



2021 Том / Volume IX

№ 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

Case Reports

Дискуссии, рецензии, юбилеи, научные школы, история фармации и фармакологии

Discussions, Referee Reports,
Anniversaries, Schools
of Thought, History
of Pharmacy and
Pharmacology



ПМФИ
Филиал ВолгГМУ

Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 9, Выпуск 4, 2021

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

Заместители главного редактора

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

Черников Максим Валентинович доктор медицинских наук, доцент, г. Пятигорск, 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

Корректор: Мищенко Екатерина Сергеевна, 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, 2021

© Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2021

© Авторы, 2021

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

Maxim V. Chernikov

PhD (Medicine), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Editorial Board

Pharmacognosy, Botany

Vladimir A. Kurkin

PhD (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Ifrat N. Zilfikarov

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

Proofreader: Mischenko Ekaterina S., 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, 2021

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2021

©Authors, 2021

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS**ОБЗОР / REVIEW**

<i>А.П. Колпаксиди, М.В. Дмитриева, И.В. Ярош, И.И. Краснюк</i>	<i>A.P. Kolpaksidi, M.V. Dmitrieva, I.V. Yarosh, I.I. Krasnyuk</i>
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА252	ANTITUMOR DRUGS BASED ON INDOLOCARBAZOL DERIVATIVES252

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / RESEARCH ARTICLE**Фармацевтическая и токсикологическая химия / Pharmaceutical and Toxicological Chemistry**

<i>М.В. Ларский, А.Е. Позднякова, З.Д. Хаджиева, Д.И. Поздняков</i>	<i>M.V. Larskiy, A.E. Pozdnyakova, Z.D. Khadzhieva, D.I. Pozdnyakov</i>
РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ В СПРЕЕ НАЗАЛЬНОМ266	DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL SUBSTANCES IN NASAL SPRAY266

Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

<i>Ф.В. Гладких, Н.А. Чиж, А.А. Манченко, И.В. Белочкина, И.П. Михайлова</i>	<i>F.V. Hladkykh, M.O. Chyzh, A.O. Manchenko, I.V. Belochkina, I.P. Mikhailova</i>
ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ НА ОТДЕЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕЧЕБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ ПРИ АДЪЮВАНТ- ИНДУЦИРОВАННОМ АРТРИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....185	EFFECT OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT ON SOME BIOCHEMICAL INDICES OF THERAPEUTIC EFFICIENCY AND TOXICITY OF DICLOFENAC SODIUM IN ADJUVANT-INDUCED EXPERIMENTAL ARTHRITIS185
<i>М.В. Корокин, М.В. Кубекина, А.В. Дейкин, О.В. Анциферов, В.М. Покровский, Л.В. Корокина, Н.Л. Карташкина, В.А. Солдатова, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко, М.В. Покровский</i>	<i>M.V. Korokin, M.V. Kubekina, A.V. Deikin, O.V. Antsiferov, V.M. Pokrovsky, L.V. Korokina, N.L. Kartashkina, V.A. Soldatova, E.V. Kuzubova, A.I. Radchenko, M.V. Pokrovsky</i>
ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АГОНИСТОВ ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРА EPOR/CD131 У ЖИВОТНЫХ С ЭНДОТЕЛИОСПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ МУТАНТНОГО ГЕНА POLG.....294	STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NOVEL EPOR/CD131 HETERORECEPTOR AGONISTS IN MICE WITH ENDOTHELIAL-SPECIFIC EXPRESSION OF MUTANT POLG GENE294
<i>Р.А. Литвинов, А.В. Гонtareва, Л.Э. Усмиянова, Д.Р. Клименко</i>	<i>R.A. Litvinov, A.V. Gontareva, L.E. Usmyanova, D.R. Klimenko</i>
ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ d-МЕТАЛЛОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ, АГРЕГАЦИЮ И АМИЛОИДНУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ АЛЬБУМИНА В РЕАКЦИИ ГЛИКИРОВАНИЯ.....306	INFLUENCE OF CERTAIN d-METALS ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS, AGGREGATION AND AMYLOID TRANSFORMATION OF ALBUMIN IN GLYCATION REACTION306
<i>М.А. Самоотруева, А.А. Озеров, А.А. Старикова, Н.М. Габитова, Д.В. Мережкина, А.А. Цибизова, И.Н. Тюренков</i>	<i>M.A. Samotrueva, A.A. Ozerov, A.A. Starikova, N.M. Gabitova, D.V. Merezhkina, A.A. Tsbizova, I.N. Tyurenkov</i>
ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИНАЗОЛИН-4(3H)-ОНОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> И <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>318	ANTIMICROBIAL ACTIVITY STUDY OF NEW QUINAZOLIN-4(3H)-ONES AGAINST <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> AND <i>STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE</i>318

УДК 615.3



ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛОКАРБАЗОЛА

А.П. Колпаксиди^{1,2}, М.В. Дмитриева², И.В. Ярош¹, И.И. Краснюк¹¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования

«Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет)

119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский

исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

115478, Россия, г. Москва, Каширское ш., д. 24

E-mail: aleksandrkolpaksidi@gmail.com

Получено 07.03.2021

Принята к печати 21.08.2021

Цель. Обобщение литературных данных о производных индокарбазола, обладающих противоопухолевой активностью.

Материалы и методы. Объектом изучения являлись препараты на основе производных индокарбазола с противоопухолевой активностью. Для поиска материалов по исследуемой проблеме использовали следующие поисково-информационные и библиотечные базы данных: Elibrary, PubMed, CyberLeninka, ResearchGate, а также Государственный реестр лекарственных средств, реестры клинических исследований clinline.ru и clinicaltrials.gov. Поиск проводился по следующим словам/словосочетаниям: индокарбазолы (indolocarbazoles), производные индокарбазолов (indolocarbazole derivatives), стаурополин (staurosporine), ребеккамицин (rebeccamycin), производные стаурополина (staurosporine derivatives), производные ребеккамицина (rebeccamycin derivatives). Поиск проводился с 11 января по 1 марта 2021 года; учитывались соединения с биологической активностью, проходящие или прошедшие доклинические и клинические испытания. Учитывались все материалы с 1977 года по 1 января 2021.

Результаты. Полученные материалы свидетельствуют о том, что производные индокарбазола являются перспективными соединениями для создания противоопухолевых лекарственных препаратов благодаря их свойствам и особенностям механизма действия. Данные препараты обладают избирательностью действия, что обусловлено направлением взаимодействия с конкретными молекулярными мишенями: киназы (особенно протеинкиназа C и её изоферменты), ДНК и ДНК-топоизомеразы. К настоящему времени синтезировано и исследовано множество соединений из класса индокарбазолов, показавших высокую противоопухолевую активность при терапии системных и солидных опухолей. Однако несмотря на это, только один лекарственный препарат на основе производного стаурополина, зарегистрированный под ТН Rydapt® (в США и странах Евросоюза) и Митикайд® (в Российской Федерации), разрешен для применения в клинике.

Заключение. Таким образом проведено обобщение основных данных из научных публикаций, посвященных перспективным противоопухолевым препаратам на основе соединений из класса индокарбазолов. В частности, приведены сведения об их молекулярном строении, происхождении, классификации, основных представителях класса, находящихся на различных стадиях исследований и разрешенных к применению в клинической практике.

Ключевые слова: индокарбазолы; производные индокарбазолов; противоопухолевые агенты; производные стаурополина; производные ребеккамицина

Список сокращений: ЛС – лекарственное средство; ЛП – лекарственный препарат; ЛФ – лекарственная форма; РКС – протеинкиназа C; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ТН – торговое наименование

ANTITUMOR DRUGS BASED ON INDOLOCARBAZOL DERIVATIVES

А.П. Kolpaksidi^{1,2}, М.В. Dmitrieva², I.V. Yarosh¹, I.I. Krasnyuk¹¹ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University)

Bldg. 2, 8, Trubetskaya St., Moscow, Russia, 119991

² N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology

24, Kashirskoe sh., Moscow, Russia, 115478

E-mail: aleksandrkolpaksidi@gmail.com

Received 7 March 2021

Accepted 21 Aug 2021

Для цитирования: А.П. Колпаксиди, М.В. Дмитриева, И.В. Ярош, И.И. Краснюк. Противоопухолевые препараты на основе производных индокарбазола. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):252-265. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265

© А.П. Колпаксиди, М.В. Дмитриева, И.В. Ярош, И.И. Краснюк, 2021

For citation: A.P. Kolpaksidi, M.V. Dmitrieva, I.V. Yarosh, I.I. Krasnyuk. Antitumor drugs based on indolocarbazol derivatives. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):252-265. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-252-265

The aim of the work is to generalize the literature data on indolocarbazole derivatives with an antitumor activity.

Materials and methods. The objects of the study were the preparations based on indolocarbazole derivatives with the antitumor activity. To search for materials on the problem under study, the following search and information as well as library databases were used: Elibrary, PubMed, CyberLeninka, ResearchGate, the State Register of Medicines, clinical trials registries clinicaltrials.gov and clinicaltrials.ru. The search for the following words / phrases was performed: indolocarbazoles, indolocarbazole derivatives, staurosporine, rebeccamycin, staurosporine derivatives. The search was conducted from January 11 until March 1, 2021. The compounds with a biological activity which were undergoing or had undergone preclinical and clinical trials, were taken into account. All the materials from 1977 to January 1, 2021, were taken into account.

Results. The materials obtained indicate that indolocarbazole derivatives are promising compounds for the creation of anticancer medicinal preparations due to their properties and peculiarities of the action mechanism. These drugs have a selective action due to the targeted interaction with specific molecular targets: kinases (especially protein kinase C and its isozymes), DNA and DNA topoisomerase. To date, many compounds from the class of indolocarbazoles have been synthesized and investigated. They have shown a high antitumor activity in the treatment of systemic and solid tumors. However, despite this, only one MP based on a staurosporine derivative, registered by the TN of Rydapt® (in the USA and EU countries) and Miticaid® (in the Russian Federation), is approved for use in the clinical practice.

Conclusion. Thus, the basic data from scientific publications on promising anticancer medicinal preparations based on compounds from the class of indolocarbazoles, have been summarized. The information is provided, in particular, on their molecular structure, the origin, classification, the main representatives of the class, which are at various stages of the research and are approved for use in the clinic.

Keywords: indolocarbazoles; indolocarbazole derivatives; antitumor agents; staurosporin derivatives; rebeccamycin derivatives

Abbreviations: P – pharmaceutical; MP – medicinal preparation; DF – dosage form; PKC – protein kinase C; DNA – deoxyribonucleic acid; TN – trade name

ВВЕДЕНИЕ

Рак часто называют «патологией века», рассматривая его в контексте эндемического заболевания, распространяющегося по всему миру. Рак также был определен как «истинная болезнь современности» (Рой Портер) или даже «важный продукт современности» (Сиддхартха Мукерджи). Эти два определения общепризнаны и оправдываются резким увеличением заболеваемости и смертности, которое наблюдается с конца XVIII века до сегодняшнего дня [1]. В 2020 году рак продолжал занимать одно из ведущих мест среди причин смертности и является важным препятствием на пути увеличения ожидаемой продолжительности жизни во всех странах мира. По оценкам Всемирной организации здравоохранения в 2019 году рак является первой или второй ведущей причиной смерти в возрасте до 70 лет в 112 из 183 стран и занимает третье или четвертое место еще в 23 странах [2].

За последние два десятилетия лечение рака с использованием фармакологических подходов сильно изменилось. Долгие годы фундаментальных и клинических исследований привели к переходу от классической противоопухолевой терапии, характеризующейся низкой селективностью действия лекарственных средств (ЛС) и сопровождающейся сильной интоксикацией организма, к более целенаправленным противоопухолевым «снайперам», которые эффективно уничтожают популяции опухолевых клеток с меньшими побочными эффектами [3].

Среди широкого спектра противоопухолевых препаратов особый интерес представляют соединения из группы производных индолокарбазола. Индолокарбазолы – это уникальный класс индольных

алкалоидов природного или синтетического происхождения, которые обладают целым рядом терапевтических свойств – противоопухолевой, антибактериальной, противопаразитарной, противовирусной, иммуномодулирующей активностью [4–7].

Наиболее значимым биологическим профилем соединений из группы производных индолокарбазола является их потенциальное противоопухолевое действие [8]. Отличительной особенностью механизма действия этих препаратов является способность взаимодействовать с несколькими мишенями и индуцировать различные пути гибели опухолевых клеток [9]. Для них такими мишенями являются ДНК, ферменты топоизомеразы и протеинкиназы C (PKC), которые отвечают за регулирование основных аспектов клеточного метаболизма, включая прогрессирующее клеточного цикла [10, 11].

Протеинкиназы C – семейство протеинкиназ, ферментов, осуществляющих фосфорилирование белков и участвующих тем самым в сигнальных каскадах клеток. Термин «протеинкиназа C» относится ко всем описанным изоферментам [12]. Ингибиторы PKC могут снижать экспрессию Р-гликопротеина в опухолевых клетках и тем самым повышать их чувствительность к химиотерапии [13]. Также активация PKC необходима для ангиогенеза опухоли [14].

Топоизомеразы влияют на топологию ДНК и способны релаксировать их сверхспирализованные молекулы путем внесения одно- или двухцепочечных разрывов с последующим восстановлением, а также отрицательных супервитков или катенанов. Ингибиторы этих ферментов широко используются для подавления активности опухолевых топоизомераз I и/или II типа с блокированием клеток в фазе G₂ и

задержкой их вступления в митоз [15]. Ингибиторы топоизомераз – одни из наиболее эффективных индукторов апоптоза, т. е. программируемой гибели опухолевых клеток [10]. Кроме того, синтезирован ряд производных индолокарбазола с антиангиогенным действием, которые способны блокировать васкулогенную мимикрию в опухоли и восстанавливать чувствительность резистентных клеток к химиотерапевтическим препаратам [16, 17]. Эти особенности механизма действия определяют широкий спектр цитотоксической и противоопухолевой активности производных индолокарбазолов.

ЦЕЛЬ. Обобщение литературных данных о производных индолокарбазола, обладающих противоопухолевой активностью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования являлись препараты на основе производных индолокарбазола, обладающие противоопухолевой активностью. Для поиска материалов использовали следующие поисково-информационные и библиотечные базы данных: Epub, PubMed, CyberLeninka, ResearchGate, а также Государственный реестр лекарственных средств, реестры клинических исследований clinicaltrials.gov. Поиск проводился по следующим словам/словосочетаниям: индолокарбазолы (indolocarbazoles), производные индолокарбазолов (indolocarbazole derivatives), стауроспорин (staurosporine), ребеккамицин (rebeccamycin), производные стауроспорина (staurosporine derivatives), производные ребеккамицина (rebeccamycin derivatives). Поиск проводился с 11 января по 1 марта 2021 года; учитывались соединения с биологической активностью, проходящие или прошедшие доклинические и клинические испытания. Учитывались все материалы с 1977 года по 1 января 2021.

Статья представляет собой обзор публикаций, посвященных производным индолокарбазола, а именно, приведены сведения об их строении, происхождении, классификации, основных представителях класса, находящихся на различных стадиях исследований и разрешенных к применению в клинике.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика соединений группы индолокарбазола

Первые индолокарбазолы были обнаружены в стрептомицетах и впоследствии выделены из многочисленных представителей флоры и фауны. На сегодняшний день этот класс соединений также пополнился широким разнообразием синтетических соединений [18]¹.

Индолокарбазолы – это класс гетероциклических

соединений, включающих в свой состав плоский цикл, состоящий из индольного и карбазольного элементов (рис. 1, 2) [18]. Индол, карбазол и их производные – бесцветные твердые кристаллические вещества, не растворяющиеся в воде. В стандартных условиях температура плавления индола – 52°C, карбазола – при 247–248°C, температура кипения – 253°C и 354–355°C, соответственно^{2,3}. Карбазольный фрагмент служит лигандом для многих рецепторов и обладает свойством обратимо связываться с ферментами, в частности с ДНК-топоизомеразой I [19], а индольный элемент отвечает за взаимодействие с ДНК [20, 21].

К классу индолокарбазолов относятся 5 подклассов соединений, различающихся структурой плоского ароматического цикла. Речь идет о 5-ти изомерах полициклической системы: индоло[2,3-а]карбазоле (1), индоло[2,3-б]карбазоле (2), индоло[2,3-с]карбазоле (3), индоло[3,2-а]карбазоле (4) и индоло[3,2-б]карбазоле (5) (рис. 3) [18].

Наиболее обширным, биологически значимым и детально изученным является подкласс производных 11,12-дигидроиндоло[2,3-а]карбазола, который включает преимущественно соединения, имеющие в качестве структурной основы индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазольный цикл, в котором 2 индольных фрагмента соединены через бензольный цикл с амидной или имидной группой. Индольные фрагменты соединены через 1 или 2 связи с углеводным фрагментом. При этом в данном подклассе также выделяют небольшую группу соединений, не включающих в свой состав дополнительный пиррольный цикл [18].

Основываясь на количестве гликозидных связей, связывающих углеводный фрагмент с изоиндольным каркасом, производные индолокарбазола можно разделить на 2 подкласса – соединения группы стауроспорина (а) и ребеккамицина (в). У стауроспорина и его производных, например, K252a (б), гликозид связан с 2 индольными группами через атомы азота в отличие от представителей группы ребеккамицина, например, холирин А (г), у которых углеводный остаток присоединяется только к одному индолу. Гетероцикл стауроспорина соединен с лактонным кольцом, гетероцикл ребеккамицина – с имидным кольцом (рис. 4) [22]. В качестве углеводных остатков в структуру индолокарбазолов могут быть включены как моносахара [23, 24], так и дисахара [25–38].

Впрочем, в литературе описаны и производные индолокарбазолов, имеющих иное строение, напри-

¹ ClassyFire. A few examples of indolocarbazoles found in the ClassyFire database. The Metabolomics Innovation Centre (TMIC) [Электронный ресурс]. URL: http://classyfire.wishartlab.com/tax_nodes/C0001866.

² PubChem Compound Summary for CID 798, Indole. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6854>

³ PubChem Compound Summary for CID 6854, Carbazole. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6854>

мер, Go 6976 (рис. 5) и AEB071 (сотрастури́н) (рис. 6) – селективные ингибиторы изоферментов протеинкиназы C α , β 1, δ , ι и ζ . В отличие от стауроспорина, Go 6976 представляет собой метил- и цианоалкилзамещенный негликозидный индолокарбазол [29], сотрастури́н содержит пиперазиновое кольцо, в котором атом азота в кольце несет арильную группу [30].

Различные модификации природных и синтетических производных индолокарбазолов приводят к изменениям их физико-химических свойств и биологической активности, что важно для разработки потенциальных противоопухолевых агентов. Очевидно, что на противоопухолевый эффект целевого соединения могут оказывать влияние как заместители в агликоне, так и природа гликозидного остатка, изменяя фармакодинамические и фармакокинетические свойства [31].

Представители класса индолокарбазолов

Стауроспорин – первое из открытых соединений производных индолокарбазола, был изолирован в 1977 г. в Институте Китасато (Япония) из культур *Streptomyces staurosporeus* и *Streptomyces actuosus*. Стауроспорин оказывает противогрибковое и гипотензивное действие, подавляет агрегацию тромбоцитов, является мощным ингибитором различных протеинкиназ, что обуславливает его применение в качестве противоопухолевого препарата [32, 33].

В 1983 г. из штамма актинобактерий C-38383 был выделен родоначальник второй группы производных индолокарбазола ребеккамицин (NSC 655649) (Bristol-Myers Co., США) [34], который структурно схож с стауроспорином, но обладает меньшей ингибирующей активностью в отношении протеинкиназ [35]. Механизм противоопухолевого действия ребеккамицина связан с ингибированием топоизомеразы I, что обусловлено его способностью взаимодействовать с ДНК [36].

С целью повышения растворимости и увеличения биологической активности гидрофобные индолокарбазолы стауроспорин и ребеккамицин подвергались различным модификациям: а) присоединение заместителей к верхнему гетероциклу, замену атомов в верхнем гетероцикле или удаление гетероцикла; б) модификации плоского хромофора; в) модификации замены или удаления углеводной части [37–39].

Производные стауроспорина

Мидостаури́н (CGP 41251, PKC 412, NVP-PKC412) (рис. 7) представляет собой N-бензоильное⁴ производное стауроспорина и является синтетическим ингибитором множества киназ, включая FLT3 и KIT, с

антиангиогенной и противоопухолевой активностью [40]. Одобрен FDA⁵ и EMA⁶ под ТН Rydapt® (Novartis Pharmaceuticals, Швейцария)⁷, в России данный ЛП зарегистрирован под ТН Митикайд® (ЛП-005927)⁸. ЛП представляет собой капсулы с жидким содержимым для перорального применения, каждая из которых содержит 25 мг мидостаурина⁹.

Энзастаури́н (LY-317615, LY317615) (Eli Lilly and Company, США) (рис. 8) представляет собой полученный из стауроспорина ациклический бисиндололилмалеимид, селективно ингибирующий протеинкиназу- β . Механизм противоопухолевого действия энзастаурина обусловлен несколькими эффектами. Во-первых, препарат обладает антиангиогенными свойствами, связанными со снижением уровня фактора роста эндотелия сосудов. Во-вторых, энзастаури́н напрямую индуцирует гибель опухолевых клеток за счет снижения фосфорилирования протеинкиназы [41]. Проводились многочисленные исследования в моно- и комбинированной терапии онкологических заболеваний различных нозологий, например, опухолей нервной системы [42–44], толстой кишки [45], лимфомы [46–49], миеломы и макроглобулинемии Вальденстрема [50], немелкоклеточного рака лёгкого [51], предстательной железы [52], яичников [53] и др.

Сотрастури́н (AEB071) (Novartis Pharmaceuticals, Швейцария) (рис. 56) является селективным ингибитором PKC β [54], предотвращающим активацию Т-клеток, имеет пиперазиновое кольцо, поэтому данное соединение можно отнести к классу органических соединений, известных как н-арилпиперазины (рис. 6) [55]. Исследовалось применение сотрастурина в терапии диффузной В-крупноклеточной лимфомы, рака желудка [56], ульвеальной меланомы [57], псориаза [58], а также при трансплантации почек [59, 60].

Лестауртиниб (A-154475, A-154475.0, CEP-701, KT-555, KT-5555, KT5555, SP-924, SP924, SPM-924) (Cephalon, Inc., США) (рис. 9)¹⁰. Изучался в лечении инфекций центральной нервной системы, вызванных свободноживущими амёбами [61], миелоидного лейкоза [62–64], полицитемии и эссенциальной тромбоцитозии [65], миелофиброза [66], рака предстательной железы [67, 68], нейробластом [69, 70] псориаза [71].

⁵ Highlights of prescribing information. Rydapt. U.S. Food and Drug Administration [Электронный ресурс]. URL: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/207997s000lbl.pdf

⁶ Rydapt. European Medicines Agency [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rydapt>

⁷ RYDAPT® (midostaurin) Capsules. AML & ASM Treatment Novartis AG [Электронный ресурс]. URL: <https://www.rydapt.com/>

⁸ Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Митикайд®. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru>

⁹ Highlights of prescribing information. Rydapt. U.S. Food and Drug Administration.

