – 2012. – V. 38, №9. – P. 2523–2545.
 27. Keri R.S., Rajappa C.K., Patil S.A.; Nagaraja B.M. Benzimidazole-core as an antimycobacterial agent // Pharmacological Reports. – 2016. – V. 68, №6. – P. 1254–1265. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.08.002>
 28. Singh N., Pandurangan A., Rana K., Anand P., Ahmad A., Tiwari A.K. Benzimidazole: A short review of their antimicrobial activities // Int. Current Pharm. J. – 2012. – V. 1, №5. – P. 119–127. Doi: <https://doi.org/10.3329/icpj.v1i5.10284>
 29. Shrivastava N., Naim M. J.; Alam Md. J., Nawaz F., Ahmed S., Alam O. Benzimidazole Scaffold as Anticancer Agent: Synthetic Approaches and Structure–Activity Relationship // Archiv der Pharmazie. – 2017. – V. 350, №6. doi: [10.1002/ardp.201700040](https://doi.org/10.1002/ardp.201700040)
 30. Furtado L.F.V., de Paiva Bello A.C.P.; Rabelo É.M.L. Benzimidazole resistance in helminths: From problem to diagnosis // Acta Tropica. – 2016. – V. 162. – P. 95–102. doi: [10.1016/j.actatropica.2016.06.021](https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.021).
 31. Gaba M., Singh S., Mohan C. Benzimidazole: an emerging scaffold for analgesic and anti-inflammatory agents // Eur. J. Med. Chem. – 2014. – V. 76. –P. 494–505. doi: [10.1016/j.ejmech.2014.01.030](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.01.030).
 32. Kim R.M., Chang J., Lins A.R., Brady E., Candelore M.R., Dallas-Yang Q., Ding V. Discovery of potent, orally active benzimidazole glucagon receptor antagonists // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2008. – V. 18. – P. 3701. doi: [10.1016/j.bmcl.2008.05.072](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.072).
 33. Gomez H.T., Nunez E.H., Rivera I.L., Alvarez J.G., Rivera R.C. Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-piperazine hybrids // Bioorg. Med. Chem. Lett. – 2008. – V. 18. – P. 3147. doi: [10.1016/j.bmcl.2008.05.009](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.009).
 34. Ates-Alagoz Z. Antioxidant activities of retinoidal benzimidazole or indole derivatives in In vitro model systems // Current Med. Chem. – 2013. – Vol. 20, N36. – P. 4633–4639.
 35. Jain Z.J., Kankate R.S., Chaudhari B.N., Kakad R.D. Action of benzimidazole-piperazine derivatives on dopamine receptors // Med. Chem. Research. – 2013. – V. 22, N2. – P. 520–530. <https://doi.org/10.1007/s00044-012-0055-5>
 36. Patil A., Ganguly S., Surana S. A systematic review of benzimidazole derivatives as an antiulcer agent // Rasayan J. Chem. – 2008. – V. 1, N3. – P. 447–460.
 37. Галенко-Ярошевский П.А., Галенко-Ярошевский А.П., Анисимова В.А., Чемоданова П.С. Производные бензимидазола: местноанестезирующие свойства, механизмы действия, перспективы использования в офтальмологии. – Краснодар: Просвещение_ЮГ. – 2015. – 781 с.

АВТОРЫ

Черников Максим Валентинович – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биологии и физиологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID 0000-0001-8340-1296. E-mail: pharmax@list.ru

Оганова Марина Альбертовна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры биологии и физиологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. E-mail: marina-oganova81@mail.ru

Герасименко Анна Сергеевна – преподаватель кафедры патологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. E-mail: ger_ann5@ro.ru

Артемьев Евгений Альбертович – аспирант кафедры биологии и физиологии патологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. E-mail: johni1001@rambler.ru