¹⁰ Lestaurtinib. DrugBank [Электронный ресурс]. URL: <https://www.drugbank.ca/drugs/DB06469>

⁴ PubChem. Compound Summary for CID 9829523, Midostaurin. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Midostaurin>

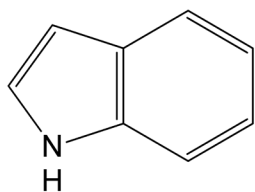


Рисунок 1 – Структурная формула индола

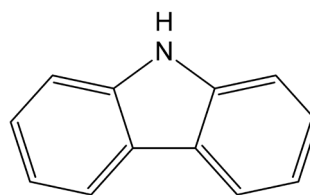


Рисунок 2 – Структурная формула карбазола

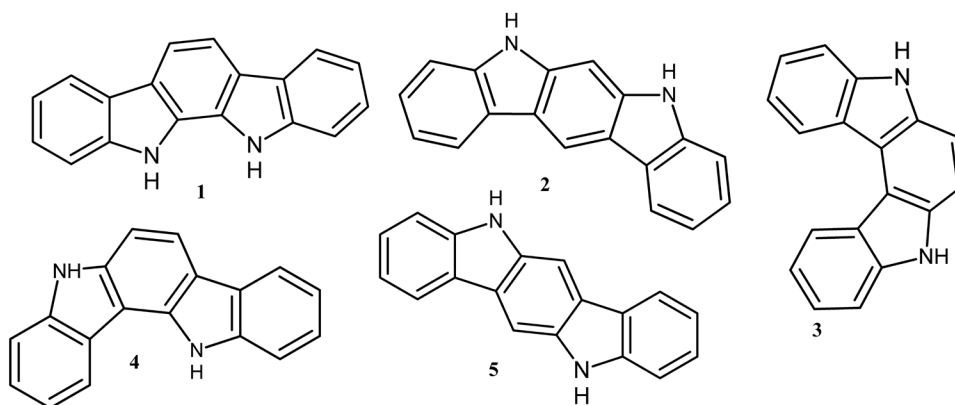
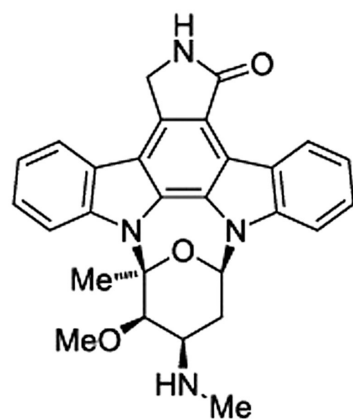
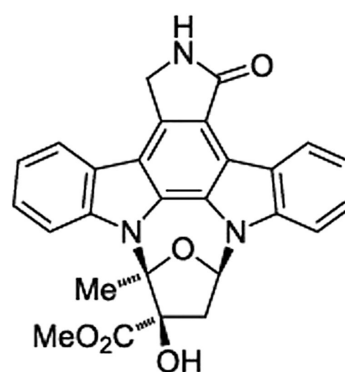


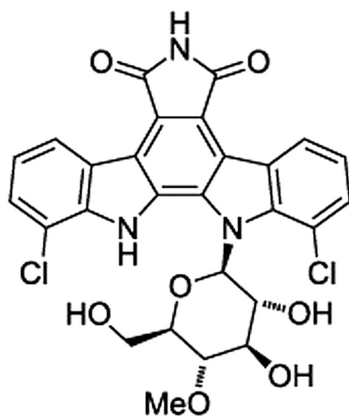
Рисунок 3 – Структурные формулы изомеров индолокразолов



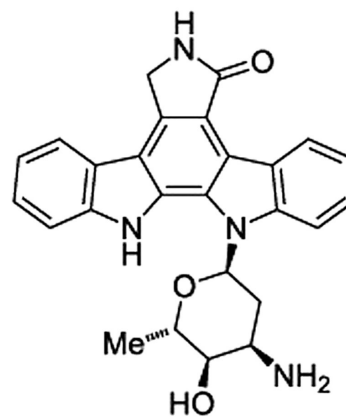
а



б



в



г

Рисунок 4 – Структурные формулы производных индолокразола

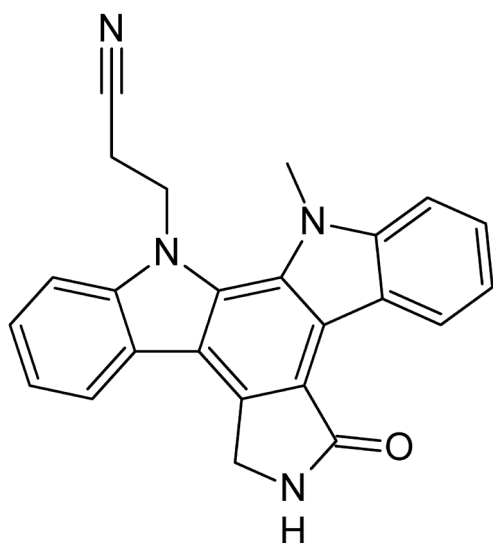


Рисунок 5 – Структурная формула Go 6976

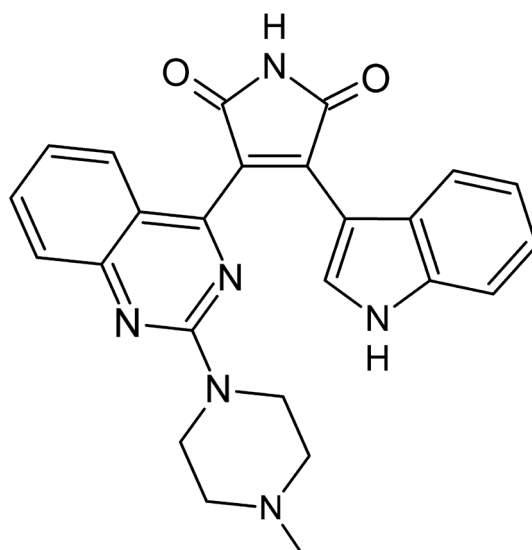


Рисунок 6 – Структурная формула сотрастаурина

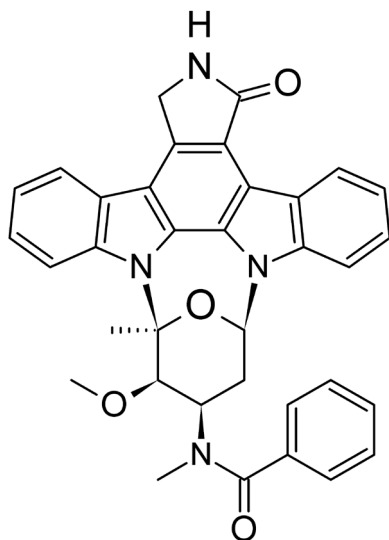


Рисунок 7 – Структурная формула мидостаурина

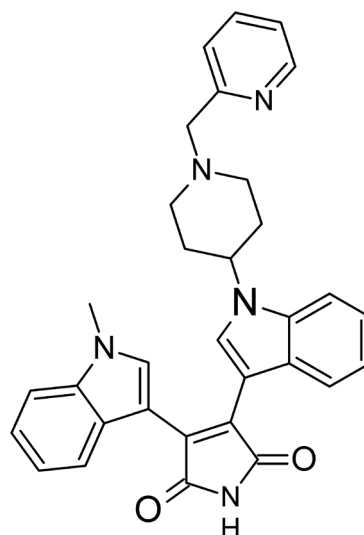


Рисунок 8 – Структурная формула энзастаурина

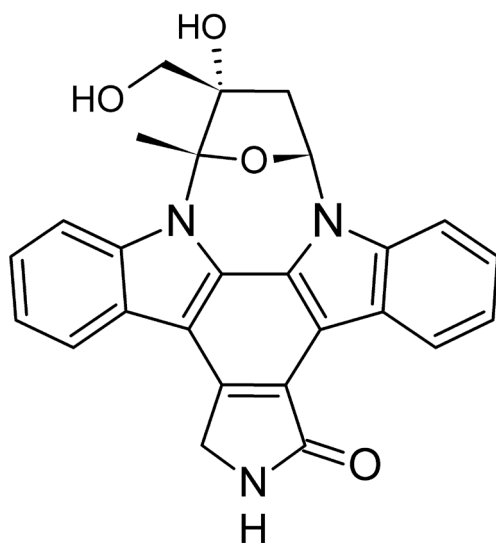


Рисунок 9 – Структурная формула лестауртиниба

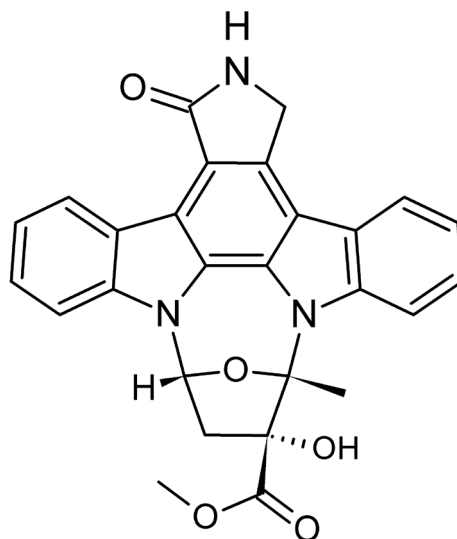


Рисунок 10 – Структурная формула K-252a

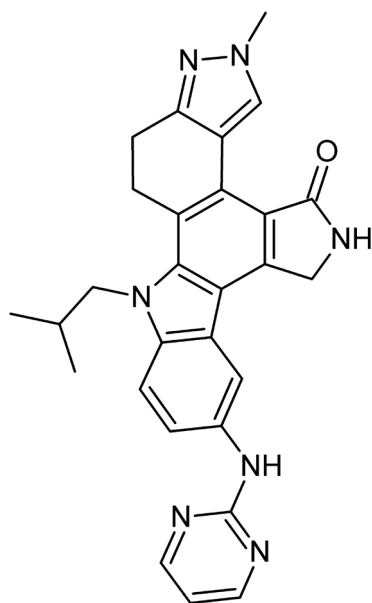


Рисунок 11 – Структурная формула CEP-11981

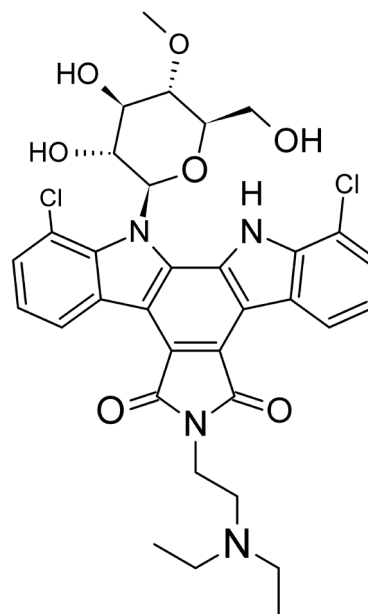


Рисунок 12 – Структурная формула бекатекарина

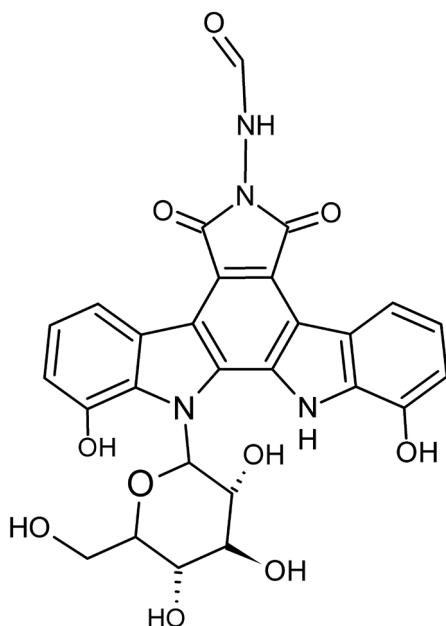


Рисунок 13 – Структурная формула NB-506

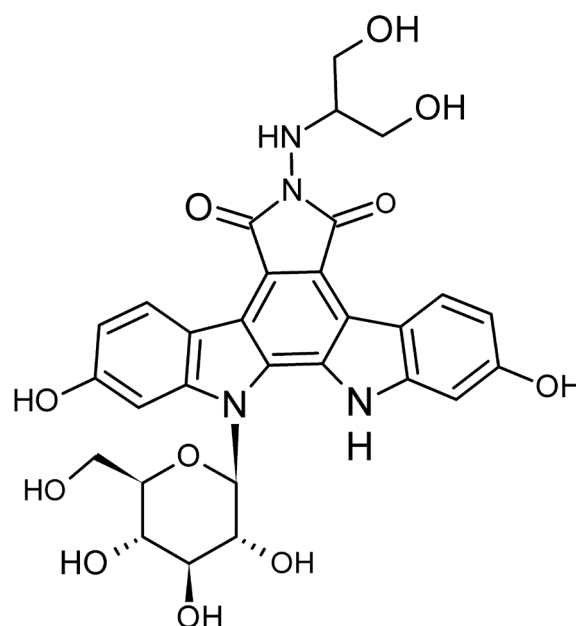


Рисунок 14 – Структурная формула эдотекарина

Среди производных стауроспорина антибиотик K-252a (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Япония) (рис. 10)¹¹, выделенное из культуры *Nocardopsis* sp. K-252a, представляет собой уникальный по своей структуре индолокарбазольный гликозид и проявляет мощную нейропротекторную противоопухолевую активность. K-252a состоит из K-252c и необычного дигидрострептозного фрагмента, связанных вместе двумя связями C-N [72]. Его полусинтетическое производное KT5720 ингибирует цАМФ-зависимую про-

теинкиназу. Активность KT5720 подтверждена на гранулёзных клетках яичника животных [73, 74].

Перспективным полусинтетическим производным стауроспорина является **стаупримид** (The Scripps Research Institute, США), который подавляет транскрипцию онкогена MYC NME2, а также увеличивает эффективность направленной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток [75, 76].

CEP-11981 (Cephalon, Inc., США) (рис. 11) – это таргетный препарат для перорального введения, проявляющий высокую ингибирующую активность в отношении нескольких мишеней – рецепторов фактора роста эндотелия сосудов 1 и 2, тирозинкиназы 2

¹¹ PubChem. Compound Summary for CID 3035817, Antibiotic K 252a. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Antibiotic-K-252a>

и фактора роста фибробластов-1, протоонкоген c-SRC и Aurora A. Исследования фармакологической активности на моделях опухолей животных и человека показали устойчивое дозозависимое антиангиогенное и противоопухолевое действие. Кроме того, CEP-11981 показал превосходную биодоступность, метаболическую стабильность и другие фармакокинетические свойства. Завершены клинические исследования I фазы по оценке фармакокинетики и фармакодинамики CEP-11981 у пациентов с запущенными, рецидивирующими/рефрактерными солидными опухолями [77, 78].

Go 6976 (Godecke AG, Германия) (рис. 5) – производное индолокарбазола, содержащее вместо гликозидного остатка пропаннитриловый радикал¹². Go 6976 является селективным ингибитором PKC α и β , умеренно ингибирует активацию протеинкиназы, регулируемой внеклеточными сигналами [79]. Кроме того, данный индолокарбазол является потенциальным противоопухолевым препаратом благодаря его способности стимулировать образование клеточных соединений (образование повышенного количества десмосом и сращений), подавлять миграцию и инвазию опухолевых клеток [80].

Также в литературе имеются данные о множестве других соединений производных стауроспорина: ZHD-0501 [81]; BMY-41950 (RK 1409) [82]; UCN-01 и UCN-02 [83]; CEP-7055 и CEP-5214 [84]; CEP-701; CEP-2563 и CEP-751 (KT-6587) [85]; KT5926 [86]; Ro 318220 и GF 109203X [87]; CEP-1347¹³ и др.

Среди отечественных соединений производных стауроспорина наиболее известны N-гликозиды индолокарбазолов: ЛХС-976, ЛХС-983, ЛХС-985, ЛХС-999, ЛХС-1006, ЛХС-1007, ЛХС-1040, ЛХС-1054, ЛХС-1098, ЛХС-1208, ЛХС-1269 и др. [88-93]. Среди них на сегодняшний день как противоопухолевые средства наиболее изученными являются соединения ЛХС-1208 и ЛХС-1269.

Производное индолокарбазола **ЛХС-1208** проявляет сильную ингибирующую активность в отношении киназ¹⁴ – циклинзависимой киназы, протеинкиназы C и тирозинкиназы; второй мишенью является ДНК и комплекс ДНК с топоизомеразой. К настоящему времени завершены доклинические испытания инъекционной лекарственной формы ЛХС-1208, содержащей в качестве сорастворителя гидрофобной активной субстанции диметилсульфоксид и солюбилизатор коллидон 17PF [94]. Также для данного соединения разработана ЛФ на основе липосом в виде лиофилизата для приготовления эмульсии для инъекций [95].

ЛХС-1269 – производное индолокарбазола с

углеводным остатком ксилозой, обладающее цитотоксическим и антиангиогенным действием и показавшее высокую противоопухолевую активность в отношении ряда перевиваемых асцитных и солидных моделей опухолей [96, 97]. К настоящему времени для ЛХС-1269 разработан состав и технология получения инъекционной липосомальной лекарственной формы [98].

Производные ребеккамицина

На основе ребеккамицина был получен гликозил-дихлориндолокарбазольный аналог с улучшенной растворимостью в воде – бекатекарин (BMS-181176, BMY-27557, NSC-655649, XL 119, XL-119, XL119) (National Cancer Institute, США) (рис. 12)¹⁵ [99]. Бекатекарин представляет собой противоопухолевый антибиотик с ингибирующей активностью как в отношении топоизомеразы I, так и в отношении топоизомеразы II, а также способностью интеркалировать ДНК [100, 104]. Исследовался в лечении рака лёгкого [101, 104], рака крови [102], опухолей нервной системы [99] и солидных опухолей [103].

NB-506 (Banyu Co., Япония) (рис. 13) представляет собой гликозидное производное ребеккамицина, противоопухолевая активность которого обусловлена его способностью взаимодействовать с ДНК и ингибировать топоизомеразу I. Остаток глюкозы, присоединенный к планарному хромофору индолокарбазола, играет значительную роль во взаимодействии ЛС с нуклеиновыми кислотами и способствует стабилизации ковалентных комплексов топоизомеразы I–ДНК [105]. Сообщается, что NB-506 находится на стадии клинических исследований [106].

Эдотекарин (J-107088, J-107088, PF-804950, PNA-782615) (Banyu Co., Япония) (рис. 14) является производным NB-506 с широким спектром противоопухолевой активности и представляет собой ингибитор топоизомеразы I, который индуцирует расщепление одноцепочечной ДНК более эффективно, чем исходный индолокарбазол или камптотецин. В отличие от других ингибиторов топоизомеразы I противоопухолевая активность меньше зависит от клеточного цикла. Несмотря на то, J-107088 имеет сходную со стауроспорином структуру, данный препарат не обладает свойствами ингибитора протеинкиназ [107]. Активно исследовался в моно- и комбинированной терапии онкологических заболеваний [108–115].

Также было обнаружено, что при выращивании в определённой среде, содержащей 0,05% раствора бромиды, *Saccharothrix aerocolonigenes* ATCC 39243 производит аналог ребеккамицина, который был обозначен как бромбеккамицин. Он имеет ту же структуру, что и ребеккамицин, за исключением замены двух атомов хлора атомами брома в молекуле.

¹² PubChem Compound Summary for CID 3501, Go-6976. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Go-6976>

¹³ CEP-1347. DrugBank [Электронный ресурс]. URL: <https://go.drugbank.com/drugs/DB05403>

¹⁴ Изоферменты не указаны.

¹⁵ PubChem Compound Summary for CID 101524, Becatecarin. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information [Электронный ресурс]. URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Becatecarin>

Авторы исследования предполагают наличие у соединения активности против лейкоза P-388 мышей [116].

На основе ребеккамицина также были получены такие соединения, как BMS-250749, BMS-210287, BMS-251873, SA315F, AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1, AT2433-B2 и др. [117].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным вопросом медицинской науки является создание новых ЛП для терапии онкологических заболеваний. Перспективным классом противоопухолевых препаратов являются производные индолакарбазолов, характеризующихся направленным механизмом действия на такие мишени, как киназы (особенно PKC и её изоферменты), ДНК и ДНК-топоизомеразы I и II. Эти соединения, наряду с противоопухолевым действием, обладают широким спектром

биологической активности, что также позволяет применять их в терапии иных нозологий, в том числе в трансплантологии.

К настоящему времени синтезировано довольно большое количество соединений, находящихся на различных стадиях доклинических и клинических исследований, относящихся к двум подклассам – производные стауроспорина и ребеккамицина. Однако для применения в клинической практике пока разрешен лишь один ЛП на основе производного стауроспорина – мидостаурин, зарегистрированный за рубежом под ТН Rydapt®, в РФ – Митикайд. Поэтому для расширения арсенала таргетных противоопухолевых препаратов необходимо дальнейшее изучение известных синтезированных производных индолакарбазола, а также поиск новых соединений с улучшенными характеристиками.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

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

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.П. Колпаксиди – написание, планирование и редактирование обзора, поиск материалов;
М.В. Дмитриева – планирование и редактирование обзора, планирование, поиск материалов;
И.В. Ярош – поиск материалов; И.И. Краснюк – поиск материалов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Falzone L., Salomone S., Libra M. Evolution of cancer pharmacological treatments at the turn of the third millennium // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1300. DOI: 10.3389/fphar.2018.01300.
2. Sung H., Siegel R.L., Jemal A., Ferlay J., Laversanne M., Soerjomataram I., Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries // *CA: a cancer journal for clinicians*. – 2021. – Vol. 71, No. 3. – P. 209–249. DOI: 10.3322/caac.21660.
3. Kroschinsky F., Stölzel F., von Bonin S., Beutel G., Kochanek M., Kiehl M., Schellongowski P. Intensive Care in Hematological and Oncological Patients (iCHOP) Collaborative Group. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management // *Crit Care*. – 2017. – Vol. 21, No. 1. – P. 89. DOI: 10.1186/s13054-017-1678-1.
4. Olano C., Méndez C., Salas J. A. Antitumor compounds from marine actinomycetes // *Marine drugs*. – 2009. – Vol. 7, No. 2. – P. 210–248. DOI: 10.3390/md7020210.
5. Bashir M., Bano A., Ijaz A.S., Chaudhary B.A. Recent developments and biological activities of N-substituted carbazole derivatives: a review // *Molecules*. – 2015. – Vol. 20, No. 8. – P. 13496–13517 DOI: 10.3390/molecules200813496.
6. Cartuche L., Sifaoui I., López-Arencibia A., Bethencourt-Estrella C.J., Nicolás-Hernández S.D., Lorenzo-Morales J., Piñero J.E., Díaz-Marrero A.R., Fernández J.J. Antikinetoplastid activity of indolocarbazoles from *Streptomyces sanyensis* // *Biomolecules*. – 2020. – Vol. 10, No. 4. – P. 657. DOI: 10.3390/biom10040657.
7. Knübel G., Larsen L.K., Moore R.E., Levine I.A., Patterson G.M. Cytotoxic, antiviral indolocarbazoles from a blue-green alga belonging to the Nostocaceae // *The Journal of antibiotics*. – 1990. – Vol. 43, No. 10. – P. 1236–1239. DOI: 10.7164/antibiotics.43.1236.
8. Wang W., Lv M., Zhao X., Zhang J. Developing a novel indolocarbazole as histone deacetylases inhibitor against leukemia cell lines // *Journal of analytical methods in chemistry*. – 2015. – Vol. 2015. DOI: 10.1155/2015/675053.
9. Киселева М.П., Покровский В.С., Татарский В.В., Борисова Л.М., Голубева И.С., Эктова Л.В. Производные индолакарбазолов – перспективный класс противоопухолевых препаратов // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2018. – Т. 17, № 4. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-4-20-26.
10. Деженкова Л.Г., Цветков В.Б., Штиль А.А. Ингибиторы топоизомераз I и II: химическая структура, механизмы действия и роль в химиотерапии опухолей // *Успехи химии*. – 2014. – Т. 83, № 1. – С. 82–94.
11. Cartuche L., Reyes-Batlle M., Sifaoui I., Arberas-Jimenez I., Pinero J.E., Fernandez J.J., Lorenzo-Morales J., Diaz-Marrero R. Antiamoebic activities of indolocarbazole metabolites isolated from *Streptomyces sanyensis* cultures // *Marine drugs*. – 2019. – Vol. 17, No. 10. – P. 588. DOI: 10.3390/md17100588.
12. Mellor H., Parker P.J. The extended protein kinase C superfamily // *Biochemical Journal*. – 1998. – Vol. 332, No. 2. – P. 281–292. DOI: 10.1042/bj3320281.
13. List A.F. Non-P-glycoprotein drug export mechanisms of multidrug resistance // *Seminars in hematology*. – 1997. – Vol. 34, No. 4 Suppl 5. – P. 20–24.
14. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2011. – Т. 10, № 3.
15. Трещалин М.И., Неборак Е.В. Топоизомеразы: особен-

- ности действия, классификация, клеточные функции, ингибиторы, антрафурандион // Российский онкологический журнал. – 2018. – Т. 23, № 2. DOI: 0.18821/1028-9984-2018-23-2-60-7.
16. Вартанян А.А., Барышникова М.А., Еремина В.А., Минер Т.Д., Тихонова Н.И., Кузьмина Н.Е., Эктова Л.В. Производные индолокарбазолов, блокирующие васкулогенную мимикрию в опухоли. Патент РФ 2557554 от 09.09.2014 г.
 17. Acero N., Braña M.F., Añorbe L., Domínguez G., Muñoz-Mingarro D., Mitjans F., Piulats J. Synthesis and biological evaluation of novel indolocarbazoles with anti-angiogenic activity // *European journal of medicinal chemistry*. – 2012. – Vol. 48. – P. 108–113. DOI: 10.1016/j.ejmech.2011.11.040. Epub 2011 Dec 7.
 18. Зенков Р.Г., Эктова Л.В., Власова О.А., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г., Кирсанов К.И. Индоло[2,3-а]карбазолы: разнообразие, биологические свойства, применение в противоопухолевой терапии // *Химия гетероциклических соединений*. – 2020. – Т. 56, № 6. – С. 644–658. DOI: 10.17650/1726-9784-2019-18-2-32-39.
 19. Parisi O.I., Morelli C., Puoci F., Saturnino C., Caruso A., Sisci D., Trombino G.E., Picci N., Sinicropi M.S. Magnetic molecularly imprinted polymers (MMIPs) for carbazole derivative release in targeted cancer therapy // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2014. – Vol. 2, No. 38. – P. 6619–6625. DOI: 10.1039/c4tb00607k.
 20. Caruso A., Ceramella J., Iacopetta D., Saturnino C., Mauro M.V., Bruno R., Aquaro S., Sinicropi M.S. Carbazole derivatives as antiviral agents: an overview // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No. 10. – P. 1912. DOI: 10.3390/molecules24101912.
 21. Lafayette E.A., de Almeida S.M.V., Cavalcanti Santos R.V., de Oliveira J.F., Amorim C.A.D.C., da Silva R.M.F., Pitta M.G.D.R., Pitta I.D.R., de Moura R.O., de Carvalho Júnior L.B., de Melo Rêgo M.J.B., de Lima M.D.C.A. Synthesis of novel indole derivatives as promising DNA-binding agents and evaluation of antitumor and antitopoisomerase I activities // *European journal of medicinal chemistry*. – 2017. – Vol. 136. – P. 511–522. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.05.012.
 22. Speck K., Magauer T. The chemistry of isoindole natural products // *Beilstein journal of organic chemistry*. – 2013. – Vol. 9, No. 1. – P. 2048–2078. DOI: 10.3762/bjoc.9.243.
 23. Борисова Л.М., Голубева И.С., Горюнова О.В., Ерёмина В.А., Жукова О.С., Киселёва М.П., Маркова Н.П., Медведева Л.А., Мельник С.Я., Минер Т.Д., Смирнова З.С., Тихонова Н.И., Фетисова Л.В., Эктова Л.В., Ярцева И.В. N-гликозиды индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазолов, обладающие противоопухолевой активностью. Патент РФ 2548045 от 27.02.2014 г.
 24. Ohkubo M., Nishimura T., Kawamoto H., Nakano M., Honma T., Yoshinari T., Arakawa H., Suda H., Morishima H., Nishimura S. Synthesis and biological activities of NB-506 analogues modified at the glucose group // *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. – 2000. – Vol. 10, No. 5. – P. 419–422. DOI: 10.1016/S0960-894X(00)00004-4.
 25. Carrasco C., Facompré M., Chisholm J.D., Van Vranken D.L., Wilson W.D., Bailly C. DNA sequence recognition by the indolocarbazole antitumor antibiotic AT2433-B1 and its diastereoisomer // *Nucleic acids research*. – 2002. – Vol. 30, No. 8. – P. 1774–1781. DOI: 10.1093/nar/30.8.1774.
 26. Animati F., Berettoni M., Bigioni M., Binaschi M., Felicetti P., Gontrani L., Incani O., Madami A., Monteagudo E., Olivieri L., Resta S., Rossi C., Cipollone A. Synthesis, biological evaluation, and molecular modeling studies of rebeccamycin analogues modified in the carbohydrate moiety // *ChemMedChem*. – 2008. – Vol. 3, No. 2. – P. 266. DOI: 10.1002/cmdc.200700232.
 27. Singh S., Kim Y., Wang F., Bigelow L., Endres M., Kharel M.K., Babnigg G., Bingman C.A., Joachimiak A., Thorson J.S., Phillips G.N. Jr. Structural characterization of AtmS13, a putative sugar aminotransferase involved in indolocarbazole AT 2433 aminopentose biosynthesis // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. – 2015. – Vol. 83, No. 8. – P. 1547–1554. DOI: 10.1002/prot.24844.
 28. Shaaban K.A., Elshahawi S.I., Wang X., Horn J., Kharel M.K., Leggas M., Thorson J.S. Cytotoxic indolocarbazoles from *Actinomadura melliaura* ATCC 39691 // *Journal of natural products*. – 2015. – Vol. 78, No. 7. – P. 1723–1729. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00429.
 29. Martiny-Baron G., Kazanietz M.G., Mischak H., Blumberg P.M., Kochs G., Hug H., Marmé D., Schächtele C. Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976 // *Journal of Biological Chemistry*. – 1993. – Vol. 268, No. 13. – P. 9194–9197.
 30. Wagner J., von Matt P., Sedrani R., Albert R., Cooke N., Ehrhardt C., Geiser M., Rummel G., Stark W., Strauss A., Cowan-Jacob S.W., Beerli C., Weckbecker G., Evenou J.P., Zenke G., Cottens S. Discovery of 3-(1 H-indol-3-yl)-4-[2-(4-methylpiperazin-1-yl) quinazolin-4-yl] pyrrole-2, 5-dione (AEB071), a potent and selective inhibitor of protein kinase C isotypes // *Journal of medicinal chemistry*. – 2009. – Vol. 52, No. 20. – P. 6193–6196. DOI: 10.1021/jm901108b.
 31. Киселева М.П., Покровский В.С., Борисова Л.М., Голубева И.С., Эктова Л.В. Влияние химической структуры производных N-гликозидов индоло [2, 3-а] пирроло [3, 4-с] карбазолов на противоопухолевую активность // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2019. – Т. 18, № 2. DOI: 10.17650 / 1726-9784-2019-18-2-32-39.
 32. Omura S., Sasaki Y., Iwai Y., Takeshima H. Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism // *The Journal of antibiotics*. – 1995. – Vol. 48, No. 7. – P. 535–548. DOI: 10.7164/antibiotics.48.535.
 33. Salas A.P., Zhu L., Sánchez C., Braña A.F., Rohr J., Méndez C., Salas J.A. Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumour indolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaG glycosyltransferase // *Molecular microbiology*. – 2005. – Vol. 58, No. 1. – P. 17–27. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04777.x.
 34. Bush J.A., Long B.H., Catino J.J., Bradner W.T., Tomita K. Production and biological activity of rebeccamycin, a novel antitumor agent // *The Journal of antibiotics*. – 1987. – Vol. 40, No. 5. – P. 668–678. DOI: 10.7164/antibiotics.40.668.
 35. Nettleton D.E., Doyle T.W., Krishnan B., Matsumoto G.K., Clardy J. Isolation and structure of rebeccamycin-a new antitumor antibiotic from *Nocardia aerocoligenes* // *Tetrahedron letters*. – 1985. – Vol. 26, No. 34. – P. 4011–4014. DOI: 10.1016/S0040-4039(00)89280-1.
 36. Bailly C., Riou J.F., Colson P., Houssier C., Rodrigues-Pereira E., Prudhomme M. DNA cleavage by topoisomerase I in the presence of indolocarbazole derivatives of rebeccamycin // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, No. 13. – P. 3917–3929. DOI: 10.1021/bi9624898.
 37. Wada Y., Nagasaki H., Tokuda M., Orito K. Synthesis of N-protected staurosporinones // *The Journal of organic chemistry*. – 2007. – Vol. 72, No. 6. – P. 2008–2014. DOI: 10.1021/jo062184r.
 38. Prudhomme M. Biological targets of antitumor indolocarbazoles bearing a sugar moiety // *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*. – 2004. – Vol. 4, No. 6. – P. 509–521. DOI: 10.2174/1568011043352650.
 39. Gescher A. Analogs of staurosporine: potential anticancer

- drugs? // General Pharmacology: The Vascular System. – 1998. – Vol. 31, No. 5. – P. 721–728. DOI: 10.1016/s0306-3623(98)00069-x.
40. Kim E. S. Midostaurin: first global approval // *Drugs*. – 2017. – Vol. 77, No. 11. – P. 1251–1259.
41. Jane E.P., Pollack I.F. Enzastaurin induces H2AX phosphorylation to regulate apoptosis via MAPK signalling in malignant glioma cells // *European Journal of Cancer*. – 2010. – Vol. 46. – No. 2. – P. 412–419. DOI: 10.1016/j.ejca.2009.10.014.
42. Kilburn L.B., Kocak M., Decker R.L., Wetmore C., Chintagumpala M., Su J., Goldman S., Banerjee A., Gilbertson R., Fouladi M., Kun L., Boyett J.M., Blaney S.M. A phase 1 and pharmacokinetic study of enzastaurin in pediatric patients with refractory primary central nervous system tumors: a pediatric brain tumor consortium study // *Neuro-oncology*. – 2015. – Vol. 17, No. 2. – P. 303–311. DOI: 10.1093/neuonc/nou114.
43. Butowski N., Chang S.M., Lamborn K.R., Polley M.Y., Pieper R., Costello J.F., Vandenberg S., Parvataneni R., Nicole A., Sneed P.K., Clarke J., Hsieh E., Costa B.M., Reis R.M., Hristova-Kazmierski M., Nicol S.J., Thornton D.E., Prados M.D. Phase II and pharmacogenomics study of enzastaurin plus temozolomide during and following radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme and gliosarcoma // *Neuro Oncol.* – 2011. – Vol. 13, No. 12. – P. 1331–1338. DOI: 10.1093/neuonc/nor130.
44. Wick W, Puduvalli V.K., Chamberlain M.C., van den Bent M.J., Carpentier A.F., Cher L.M., Mason W., Weller M., Hong S., Musib L., Liepa A.M., Thornton D.E., Fine H.A. Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma // *Journal of clinical oncology*. – 2010. – Vol. 28, No. 7. – P. 1168. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.2595.
45. Glimelius B., Lahn M., Gawande S., Cleverly A., Darstein C., Musib L., Liu Y., Spindler K.L., Frödin J.E., Berglund A., Byström P., Qvortrup C., Jakobsen A., Pfeiffer P. A window of opportunity phase II study of enzastaurin in chemo-naïve patients with asymptomatic metastatic colorectal cancer // *Annals of oncology*. – 2010. – Vol. 21, No. 5. – P. 1020–1026. DOI: 10.1093/annonc/mdp521.
46. He Y., Li J., Ding N., Wang X., Deng L., Xie Y., Ying Z., Liu W., Ping L., Zhang C., Song Y., Zhu J. Combination of Enzastaurin and Ibrutinib synergistically induces anti-tumor effects in diffuse large B cell lymphoma // *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 38, No. 1. – P. 86. DOI: 10.1186/s13046-019-1076-4.
47. Li X., Fang X., Li S., Zhang W., Yang N., Cui Y., Huang H., Cai R., Lin X., Fu X., Hong H., Lin T. A pharmacokinetic and safety study of a fixed oral dose of enzastaurin HCl in native Chinese patients with refractory solid tumors and lymphoma // *Oncotarget*. – 2016. – Vol. 7, No. 14. – P. 18585–18593. DOI: 10.18632/oncotarget.7875.
48. Morschhauser F., Seymour J.F., Kluin-Nelemans H.C., Grigg A., Wolf M., Pfreundschuh M., Tilly H., Raemaekers J., van't Veer M.B., Milpied N., Cartron G., Pezzutto A., Spencer A., Reyes F., Dreyling M. A phase II study of enzastaurin, a protein kinase C beta inhibitor, in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma. // *Annals of oncology*. – 2008. – Vol. 19, No. 2. – P. 247–253. DOI:10.1093/annonc/mdm463.
49. Querfeld C., Kuzel T.M., Kim Y.H., Porcu P., Duvic M., Musiek A., Rook A.H., Mark L.A., Pinter-Brown L., Hamid O., Lin B., Bian Y., Boye M., Day J.M., Rosen S.T. Multicenter phase II trial of enzastaurin in patients with relapsed or refractory advanced cutaneous T-cell lymphoma // *Leukemia & lymphoma*. – 2011. – Vol. 52, No. 8. – P. 1474–1480. DOI: 10.3109/10428194.2011.572265.
50. Ghobrial I.M., Vij R., Siegel D., Badros A., Kaufman J., Raju N., Jakubowiak A., Savona M.R., Obreja M., Berdeja J.G. A Phase Ib/II Study of Oprozomib in Patients with Advanced Multiple Myeloma and Waldenström Macroglobulinemia. // *Clinical Cancer Research*. – 2019. – Vol. 25, No. 16. – P. 4907–4916. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3728.
51. Chiappori A., Bepler G., Barlesi F., Soria J.C., Reck M., Bearz A., Barata F., Scagliotti G., Park K., Wagle A., Liepa A.M., Zhao Y.D., Chouaki N., Iscoe N., von Pawel J. Phase II, double-blinded, randomized study of enzastaurin plus pemetrexed as second-line therapy in patients with advanced non-small cell lung cancer // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2010. – Vol. 5, No. 3. – P. 369–375. DOI: 10.1097/JTO.0b013e3181cee24f.
52. Dreicer R., Garcia J., Hussain M., Rini B., Vogelzang N., Srinivas S., Somer B., Zhao Y.D., Kania M., Raghavan D. Oral enzastaurin in prostate cancer: a two-cohort phase II trial in patients with PSA progression in the non-metastatic castrate state and following docetaxel-based chemotherapy for castrate metastatic disease // *Investigational new drugs*. – 2011. – Vol. 29, No. 6. – P. 1441–1448. DOI: 10.1007/s10637-010-9428-0.
53. Usha L., Sill M.W., Darcy K.M., Benbrook D.M., Hurteau J.A., Michelin D.P., Mannel R.S., Hanjani P., De Geest K., Godwin A.K. A Gynecologic Oncology Group phase II trial of the protein kinase C-beta inhibitor, enzastaurin and evaluation of markers with potential predictive and prognostic value in persistent or recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies // *Gynecol Oncol.* – 2011. – Vol. 121, No. 3. – P. 455–461. DOI: 10.1016/j.ygyno.2011.02.013.
54. Naylor T.L., Tang H., Ratsch B.A., Enns A., Loo A., Chen L., Lenz P., Waters N.J., Schuler W., Dörken B., Yao Y.M., Warmuth M., Lenz G., Stegmeier F. Protein kinase C inhibitor sotrastaurin selectively inhibits the growth of CD79 mutant diffuse large B-cell lymphomas // *Cancer research*. – 2011. – Vol. 71, No. 7. – P. 2643–2653. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2525.
55. Fang Y.H., Joo D.J., Lim B.J., Huh K.H., Kim M.S., Suh H., Kim Y.S. The effects of AEB071 (sotrastaurin) with tacrolimus on rat heterotopic cardiac allograft rejection and survival // *Journal of Surgical Research*. – 2011. – Vol. 171, No. 1. – P. e133–e137. DOI: 10.1016/j.jss.2011.06.039.
56. Yuan Y., Yangmei Z., Rongrong S., Xiaowu L., Youwei Z., Sun S. Sotrastaurin attenuates the stemness of gastric cancer cells by targeting PKCδ. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 117. – P. 109165. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109165.
57. Piperno-Neumann S., Larkin J., Carvajal R.D., Luke J.J., Schwartz G.K., Hodi F.S., Sablin M.P., Shoushtari A.N., Szpakowski S., Chowdhury N.R., Brannon A.R., Ramkumar T., de Koning L., Derti A., Emery C., Yerramilli-Rao P., Kapiteijn E. Genomic profiling of metastatic uveal melanoma and clinical results of a phase I study of the protein kinase C inhibitor AEB071 // *Molecular cancer therapeutics*. – 2020. – Vol. 19, No. 4. – P. 1031–1039. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-19-0098.
58. Skvara H., Dawid M., Kleyn E., Wolff B., Meingassner J.G., Knight H., Dumortier T., Kopp T., Fallahi N., Stary G., Burkhart C., Grenet O., Wagner J., Hijazi Y., Morris R.E., McGeown C., Rordorf C., Griffiths C.E., Stingl G., Jung T. The PKC inhibitor AEB071 may be a therapeutic option for psoriasis // *The Journal of clinical investigation*. – 2008. – Vol. 118, No. 9. – P. 3151–3159. DOI: 10.1172/JCI35636.
59. Kovarik J.M., Steiger J.U., Grinyo J.M., Rostaing L., Arns W., Dantal J., Proot P., Budde K; Sotrastaurin Renal Transplant Study Group. Pharmacokinetics of sotrastaurin combined with tacrolimus or mycophenolic acid in de novo kidney

- transplant recipients // Transplantation. – 2011. – Vol. 91, No. 3. – P. 317–322. DOI: 10.1097/TP.0b013e318203860d.
60. Matz M., Naik M., Mashreghi M.F., Glander P., Neumayer H.H., Budde K. Evaluation of the novel protein kinase C inhibitor sotrastaurin as immunosuppressive therapy after renal transplantation // Expert opinion on drug metabolism & toxicology. – 2011. – Vol. 7, No. 1. – P. 103–113. DOI: 10.1517/17425255.2011.540238.
 61. Kangussu-Marcolino M.M., Ehrenkauf G.M., Chen E., Debnath A., Singh U. Identification of plicamycin, TG02, panobinostat, lestaurtinib, and GDC-0084 as promising compounds for the treatment of central nervous system infections caused by the free-living amoebae Naegleria, Acanthamoeba and Balamuthia // International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance. – 2019. – Vol. 11. – P. 80–94. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2019.10.003.
 62. Ramos N.R., Mo C.C., Karp J.E., Hourigan C.S. Current approaches in the treatment of relapsed and refractory acute myeloid leukemia // Journal of clinical medicine. – 2015. – Vol. 4, No. 4. – P. 665–695 DOI: 10.3390/jcm4040665.
 63. Knapper S., Burnett A.K., Littlewood T., Kell W.J., Agrawal S., Chopra R., Clark R., Levis M.J., Small D. A phase 2 trial of the FLT3 inhibitor lestaurtinib (CEP701) as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia not considered fit for intensive chemotherapy // Blood. – 2006. – Vol. 108, No. 10. – P. 3262–3270. DOI: 10.1182/blood-2006-04-015560.
 64. Sutamtewagul G., Vigil C.E. Clinical use of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia // OncoTargets and therapy. – 2018. – Vol. 11. – P. 7041. DOI: 10.2147/OTT.S171640.
 65. Hexner E., Roboz G., Hoffman R., Luger S., Mascarenhas J., Carroll M., Clementi R., Bensen-Kennedy D., Moliterno A. Open-label study of oral CEP-701 (lestaurtinib) in patients with polycythemia vera or essential thrombocythemia with JAK2-V617F mutation. // British journal of haematology. – 2014. – Vol. 164, No. 1. – P. 83–93. DOI: 10.1111/bjh.12607.
 66. Mascarenhas J., Baer M.R., Kessler C., Hexner E., Tremblay D., Price L., Sandy L., Weinberg R., Pahl H., Silverman L.R., Goldberg J.D., Kosiorek H., Dueck A.C., Hoffman R. Phase II trial of Lestaurtinib, a JAK2 inhibitor, in patients with myelofibrosis // Leukemia & lymphoma. – 2019. – Vol. 60, No. 5. – P. 1343–1345. DOI: 10.1080/10428194.2018.1532509.
 67. Festuccia C., Muzi P., Gravina G.L., Millimaggi D., Specia S., Dolo V., Ricivuto E., Vicentini C., Bologna M. Tyrosine kinase inhibitor CEP-701 blocks the NTRK1/NGF receptor and limits the invasive capability of prostate cancer cells in vitro. // International journal of oncology. – 2007. – Vol. 30, No. 1. – P. 193–200.
 68. Collins C., Carducci M.A., Eisenberger M.A., Isaacs J.T., Partin A.W., Pili R., Sinibaldi V.J., Walczak J.S., Denmeade S.R. Preclinical and clinical studies with the multi-kinase inhibitor CEP-701 as treatment for prostate cancer demonstrate the inadequacy of PSA response as a primary endpoint // Cancer biology & therapy. – 2007. – Vol. 6, No. 9. – P. 1356–1363. DOI: 10.4161/cbt.6.9.4541.
 69. Iyer R., Evans A.E., Qi X., Ho R., Minturn J.E., Zhao H., Balamuth N., Maris J.M., Brodeur G.M. Lestaurtinib enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in murine xenograft models of neuroblastoma // Clinical Cancer Research. – 2010. – Vol. 16, No. 5. – P. 1478–1485. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1531.
 70. Minturn J.E., Evans A.E., Villablanca J.G., Yanik G.A., Park J.R., Shusterman S., Groshen S., Hellriegel E.T., Bensen-Kennedy D., Matthay K.K., Brodeur G.M., Maris J.M. Phase I trial of lestaurtinib for children with refractory neuroblastoma: a new approaches to neuroblastoma therapy consortium study // Cancer chemotherapy and pharmacology. – 2011. – Vol. 68, No. 4. – P. 1057–1065. DOI: 10.1007/s00280-011-1581-4.
 71. Volc S., Ghoreschi K. Pathophysiological basis of systemic treatments in psoriasis // JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft. – 2016. – Vol. 14, No. 6. – P. 557–572. DOI: 10.1111/ddg.13050.
 72. Chiu H.T., Chen Y.L., Chen C.Y., Jin C., Lee M.N., Lin Y.C. Molecular cloning, sequence analysis and functional characterization of the gene cluster for biosynthesis of K-252a and its analogs // Molecular BioSystems. – 2009. – Vol. 5, No. 10. – P. 1180–1191. DOI: 10.1039/b905293c.
 73. Gadbois D.M., Crissman H.A., Tobey R.A., Bradbury E.M. Multiple kinase arrest points in the G1 phase of nontransformed mammalian cells are absent in transformed cells // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – Vol. 89, No. 18. – P. 8626–8630. DOI: 10.1073/pnas.89.18.8626.
 74. Makarevich A.V., Sirotkin A.V., Rafay J. Comparison of effects of protein kinase A, mitogen-activated protein kinase, and cyclin-dependent kinase blockers on rabbit ovarian granulosa cell functions //Hormone and metabolic research. – 2010. – Vol. 42, No. 13. – P. 936–943. DOI: 10.1055/s-0030-1267226.
 75. Zhu S., Wurdak H., Wang J., Lyssiotis C.A., Peters E.C., Cho C.Y., Wu X., Schultz P.G. A small molecule primes embryonic stem cells for differentiation // Cell stem cell. – 2009. – Vol. 4, No. 5. – P. 416–426. DOI: 10.1016/j.stem.2009.04.001.
 76. Bouvard C., Lim S.M., Ludka J., Yazdani N., Woods A.K., Chatterjee A.K., Schultz P.G., Zhu S. Small molecule selectively suppresses MYC transcription in cancer cells // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2017. – Vol. 114, No. 13. – P. 3497–3502. DOI: 10.1073/pnas.1702663114.
 77. Hudkins R.L., Becknell N.C., Zulli A.L., Underiner T.L., Angeles T.S., Aimone L.D., Albom M.S., Chang H., Miknyoczki S.J., Hunter K., Jones-Bolin S., Zhao H., Bacon E.R., Mallamo J.P., Ator M.A., Ruggeri B.A. Synthesis and biological profile of the pan-vascular endothelial growth factor receptor/tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor-like homology domains 2 (VEGF-R/TIE-2) inhibitor 11-(2-Methylpropyl)-12, 13-dihydro-2-methyl-8-(pyrimidin-2-ylamino)-4 H-indazolo [5, 4-a] pyrrolo [3, 4-c] carbazol-4-one (CEP-11981): a novel oncology therapeutic agent // Journal of medicinal chemistry. – 2012. – Vol. 55, No. 2. – P. 903–913. DOI: 10.1021/jm201449n.
 78. Pili R., Carducci M., Brown P., Hurwitz H. An open-label study to determine the maximum tolerated dose of the multitargeted tyrosine kinase inhibitor CEP-11981 in patients with advanced cancer // Investigational new drugs. – 2014. – Vol. 32, No. 6. – P. 1258–1268. DOI: 10.1007/s10637-014-0147-9.
 79. Higa-Nakamine S., Maeda N., Toku S., Yamamoto H. Involvement of protein kinase D1 in signal transduction from the protein kinase C pathway to the tyrosine kinase pathway in response to gonadotropin-releasing hormone // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290, No. 43. – P. 25974–25985. DOI: 10.1074/jbc.M115.681700.
 80. Koivunen J., Aaltonen V., Koskela S., Lehenkari P., Laato M., Peltonen J. Protein kinase C α/β inhibitor Go6976 promotes formation of cell junctions and inhibits invasion of urinary bladder carcinoma cells // Cancer research. – 2004. – Vol. 64, No. 16. – P. 5693–5701. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-03-3511.
 81. Xiao-Xian H., Cheng-Bin C., Qian-Qun G., Wei-Ming

- Z., Hong-Bing L., Jing-Yan G., Hiroyuki O. ZHD-0501, a novel naturally occurring staurosporine analog from *Actinomyces* sp. 007 // *Tetrahedron Letters*. – 2005. – Vol. 46, No. 36. – P. 6137–6140. DOI: 10.1016/j.tetlet.2005.06.154.
82. Schroeder D., Lam K.S., Mattei J., Hesler G.A. BMY-41950 antitumor antibiotic. U.S. Patent No. 5,073,633. 17 Dec. 1991.
83. Takahashi I., Saitoh Y., Yoshida M., Sano H., Nakano H., Morimoto M., Tamaoki T. UCN-01 and UCN-02, new selective inhibitors of protein kinase C. II. Purification, physico-chemical properties, structural determination and biological activities. // *The Journal of antibiotics*. – 1989. – Vol. 42, No. 4. – P. 571–576. DOI: 10.7164/antibiotics.42.571.
84. Ruggeri B., Singh J., Gingrich D., Angeles T., Albom M., Chang H., Robinson C., Hunter K., Dobrzanski P., Jones-Bolin S., Aimone L., Klein-Szanto A., Herbert J.M., Bono F., Schaeffer P., Casellas P., Bourie B., Pili R., Isaacs J., Ator M., Hudkins R., Vaught J., Mallamo J., Dionne C. CEP-7055: a novel, orally active pan inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases with potent antiangiogenic activity and antitumor efficacy in preclinical models // *Cancer research*. – 2003. – Vol. 63, No. 18. – P. 5978–5991.
85. Strock C.J., Park J.I., Rosen M., Dionne C., Ruggeri B., Jones-Bolin S., Denmeade S.R., Ball D.W., Nelkin B.D. CEP-701 and CEP-751 inhibit constitutively activated RET tyrosine kinase activity and block medullary thyroid carcinoma cell growth // *Cancer Research*. – 2003. – Vol. 63, No. 17. – P. 5559–5563.
86. Nakanishi S., Yamada K., Iwahashi K., Kuroda K., Kase H. KT5926, a potent and selective inhibitor of myosin light chain kinase // *Molecular pharmacology*. – 1990. – Vol. 37, No. 4. – P. 482–488.
87. Alessi D. R. The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1 β (Rsk-2) and p70 S6 kinase // *FEBS letters*. – 1997. – Vol. 402, No. 2–3. – P. 121–123. DOI: 10.1016/S0014-5793(96)01510-4.
88. Мельник С.Я., Власенкова Н.К., Гараева Л.Д., Голубева И.С., Горюнова О.В., Ерёмкина В.А., Маркова Н.П., Миникер Т.Д., Плихтяк И.Л., Тихонова Н.И., Эктова Л.В., Ярцева И.В. Способ получения N-гликозидов производных индоло[2,3-а]пирроло[3,4-с]карбазол-5,7-дионов, обладающих цитотоксической и противоопухолевой активностью. Патент № 2427585 от 10.12.2009 г.
89. Киселева М.П., Смирнова З.С., Борисова Л.М., Кубасова И.Ю., Эктова Л.В., Миникер Т.Д., Плихтяк И.Л., Медведева Л.А., Еремина В.А., Тихонова Н.И. Поиск новых противоопухолевых соединений среди производных N-гликозидов индоло[2,3-а]карбазолов // *Российский онкологический журнал*. – 2015. – Т. 20, № 1. – С. 33–37.
90. Голубева И.С., Горюнова О.В., Яворская Н.П. Сравнительное изучение *in vivo* потенциальных противоопухолевых свойств в ряду аминокислотных производных гликозидов индолокарбазола (развернутое сообщение) // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2018. – Т. 17, № 2. DOI: 10.17650/1726-9784-2018-17-2-71-77.
91. Голубева И.С., Яворская Н.П., Еремина В.А., Тихонова Н.И., Миникер Т.Д., Эктова Л.В., Дмитриева М.В. Противоопухолевая активность гликозидов индолокарбазолов // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 23–24.
92. Эктова Л.В., Еремина В.А., Н.И. Тихонова, И.Л. Плихтяк, Л.А. Медведева, И.В. Ярцева, Н.И. Моисеева, И.С. Голубева, Яворская Н.П., Будько А.П., Тарасова О.И., Пугачева Р.Б. Синтез и цитотоксическая активность N-гликозидов индоло [2, 3-а] пирроло [3, 4-с] карбазол-5, 7-дионов, замещенных по малейшему атому азота // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2020. – Т. 54, № 5. – С. 26–29. DOI: 0023-1134-2020-54-5-26-29.
93. Киселева М.П., Борисова Л.М., Эктова Л.В., Еремина В.А., Тихонова Н.И., Дмитриева М.В., Миронова С.Е., Медведева Л.А. Исследование противоопухолевой активности новых соединений в ряду производных гликозидов индолокарбазолов // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2018. – Т. 17, № 1. – С. 35.
94. Гулякин И.Д., Николаева Л.Л., Дмитриева М.В., Орлова О.Л., Полозкова А.П., Оборотова Н.А., Игнатова Е.В., Дмитричева Н.А., Ярцева И.В., Шпрах З.С. Получение и анализ лиофилизированной лекарственной формы ЛХС-1208 методами тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2016. – № 4 (17). – С. 62–67.
95. Гулякин И.Д., Хашем А., Николаева Л.Л., Дмитриева М.В., Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Оборотова Н.А., Ланцова А.В. Разработка новой технологии получения лекарственной формы для внутривенного введения производного индолокарбазола ЛХС-1208 // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2016. – Т. 15, № 2. – С. 55–60. DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-2-55-60.
96. Яворская Н.П., Голубева И.С., Эктова Л.В., Еремина В.А., Тихонова Н.И., Миникер Т.Д., Дмитриева М.В. Противоопухолевая активность индолокарбазола ЛХС-1269 // *Российский биотерапевтический журнал*. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 125–126.
97. Вартанян А.А., Барышникова М.А., Бурова О.С., Эктова Л.В., Смирнова Л.И., Шпрах З.С. Блокатор васкулогенной мимикрии восстанавливает чувствительность резистентных клеток меланомы к ДНК-повреждающим агентам. *Российский биотерапевтический журнал*. – 2016. – Т. 15, № 1. – С. 19–20.
98. Лугэнь Б., Дмитриева М.В., Орлова О.Л., Краснюк И.И., Краснюк И.И. (мл.), Боков Д.О., Степанова О.И., Беляцкая А.В. Разработка состава липосомальной лекарственной формы гидрофобного производного индолокарбазола // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2020. – Т. 9, № 3. – С. 21–26. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-21-26.
99. Sherer C., Snape T.J. Heterocyclic scaffolds as promising anticancer agents against tumours of the central nervous system: Exploring the scope of indole and carbazole derivatives // *European journal of medicinal chemistry*. – 2015. – Vol. 97. – P. 552–560.
100. Rewcastle G.W. Becatecarin (Helsinn Healthcare) // *IDrugs: the investigational drugs journal*. – 2005. – Vol. 8, No. 10. – P. 838–847.
101. Robey R.W., Obrzut T., Shukla S., Polgar O., Macalou S., Bahr J.C., Di Pietro A., Ambudkar S.V., Bates S.E. Becatecarin (rebeccamycin analog, NSC 655649) is a transport substrate and induces expression of the ATP-binding cassette transporter, ABCG2, in lung carcinoma cells // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2009. – Vol. 64, No. 3. – P. 575–583. DOI: 10.1007/s00280-008-0908-2.
102. Borthakur G., Alvarado Y., Ravandi-Kashani F., Cortes J., Estrov Z., Faderl S., Ivy P., Bueso-Ramos C., Nebiyou Bekele B., Giles F. Phase 1 study of XL119, a rebeccamycin analog, in patients with refractory hematologic malignancies // *Cancer*. – 2008. – Vol. 113, No. 2. – P. 360–366. DOI: 10.1002/cncr.23559.
103. Pommerehne K., Walisko J., Ebersbach A., Krull R. Phase I trial of combination becatecarin and oxaliplatin in patients with advanced solid tumors // *Journal of Clinical*

- Oncology. – 2007. – Vol. 25, No. 18. – P. 2561–2561. DOI: 10.1007/s00253-019-09741-y.
104. Schwandt A., Mekhail T., Halmos B., O'Brien T., Ma P.C., Fu P., Ivy P., Dowlati A. Phase-II trial of rebeccamycin analog, a dual topoisomerase-I and-II inhibitor, in relapsed «sensitive» small cell lung cancer // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2012. – Vol. 7, No. 4. – P. 751–754. DOI: 10.1097/JTO.0b013e31824abca2.
 105. Qu X., Chaires J.B., Ohkubo M., Yoshinari T., Nishimura S., Bailly C. A DNA binding indolocarbazole disaccharide derivative remains highly cytotoxic without inhibiting topoisomerase I // *Anti-cancer drug design*. – 1999. – Vol. 14, No. 5. – P. 433–442.
 106. Saijo N. Preclinical and clinical trials of topoisomerase inhibitors // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2000. – Vol. 922, No. 1. – P. 92–99. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb07028.x.
 107. Saif M.W., Diasio R.B. Edotecarin: a novel topoisomerase I inhibitor // *Clinical colorectal cancer*. – 2005. – Vol. 5, No. 1. – P. 27–36. DOI: 10.3816/cc.2005.n.014.
 108. Yamada Y., Tamura T., Yamamoto N., Shimoyama T., Ueda Y., Murakami H., Kusaba H., Kamiya Y., Saka H., Tanigawara Y., McGovren J.P., Natsumeda Y. Phase I and pharmacokinetic study of edotecarin, a novel topoisomerase I inhibitor, administered once every 3 weeks in patients with solid tumors // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2006. – Vol. 58, No. 2. – P. 173–182. DOI: 10.1007/s00280-005-0149-6.
 109. Saif M.W., Sellers S., Diasio R.B., Douillard J.Y. A phase I dose-escalation study of edotecarin (J-107088) combined with infusional 5-fluorouracil and leucovorin in patients with advanced/metastatic solid tumors // *Anti-cancer drugs*. – 2010. – Vol. 21, No. 7. – P. 716. DOI: 10.1097/CAD.0b013e32833cb658.
 110. Ciomei M., Croci V., Ciavolella A., Ballinari D., Pesenti E. Antitumor efficacy of edotecarin as a single agent and in combination with chemotherapy agents in a xenograft model // *Clinical cancer research*. – 2006. – Vol. 12, No. 9. – P. 2856–2861. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1859.
 111. Hurwitz H.I., Cohen R.B., McGovren J.P., Hirawat S., Petros W.P., Natsumeda Y., Yoshinari T. A phase I study of the safety and pharmacokinetics of edotecarin (J-107088), a novel topoisomerase I inhibitor, in patients with advanced solid tumors // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2007. – Vol. 59, No. 1. – P. 139–147. DOI: 10.1007/s00280-006-0267-9.
 112. Ciomei M., Croci V., Stellari F., Amboldi N., Giavarini R., Pesenti E. Antitumor activity of edotecarin in breast carcinoma models // *Cancer chemotherapy and pharmacology*. – 2007. – Vol. 60, No. 2. – P. 229–235. DOI: 10.1007/s00280-006-0365-8.
 113. Vrdoljak E., Boban M., Saratlija-Novaković Z., Jović J. Long-lasting partial regression of glioblastoma multiforme achieved by edotecarin: case report. // *Croatian medical journal*. – 2006. – Vol. 47, No. 2. – P. 305–309.
 114. Yin D., Toler S., Guo F., Duncan B., Sharma A. Pharmacokinetics (PK) of edotecarin (J-107088), a topoisomerase I inhibitor, in patients with metastatic breast cancer (mBC) or glioblastoma multiforme (GBM) // *Journal of Clinical Oncology*. – 2005. – Vol. 23, No. 16. – P. 2073–2073. DOI: 10.1200/jco.2005.23.16_suppl.2073.
 115. Carvajal R.D., Ilson D.H., Noy A. Possible role of edotecarin, a novel topoisomerase I inhibitor, in therapy-related myelodysplastic syndrome. // *Leukemia & lymphoma*. – 2007. – Vol. 48. – No. 1. – P. 192–194.
 116. Lam K.S., Schroeder D.R., Veitch J.M., Matson J.A., Forenza S. Isolation of a bromo analog of rebeccamycin from *Saccharothrix aerocolonigenes*. // *The Journal of antibiotics*. – 1991. – Vol. 44, No. 9. – P. 934–939. DOI: 10.7164/antibiotics.44.934.
 117. Matson J.A., Claridge C., Bush J.A., Titus J., Bradner W.T., Doyle T.W., Horan A.C., Patel M. AT2433-A1, AT2433-A2, AT2433-B1, and AT2433-B2 novel antitumor antibiotic compounds produced by *Actinomadura melliara*. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties // *The Journal of antibiotics*. – 1989. – Vol. 42, No. 11. – P. 1547–1555. DOI: 10.7164/antibiotics.42.1547.

АВТОРЫ

Колпаксиди Александр Павлович – аспирант кафедры фармацевтической технологии Института Фармации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет); лаборант-исследователь лаборатории разработки лекарственных форм НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9388-1019. E-mail: aleksandrkolpaksidi@gmail.com

Дмитриева Мария Вячеславовна – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории разработки лекарственных форм НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухо-

лей ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-6740-5692. E-mail: dmitrieva.m@ronc.ru

Ярош Илья Валерьевич – ординатор кафедры фармацевтической технологии Института Фармации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0002-3347-9674. E-mail: ilya96yarosh@gmail.com

Краснюк Иван Иванович – доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической технологии Института Фармации ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет). ORCID ID: 0000-0003-4382-7377. E-mail: krasnyuki@mail.ru

УДК 615.074: 615.21/.26: 615.451.35



РАЗРАБОТКА И ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ В СПРЕЕ НАЗАЛЬНОМ

М.В. Ларский, А.Е. Позднякова, З.Д. Хаджиева, Д.И. Поздняков

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения Высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет».

357532, Россия, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Получено 12.04.2021

Принята к печати 15.08.2021

Перспективным подходом к лечению аллергического ринита может стать интраназальное введение блокаторов H_1 -гистаминовых рецепторов. Ранее был разработан оригинальный состав спрея назального, содержащего фексофенадина гидрохлорид и аммония глицирризинат, демонстрирующий высокий уровень терапевтической эффективности.

Цель состояла в разработке и валидации методики количественного определения активных фармацевтических субстанций фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее для интраназального введения.

Материалы и методы. В ходе разработки и валидации методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее назальном применялся метод высокоэффективной жидкостной хроматографии: хроматограф с УФ детектором DionexUltimate 3000 с колонкой Luna C18 (2), содержащей в качестве сорбента октадецилсиликагель с зернением 5 мкм. Анализ и валидационные процедуры выполнялись в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

Результаты. Исследование показало, что для количественного определения при совместном присутствии фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината оптимальным является градиентный режим элюирования с составом подвижной фазы 50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата и метанолом (45:55), который обеспечивал разделение компонентов смеси в интервале 20 минут. Валидационная оценка показала, что разработанная методика отвечает всем критериям валидности по показателям: правильность, прецизионность, специфичность и линейность в аналитической области.

Заключение. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования метода высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиентном режиме элюирования с составом подвижной фазы 50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата с метанолом (45:55) для количественного определения активных фармацевтических субстанций – фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в составе перспективного спрея назального для лечения аллергического ринита.

Ключевые слова: аллергический ринит; количественное определение; высокоэффективная жидкостная хроматография; фексофенадина гидрохлорид; аммония глицирризинат

Список сокращений: АР – аллергический ринит; АФС – активная фармацевтическая субстанция; УФ – ультрафиолетовый; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации; х. ч. – химический чистый

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF METHODS FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ACTIVE PHARMACEUTICAL SUBSTANCES IN NASAL SPRAY

M.V. Larskiy, A.E. Pozdnyakova, Z.D. Khadzhieva, D.I. Pozdnyakov

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

E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

Received 12 April 2021

Accepted 15 Aug 2021

Для цитирования: М.В. Ларский, А.Е. Позднякова, З.Д. Хаджиева, Д.И. Поздняков. Разработка и валидация методики количественного определения активных фармацевтических субстанций в спрее назальном. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):266-277. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-266-277

© М.В. Ларский, А.Е. Позднякова, З.Д. Хаджиева, Д.И. Поздняков, 2021

For citation: M.V. Larskiy, A.E. Pozdnyakova, Z.D. Khadzhieva, D.I. Pozdnyakov. Development and validation of methods for quantitative determination of active pharmaceutical substances in nasal spray. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):266-277. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-266-277

Intranasal administration of H_1 -histamine receptor blockers may be a promising approach to the treatment of allergic rhinitis. Earlier, an original composition of a nasal spray containing fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate and demonstrating a high level of therapeutic efficacy, was developed.

The aim of the study was to develop and validate a method of the quantitative determination of active pharmaceutical ingredients fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate in a spray for intranasal administration.

Materials and methods. During the development and validation of the method of the fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate quantitative determination in a nasal spray, the method of high performance liquid chromatography was used: a Dionex Ultimate 3000 UV chromatograph with a Luna C18 column (2) containing octadecylsilicagel with a 5 μ m grain size as a sorbent. The analysis and validation procedures were performed in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, the XIVth edition.

Results. The study showed that for the simultaneous quantitative determination of fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate, the optimal elution regime is a gradient mode with a mobile phase containing 50 mmol/L potassium dihydrogen phosphate solution with methanol (45:55), which ensured the separation of the components in the 20 minutes interval. The validation procedures showed that the developed methodology correspond to all the criteria of validity in terms of the following indicators: correctness, precision, specificity and linearity in the analytical area.

Conclusion. The obtained results indicate the possibility of using the method of high-performance liquid chromatography in a gradient elution mode with a mobile phase of the composition of a 50 mmol/L solution of potassium dihydrogen phosphate with methanol (45:55) for the simultaneous quantitative determination of active pharmaceutical ingredients – fexofenadine hydrochloride and ammonium glycyrrhizinate as parts of a promising nasal spray for the allergic rhinitis treatment.

Keywords: allergic rhinitis; quantification; high performance liquid chromatography; fexofenadine hydrochloride; ammonium glycyrrhizinate

Abbreviations: AR – allergic rhinitis; API – active pharmaceutical ingredient; UV – ultraviolet; HPLC – high performance liquid chromatography; SPRF – State Pharmacopoeia of the Russian Federation

ВВЕДЕНИЕ

Аллергический ринит (АР) является наиболее распространенным заболеванием, возникающим в следствие гиперчувствительности организма к различного рода антигенам. АР занимает шестое место в мире среди наиболее распространенных атопических заболеваний, приводящих к снижению показателей качества жизни и ухудшению производительности труда, что негативно отражается на экономической составляющей деятельности человека и требует значительных финансовых вложений, как личных, так и со стороны системы здравоохранения [1, 2]. В тоже время, количество людей, у которых ежегодно диагностируют аллергический ринит, неуклонно возрастает, что делает разработку эффективных и безопасных лекарственных средств для лечения и профилактики аллергического ринита актуальным, как для самих пациентов, так и для государства в целом [3].

Имеющиеся в настоящее время фармакологические подходы к терапии АР подразумевают устранение основных симптомов заболевания. С этой целью применяются как интраназальные, так и системные лекарственные препараты (ЛП). ЛП, вводимые интраназально, представлены глюкокортикостероидами, которые являются препаратами первой линии. Также возможно введение в носовую полость деконгестантов и антихолинэргических средств. Системно в лечении АР применяют H_1 -гистаминолитики, стабилизаторы мембран тучных клеток и антагонисты лейкотриеновых рецепторов [4]. Несмотря на достаточный уровень эффективности, применение интраназальных глюкокортикостероидов в ряде случаев не обеспечи-

вает необходимые требования фармакобезопасности, что ограничивает их повседневное использование [5]. В связи с этим принимались неоднократные попытки преодолеть существующие недостатки глюкокортикостероидов, в том числе путем создания рациональных комбинаций ЛП или их полная замена на средства альтернативной фармакотерапевтической группы. В последнем случае актуальным является интраназальное применение блокаторов H_1 -рецепторов гистамина, при этом с целью увеличения терапевтического эффекта возможна разработка синергетических комбинаций на основе неседативных гистаминоблокаторов и других антиаллергических средств [6]. Перспективным направлением в коррекции аллергического ринита можно считать применение комбинации H_1 -гистаминоблокатора последнего поколения – фексофенадина гидрохлорида и противоаллергического средства растительного происхождения – аммония глицирризината в составе разрабатываемого назального спрея [7].

Фексофенадин является активным метаболитом терфенадина – противоаллергического средства антигистаминного действия. Фексофенадин относится к блокаторам H_1 -гистаминовых рецепторов длительного действия последнего поколения, лишенных выраженного седативного эффекта. Фексофенадин имеет благоприятный профиль лекарственной безопасности, превосходящий таковой у антигистаминных препаратов первого поколения. Отсутствие седативного эффекта позволяет использовать препарат различными группам населения, в том числе в рабочее время, так как не нарушается концентрация внимания, моторные и когнитивные функции [8–12].

Аммония глицирризинат является одним из эф-

фективных лекарственных средств, получаемых из экстракта солодки голой. Аммонийная соль глицирризиновой кислоты обладает доказанной противовоспалительной, антиноцицептивной, противоаллергической, противовирусной, антиоксидантной, иммуностимулирующей и гепатопротекторной активностью [13–17].

В ранее проведенном исследовании, посвященном экспериментальной оценке фармакологической эффективности комбинации активных субстанций фексофенадина гидрохлорид + аммония глицирризинат (вспомогательные вещества: бензалкония хлорид, полиэтиленоксид – 400, пропиленгликоль) при АР у животных, было установлено, что интраназальное введение изучаемого состава по выраженности действия было сопоставимо с глюкокортикостероидами, что подразумевает актуальность дальнейшего исследования данной комбинации с позиции фармацевтического анализа [18].

ЦЕЛЬ. Разработка и валидация методики количественного определения активных фармацевтических субстанций фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее для интраназального введения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые объекты и материалы для проведения анализа

Основываясь на существующих в настоящее время тенденциях в области качественного и количественного анализа фармакологически активных соединений, а также на особенностях фармацевтического анализа соединений, схожих по структуре (терфенадин и глицирризиновая кислота соответственно) с целевыми – фексофенадина гидрохлоридом и аммония глицирризинатом в данном исследовании нами был выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [19, 20]. В работе в качестве объектов были использованы: субстанция аммония глицирризината (содержание 99,4%, ЗАО «ВИФИТЕХ», Россия); субстанция фексофенадина гидрохлорида (содержание 101,6%, Инд – Свифт Лабораториз Лимитед, Индия); стандартные образцы фексофенадина гидрохлорида (Sigma – Aldrich, США); стандартные образцы аммония глицирризината (Sigma – Aldrich, США); ацетонитрил; вода для хроматографии; метанол (квалификации HPLC Grade; Panreac, Испания), калия дигидрофосфат х. ч. Разработку методики проводили при помощи оборудования: хроматограф DionexUltimate 3000 (Thermo Scientific, США), снабженный УФ-детектором UVD-3000, колонкой Luna C18 (2) размером 150 × 4,6 мм (зернение октадецилсиликагеля – 5 мкм) (Phenomenex, США); центрифуга ОПН – 3.02 (Россия); весы аналитические Сартorius, ЛБ 210-а (Россия).

Температура исследуемых образцов составляла 20°C, температура хроматографической колонки –

30°C, поддерживалась термостатом. Объем пробы составлял 20 мкл, вводился с помощью автосамплера. Детектирование проводили спектрофотометрически при длине волны 234 нм.

Методы количественного анализа активных фармацевтических субстанций (АФС)

Количественный анализ АФС разрабатываемого спрея для интраназального введения проводили согласно требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIV издания ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография» и ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик»¹.

Приготовление растворов стандартных образцов

Приготовление растворов стандартных образцов проводили следующим образом: точную навеску стандартного образца (около 30 мг для фексофенадина гидрохлорида и около 10 мг для аммония глицирризината) помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, добавляли около 5 мл смеси метанола и 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата (55:45), растворяли при перемешивании, после чего объем колбы доводили до метки. Переносили 2 мл полученного раствора в мерную колбу вместимостью 25 мл, после чего доводили объем до метки тем же растворителем. Перед введением растворы фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (Phenomenex, США), отбрасывая первые порции фильтрата.

Приготовление испытуемого раствора

Приготовление испытуемого раствора: переносили 2 мл лекарственного средства в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляли до метки смесь метанола и 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата (55:45), перемешивали и фильтровали через нейлоновый фильтр с размером пор 0,45 мкм (Phenomenex, США), отбрасывая первые порции фильтрата (испытуемый раствор).

Расчет содержания фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в лекарственном средстве в мг/мл проводили по формуле:

$$C_x = \frac{S_x \times a_{CT} \times P \times W_x \times V_{CT}}{S_{CT} \times V_x \times W_{CT} \times W_{CT2} \times 100}, \quad (1)$$

где: C_x – содержание определяемого компонента, мг/мл; S_x – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме испытуемого раствора, мAU×мин; S_{CT} – площадь пика определяемого компонента на хроматограмме стандартного раствора, мAU×мин; V_x

¹ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: http://femb.ru/femb/pharmacopea.php

– объем аликвоты лекарственного средства, мл; $V_{\text{ст}}$ – объем аликвоты раствора стандартного образца, мл; $a_{\text{ст}}$ – навеска стандартного образца, мг; P – содержание вещества в стандартном образце, %; W_x – объем мерной колбы, взятой для разведения лекарственного средства, мл; $W_{\text{ст}}$, $W_{\text{ст}2}$ – объемы мерных колб, взятых для разведения раствора стандартного образца, мл.

Расчет содержания компонентов лекарственного средства относительно заявленного проводили по формуле:

$$X = \frac{C_x \times 100}{L}, \quad (2)$$

где: X – содержание определяемого вещества относительно заявленного, %; C_x – содержание определяемого вещества, мг/мл; L – заявленное содержание вещества в спрее назальном, мг/мл.

Приготовление растворов для валидационной оценки «линейность»

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 0,0300 г стандартного образца фексофенадина гидрохлорида, растворяли при перемешивании в 6 мл смеси метанола и 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата (55:45), после чего объем колбы доводили до метки той же смесью. Переносили в мерные колбы вместимостью 25 мл по 1,2; 1,6; 2,0; 2,4; 2,8 мл полученного раствора, объем доводили до метки тем же растворителем.

Приготовление растворов для валидационной оценки по показателю «правильность» и «аналитическая область»

Модельная смесь была приготовлена с содержанием фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в 60% относительно заявленного в спрее (0,18 г фексофенадина гидрохлорида и 0,06 г аммония глицирризината на 100 мл лекарственного средства). Далее проводили анализ полученного раствора в соответствии с предлагаемой методикой. Параллельно помещали по 2 мл раствора полученной модельной смеси в мерные колбы вместимостью 25 мл и отдельно вносили добавки по 0,4; 0,8 и 1,2 мл 0,3% раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида и 0,1% раствора стандартного образца аммония глицирризината до получения уровней концентрации 80%; 100% и 120% относительно номинального. После этого объем колбы доводили до метки подвижной фазой с соотношением компонентов на начало анализа, каждое разведение повторяли трехкратно.

Статистическая обработка данных

Результаты исследований обрабатывали статистическими методами, используя программный пакет Microsoft Excel v 13.0 с расширенными возможностями статистического анализа данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината при совместном присутствии в спрее назальном

Нашей задачей явилась разработка ВЭЖХ-методики количественного определения активных фармацевтических субстанций в спрее назальном. В литературе отсутствует методика ВЭЖХ-анализа при совместном присутствии фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината, однако описаны способы их индивидуального определения [21–24].

Предварительные исследования по разработке и оптимизации методики количественного определения АФС спреями назального противоаллергического действия, позволили установить, что оптимальным водным компонентом подвижной фазы, дополнительно подавляющего ионизацию, является раствор калия дигидрофосфата в концентрации 0,05–0,1 моль/л с pH 4,5–4,8. Наблюдали отсутствие выраженной разницы при использовании 0,05 М – 0,1 М раствора калия дигидрофосфата, а также с целью минимизации потенциально негативных факторов, связанных с использованием солевых буферных растворов, в дальнейшем использовали 50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата.

Экспериментальное изучение хроматографического поведения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в смесях 50 ммоль/л раствора калия дигидрофосфата с метанолом позволили сделать вывод о том, что метанол и его смеси с водой легко растворяли компоненты лекарственного препарата². Дрейф базовой линии, свойственный градиентному элюированию, не оказывал влияния на учет результатов разделения. Для сокращения времени анализа, улучшения разделения и уменьшения вязкости подвижной фазы, температура хроматографической колонки была повышена до 30°C. Оптимизированные условия хроматографического определения представлены в таблице 1.

Типичная хроматограмма спреями назального представлена на рисунке 1.

Параллельно проводили хроматографирование растворов стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида, аммония глицирризината, а также растворов вспомогательных веществ в составе спреями назального (бензалкония хлорида, полиэтиленоксида – 400, пропиленгликоля) и подвижной фазы. В предлагаемых условиях хроматографического определения осуществляется достоверное разделение компонентов в пределах 20 минут при некотором дрейфе базовой линии, свойственном градиентному режиму элюирования.

² Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

Таблица 1 – Условия хроматографического определения

Время, мин	Режим элюирования	
	Метанол, %	50 ммоль/л раствор калия дигидрофосфата, %
0	55	45
10	55	45
30	95	5

Таблица 2 – Характеристики пиков АФС на хроматограммах спрея назального

Компонент спрея	Хроматографические характеристики			
	Время удерживания (t_R), мин	Фактор асимметрии (A_s)	Разрешение (R_s)	Эффективность (число теоретических тарелок, N)
Фексофенадина гидрохлорид	6,2±0,2	не более 1,2	не менее 1,5	2800
Аммония глицирризинат	16,4±0,2	не более 1,4	не менее 1,5	30000

Таблица 3 – Характеристики пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината на хроматограммах растворов стандартных образцов

Компонент спрея	Хроматографические характеристики			
	Время удерживания (t_R), мин	Фактор асимметрии (A_s)	Разрешение (R_s)	Эффективность (число теоретических тарелок, N)
Фексофенадина гидрохлорид	6,2±0,2	не более 1,4	не менее 1,5	2900
Аммония глицирризинат	16,4±0,2	не более 1,3	не менее 1,5	31000

Таблица 4 – Оценка воспроизводимости площадей пиков на хроматограммах стандартных растворов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината

Определяемый компонент	Повторность инъекции, n	Площадь пика, mAU×мин	Расчет RSD, %
Фексофенадина гидрохлорид	1	33,12	$\bar{X} = 33,16$ $S^2 = 0,005667$ $SD = 0,07528$ $RSD = 1,25\%$
	2	33,26	
	3	33,08	
	4	33,24	
	5	33,18	
	6	33,10	
Аммония глицирризинат	1	8,13	$\bar{X} = 8,12$ $S^2 = 0,002417$ $SD = 0,04916$ $RSD = 0,82\%$
	2	8,04	
	3	8,12	
	4	8,18	
	5	8,16	
	6	8,10	

Таблица 5 – Исходные данные для оценки линейности методики в отношении фексофенадина гидрохлорида

№ п/п	Концентрация раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида, %	Площадь пика, mAU×мин (среднее значение из трех последовательных инъекций)
1	0,0144	19,90
2	0,0192	28,10
3	0,0240	33,16
4	0,0288	39,98
5	0,0336	48,26

Таблица 6 – Исходные данные для оценки линейности методики в отношении аммония глицирризината

№ п/п	Концентрация раствора стандартного образца аммония глицирризината, %	Площадь пика, мAU×мин (среднее значение из трех последовательных инъекций)
1	0,0048	5,01
2	0,0064	6,18
3	0,0080	8,12
4	0,0096	9,04
5	0,0112	10,45

Таблица 7 – Результаты оценки прецизионности методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината (уровень повторяемости)

Компонент	S пика, мAU × мин	Найдено, мг/мл	Метрологические характеристики
Фексофенадина гидрохлорид	32,91	2,98	$\bar{x} = 2,92$
	31,86	2,88	$S^2 = 0,00188$
	32,13	2,91	$SD = 0,04336$
	31,76	2,87	$RSD = 1,48\%$
	32,27	2,92	$\Delta\bar{x} = \pm 0,05$
	32,76	2,96	$\bar{\varepsilon} = \pm 1,56\%$
			$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 2,92 \pm 0,05 \text{ мг/мл}$
Аммония глицирризинат	8,36	1,03	$\bar{x} = 1,00$
	8,02	0,99	$S^2 = 0,002657$
	7,44	0,92	$SD = 0,05154$
	8,52	1,05	$RSD = 5,14\%$
	7,86	0,97	$\Delta\bar{x} = \pm 0,05$
	8,56	1,05	$\bar{\varepsilon} = \pm 5,40\%$
			$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 1,00 \pm 0,05 \text{ мг/мл}$

Примечание: Площадь пика раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида = 33,16 мAU×сек; площадь пика раствора стандартного образца аммония глицирризината = 8,12 мAU×сек

Таблица 8 – Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината

Фексофенадина гидрохлорид					
Аналитик 1		Аналитик 2		Метрологические характеристики	
S пика, мAU × мин	Найдено, мг/мл	S пика, мAU × мин	Найдено, мг/мл	Аналитик 1	Аналитик 2
32,91	2,98	32,64	2,96		
31,86	2,88	33,42	3,03	$\bar{x} = 2,92$	$\bar{x} = 2,98$
32,13	2,91	33,04	3,00	$S^2 = 0,00188$	$S^2 = 0,001987$
31,76	2,87	32,08	2,91	$SD = 0,04336$	$SD = 0,04457$
32,27	2,92	33,12	3,01	$RSD = 1,48\%$	$RSD = 1,49\%$
32,76	2,96	32,54	2,95	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 2,92 \pm 0,05 \text{ мг/мл}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 2,98 \pm 0,05 \text{ мг/мл}$
$t_{\text{выч}} = 2,04 < t(95\%; 10); F_{\text{выч}} = 1,06 < F(95\%; 5; 5)$ – различия между полученными результатами случайны					
Аммония глицирризинат					
Аналитик 1		Аналитик 2		Аналитик 1	Аналитик 2
8,36	1,03	8,84	1,08		
8,02	0,99	8,56	1,04	$\bar{x} = 1,00$	$\bar{x} = 1,02$
7,44	0,92	8,12	0,99	$S^2 = 0,002657$	$S^2 = 0,003107$
8,52	1,05	8,92	1,09	$SD = 0,05154$	$SD = 0,055737$
7,86	0,97	7,49	0,91	$RSD = 5,15\%$	$RSD = 5,45\%$
8,56	1,05	7,84	0,95	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 1,00 \pm 0,05 \text{ мг/мл}$	$\bar{x} \pm \Delta\bar{x} = 1,02 \pm 0,06 \text{ мг/мл}$
$t_{\text{выч}} = 0,64 < t(95\%; 10); F_{\text{выч}} = 1,17 < F(95\%; 5; 5)$ – различия между полученными результатами случайны					

Примечание: Аналитик 1: площадь пика раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида = 33,16 мAU×сек; площадь пика раствора стандартного образца аммония глицирризината = 8,12 мAU×сек; Аналитик 2: площадь пика раствора стандартного образца фексофенадина гидрохлорида = 33,04 мAU×сек; площадь пика раствора стандартного образца аммония глицирризината = 8,21 мAU×сек.

Таблица 9 – Схема приготовления растворов модельной смеси с добавками растворов стандартных образцов АФС

Определяемый компонент	Внесено в виде модельной смеси, мг	Внесено добавки стандартного образца, мг	Суммарное расчетное содержание компонента после разведения мг/мл	Уровень концентрации относительно номинального, %
Фексофенадина гидрохлорид	3,6	1,2	0,192	80
	3,6	2,4	0,240	100
	3,6	3,6	0,288	120
Аммония глицирризинат	1,2	0,4	0,064	80
	1,2	0,8	0,080	100
	1,2	1,2	0,096	120

Таблица 10 – Результаты оценки правильности методики количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината

Внесено добавки, мг	Найдено добавки, мг	Открываемость, %	Характеристики, рассчитанные по значению открываемости
Фексофенадина гидрохлорид			
1,20	1,26	104,84	
1,20	1,15	95,74	
1,20	1,18	98,07	
2,40	2,29	95,39	
2,40	2,44	101,69	
2,40	2,52	104,95	
3,60	3,69	102,54	
3,60	3,53	98,07	
3,60	3,72	103,36	
Аммония глицирризинат			
0,4	0,36	90,00	
0,4	0,34	85,00	
0,4	0,36	90,00	
0,8	0,82	102,50	
0,8	0,85	106,25	
0,8	0,78	97,50	
1,2	1,14	95,00	
1,2	1,09	90,83	
1,2	1,26	105,00	
			$\bar{x} = 100,52\%$ $SD = 3,76$ $RSD = 3,74\%$
			$\bar{x} = 95,79\%$ $SD = 7,51$ $RSD = 7,84\%$

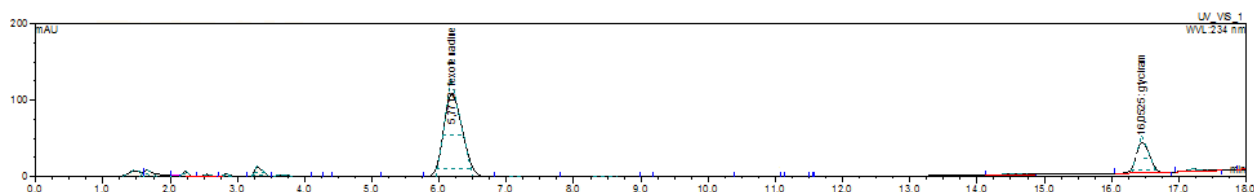


Рисунок 1 – Хроматограмма испытуемого раствора

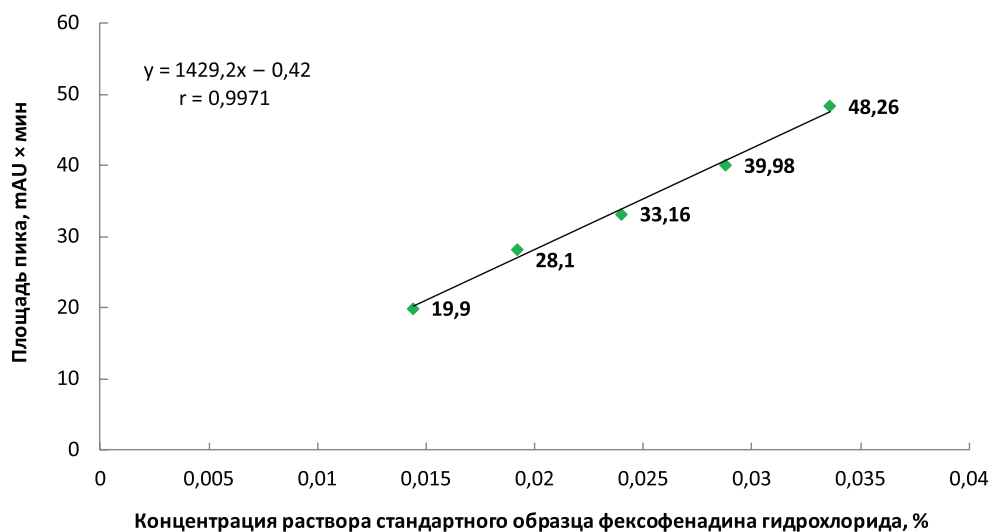


Рисунок 2 – График зависимости площади пика фексофенадина гидрохлорида от его концентрации

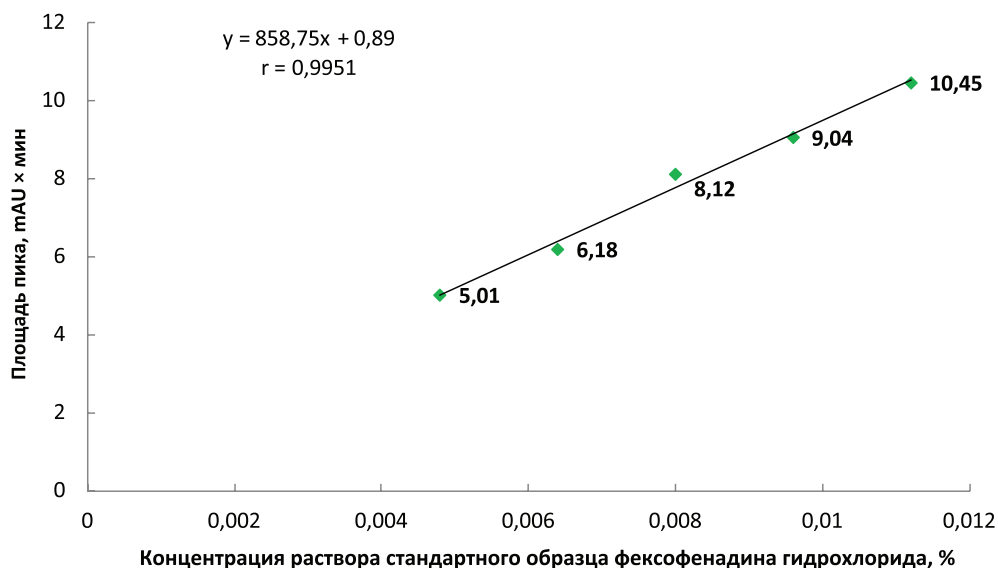


Рисунок 3 – График зависимости площади пика аммония глицирризината от его концентрации

Для оценки пригодности хроматографической системы последовательно анализировали в шестикратной повторности растворы спрея назального и стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината, определяя время удерживания, факторы асимметрии, разрешение и эффективность хроматографической системы.

Основные характеристики пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината на хроматограммах раствора спрея назального и растворов стандартных образцов представлены в таблицах 2 и 3.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что времена удерживания двух основных пиков на хроматограмме раствора спрея назального совпадают с таковыми для пиков на хроматограммах растворов стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината.

По площадям пиков, полученных при анализе шести последовательных инъекций растворов

стандартных образцов, проводили расчёт величины относительного стандартного отклонения (RSD). Результаты представлены в таблице 4.

Как следует из представленных результатов, относительное стандартное отклонение площадей пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината, полученных при повторных введениях одних и тех же стандартных растворов, не превышает 2%, что отвечает критериям пригодности хроматографической системы.

Таким образом, характеристики пиков на хроматограммах как раствора спрея назального, так и растворов стандартных образцов отвечают общепринятым параметрам пригодности хроматографической системы: эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пикам определяемых веществ – не ниже 2000 теоретических тарелок, факторы асимметрии пиков находятся в пределах от 0,8 до 1,5; относительное стандартное отклонение площадей пиков определяемых веществ не превышает 2%.

**Валидационная оценка
разработанной методики**

Критерием оценки аналитической методики служит ее валидационная оценка. Валидацию методики ВЭЖХ – анализа для количественного определения компонентов спрея назального проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания для решения практических вопросов осуществления валидационных процедур руководствовались литературными данными³.

Специфичность методики определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее назальном подтверждалась соответствием времен удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора и пиков растворов стандартных образцов фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината. Анализ модельной смеси, состоящей из вспомогательных веществ спрея назального, подтвердил отсутствие посторонних хроматографических пиков в областях выхода пиков фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината⁴.

Линейность в отношении фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината устанавливали с использованием растворов стандартных образцов. Диапазон концентраций растворов включал предполагаемую аналитическую область методики – от 80 до 120% каждого компонента⁵.

Растворы хроматографировали в вышеописанных условиях в трехкратной повторности, результаты представлены в таблице 5.

Полученные данные использовали для построения графика зависимости площади пика от концентрации фексофенадина гидрохлорида (рисунок 2).

Линейный регрессионный анализ полученных результатов методом наименьших квадратов позволил установить, что зависимость площади пика фексофенадина гидрохлорида от его концентрации линейна и описывается уравнением $y = 1429(\pm 264,2) \times x - 0,42$; коэффициент корреляции составляет 0,9971, а свободный член уравнения является статистически незначимым, что имеет важное значение для подтверждения правильности методики.

Линейность методики в отношении аммония глицирризината проводили аналогичным образом. Растворы для хроматографирования получали разбавлением исходного 0,1% раствора стандартного образца аммония глицирризината. Результаты определения представлены в таблице 6.

Калибровочный график, построенный по полученным данным, представлен на рисунке 3.

Анализ полученной зависимости показал, что она описывается линейным уравнением вида $y = b \times$

$x + a$, где $b = 858,75 \pm 204,59$. Свободный член уравнения равен 0,89, однако его статистическая значимость отсутствует. Коэффициент корреляции равен 0,9951, что соответствует предъявляемым требованиям ($\geq 0,98$)⁶.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной линейности методики определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината.

Прецизионность методики оценивали путем анализа образца спрея назального в шестикратной повторности (уровень повторяемости). Для оценки внутрилабораторной прецизионности анализ испытуемого образца проводился другим аналитиком в другие дни с использованием того же оборудования. Результаты оценки прецизионности представлены в таблицах 7 и 8.

Полученные результаты свидетельствуют об удовлетворительной прецизионности предлагаемой методики количественного определения компонентов разрабатываемого спрея назального на уровнях повторяемости и внутрилабораторной прецизионности.

Установлено, что среднее содержание фексофенадина гидрохлорида в исследуемом образце спрея назального составляет $2,92 \pm 0,05$ мг/мл (97% от заявленного; относительная погрешность определения $\pm 1,56\%$); аммония глицирризината $1,00 \pm 0,05$ мг/мл (100% от заявленного; относительная погрешность определения $\pm 5,4\%$).

Учитывая то, что спрей назальный является многокомпонентным, правильность методики проверяли с использованием метода добавок⁷.

Схема получения растворов с добавками представлена в таблице 9.

Результаты определения правильности методики представлены в таблице 10.

Как следует из полученных результатов, открываемость внесенных добавок фексофенадина гидрохлорида находилась в интервале от 95 до 105%, аммония глицирризината – от 85 до 106,25% при величине RSD не более $\pm 3,74\%$ и $\pm 7,84\%$ соответственно, что соответствует предъявляемым требованиям⁸. Таким образом, предлагаемая методика характеризуется удовлетворительной правильностью.

Аналитический диапазон методики относительно номинальной концентрации определяемых веществ в спрее назальном составил от 80% до 120%.

Известно, что метод высокоэффективной жид-

³ Валидация аналитических методик для производителей лекарств / Под ред. В.В. Береговых. – М.: Литтерра, 2008. – 132 с.

⁴ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁵ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁶ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁷ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

⁸ Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I–IV. М., 2018. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

костной хроматографии наряду с другими методами, все чаще используется при проведении как качественного, так и количественного анализа активных фармацевтических субстанций. Особую актуальность данный метод приобретает в ходе анализа комбинаций фармакологически активных соединений, представленных в одной лекарственной форме. Как указывает Ibrahim F. A., et al. (2019), используя высокоэффективную жидкостную хроматографию с УФ-детектированием можно успешно проводить идентификацию и количественное определение активных компонентов в комбинациях моксифлоксацина (синтетическое антибактериальное средство группы фторхинолонов) с глюкокортикостероидами, предназначенными для системного применения – дексаметазоном и преднизолоном. Причем в данном исследовании авторами использовался оригинальный подход из области «зеленой химии» без использования токсичных органических растворителей: в качестве элюента в изократическом режиме определения использовалась смесь этанол:вода в соотношении 90:10 [25].

В другом исследовании, проведенном авторским коллективом Al-Sanea M. M. et al (2021), показано, что метод высокоэффективной жидкостной хроматографии позволяет успешно количественно определять активные субстанции в широко распространенных комбинациях антигипертензивных препаратов: гидрохлортиазид+олмесартана; медоксомил и гидрохлортиазид+фозиноприл-натрий. Стоит отметить, что в данной работе изократический режим определения с подвижной фазой дигидрофосфат калия + ортофосфорная кислота (pH=3) с добавлением ацетонитрила и метанола позволял не только качественно и количественно определять целевые соединения, но и идентифицировать ряд специфических примесей, например, хлортиазид, который является продуктом реакции дегидрирования гидрохлортиазида [26].

Учитывая широкую распространенность метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также его высокие аналитические характеристики, неудивительно, что высокоэффективная жидкостная хроматография распространена в фармацевтическом анализе лекарственных препаратов противоаллергического действия и их комбинаций. Так, Shamshad H., et al., (2021), показано, что возможна успешная идентификация и количественное определение цетиризина в присутствии хлорохина и пириметамина, с применением изократического режима элюирования смесью метанол:вода (70:30) и УФ-детекцией [27]. Аналогично, Shamshad & Mirza (2021), продемонстрировали возможность определения цетиризина в присутствии диклофенака натрия [28]. Лоратадин может быть успешно идентифицирован в комбинации с псевдоэфедрином при использовании в качестве элюента смеси метанол:вода (90:10) в изократическом режиме [29].

Кроме того, высокоэффективная жидкостная

хроматография позволяет разделять вещества, обладающие противоаллергическими свойствами от их метаболитов (в том числе проявляющих фармакологическую активность), что было показано Sebaiy & Ziedan (2019). В данной работе авторы идентифицировали и определили количественно лоратадин и его активный метаболит дезлоратадин (который также является антиаллергическим препаратом, блокирующим H_1 -рецепторы гистамина) при элюировании смесью метанол + ортофосфорная кислота (85:15) в изократическом режиме и детекцией УФ-спектрофотометрическим блоком [30].

Известны методики качественного и количественного определения фексофенадина гидрохлорида в одной лекарственной форме с монтелукастом натрия и амброксола гидрохлоридом в изократическом режиме элюирования смесью метанол:вода (70:30) и УФ-детекцией [31].

Таким образом, на основании литературных данных в настоящем исследовании для качественного и количественного определения активных субстанций фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием. В ходе работы было показано, что в силу различной растворимости целевых субстанций, изократический режим элюирования не позволяет достичь оптимального разделения компонентов при продолжительности анализа менее 30 минут, что определило использование градиентного режима. Стоит отметить, что подобные обстоятельства замены режима анализа были описаны в литературе. Так Leistner & Holzgrabe (2021) при анализе примесей к субстанции баклофена использовали градиентный режим, поскольку существующие примеси для данного вещества представлены труднорастворимыми цвиттер-ионами [32]. Аналогично анализировались 11 примесей субстанции ивабрадина [33] и комбинации фармакологически активных соединений парацетамола и метионина [34].

Дальнейший ход исследования показал, что разработанная методика анализа является воспроизводимой и отвечает всем требованиям валидности, что особенно важно в анализе комбинаций лекарственных средств. Как указывает Narula & Pal (2021), валидационная оценка методик анализа является необходимым шагом в создании рациональных методов анализа лекарственных препаратов и занимает одно из ведущих мест в ходе их разработки [35]. Известны случаи, когда оптимальные методики анализа (диазепам, метформин) не отвечали требованиям валидности и, соответственно, не могли быть использованы для практического применения [36]. В этой связи разработанная методика совместного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в спрее назального противоаллергического действия является пригодным аналитическим инструментом фармацевтического анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Осуществлен подбор оптимальных условий и разработана методика определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината с помощью ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования. Результаты валидационной оценки показали, что разработанная методика соответствует всем валидационным параметрам – является правильной, прецизионной, специфичной и линейной в аналитической области, что подтверждает ее применимость

для подтверждения количественного определения фексофенадина гидрохлорида и аммония глицирризината в лекарственном средстве. Экспериментально установлено, что при ВЭЖХ – анализе среднее содержание фексофенадина гидрохлорида в разработанном спрее назальном противоаллергического действия составляет $2,92 \pm 0,05$ мг/мл (относительная погрешность определения $\pm 1,56\%$), аммония глицирризината – $1,00 \pm 0,05$ мг/мл (относительная погрешность определения $\pm 5,40\%$).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено в рамках проекта, поддерживаемого Стипендиальной программой Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам, осуществляющим перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики (конкурс СП-1044.2019.4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ВКЛАД АВТОРОВ

М.В. Ларский – проведение экспериментальной части работы, подготовка предварительного варианта рукописи; А.Е. Позднякова – обзор литературных источников по теме исследования, проведение экспериментальной части работы, подготовка предварительного варианта рукописи; З.Д. Хаджиева – разработка концепции исследования, утверждение окончательного варианта рукописи; Д.И. Поздняков – статистическая обработка полученных результатов, подготовка предварительного варианта рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zuberbier T., Lotvall J., Simoens S., Subramanian S.V., Church M.K. Economic burden of inadequate management of allergic diseases in the European Union: a GA (2) LEN review // *Allergy*. – 2014. – Vol. 69. – No.10. P. 1275–1279. DOI: 10.1111/all.12470.
2. Gulhane C. A., Khadabadi S. S., Atram S. C. Analytical method development and validation for simultaneous estimation of some drugs in pharmaceutical dosage form // *Asian Journal of Pharmaceutical Analysis*. – 2019. – Vol. 9, No.3. – P. 107–112. DOI: 10.5958/2231-5675.2019.00020.6.
3. Sakalgaonkar A.A., Mirgane S.R., Pawar R.P. Validated LC Method, with a Chiral Mobile Phase, for Separation of the Isomers of Fexofenadine Hydrochloride // *Chromatographia*. – 2008. – Vol. 68. – P. 143–146. DOI: 10.1365/s10337-008-0667-6.
4. Sur D.K., Plesa M.L. Treatment of Allergic Rhinitis. *AmFamPhysician* // 2015. – Vol. 92, No.11. – P. 985–92.
5. Vatti R.R., Ali F., Teuber S., Chang C., Gershwin M.E. Hypersensitivity reactions to corticosteroids // *Clin Rev Allergy Immunol*. – 2014. – Vol. 47, No.1. – P. 26–37. DOI: 10.1007/s12016-013-8365-z.
6. Kakli H.A., Riley T.D. Allergic Rhinitis // *Prim Care*. 2016. – Vol. 43, No.3. – P. 465–75. DOI: 10.1016/j.pop.2016.04.009.
7. Smith S.M., Gums J.G. Fexofenadine: biochemical, pharmacokinetic and pharmacodynamic properties and its unique role in allergic disorders // *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. – 2009. – Vol. 5, No. 7. – P. 813–22. DOI: 10.1517/17425250903044967.
8. Huang C.Z., Jiang Z.H., Wang J., Luo Y., Peng H. Antihistamine effects and safety of fexofenadine: a systematic review and Meta-analysis of randomized controlled trials. // *BMC pharmacology & toxicology*. – 2019. – Vol. 20, No.1. – P. 72. DOI: 10.1186/s40360-019-0363-1.
9. Iriarte Sotés P., Armisén M., Usero-Bárcena T. Efficacy and Safety of Up-dosing Antihistamines in Chronic Spontaneous Urticaria: A Systematic Review of the Literature // *J Investig Allergol Clin Immunol*. – 2021. – Vol. 31, No.4. – P. 282–291. DOI: 10.18176/jiaci.0649.
10. Phinyo P., Koompawichit P., Nochaiwong S., Tovanabutra N., Chiewchanvit S., Chuamanochan M. Comparative Efficacy and Acceptability of Licensed Dose Second-Generation Antihistamines in Chronic Spontaneous Urticaria: A Network Meta-Analysis // *J Allergy Clin Immunol Pract*. – 2021. – Vol. 9, No.2. – P. 956–970.e57. DOI: 10.1016/j.jaip.2020.08.055.
11. Ellis A.K., Murrieta-Aguttes M., Furey S., Picard P., Carlsten C. Effect of fexofenadine hydrochloride on allergic rhinitis aggravated by air pollutants // *ERJ Open Res*. – 2021. – Vol. 7, No.2. – P. 00806–2020. DOI: 10.1183/23120541.00806-2020.
12. Everardo P.G., Magdalena G.S., Maria Elena G.P., Vanessa C.M., Gabriela S.C. Bioavailability assessment of fexofenadine and montelukast in a fixed-dose combination tablet versus the components administered simultaneously // *Allergol Immunopathol (Madr)*. – 2021. – Vol. 49, No.4. – P. 15–25. DOI: 10.15586/aei.v49i4.89.
13. Schröfelbauer B. Glycyrrhizin, the main active compound in liquorice, attenuates pro-inflammatory responses by interfering with membrane-dependent receptor signaling // *The Biochemical journal*. – 2009. – Vol. 421, No.3. – P. 473–82. DOI: 10.1042/BJ20082416.
14. Murray M.T. Glycyrrhiza glabra (Licorice) // *Textbook of Natural Medicine*. – 2020. – P. 641.
15. Langer D., Czarzynska-Goslinska B., Goslinski T. Glycyrrhetic acid and its derivatives in infectious diseases // *Current Issues in Pharmacy and Medical Sciences*. – 2016. – Vol. 29, No.3. – P. 118–123. DOI: 10.1515/cipms-2016-0024.
16. Maione F., Minosi P., di Giannuario A. Long-lasting

- anti-inflammatory and antinociceptive effects of acute ammonium glycyrrhizate administration: pharmacological, biochemical, and docking studies // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, No.13. – P. 2453. DOI: 10.3390/molecules24132453.
17. Yang R., Yuan B.C., Ma Y.S., Zhou S., Liu, Y. The anti-inflammatory activity of licorice, a widely used Chinese herb // *Pharmaceutical biology*. – 2017. – Vol. 55, No.1. – P. 5–18. DOI: 10.1080/13880209.2016.1225775.
 18. Pozdnyakov D.I., Khadzиеva Z.D., Pozdnyakova A.E., Zagorskaya N.S. Antiallergic effect of new combined nasal aerodisperse system in the conditions of experimental allergic rhinitis // *Biomedical and Pharmacology Journal*. – 2019. – Vol. 12, No.1. – P. 453–461. DOI: 10.13005/bpj/1660.
 19. Liu Y., Wang X., Yu J., Guo X. Chiral separation and molecular simulation study of six antihistamine agents on a coated cellulose tri-(3, 5-dimethylphenylcarbamate) column (Chiralcel OD-RH) and its recognition mechanisms // *Electrophoresis*. 2021. – Vol. 1, No.14–15. – P. 1461–1472. DOI: 0.1002/elps.202100033.
 20. Cai S. H., Zhao H. C., Jia M., Zhao X. L., et.al. Quality evaluation of fried *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma* pieces by HPLC fingerprint and multicomponent quantitative analysis // *Zhongguo Zhong yao za zhi= Zhongguo Zhongyao Zazhi= China Journal of Chinese Materia Medica*. – 2021. – Vol. 46, No.1. – P. 118–124. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20201022.306.
 21. Maher H. M., Sultan M. A., Olah I. V. Development of validated stability-indicating chromatographic method for the determination of fexofenadine hydrochloride and its related impurities in pharmaceutical tablets // *Chemistry Central journal*. – 2011. – Vol. 5, No.1. – P. 76. DOI: 10.1186/1752-153X-5-76.
 22. Хаджиева З.Д., Чумакова В.А., Губанова Л.Б. Разработка методики количественного определения фексофенадина в геле с использованием метода ВЭЖХ // *Вестник Росздравнадзора*. – 2016. – № 2. – С. 67–71.
 23. Хаджиева З.Д. Определение глицирризиновой кислоты в сырье и препаратах солодки голой методом ВЭЖХ // *Вестник новых медицинских технологий*. – 2006. – Т. 13, №3. – С. 188–190.
 24. Хаджиева З.Д., Чумакова В.А., Губанова Л.Б. Разработка методики количественного определения фексофенадина в субстанции спектрофотометрическим методом // *Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация*. – 2015. – № 22, №219. – С. 158–163.
 25. Ibrahim F. A., Elmansi H., Fathy M. E. Green RP-HPLC method for simultaneous determination of moxifloxacin combinations: investigation of the greenness for the proposed method // *Microchemical Journal*. – 2019. – Vol. 148. – P. 151–161. DOI: 10.1016/j.microc.2019.04.074.
 26. Al-Sanea M.M. Abdelgawad M.A., Alharbi K.S., Adly S.M., et al. Simultaneous analysis of several antihypertensive drugs in different combinations: Application for determination of drug degradation products and process impurities // *Microchemical Journal*. – 2021. – Vol. 166. – P. 106203. DOI: 10.2174/1573412914666180716161557
 27. Shamshad H., Sayqal A., Zeb J., Mirza A. Z Simultaneous determination of chloroquine and pyrimethamine with cetirizine in an active form and human serum by RP-HPLC // *Journal of Chromatographic Science*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 18. DOI: 10.1093/chromsci/bmab018.
 28. Shamshad H., Mirza A.Z. Application of RP-HPLC method for the simultaneous determination of cetirizine in the presence of quinolones // *Futur J Pharm Sci*. – 2021. – Vol. 7. – P. 117. DOI: 10.1186/s43094-021-00270-y.
 29. Reid I.O.A., Gadkariem E.A. Simultaneous determination of pseudoephedrine and loratadine in syrups by HPLC using cation exchange column and experimental design optimization // *The Pharma Innovation*. – 2017. – Vol. 6, No.3. – P. 244.
 30. Sebaiy M.M., Ziedan N.I. Developing a High-performance Liquid Chromatography Method for Simultaneous Determination of Loratadine and its Metabolite Desloratadine in Human Plasma // *Current drug metabolism*. – 2019. – Vol. 20, No.13. – P. 1053–1059. DOI: 10.2174/1389200220666191125095648.
 31. Sharma K., Bhatia R., Anghore D., Singh V., et al. Development and validation of UV-spectrophotometric and RP-HPLC methods for simultaneous estimation of fexofenadine hydrochloride, montelukast sodium and ambroxol hydrochloride in tablet dosage form // *Analytical Chemistry Letters*. – 2018. – Vol. 8, No.6. – P. 829–843. DOI: 10.1080/22297928.2018.1465470.
 32. Leistner A., Holzgrabe, U. Impurity Profiling of Baclofen Using Gradient HPLC–UV Method // *Chromatographia*. – 2021. DOI: 10.1007/s10337-021-04079-y.
 33. Tomić J., Djajić N., Agbaba D., Otašević B., et al. Robust optimization of gradient RP HPLC method for simultaneous determination of ivabradine and its eleven related substances by AQbD approach // *Acta Chromatographica*. – 2021. DOI: 10.1556/1326.2021.00885.
 34. Ibrahim H.H., Meray A.M., Saad, A.S. Dual-mode gradient HPLC and TLC densitometry methods for the simultaneous determination of paracetamol and methionine in the presence of paracetamol impurities // *Journal of AOAC International*. – 2021. DOI:10.1556/1326.2021.00885.
 35. Narula P., Pal B. A comprehensive review of method development by HPLC // *World Journal of Pharmaceutical Research*. – 2021. – Vol. 10, No.6. – P. 1839–1858. DOI: 10.20959/wjpr20216-20698.
 36. Singh R. HPLC method development and validation— an overview // *Journal of Pharmaceutical Education & Research*. – 2013. – Vol. 4, No.1. – P. 26–33.

АВТОРЫ

Ларский Михаил Владимирович – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0001-9724-1799. E-mail: larsky.mikhail@gmail.com

Позднякова Анастасия Евгеньевна – аспирант кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0003-0328-0127. E-mail: techno.nastya2015@yandex.ru

Хаджиева Зара Джамалеевна – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармацевтической технологии с курсом медицинской биотехнологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0001-9724-1799. E-mail: Zara-farm@mail.ru

Поздняков Дмитрий Игоревич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО ВолгГМУ. ORCID ID: 0000-0002-5595-8182. E-mail: pozdniackow.dmitry@yandex.ru

УДК: 615.276+618.46+612.592+616-002+612.11



ВЛИЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННОГО ЭКСТРАКТА ПЛАЦЕНТЫ НА ОТДЕЛЬНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ ЛЕЧЕБНОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ ДИКЛОФЕНАКА НАТРИЯ ПРИ АДЪЮВАНТ-ИНДУЦИРОВАННОМ АРТРИТЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ф.В. Гладких^{1,2}, Н.А. Чиж¹, А.А. Манченко¹, И.В. Белочкина¹, И.П. Михайлова¹

¹ Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины
61016, Украина, г. Харьков, ул. Переяславская, д. 23

² Государственное учреждение «Институт медицинской радиологии и онкологии им. С.П. Григорьева
Национальной академии медицинских наук Украины»
61024, Украина, г. Харьков, ул. Пушкинская, д. 82

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Получено 28.05.2021

Принята к печати 16.08.2021

Актуальность. Нестероидные противовоспалительные препараты являются одними из наиболее востребованных классов лекарственных средств в клинике внутренней медицины. Однако применение указанных препаратов ассоциируется с широким спектром нежелательных реакций с вовлечением ряда органов и систем, в частности желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой системы и почек.

Цель. Охарактеризовать влияние криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия при их комбинированном применении на состояние прооксидантно-оксидантной системы, активность воспалительных, деструктивных и цитолитических процессов, а также состояние белкового и липидного обмена по данным биохимических исследований у крыс с экспериментальным ревматоидным артритом.

Результаты. Введение диклофенака натрия и криоконсервированного экстракта плаценты крысам с адъювантным артритом привело к нормализации уровня активных продуктов тиобарбитуровой кислоты, что указывает на нивелирование признаков артрит-индуцированного оксидативного стресса. Также выявлено статистически достоверное ($p=0,01$) повышение активности супероксиддисмутазы на 30,6% относительно значений у крыс контрольной группы. Установлено усиление противовоспалительных свойств диклофенака натрия на фоне комбинированного применения диклофенака натрия с криоконсервированным экстрактом плаценты, так как уровень С-реактивного белка снизился ($p<0,001$) на 61,1% относительно нелеченых крыс, а уровень серомукоида статистически достоверно ($p<0,01$) снизился на 17,1% относительно показателей крыс группы монотерапии исследуемым нестероидным противовоспалительным препаратом. Показано, что уровень аланин-аминотрансферазы статистически достоверно ($p<0,01$) был ниже на 38,9%, а аспартат-аминотрансферазы – ниже на 37,9% ($p<0,01$) относительно показателей животных, которым вводили диклофенак натрия, что соответственно на 16,7% ($p=0,02$) и 17,2% ($p<0,001$) было ниже показателей крыс контрольной группы с нелеченым адъювантным артритом. Установленные изменения со стороны аминотрансфераз указывают на способность криоконсервированного экстракта плаценты нивелировать не только артрит-индуцированный цитолитический синдром, но и диклофенак-индуцированный. Комбинированное применение криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия сопровождалось нормализацией уровня общих липидов и фосфолипидов в сыворотке крови крыс на фоне экспериментального ревматоидного артрита. Так содержание фосфолипидов в пуле липидов статистически достоверно ($p=0,02$) выросло на 22,6% относительно показателей животных с адъювантным артритом без лечения.

Заключение. Исследование показало, что комбинированное применение диклофенака натрия и криоконсервированного экстракта плаценты приводит к восстановлению равновесия прооксидантно-антиоксидантной системы, более выраженному, чем при монотерапии диклофенаком натрия, снижению активности воспалительных, деструктивных и цитолитических процессов, а также восстановлению липидного обмена у крыс с экспериментальным ревматоидным артритом.

Ключевые слова: криоконсервированный экстракт плаценты; адъювантный артрит; противовоспалительная активность; нестероидные противовоспалительные препараты; диклофенак натрия

Для цитирования: Ф.В. Гладких, Н.А. Чиж, А.А. Манченко, И.В. Белочкина, И.П. Михайлова. Влияние криоконсервированного экстракта плаценты на отдельные биохимические показатели лечебной эффективности и токсичности диклофенака натрия при адъювант-индуцированном артрите в эксперименте. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):278-293. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-278-293

© Ф.В. Гладких, Н.А. Чиж, А.А. Манченко, И.В. Белочкина, И.П. Михайлова, 2021

For citation: F.V. Hladkykh, M.O. Chyzh, A.O. Manchenko, I.V. Belochkina, I.P. Mikhailova. Effect of cryopreserved placenta extract on some biochemical indices of therapeutic efficiency and toxicity of diclofenac sodium in adjuvant-induced experimental arthritis. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):278-293. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-278-293

Список сокращений: АА – адьювантный артрит; АЛТ – аланин-аминотрансфераза; АОС – антиоксидантная система; АсАТ – аспартат-аминотрансфераза, в/ж – внутривенно, в/м – внутримышечно; ГГТ – гамма-глутамилтрансфераза; ДН – диклофенак натрия; ЖКТ – желудочно-кишечный тракт; ИПКиК НАН Украины – Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины; КЭП – криоконсервированный экстракт плаценты; НПВП – нестероидные противовоспалительные препараты; ОС – окислительный стресс; ПОЛ – перекисное окисление липидов; ПОЛ-АОС – перекисное окисление липидов-антиоксидантная система; СОД – супероксиддисмутаза; С-РБ – С-реактивный белок; ТБК-РП – активные продукты тиобарбитуровой кислоты; ЦОГ – циклооксигеназа; 95% ДИ – 95% доверительный интервал

EFFECT OF CRYOPRESERVED PLACENTA EXTRACT ON SOME BIOCHEMICAL INDICES OF THERAPEUTIC EFFICIENCY AND TOXICITY OF DICLOFENAC SODIUM IN ADJUVANT-INDUCED EXPERIMENTAL ARTHRITIS

F.V. Hladkykh^{1,2}, M.O. Chyzh¹, A.O. Manchenko¹, I.V. Belochkina¹, I.P. Mikhailova¹

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine
23, Pereyaslavska Str., Kharkiv, Ukraine, 61015

² State Organization "Grigoriev Institute for Medical Radiology and Oncology of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine"
82, Pushkinska Str., Kharkiv, Ukraine, 61024

E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Received 28 May 2021

Accepted 16 Aug 2021

Relevance. Non-steroidal anti-inflammatory drugs are among the top requested ones in the clinic of internal medicine. However, these drugs are associated with a wide range of adverse reactions involving a number of organs and systems, in particular the gastrointestinal tract, cardiovascular system and kidneys.

The aim of the study is to characterize the effect of the combined use of cryopreserved placenta extract and diclofenac sodium on the prooxidant-oxidative system, the activity of inflammatory, destructive and cytolytic processes, as well as protein and lipid metabolism in rats with experimental rheumatoid arthritis.

Results. The administration of diclofenac sodium and cryopreserved placenta extract to rats with adjuvant arthritis normalized the level of active products of thiobarbituric acid and hence was indicative of the neutralization of an arthritis-induced oxidative stress. A statistically significant ($p=0.01$) increase of a superoxide dismutase activity (by 30.6% relative as compared with rats of the control group) has also been established. An increase in the anti-inflammatory properties of diclofenac sodium in the combined use of diclofenac sodium with a cryopreserved placenta extract has been found out. The level of C-reactive protein decreased ($p<0.001$) by 61.1% as compared with the untreated rats, and the level of seromucoid has been significantly ($p<0.01$) decreased by 17.1% as compared with the rats of the monotherapy group treated with the studied NSAIDs. It was shown that alanine aminotransferase and aspartate levels were significantly lower (by 38.9%, $p<0.01$ and by 37.9%, $p<0.01$, respectively) as compared with those of the animals that had been administrated with diclofenac sodium. Their indices were by 16.7% ($p=0.02$) and 17.2% ($p<0.001$) lower than the indices of the control group rats with untreated adjuvant arthritis. The established changes of aminotransferases levels indicate the ability of a cryopreserved placenta extract to level not only an arthritis-induced cytolytic syndrome, but also a diclofenac-induced one. The combined use of cryopreserved placenta extract and diclofenac sodium was accompanied by the normalization of the total lipids level and phospholipids in the blood serum of rats against the background of experimental rheumatoid arthritis. Thus, the content of phospholipids in the lipid pool statistically significantly ($p=0.02$) increased by 22.6% as compared with the indices of the animals with adjuvant arthritis without treatment.

Conclusion. The study showed that the combined use of diclofenac sodium and cryopreserved placenta extract leads to the restoration of the balance of the prooxidant-antioxidant system that is more pronounced than monotherapy with diclofenac sodium. A decrease in the activity of inflammatory, destructive and cytolytic processes, as well as the restoration of lipid metabolism in the rats with experimental rheumatoid arthritis, has also been observed.

Keywords: cryopreserved placenta extract; adjuvant arthritis; anti-inflammatory activity; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; diclofenac sodium

Abbreviations: АЛТ – alanine-aminotransferase; АсАТ – aspartate aminotransferase; АА – adjuvant arthritis; АОС – antioxidant system; СОД – cyclooxygenase; КЭП – cryopreserved placenta extract; С-РБ – C-reactive protein; ДС – diclofenac sodium; ГГТ – gamma glutamyl traspeptidase; GI tract – gastrointestinal tract; i/g – intragastrically; i/m – intramuscularly; ИПКиК НАН Украины – Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine; LP – lipid peroxidation; LP-АОС – lipid peroxidation-antioxidant system; NSAIDs – non-steroidal anti-inflammatory drugs; ОС – oxidative stress; РА – rheumatoid arthritis; СОД – superoxide dismutase; ТБА-РП – active products of thiobarbituric acid; 95% ДИ – 95% Confidence interval

ВВЕДЕНИЕ

Среди многочисленных лекарственных средств, которые есть в арсенале клиницистов, нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) занимают особое место. Это обусловлено наличием у них неспецифического противовоспалительного и обезболивающего свойств, что обосновывает ежегодное увеличение их продаж на фоне старения населения, поскольку, как известно, частота их применения возрастает с возрастом. НПВП играют особую роль в симптоматической терапии больных с ревматическими заболеваниями: ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилоартрит, подагра и др. [1–5].

Однако, не смотря на общепризнанную эффективность НПВП, их применение в клинической практике существенно ограничено риском развития нежелательных побочных эффектов со стороны различных органов и систем, в частности желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), сердечно-сосудистой системы, печени, почек [2–6]. К тому же в 25,0–35,0% случаев пациенты применяют НПВП нерационально и не учитывают наличия факторов риска развития нежелательных эффектов.

Известно, что максимальный риск сердечно-сосудистых осложнений имеет место при приёме препаратов, обладающих высокой селективностью к циклооксигеназе (ЦОГ) 2 типа (коксибов – целекоксиба, эторикоксиба и др.), в то время как риск осложнений со стороны ЖКТ наиболее характерен при приеме неселективных НПВП (диклофенака, индометацина, ибупрофена и др.) [3, 4]. Так в первые 7 дней приёма целекоксиба, повышение риска инфаркта миокарда составляет 92,0–99,0% [3, 7]. Нежелательные реакции со стороны ЖКТ – наиболее распространенная патология, обусловленная ингибированием ЦОГ-1 и как следствие снижением защитного потенциала слизистой оболочки пищеварительного тракта [8, 9]. Неселективные ингибиторы ЦОГ повышают риск ЖКТ-кровотечений в среднем в 4 раза, а селективные – в 3 раза [4, 5].

Проблема ЖКТ-переносимости широко применяемых НПВП обосновывает актуальность поиска эффективных цитопротективных препаратов, способных повышать устойчивость слизистой оболочки пищеварительного тракта [10, 11]. Лечение НПВП-индуцированной эзофагогастроэнтероколонопатии классически направлено на кислотосупрессивную терапию (ингибиторы протонной помпы, H_2 -гистаминоблокаторы и др.), применение гастроцитопротекторов (де-нол, сукральфат и др.) и препаратов, которые восстанавливают содержание простагландинов в слизистой оболочке (мизопростол, ребамипид и др.) [5, 12–14]. Однако все указанные группы лекарственных средств недостаточно удовлетворяют клиницистов, поскольку направлены преимущественно на лечение НПВП-гастропатии, в то время как НПВП способны вызывать поражения, в том числе, и дистальных отделов ЖКТ, а также имеют собственные побочные эффекты [13–19].

Одним из перспективных направлений терапии патологий ЖКТ является использование препаратов биологического происхождения, преимуществами которых является их комплексное фармакологическое действие и хорошая переносимость. [20–22].

В качестве средства коррекции ulcerогенного действия НПВП наше внимание привлек криоконсервированный экстракт плаценты (КЭП) человека, обладающий мультивекторным спектром биологической активности [23–26].

Впервые криоконсервированные препараты плацентарной ткани человека были получены учеными Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины (ИПКиК НАН Украины), которые разработали и внедрили в практику уникальную методику его длительного хранения в низкотемпературной среде. Это обеспечило первенство Украины среди европейских стран по опыту криоконсервирования биологических тканей [26–31].

В предыдущих исследованиях нами показано, что КЭП способен нивелировать ulcerогенное действие НПВП, в частности диклофенака натрия, мелоксикама, ибупрофена и др. [32–34]. В то же время по данным литературы КЭП присущи собственные противовоспалительные свойства [35], механизм которых, очевидно, связан с действием содержащихся в нем гормонов (прогестерона, эстрадиола, пролактина, гонадотропина и др.).

Кроме того, КЭП обладает выраженными антиоксидантными свойствами и его противовоспалительное действие, возможно, связано с устранением провоспалительной модуляции реакций системы крови активными формами кислорода и продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в результате стимуляции физиологической антиоксидантной системы [35].

Все вышеуказанные факты обосновывают необходимость углубленного изучения механизмов терапевтического, в частности противовоспалительного, действия КЭП при его комбинированном использовании с НПВП.

ЦЕЛЬ. Охарактеризовать влияние криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия при их комбинированном применении на состояние прооксидантно-антиоксидантной системы, активность воспалительных, деструктивных и цитолитических процессов, а также состояние белкового и липидного обмена по данным биохимических исследований у крыс с экспериментальным ревматоидным артритом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на базе ИПКиК НАН Украины в отделе экспериментальной криомедицины. Работа выполнена в контексте плановой научно-исследовательской работы «Деструктивные и

восстановительные процессы в тканях *in vivo* после воздействия низких температур и биологически активных веществ» (шифр 2.2.6.113, номер государственной регистрации 0117U001049).

Исследование проведено на 28 половозрелых нелинейных крысах-самцах, полученных из вивария ИПКиК НАН Украины, массой 200–220 г, разделенных на 4 группы, по 7 животных в каждой: I – интактные крысы ($n=7$); II (контроль) – крысы ($n=7$) с экспериментальным РА без лечения; III – крысы ($n=7$) с экспериментальным РА, которым вводили диклофенак натрия (ДН) (8 мг/кг [36], внутривенно (в/в)); IV ($n=7$) – крысы с экспериментальным РА, которым вводили ДН (8 мг/кг, в/в) и КЭП (0,16 мг/кг [37], внутримышечно (в/м)).

Режим введения и дозировки исследуемых средств

Лечение АА проводилось с 14-го по 28-й день. ДН (ЧАО «Химфармзавод «Красная звезда», ООО «Фармацевтическая компания «Здоровье», Украина) вводили в/в в дозе, равной ED_{50} по противовоспалительной активности на модели карагенин-индуцированного отека – 8 мг/кг в виде эмульсии на полисорбате «Twin-80» [35, 37]. Указанная доза ДН соответствует разовой дозе для человека 88 мг (1,25 мг/кг), что согласуется с клиническими рекомендациями об использовании ДН у больных по 75–100 мг/сут. при его длительном применении и в 1,7 раза ниже его максимальной суточной дозы 150 мг [8].

Препарат КЭП «Криоцелл-криоэкстракт плаценты» (Государственное предприятие «Межведомственный научный центр криобиологии и криомедицины Национальной академии наук, Национальной академии медицинских наук и Министерства здравоохранения Украины», Украина) согласно инструкции, применяется у пациентов парентерально в разовой дозе 1,8 мл [37]. Перед применением препарата «Криоцелл-криоэкстракт плаценты» разовую дозу (0,16 мл/кг) экстенпорально разводили в 0,9% растворе хлорида натрия из расчета 0,1 мл 0,9% раствора хлорида натрия /100 г массы тела. КЭП по 0,16 мл/кг массы тела вводили в/м с интервалом 2 дня (всего 5 инъекций), соответственно на 14, 17, 20, 23 и 26 дни, что соответствовало инструкции к его клиническому применению – в/м по 1,8 мл с интервалом 2–3 дня курсом 1–5 инъекций.

Модель хронического иммунного воспаления

Для воспроизведения условий введения крысам НПВП, соответствующих их клиническому применению нами была выбрана модель экспериментального ревматоидного артрита (РА) – адьювантный артрит (АА) у крыс, которая имеет все морфофункциональные признаки РА и сопровождается типичной реакцией, основным звеном которой является Т-клеточный иммунитет [38–40]. АА моделировали путем

субплантарного введения полного адьюванта Фрейнда (ПАФ, Thermo Fisher Scientific, США) в заднюю правую конечность из расчета 0,1 мл на крысу. День введения адьюванта принимали за «0» день эксперимента [40–42]. Максимальное проявление местной воспалительной реакции, которая сопровождалась значительным увеличением объема конечности определялась на 12–14 сутки, далее активность воспалительного процесса постепенно уменьшалась.¹

На 28 сутки эксперимента животных выводили из эксперимента и после декапитации животных отбирали образцы крови в пробирки с предварительно внесенным антикоагулянтом (2-х замещенной калийной солью этилендиаминотетрауксусной кислоты). Плазму отделяли центрифугированием в течение 15 мин при 3000 об/мин. Для получения сыворотки кровь отбирали в стеклянные пробирки без антикоагулянта и выдерживали при комнатной температуре (20–26°C) до полного отделения сыворотки, которую отбирали в пробирку и центрифугировали в течение 15–20 мин при 3000 об/мин.

Биохимические методы исследования крови²

1. Содержание активных продуктов тиобарбитуровой кислоты (ТБК-РП) в сыворотке крови определяли спектрофотометрически по методу Asakawa T. et al. [43] по реакции с ТБК и рассчитывали по показателям оптической плотности, определенным по светопоглощению при длине волны $\lambda=535$ нм, учитывая коэффициент молярной экстинкции окрашенного в красный цвет комплекса, который равен $1,56 \times 10^5$ моль⁻¹/см⁻¹ и выражали в мкмоль/л;
2. Активность супероксиддисмутазы (СОД) в сыворотке крови (КФ 1.15.1.1.) определяли спектрофотометрически по методу Костюка В.А. и соавт. [44], основанному на подавлении реакции окисления кверцетина, по показателям оптической плотности, определенным по светопоглощению при длине волны $\lambda=406$ нм. Активность СОД выражали в % ингибирования окисления кверцетина;
3. Содержание серомукоида в сыворотке крови определяли спектрофотометрически по методу Weimer H.E. и Moshin R.J., который заключается в осаждении белков сыворотки крови 1,8 М раствором перхлорной кислоты ($HClO_4$), выделении серомукоида из фильтрата с помощью фосфорно-вольфрамовой кислоты и дальнейшем количественном определении по разнице светопоглощения при длине волны $\lambda=260$ нм и $\lambda=280$ нм. Содержание серомукоида определяли в единицах оптической плотности (ед. оп. плотн.) и вы-

¹ Стефанов О.В. Доклінічні дослідження лікарських засобів : методичні рекомендації; за ред. член-кор. АМН України О.В. Стефанова. – Київ: Видавничий дім «Авіцена», 2001. – 527 с.

² Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимическим исследованиям и лабораторной диагностике. Москва: МЕДпресс-информ; 2009. 896 с.

- ражали в ммоль/л (коэффициент пересчета = 1; 1 ед. опт. плотн. = 1 ммоль/л);
4. Содержание С-реактивного белка (С-РБ) в сыворотке крови определяли по степени агглютинации и помутнения согласно инструкции использования латексного диагностического теста для выявления С-реактивного белка в сыворотке крови «С-РБ латекс-тест» (ООО НПЛ «Гранум», Украина) и выражали в мг/л;
 5. Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) в сыворотке крови (КФ 2.6.1.1) определяли спектрофотометрически по методу Reitman S. и Frankel S. и выражали в мкмоль/(млхч). Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «АЛТ (Райтман-Френкеля с калибратором)» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 6. Активность аспартатаминотрансферазы (АсАТ) в сыворотке крови (КФ 2.6.1.1) определяли спектрофотометрически по методу Reitman S. и Frankel S. и выражали в мкмоль/(млхч). Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «АсАТ (Райтман-Френкеля с калибратором)» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 7. Активность гамма-глутамилтранспептидазы (ГГТП) в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом и выражали в Ед/л. Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «ГГТП» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 8. Активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом и выражали в мкмоль/л. Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «Щелочная фосфатаза» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 9. Содержание общего белка в сыворотке крови определяли спектрофотометрическим методом по биуретовой реакции и выражали в г/л. Исследования проводились с использованием наборов для биохимических исследований «Общий белок» (ООО НПП «Филисит-Диагностика», Украина);
 10. Содержание общих липидов в сыворотке крови определяли спектрофотометрически по цветовой реакции с сульфосфосфованилиновым реактивом, которая основывается на том, что продукты распада ненасыщенных жирных кислот, образующихся после кислотного гидролиза липидов, взаимодействуют с фосфорнованилиновым реактивом с образованием окрашенных комплексов, имеющих максимум поглощения при длине волны $\lambda=530$ нм. Липидные экстракты получали по методу Bligh E. G. и Dyer W. I. [45]. Фосфолипиды фракционировали методом Svetashev V. I. и Vaskovsky V. E., путем двумерной микротонкошаровой хроматографии [46]. Фосфолипиды идентифицировали по методу

[47] и выражали их содержание по уровню неорганического фосфора в г/л.

Биоэтические аспекты исследования

Животных содержали в условиях вивария ИПКиК НАН Украины. В течении 14 дней крысы находились на карантине (в соответствии с санитарными нормами «Структура и содержание экспериментальных биологических клиник» (Приказ № 755 от 12.08.1997 г.) на водно-пищевом рационе со свободным доступом к пище и воде (согласно Приложения от 04.12.1977 г. к Приказу №163 от 10.03.1996 г. «Про суточные нормы кормления лабораторных животных и продуцентов»). Все экспериментальные исследования над лабораторными животными проводили в соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики и с соблюдением основных положений Конвенции Совета Европы об охране позвоночных животных, используемых в экспериментах и в других научных целях от 18 марта 1986 г.; Директивы Европейского парламента и Совета Евросоюза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей; приказ Министерства здравоохранения Украины от 14 декабря 2009 г. №944 «Об утверждении порядка проведения доклинического изучения лекарственных средств и экспертизы материалов доклинического изучения лекарственных средств» и Закона Украины от 21 февраля 2006 г. № 3447-IV «О защите животных от жестокого обращения».

Комплексная программа исследований рассмотрена и согласована Комитетом по биоэтике при ИПКиК НАН Украины (выписка из протокола № 2 от 11 марта 2020).

Статистическая обработка полученных результатов

Проведена с использованием прикладной программы для работы с электронными таблицами «Microsoft Office Excel 2003; 2013» (Microsoft Corporation, США) с помощью расширения «Real Statistics» (<http://www.real-statistics.com/>). Оценку характера распределения величин в каждой группе выборочной совокупности проводили с использованием W-критерия Шапиро-Вилка (Shapiro-Wilk test; $n < 50$). Однородность дисперсий определяли по критерию Левена (Levene's test). Для оценки значимости выявленных различий исследуемых показателей при разных условиях эксперимента проводили статистический анализ с использованием параметрических и непараметрических критериев. При нормальном распределении независимых величин различия между группами определяли попарно по t-критерию Стьюдента. При ненормальном распределении по крайней мере одной из групп независимых величин различия между ними определяли попарно по непараметрическому ранговому U-критерию Манна-Уитни (Mann-Whitney). Полученные значения сравнивали с критическими при уровне достоверности выше 95,0%

($p \leq 0,05$), выше 99,0% ($p \leq 0,01$), выше 99,5% ($p \leq 0,005$) и выше 99,9% ($p \leq 0,001$) и делали вывод о вероятности погрешности. Цифровые данные в случае нормального распределения величин приведены в виде « $M \pm m$ » ($M \pm SE$), где: M – среднее арифметическое значение; m (SE) – стандартная ошибка среднего арифметического или M (95% ДИ: 5% – 95%), где: 95% ДИ – 95% доверительный интервал. При ненормальном распределении полученных величин данные представлены в виде Me [LQ ; UQ], где Me – медиана [LQ ; UQ] – верхняя граница нижнего (первого) квартиля (lower quartile – LQ) и нижняя граница верхнего (третьего) квартиля (upper quartile – UQ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Биохимические исследования периферической крови крыс с АА (контрольная группа) показали статистически достоверное ($p < 0,001$) увеличение содержания ТБК-РП на 53,7% относительно показателей интактных животных (рис. 1), что указывает на активацию ПОЛ, что вероятно обусловлено развитием системного воспалительного процесса [47, 48].

Как известно продукты ПОЛ способствуют агрегации тромбоцитов, уменьшению синтеза простагландинов с антикоагулянтным действием, формированию синдрома цитолиза, выходу факторов свертывания крови и подавлению деления и регенерации клеток. ТБК-РП выступает эндогенным альдегидом, который является клинико-лабораторным маркером оксидативного стресса и широко применяется для контроля эффективности лечения целого ряда заболеваний – РА, остеоартрит, ишемическая болезнь сердца и др. [49–51].

Монотерапия ДН крыс с АА привела к статистически достоверному ($p < 0,01$) снижению уровня ТБК-РП на 19,0% относительно показателей животных контрольной группы в аналогичные сроки исследования. Комбинированное применение ДН и КЭП сопровождалось более выраженным снижением интенсивности процессов ПОЛ на что указывало уменьшение содержания ТБК-РП у крыс с АА на 31,7% относительно показателей крыс с АА без лечения, что в 1,7 раз превышало аналогично направленные изменения на фоне применения только ДН.

Следует отметить, что у животных с АА, которым вводили ДН и КЭП уровень ТБК-РП на 28 день эксперимента практически сопоставлялся с показателями интактных крыс и составлял 4,3 [3,6; 4,5] мкмоль/л (рис. 1), что указывает на нивелирование признаков АА-индуцированного оксидативного стресса и может расцениваться как один из механизмов лечебного действия исследуемых препаратов.

Установленная активация ПОЛ у крыс на фоне развития АА согласовывалась с параллельным истощением антиоксидантной системы (АОС) на что указывало статистически достоверно ($p < 0,01$) снижение уровня СОД на 27,9% относительно показателей интактных животных (рис. 2).

Как известно, СОД совместно с другими ферментами АОС (каталаза, церулоплазмин, глутатионпероксидаза, глутатионредуктаза и др.) выступают неотъемлемым компонентом ПОЛ-АОС. Оценка функционального состояния АОС определяет уровень компенсаторного и адаптивного ответа организма в условиях возможного развития ОС [51, 52].

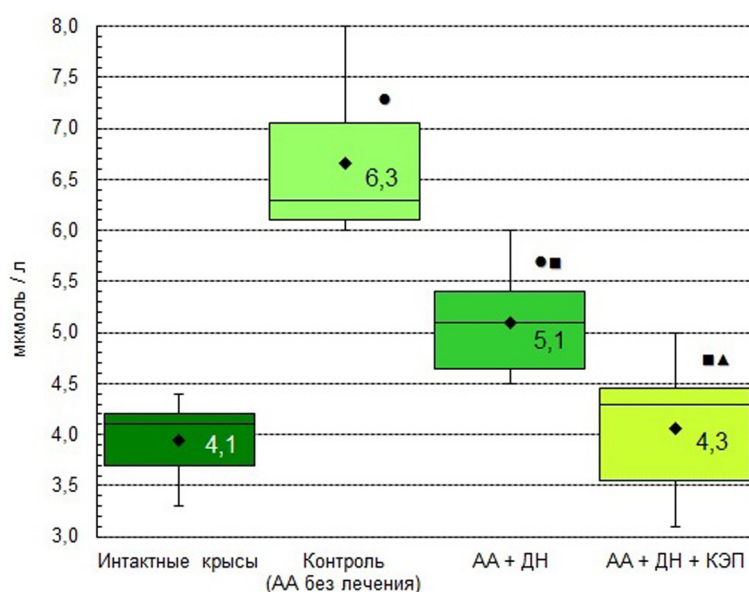


Рисунок 1 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень ТБК-РП в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентилей, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (▶ – медиана равна 25 (75) перцентилею), ♦ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

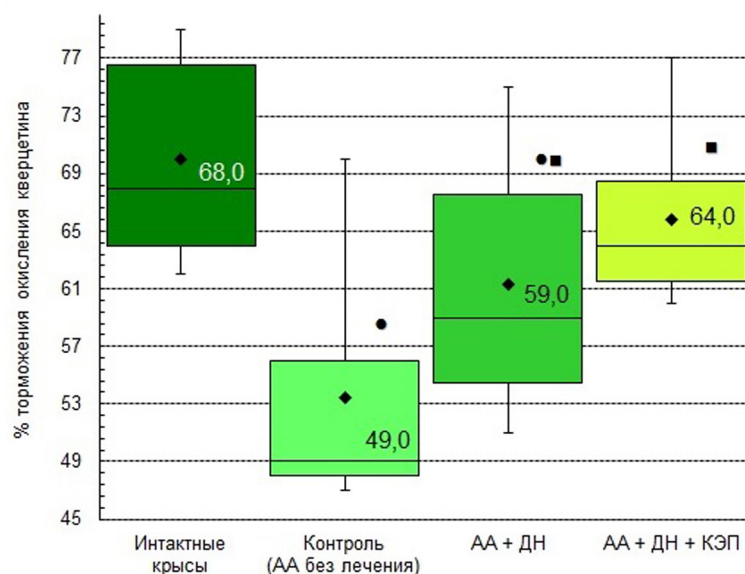


Рисунок 2 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень СОД в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (► – медиана равна 25 (75) перцентилю), ♦ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

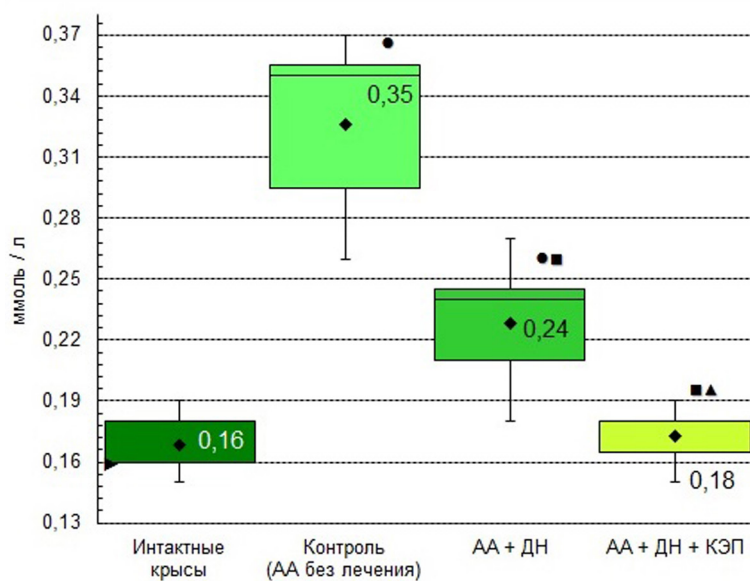


Рисунок 3 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень серомукоида в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (► – медиана равна 25 (75) перцентилю), ♦ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

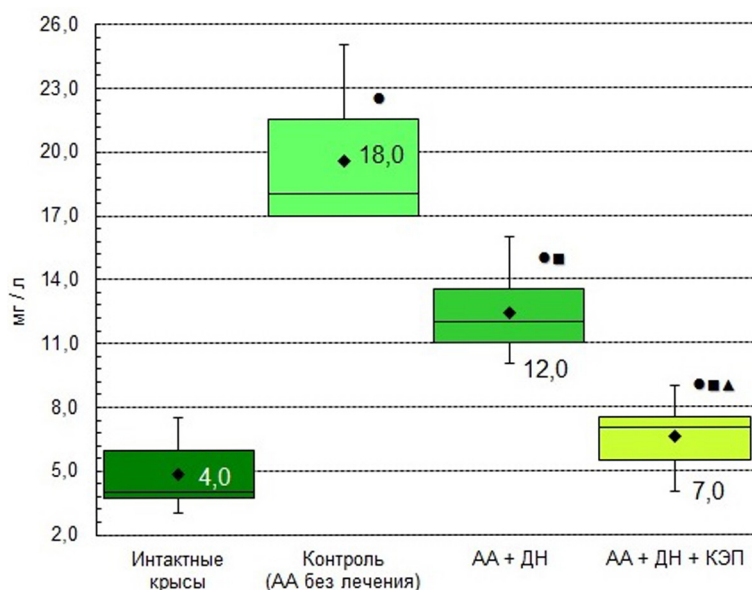


Рисунок 4 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень С-РБ в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (► – медиана равна 25 (75) перцентилю), ♦ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

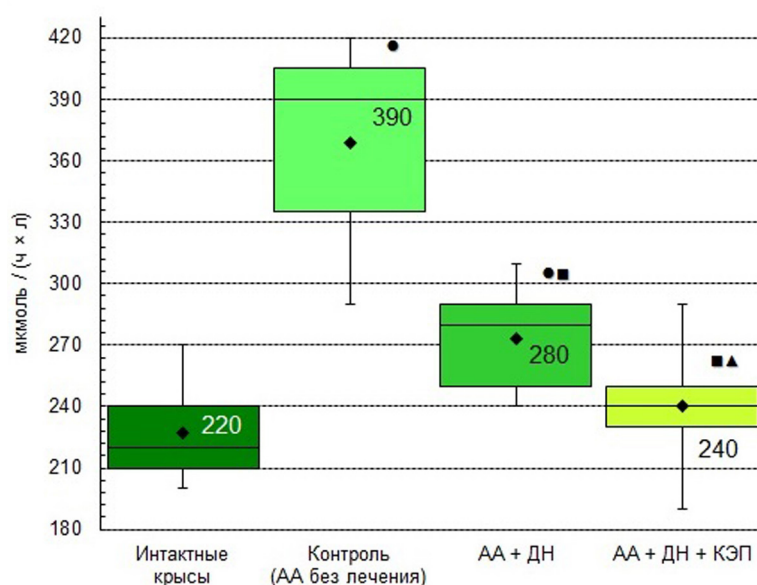


Рисунок 5 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на уровень щелочной фосфатазы в периферической крови у крыс с АА на 28-е сутки эксперимента

Примечание: распределение величин ненормальное. Боксы включают результаты от 25-го до 75-го перцентиля, вертикальные линии за пределами боксов – минимальное и максимальное значения. Горизонтальная линия внутри бокса – медиана (► – медиана равна 25 (75) перцентилю), ♦ – среднее значение; ● – $p < 0,05$ относительно показателей интактных крыс, ■ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА без лечения; ▲ – $p < 0,05$ относительно показателей крыс с АА, леченных ДН

Таблица 1 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на маркеры цитолиза в периферической крови крыс с АА на 28-е сутки эксперимента ($M \pm m$ (95% ДИ) или Me [LQ; UQ]; $n=28$)

Исследуемый показатель, единицы измерения	Условия эксперимента			
	I группа	II группа	III группа	IV группа
	Интактные крысы	Контроль (АА без лечения)	АА + ДН	АА +ДН +КЭП
n	7	7	7	7
Аланин-аминотрансфераза (АлАт), мкмоль/мл/ч	1,4 [1,3; 1,6]	1,8 [1,6; 1,9] $p_{1-2}=0,01$	2,2 [2,1; 2,3] $p_{1-3}<0,01$ $p_{2-3}=0,01$	1,5 [1,5; 1,6] $p_{1-4}=0,17$ $p_{2-4}=0,02$ $p_{3-4}<0,01$
Аспартат-аминотрансфераза (АсАт), мкмоль/мл/ч	2,3 [2,1; 2,4]	2,9 [2,9; 3,5] $p_{1-2}<0,001$	3,5 [3,3; 2,4] $p_{1-3}<0,01$ $p_{2-3}=0,2$	2,4 [2,3; 2,5] $p_{1-4}=0,14$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}<0,01$
Гаммаглутамил-транспептидаза (ГГТП), Ед/л	22,3 $\pm$ 1,81 (95% ДИ: 18,7–25,8)	36,1 $\pm$ 0,80 (95% ДИ: 34,6–37,7) $p_{1-2}<0,001$	27,9 $\pm$ 1,30 (95% ДИ: 25,3–30,4) $p_{1-3}=0,03$ $p_{2-3}<0,001$	23,9 $\pm$ 1,10 (95% ДИ: 21,7–26,0) $p_{1-4}=0,5$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}=0,04$

Таблица 2 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на показатели белкового гомеостаза в периферической крови крыс с АА на 28-е сутки эксперимента ($M \pm m$ (95% ДИ) или Me [LQ; UQ]; $n=28$)

Исследуемый показатель, единицы измерения	Условия эксперимента			
	I группа	II группа	III группа	IV группа
	Интактные крысы	Контроль (АА без лечения)	АА +ДН	АА +ДН +КЭП
n	7	7	7	7
Общий белок, г/л	78,9 $\pm$ 1,45 (95% ДИ: 76,0–81,7)	74,6 $\pm$ 1,36 (95% ДИ: 71,9–77,2) $p_{1-2}=0,05$	74,7 $\pm$ 0,92 (95% ДИ: 72,9–76,5) $p_{1-3}=0,03$ $p_{2-3}=0,9$	81,0 $\pm$ 1,50 (95% ДИ: 78,1–83,9) $p_{1-4}=0,3$ $p_{2-4}=0,01$ $p_{3-4}<0,01$
Альбумины, г/л	35,3 $\pm$ 1,69 (95% ДИ: 32,0–38,6)	25,1 $\pm$ 1,03 (95% ДИ: 23,1–27,2) $p_{1-2}<0,001$	27,9 $\pm$ 1,30 (95% ДИ: 25,3–30,4) $p_{1-3}<0,01$ $p_{2-3}=0,1$	37,4 $\pm$ 1,90 (95% ДИ: 33,7–41,2) $p_{1-4}=0,01$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}<0,01$
Глобулины, г/л	45,7 $\pm$ 1,54 (95% ДИ: 42,7–48,7)	49,6 $\pm$ 1,29 (95% ДИ: 47,0–52,1) $p_{1-2}=0,08$	46,7 $\pm$ 1,19 (95% ДИ: 44,4–49,0) $p_{1-3}=0,6$ $p_{2-3}=0,1$	40,4 $\pm$ 0,65 (95% ДИ: 39,2–41,7) $p_{1-4}<0,01$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$
Соотношение «альбумины/ глобулины»	0,78 $\pm$ 0,039 (95% ДИ: 0,70–0,85)	0,51 $\pm$ 0,028 (95% ДИ: 0,46–0,57) $p_{1-2}<0,001$	0,60 $\pm$ 0,035 (95% ДИ: 0,53–0,67) $p_{1-3}<0,01$ $p_{2-3}=0,07$	0,93 $\pm$ 0,045 (95% ДИ: 0,84–1,02) $p_{1-4}=0,03$ $p_{2-4}<0,001$ $p_{3-4}<0,001$

Таблица 3 – Влияние ДН и его комбинации с КЭП на показатели липидного гомеостаза в периферической крови крыс с АА на 28-е сутки эксперимента ($M \pm m$ (95% ДИ) или Me [LQ; UQ]; $n=28$)

Исследуемый показатель, единицы измерения	Условия эксперимента			
	I группа Интактные крысы	II группа Контроль (АА без лечения)	III группа АА +ДН	IV группа АА +ДН +КЭП
n	7	7	7	7
Общие липиды, г/л	3,0 [2,7–3,3]	5,1 [4,5–5,2] $p_{1-2} < 0,001$	4,4 [4,2–4,5] $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,07$	3,3 [3,2–3,4] $p_{1-4} = 0,1$ $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} < 0,001$
Фосфолипиды, г/л	2,1 $\pm$ 0,05 (95% ДИ: 2,0–2,2)	2,5 $\pm$ 0,09 (95% ДИ: 2,3–2,7) $p_{1-2} < 0,001$	2,0 $\pm$ 0,05 (95% ДИ: 1,9–2,1) $p_{1-3} = 0,6$ $p_{2-3} < 0,001$	2,1 $\pm$ 0,05 (95% ДИ: 2,0–2,2) $p_{1-4} = 0,5$ $p_{2-4} < 0,01$ $p_{3-4} = 0,2$
Фосфолипиды относительно общих липидов, %	70,9 $\pm$ 5,35 (95% ДИ: 60,4–81,4)	53,2 $\pm$ 3,60 (95% ДИ: 46,2–60,3) $p_{1-2} = 0,02$	46,9 $\pm$ 1,80 (95% ДИ: 43,3–50,4) $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} = 0,1$	65,2 $\pm$ 2,47 (95% ДИ: 60,3–70,0) $p_{1-4} = 0,4$ $p_{2-4} = 0,02$ $p_{3-4} < 0,001$

Монотерапия ДН крыс с АА привела к статистически достоверному ($p=0,03$) повышению активности СОД на 20,4% относительно показателей нелеченых животных (II группа), однако данное значение (59,0% ингибирования окисления кверцетина) все же на 13,2% было ниже показателей животных без АА (68,0 [64,0; 76,5] %).

На фоне комбинированного применения ДН и КЭП нами отмечено статистически достоверное ($p=0,01$) повышение активности СОД на 30,6% относительно значений у крыс контрольной группы, что лишь на 5,9% было ниже показателей интактных крыс и указывало на наиболее выраженное восстановление активности АОС.

Для оценки состояния соединительнотканых структур у крыс на фоне развития АА нами исследовался уровень серомукоидов, поскольку именно эта группа гликопротеинов поступает в плазму крови при разрушении, деградациии или повреждении соединительной ткани. Кроме того, серомукоиды принято рассматривать как острофазные маркеры воспаления, которые могут служить индикатором выраженности воспалительного процесса поскольку их период жизни составляет около 5 дней [53–56].

Установлено, что на 28-й день эксперимента у крыс с АА отмечено статистически достоверный ($p<0,001$) рост уровня серомукоида в 2,2 раза относительно показателей интактных крыс (рис. 3).

Монотерапия ДН крыс с АА привела к статистически достоверному ($p<0,01$) снижению уровня изучаемого показателя на 31,4% относительно уровня нелеченых животных. Комбинированное применение ДН и КЭП привело к статистически достоверному

($p<0,01$) еще большему снижению содержанию серомукоида на 17,1% относительно показателей крыс группы монотерапии ДН, который составил соответственно 0,18 [0,17; 0,18] ммоль/л.

«Золотым» маркером воспаления практически при всех патологических процессах по праву принято считать С-РБ, поскольку он имеет тенденцию значительно повышаться при повреждениях тканей, инфекциях бактериальной или вирусной природы, воспалении и злокачественных новообразованиях, а при некрозе тканей и вовсе может в течении суток возрастать до 300 мг/л [47, 57–61].

Установлено, что развитие экспериментального РА у крыс привело к статистически достоверному ($p<0,001$) увеличению уровня С-РБ в 4,5 раза относительно показателей интактных животных (рис. 4).

На фоне монотерапии ДН данный показатель снизился ($p<0,001$) на 33,3%, а на фоне комбинированного введения ДН и КЭП – снизился ($p<0,001$) на 61,1% относительно значений у крыс с АА без лечения. Полученные данные указывают на выраженные противовоспалительные свойства ДН, которые потенцируются при совместном применении с КЭП, однако могут быть связаны и с собственной противовоспалительной активностью КЭП.

Установленные биохимические признаки активного воспалительного процесса и развивающийся при этом дисбаланс в системе ПОЛ-АОС обосновывает целесообразность детального анализа активности маркеров цитолиза на фоне лечения крыс с АА – АлАТ, АсАТ и ГГТП [62, 63].

Исследование показало, что развитие АА у крыс сопровождалось увеличением содержания АлАТ на

28,6% ($p=0,01$), АсАТ на 26,1% ($p<0,001$) и ГГТП на 62,2% ($p<0,001$) относительно показателей интактных крыс (табл. 1).

Аминотрансферазы являются сложными белками-ферментами, которые катализируют процессы трансаминирования и обеспечивая синтез отдельных аминокислот в организме. Доказано, что под влиянием повреждающих факторов нарушается энергетический метаболизм гепатоцитов, что приводит к повышению проницаемости клеточных мембран и появлению в сыворотке крови компонентов цитоплазмы.

Поскольку маркер повреждения клеточных – ГГПТ в наибольшей степени содержится в почках, печени и тонкой кишке то можно предположить о наличии воспалительного процесса в указанных органах, что сопоставляется с данными литературы о системности воспалительного процесса при РА, аналогом которого является АА у животных [50].

Применение ДН привело к усилению цитолитических процессов, на что указывало еще большее возрастание исследуемых маркеров в периферической крови – так АлАТ был выше на 22,2% ($p<0,01$), а АсАТ – на 20,7% ($p=0,2$) относительно показателей крыс с АА без лечения, что на 57,1% ($p<0,01$) и 52,2% ($p<0,01$) соответственно превышало показатели интактных животных (табл. 1). Летальности в группе комбинированного применения ДН и КЭП не отмечено. Указанные изменения со стороны активности аминотрансфераз согласуются с данными о гепатотоксическом действии ДН [3, 8, 64–66].

Также установлено, что на фоне применения ДН ГГТП статистически достоверно ($p<0,001$) снизился на 22,9% относительно показателей животных контрольной группы (табл. 1).

Особое внимание привлекают показатели цитолитических процессов у крыс с АА на фоне комбинированного применения ДН и КЭП (табл. 1). Так установлено, что АлАТ статистически достоверно ($p<0,01$) был ниже на 38,9%, а АсАТ – ниже ($p<0,01$) на 37,9% относительно показателей животных, которым вводили ДН, что соответственно на 16,7% ($p=0,02$) и 17,2% ($p<0,001$) было ниже показателей крыс контрольной группы с нелеченым АА. Установленные изменения со стороны аминотрансфераз указывают на способность КЭП нивелировать не только АА-индуцированный цитолитический синдром, но и сопутствующий цитолиз, усиливаемый ДН, что указывает на универсальность его цитопротективной активности, вероятно, обусловленной его способностью стабилизировать клеточные мембраны, а также его антиоксидантными свойствами.

Кроме того установлено, что комбинированное применение ДН и КЭП сопровождалось также статистически достоверным ($p<0,001$) снижением уровня ГГТП на 28,6% относительно нелеченых крыс с АА, что на 11,4% было ниже ($p=0,01$) чем у крыс, леченных только ДН (табл. 1).

Оценка уровня щелочной фосфатазы в периферической крови у крыс с АА показала, что развитие системного аутоиммунного воспаления сопровождалось статистически достоверным ($p<0,001$) повышением указанного металлопротеина на 77,3% относительно показателей интактных крыс и составило 390 [335; 405] мкмоль/чхл (рис. 5).

Щелочная фосфатаза – гетерогенный энзим, состоящий из отдельных изоферментов, каждый из которых сосредоточен в определенном органе: печени, костной ткани, кишечнике, плаценте. Локализуясь на клеточной мембране, фермент подключается к транспортировке биологически важных соединений, в первую очередь, фосфора. Щелочная фосфатаза активно участвует в процессах фосфорно-кальциевого обмена в организме. Рост активности щелочной фосфатазы указывает на активацию процессов ремоделирования костной ткани, поскольку ее костная фракция синтезируется остеобластами и их предшественниками и участвует в минерализации костного матрикса [50, 67–69]. Повышение активности данного фермента может указывать на повышение остеобластической активности и усиление деструктивных изменений в печени или возникновения холестаза у крыс с АА [3].

Монотерапия ДН привела к статистически достоверному ($p<0,01$) снижению активности щелочной фосфатазы на 28,2%, а комбинированное применение ДН и КЭП сопровождалось более выраженным снижением активности указанного фермента на 38,5% ($p<0,01$) относительно показателей нелеченых крыс с АА (рис. 5).

Изучение белкового спектра крови крыс с АА показало, что уровень общего белка практически не имел различий у интактных крыс и крыс с АА (табл. 2).

Изучение содержания отдельных белковых фракций показало, что развитие АА у крыс сопровождалось статистически достоверным ($p<0,001$) снижением содержания альбуминов на 28,7% относительно показателей интактных крыс. Альбумины – наиболее гомогенная фракция протеинов, основной функцией которых является поддержание коллоидно-осмотического давления, а также транспорт углеводов, липидов, гормонов и пигментов. Организм пациента с активным РА более активно потребляет альбумины в месте воспаления, в результате чего развивается гипоальбуминемия.

Кроме того, отмечено, что у крыс с АА незначительно возрастало содержание глобулинов на 8,4% ($p=0,04$) относительно показателей интактных животных. Как известно, при длительном подостром прогрессирующем процессе наблюдается, главным образом, гипергамаглобулинемия, что связано с ростом уровня аутоантител [50, 51, 70, 71].

Указанные изменения приводили к статистически достоверному ($p<0,001$) снижению значения альбумин/глобулинового соотношения периферической

крови на 34,2% относительно показателей интактных животных (табл. 3). Изменение соотношения протеиновых фракций, как правило, соответствует тяжести РА и отражает динамику воспалительного процесса [50, 51, 70, 72].

Монотерапия ДН привела к статистически достоверному ($p=0,04$) снижению значения альбумин/глобулинового соотношения на 17,5% относительно крыс с АА без лечения. Комбинированное же применение ДН и КЭП сопровождалось полным повышением ($p=0,01$) исследуемого соотношения на 19,5% выше чем у интактных животных, что обусловлено повышением уровня альбуминов практически до уровня интактных животных и в то же время на 11,6% ниже ($p<0,01$) значения у интактных крыс содержание глобулинов (табл. 3).

Важную роль в жизнедеятельности клетки играют липиды, которые выступают структурными компонентами биомембран, энергетическим субстратом клетки, участвующие в реакциях сигнальной трансдукции, экзо- и эндоцитоза и тому подобное. Кроме того, они участвуют в фиксации белков фосфолипидного бислоя и обеспечивают их соответствующую ориентацию в клеточной мембране, является неполярным средой для жирорастворимых субстратов и кофакторов ферментов, обуславливают их фолдинг, а также выполняют роль регуляторов и модуляторов ферментативной активности [69, 73].

Исследование показало, что у крыс на фоне развития АА отмечается статистически достоверное ($p=0,02$) снижение доли фосфолипидов в пуле общих липидов на 25,0%. При этом отмечено рост общего уровня липидов ($p<0,001$) в 1,7 раза и непропорциональный рост содержания фосфолипидов ($p<0,001$) в 1,2 раза, что обусловлено активацией циклооксигеназного пути метаболизма мембранных фосфолипидов (табл. 3).

На фоне монотерапии ДН отмечено снижение уровня общих липидов ($p=0,07$) в 1,3 раза и снижение уровня фосфолипидов ($p<0,001$) так же в 1,3 раза относительно показателей животных с АА без лечения, что соответствовало развитию еще большего дисбаланса содержания фосфолипидов в пуле общих липидов – их содержание снизилось еще на 6,3%, однако указанные изменения не достигли уровня статистической значимости ($p=0,1$).

На фоне комбинированного применения ДН и КЭП у крыс с АА отмечена статистически достоверная ($p=0,02$) гармонизация липидного баланса – содержание фосфолипидов выросло на 22,6% относительно показателей животных с АА без лечения и составил соответственно $2,1\pm 0,05$ (95% ДИ: 2,0–2,2) г/л. Ука-

занные изменения наблюдались на фоне снижения уровня общих липидов в сыворотке крови ($p<0,001$) на 35,3% относительно показателей нелеченых крыс и составили соответственно 3,3 [3,2–3,4] г/л, что сопоставлялось с показателями интактных животных 3,0 [2,7–3,3] г/л.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Введение диклофенака натрия и криоконсервированного экстракта плаценты крысам с адьювантным артритом привело нормализации уровня активных продуктов тиобарбитуровой кислоты, что указывает на нивелирование признаков артрит-индуцированного оксидативного стресса. Также выявлено статистически достоверное ($p=0,01$) повышение уровня супероксиддисмутазы на 30,6% относительно значений у крыс контрольной группы.

Установлено усиление противовоспалительных свойств диклофенака натрия на фоне комбинированного применения диклофенака натрия с криоконсервированным экстрактом плаценты – уровень С-реактивного белка снизился ($p<0,001$) на 61,1% относительно нелеченых крыс, а уровень серомукоида статистически достоверно ($p<0,01$) снизился на 17,1% относительно показателей крыс группы монотерапии исследуемым НПВП.

Показано, что уровень аланин-аминотрансфераз статистически достоверно ($p<0,01$) был ниже на 38,9%, а аспартат-аминотрансферазы – ниже ($p<0,01$) на 37,9% относительно показателей животных, которым вводили диклофенак натрия, что соответственно на 16,7% ($p=0,02$) и 17,2% ($p<0,001$) было ниже показателей крыс контрольной группы с нелеченым адьювантным артритом. Установленные изменения со стороны аминотрансфераз указывают на способность криоконсервированного экстракта плаценты нивелировать не только артрит-индуцированный цитолитический синдром, но и диклофенак-индуцированный.

Комбинированное применение криоконсервированного экстракта плаценты и диклофенака натрия сопровождалось нормализацией уровня общих липидов и фосфолипидов в сыворотке крови крыс на фоне экспериментального ревматоидного артрита. Так содержание фосфолипидов в пуле фосфолипидов статистически достоверно ($p=0,02$) выросло на 22,6% относительно показателей животных с адьювантным артритом без лечения.

В дальнейшем, для корректной оценки активности воспалительного процесса целесообразно определение уровня матриксных металлопротеиназ и гомоцистеина.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность лаборантам Отдела экспериментальной криомедицины З.Е. Губенко и Л.М. Гордеевой и заведующей вивария Л.В. Бацуновой Института проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины за помощь в проведении экспериментальных исследований.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Ф.В. Гладких – идея, концепция и дизайн исследования, координация и участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов, статистическая обработка и анализ полученных данных, написание основного текста статьи и формулирование выводов; Н.А. Чиж – концепция исследования, участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов, редактирование текста статьи;

А.А. Манченко – участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов;

И.В. Белочкина – участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов, поисково-аналитическая работа; И.П. Михайлова – участие в проведении экспериментальной работы, сбор материалов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zeng C., Wei J., Persson M. S. M., Sarmanova A., Doherty M., Xie D., Wang Y., Li X., Li J., Long H., Lei G., Zhang W. Relative efficacy and safety of topical non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis: a systematic review and network meta-analysis of randomised controlled trials and observational studies // *British Journal of Sports Medicine*. – 2018. – Vol. 52, No.10. – P. 642–650. DOI: <https://doi.org/10.1136/bjsports-2017-098043>.
2. Балабанцева А.П., Каратеев А. Е. Частота и клинко-эндоскопические особенности сочетанных НПВП-индуцированных гастроинтестинальных повреждений // *Современная ревматология*. 2018. – Т. 12, №4. – С. 95–100. DOI: <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2018-4-95-100>.
3. Ушкалова Е.А., Зырянов С.К., Затолочина К.Э. Безопасность и переносимость НПВС: фокус на ацеклофенак // *Медицинский совет*. – 2019. – №9. – С. 110–120. – DOI: <https://doi.org/10.21518/2079-701X-2019-9-110-120>.
4. Fischbach W. Drug-induced gastrointestinal bleeding // *Internist*. – 2019. – Vol. 60, No.6. – P. 597–607. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00108-019-0610-y>.
5. Трінус Ф.П. Рзвиток уявленнь про механізм дії нестероїдних протизапальних лікарських засобів та анальгетиків-антипіретиків Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2012. – Т. 2, №27. – С. 68–72.
6. Гладких Ф.В. Мультиимодальная анальгезия: полипрагмазия в обезболивании или рациональное применение нестероидных противовоспалительных средств для предотвращения хронизации боли // *Траектория науки: міжнародний електронний науковий журнал = Traektoriâ Nauki = Path of Science*. – 2020. – Т. 6, №7. – С. 4009–4018. DOI: <http://dx.doi.org/10.22178/pos.60-5>.
7. Bally M., Dendukuri N., Rich B., Nadeau L., HelinSalmivaara A., Garbe E., Brophy J. M. Risk of acute myocardial infarction with NSAIDs in real world use: bayesian meta-analysis of individual patient data // *British Medical Journal*. – 2017. – No.357. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.j1909>.
8. Каратеев А.Е., Насонов Е.Л., Ивашкин В.Т., Мартынов А.И., Яхно Н.Н., Арутюнов Г.П., Алексеева Л.И., Абузарова Г.Р., Евсеев М.А., Кукушкин М.Л., Копенкин С.С., Лиля А.М., Лапина Т.Л., Новикова Д. С., Полкова Т.В., Ребров А.П., Скоробогатых К.В., Чичасова Н.В. Рациональное использование нестероидных противовоспалительных препаратов. Клинические рекомендации // *Научно-практическая ревматология*. – 2018. – №56. – С. 1–29. DOI: <https://doi.org/10.14412/1995-4484-2018-1-29>.
9. Cooper C., Chapurlat R., Al-Daghri N., Herrero-Beaumont G., Bruyere O., Rannou F., Roth R., Uebelhart D., Reginster J. Y. Safety of oral non-selective non-steroidal anti-inflammatory drugs in osteoarthritis: what does the literature say? // *Drugs & Aging*. – 2019. – Vol. 36, No.1. – С. 15–24. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40266-019-00660-1>.
10. Лазебник Л.Б., Голованова Е.В., Алексеенко С.А., Бакулина Н.В., Барановский А.Ю., Белова Г.В., Бордин Д.С., Вьючнова Е.С., Гайдукова И.З., Гимаева З.Ф., Кашкина Е.И., Козлова И.В., Кокорин В.А., Лапина Е.Д., Ли Е.Д., Мигуськина Е.И., Мирончев О.В., Онучина Е.В., Охлобыстин А.В., Пасечников В. Д., Пахомова И.Г., Позднякова О.Ю., Путинцева И.В., Сарсенбаева А.С., Свиридова Т.Н., Симаненков В.И., Симонова Ж.Г., Ситкин С.И., Ткаченко Е.И., Туркина С.В., Хабарова Ю.А., Шевяков М.А., Яковенко Э.П., Яковлев А.А., Янковая Т.Н. Рекомендации по профилактике и лечению эзофаго-гастро-энтеро-колитов, индуцированных нестероидными противовоспалительными препаратами // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. – 2018. – Т.3, №151. – С. 4–18. – <https://www.nogr.org/jour/article/view/567/562>.
11. Yang J.H., Lee B.H., Eum K.S., Suk K.S., Park J.O., Kim H.S., Lee H.M., Moon S.H. Prevalence of gastrointestinal and cardiovascular risk in patients with degenerative lumbar spinal disease // *Clinics in Orthopedic Surgery*. – 2020. – Vol. 12, No.3. – P. 343–352. DOI: <https://doi.org/10.4055/cios20021>.
12. Каратеев А.Е. Обладают ли нестероидные противовоспалительные препараты патогенетическим действием? // *Современная ревматология*. – 2012. – №4. – С. 13–22.
13. Каратеев А.Е. Селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 и «защищенные» нестероидные противовоспалительные препараты: два метода профилактики лекарственных осложнений // *Клиническая медицина*. – 2014 – №8. – С. 54–61.
14. Davis A., Robson J. The dangers of NSAIDs: look both ways. *British Journal of General Practice*. – 2016. – Vol. 66, No.645. – P. 172–173. DOI: <https://doi.org/10.3399/bjgp16X684433>.
15. Довгань Е.В. Клиническая фармакология нестероид-

- ных противовоспалительных препаратов: курс – на безопасность // Российский медицинский журнал. – 2017. – №13. – С. 979–985.
16. Степанюк Н.Г., Гладких Ф.В., Басараб О.В. Аналіз побічних реакцій на тлі застосування анальгетиків–антипиретиків та нестероїдних протизапальних засобів, які призначались лікарями закладів охорони здоров'я Подільського регіону у 2015 році // Галицький лікарський вісник. – 2016. – Т. 2, №23. – С. 60–63. – Режим доступу: <http://ojs.ifnmu.edu.ua/index.php/gmj/article/view/545>.
 17. Bjarnason I., Takeuchi K. Intestinal permeability in the pathogenesis of NSAID-induced enteropathy // *Journal of Gastroenterology*. – 2009. – No.44. – P. 23–29. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00535-008-2266-6>.
 18. Голованова Э.В. Защита слизистой желудочно-кишечного тракта от повреждающего действия нестероидных противовоспалительных средств // *Клиническая геронтология*. – 2017. – №1–2. – С. 47–51.
 19. Гладких Ф.В. Превентивно-лечебные стратегии фармакокоррекции гастропатии, индуцированной нестероидными противовоспалительными препаратами // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2017. – №4. – С. 14–23. DOI: <http://dx.doi.org/10.17816/RCF15414-23>.
 20. Куксгауз И.А., Шекунова Е.В., Кашкин В.А., Фаустова Н.М., Гущин Я.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Изучение гастропротективного эффекта препарата Алфлутоп на модели индуцированной диклофенаком гастропатии у крыс // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2019. – №5. – С. 15–21. DOI: <https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-165-5-15-21>.
 21. Гулевский А.К., Абакумова Е.У., Моисеева Н.Н., Долгих О.Л. Влияние фракции пуповинной крови (до 5 кДа) крупного рогатого скота на биохимические показатели крови при экспериментальной субхронической язве желудка крыс // *Украинский биохимический журнал*. – 2008. – Т. 80, №2. – С. 120–127.
 22. Жариков А.Ю., Лоренц С.Э., Бобров И.П., Мазко О.Н., Макарова О.Г. Поиск новых молекул олигопептидов для фармакологической коррекции НПВС-индуцированной язвы желудка // *Биомедицина*. – 2019. – Т. 15, №3. – С. 90–97. DOI: <https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-3-90-97>.
 23. Гулида М.О., Мирошниченко Е.В., Берёзка Н.И., Гарячий Е.В. Применение экстракта плаценты в комплексном лечении больных ревматоидным артритом // *Экспериментальная і клінічна медицина*. – 2014. – Т. 1, №62. – С. 168–171.
 24. Капустянська А.А. Застосування препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» в комплексному лікуванні загострення подагричного артриту з метаболічним артритом // *Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медичної стоматологічної академії*. – 2010. – Т. 10, №30. – С. 54–58.
 25. Pogozhykh O., Prokopyuk V., Figueiredo C., Pogozhykh D. Placenta and placental derivatives in regenerative therapies: experimental studies, history, and prospects. *Stem Cells International*. – 2018. – No.2018. – P. 1–14. DOI: <https://doi.org/10.1155/2018/4837930>.
 26. Shepitko K.V. Application of cryopreserved placenta preparations in the small intestine pathologies in rats for their further use in exigent conditions // *Bulletin of problems biology and medicine*. – 2019. – Vol. 4, No.154. P. 56–61. DOI: <http://doi.org/10.29254/2077-4214-2019-4-2-154-56-61>.
 27. Petrenko Y.A., Petrenko A.Y., Martin I., Wendt D. Perfusion bioreactor-based cryopreservation of 3D human mesenchymal stromal cell tissue grafts // *Cryobiology*. – 2017. – No.76. – P. 150–153. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2017.04.001>.
 28. Rogulska O., Tykhvynska O., Revenko O., Grischuk V., Mazur S., Volkova N., Vasyliiev R., Petrenko A., Petrenko Y. Novel cryopreservation approach providing off-the-shelf availability of human multipotent mesenchymal stromal cells for clinical applications // *Stem Cells International*. – 2019. – No.2019. – 4150690. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/4150690>.
 29. Pogozhykh D., Pogozhykh O., Prokopyuk V., Kuleshova L., Goltsev A., Blasczyk R., Mueller T. Influence of temperature fluctuations during cryopreservation on vital parameters, differentiation potential, and transgene expression of placental multipotent stromal cells // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2017. – Vol. 8, No.1. – P. 66. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0512-7>.
 30. Капустянська А.А. Застосування препарату «Кріоцелл-кріоекстракт плаценти» в комплексному лікуванні загострення подагричного артриту з метаболічним артритом. Актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник Української медико-стоматологічної академії. – 2010. – Т. 10, №30. – С. 54–58.
 31. Прокопюк В.Ю., Фалько О.В., Мусатова І.Б., Прокопюк О.С., Роєнко О.О., Терехова О.О., Чуб О.В. Кріоконсервування та низькотемпературне зберігання плацентарних біоб'єктів // *Проблеми кріобіології і кріомедицини*. – 2015. – Т. 25, №4. – С. 291–310.
 32. Гладких Ф.В., Чиж Н.А. Механізми захисту слизової оболонки желудка в умовах застосування кріоекстракта плаценти при диклофенак-індуцированій гастропатії. Сборник матеріалів сателітної дисциплінарної науково-практичної конференції студентів і молодих учених «Фундаментальна наука в сучасній медицині–2021». Мінськ: Заклад освіти «Білоруський державний медичний університет». – 2021. – С. 436–340.
 33. Гладких Ф.В., Чиж Н.А., Слета И.В. Исследование гастропротекторной активности криоконсервированного экстракта плаценты при ибупрофен-индуцированном поражении желудка в эксперименте. Материалы VII Республиканской научно-практической конференции молодых ученых «Современные достижения молодых ученых в медицине–2020». Гродно. Гродно: Заклад освіти «Гродненський державний медичний університет». – 2020. – С. 57–60.
 34. Гладких Ф.В., Чиж М.О. Модуляція мелоксикам-індукованих змін секреторної та моторної активності шлунка шляхом застосування кріоекстракту плаценти // *Праці Наукового Товариства ім. Т.Г. Шевченка. Медичні науки*. – 2021. – Т. 64, №1. – С. 84–94. DOI: <https://doi.org/10.25040/10.25040/ntsh2021.01.08>. Режим доступу: <https://mspsss.org.ua/index.php/journal/article/view/400>.
 35. Gryshchenko N.G., Klimenko N.A., Gorgol N.I., Tatarko S.V. Effect of placental cryoextract on chronic inflammation of the ovaries in mice // *Medicine today and tomorrow*. – 2010. – Vol. 2–3, No.47–48. – P. 7–17.

36. Брунь Л.В., Маколінець В.І. Дослідження впливу низькоінтенсивного інфрачервоного лазерного випромінювання на концентрацію диклофенаку натрію у плазмі крові щурів методом вискоєфективної рідинної хроматографії. Медична та клінічна хімія. – 2016. – Т. 18, №2. – С. 54–59.
37. Рыболовлев Ю.Р., Рыболовлев Р.С. Дозирование веществ для млекопитающих по константам биологической активности // Доклады АН СССР. – 1979. – Т. 247, №6. – С. 1513–1516.
38. Орловская И.А., Цырендоржиев Д.Д., Щелкунов С.Н. Ревматоидный артрит: лабораторные модели заболевания // Медицинская иммунология. – 2015. – Т. 17, №3. – С. 203–210.
39. Громыко М.В., Грицук А.И. Экспериментальные модели ревматоидного артрита // Проблемы здоровья и экологии. – 2012. – Т. 2, №32. – С. 115–118.
40. Freund J. Some aspects of active immunization. Annual Review of Microbiology. – 1947. – No.1. – P. 291–308.
41. Choudhary N., Bhatt L.K., Prabhavalkar K.S. Experimental animal models for rheumatoid arthritis // Immunopharmacology and Immunotoxicology. – 2018. – Vol. 40, No.3. – P. 193–200. DOI: <https://doi.org/10.1080/08923973.2018.1434793>.
42. Alavala S., Nalban N., Sangaraju R., Kuncha M., Jerald M. K., Kilari E. K., Sistla R. Anti-inflammatory effect of stevioside abates Freund's complete adjuvant (FCA)-induced adjuvant arthritis in rats // Inflammopharmacology. – 2020. – Vol. 28, No.6. – P. 1579–1597. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10787-020-00736-0>.
43. Asakawa T., Matsushita S. coloring condition of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides // Lipids. – 1980. – Vol. 15, No.3. – P. 137–140.
44. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалёва Ж.В. Простой и чувствительный метод определения активности супероксиддисмутазы, основанный на реакции окисления кверцетина // Вопросы медицинской химии. – 1990. – №2. – С. 88–91.
45. Bligh E.G., Dyer W.I. A rapid method of total lipid extraction and purification // Canadian Journal of Biochemistry and Physiology. – 1959. – Vol. 37, No.8. – P. 911–917.
46. Svetashev V.I., Vaskovsky V.E. A simplified technique for thin layer microchromatography of lipids // Journal of Chromatography. – 1972. – No.67. – P. 376–378.
47. Vaskovsky V.E., Kostetsky E.Y., Vasendin I.M. A universal reagent for phospholipid analysis // Journal of Chromatography. – 1975. – No.114. – P. 129–141.
48. Mititelu R.R., Padureanu R., Bacanoiu M., Padureanu V., Docea A. O., Calina D., Barbulescu A. L., Buga A. M. Inflammatory and oxidative stress markers-mirror tools in rheumatoid arthritis // Biomedicines. – 2020. – №8(5). – P. 125. DOI: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8050125>.
49. Войтенко Н.Г., Макарова М.Н., Зуева А.А. Вариабельность биохимических показателей крови и установление референсных интервалов в доклинических исследованиях. Сообщение 1: крысы // Лабораторные животные для научных исследований. – 2020. – №1. – С. 47–53. – DOI: <https://doi.org/10.29296/2618723X-2020-01-06>.
50. Гладких Ф.В., Степанюк Н.Г. Характеристика терапевтического эффекта ибупрофену та його комбінації з вінбономом за даними гематологічних показників на моделі ад'ювантного артриту у щурів // Львівський медичний часопис. – 2015. – №4. – С. 64–70. Режим доступа: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Lmch_2015_21_4_14.
51. Подольський В. В., Подольський В. В. Перекисне окислення ліпідів як прояв оксидативного стресу в організмі жінок із змінами репродуктивного здоров'я на тлі соматоформних захворювань із порушеннями вегетативного гомеостазу // Акушерство та гінекологія. – 2017. – № 2. – С. 98–104. DOI: <https://doi.org/10.11603/24116-4944.2017.2.8095>.
52. Agrahari G., Sah S. K., Nguyen C. T., Choi S. S., Kim H. Y., Kim T. Y. Superoxide dismutase 3 inhibits LL-37/KLK-5-mediated skin inflammation through modulation of EGFR and associated inflammatory cascades // Journal of Investigative Dermatology. – 2020. – Vol. 140, No.3. – P. 656–665. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.08.434>.
53. Nguyen N.H., Tran G.B., Nguyen C.T. Anti-oxidative effects of superoxide dismutase 3 on inflammatory diseases // Journal of Molecular Medicine. – 2020. – Vol. 98, No.1. – P. 59–69. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00109-019-01845-2>.
54. Suchdev P.S., Williams A.M., Mei Z., Flores-Ayala R., Pasricha S.R., Rogers L.M., Namaste S.M. Assessment of iron status in settings of inflammation: challenges and potential approaches // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2017. – Vol. 106, No.6. – P. 1626–1633. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.155937>.
55. Iwanczak B., Ruczka M., Matusiewicz M., Pytrus T., Matusiewicz K., Krzesiek E. Correlation between biomarkers (calprotectin, seromucoid, metalloproteinase-3 and CRP) and clinical and endoscopic activity of ulcerative colitis in children // Advances in Medical Sciences. – 2020. – Vol. 65, No.2. – P. 259–264. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.advms.2020.03.004>.
56. Namaste S.M., Aaron G.J., Varadhan R., Pearson J.M., Suchdev P.S., BRINDA Working Group. Methodologic approach for the biomarkers reflecting inflammation and nutritional determinants of anemia (BRINDA) project // The American Journal of Clinical Nutrition. – 2017. – Vol. 106, No.1. – P. 333–347. DOI: <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.142273>.
57. Smith S.A., Waters N.J. Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations for drugs binding to alpha-1-acid glycoprotein // Pharmaceutical Research. – 2018. – Vol. 36, No.2. – P. 30. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11095-018-2551-x>.
58. Sproston N.R., Ashworth J.J. Role of C-Reactive Protein at Sites of Inflammation and Infection // Frontiers in Immunology. – 2018. – No.9. – P. 754. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00754>.
59. Lopic I., Padoan A., Bozzato D., Plebani M.. Erythrocyte sedimentation rate and C-reactive protein in acute inflammation // American Journal of Clinical Pathology. – 2020. – Vol. 153, No.1. – P. 14–29. DOI: <https://doi.org/10.1093/ajcp/aqz142>.
60. Yao Z., Zhang Y., Wu H. Regulation of C-reactive protein conformation in inflammation // Inflammation Research. – 2019. – Vol. 68, No.10. – P. 815–823. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00011-019-01269-1>.
61. Avan A., Tavakoly Sany S.B., Ghayour-Mobarhan M., Rahimi H.R., Tajfard M., Ferns G. Serum C-reactive protein in the prediction of cardiovascular diseases: Overview of the latest clinical studies and public health practice // Journal of Cellular Physiology. – 2018. – Vol. 233, No.11. – P. 8508–8525. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcp.26791>.

62. Li W., Cao T., Luo C., Cai J., Zhou X., Xiao X., Liu S. Crosstalk between ER stress, NLRP3 inflammasome, and inflammation // *Applied Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 104, No.14. – P. 6129–6140. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10614-y>.
63. Wang J., Xia J., Yan X., Yang Y., Wei J., Xiong Y., Wu W., Liu Y., Chen Y., Jia B., Chen Z., Zhang Z., Ding W., Huang R., Wu C. The gamma-glutamyl transpeptidase to platelet ratio predicts liver inflammation in chronic hepatitis B with normal or mildly elevated alanine transaminase // *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*. – 2020. – Vol. 44, No.6. – P. 913–922. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2020.01.011>.
64. Ndrepepa G, Collieran R, Kastrati A. Gamma-glutamyl transferase and the risk of atherosclerosis and coronary heart disease // *Clinica Chimica Acta*. – 2018. – No.476. – P. 130–138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.11.026>.
65. Mohi-Ud-Din R., Mir R. H., Sawhney G., Dar M.A., Bhat Z.A. Possible pathways of hepatotoxicity caused by chemical agents // *Current drug metabolism*. – 2019. – Vol. 20, No.11. – P. 867–879. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389200220666191105121653>.
66. Jung S.H., Lee W., Park S.H., Lee K.Y., Choi Y.J., Choi S., Kang D., Kim S., Chang T.S., Hong S.S., Lee B.H. Diclofenac impairs autophagic flux via oxidative stress and lysosomal dysfunction: Implications for hepatotoxicity // *Redox Biology*. – 2020. – No.37. – P. 101751. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101751>.
67. Vyas A., Purohit A., Ram H. Assessment of dose-dependent reproductive toxicity of diclofenac sodium in male rats // *Drug and Chemical Toxicology*. – 2019. – Vol. 42, No.5. – P. 478–486. DOI: <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1421659>.
68. Yeh J.C., Wu C.C., Choy C.S., Chang S.W., Liou J.C., Chen K.S., Tung T.H., Lin W.N., Hsieh C.Y., Ho C.T., Wang T.M., Chang J.F. Non-hepatic alkaline phosphatase, hs-CRP and progression of vertebral fracture in patients with rheumatoid arthritis: a population-based longitudinal study // *Journal of Clinical Medicine*. – 2018. – Vol. 7, No.11. – P. 439. DOI: <https://doi.org/10.3390/jcm7110439>.
69. Jo S., Han J., Lee Y.L., Yoon S., Lee J., Wang S.E., Kim T.H. Regulation of osteoblasts by alkaline phosphatase in ankylosing spondylitis // *International Journal of Rheumatic Diseases*. – 2019. – Vol. 22, No.2. – P. 252–261. DOI: <https://doi.org/10.1111/1756-185X.13419>.
70. Hirschmugl B., Crozier S., Matthews N., Kitzinger E., Klymiuk I., Inskip H. M., Harvey N. C., Cooper C., Sibley C.P., Glazier J., Wadsack C., Godfrey K.M., Desoye G., Lewis R.M. Relation of placental alkaline phosphatase expression in human term placenta with maternal and offspring fat mass // *International Journal of Obesity*. – 2018. – Vol. 42, No.6. – P. 1202–1210. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41366-018-0136-8>.
71. Liao K.P., Solomon D.H. Lipids and cardiovascular risk through the lens of rheumatoid arthritis // *Arthritis & Rheumatology*. – 2019. – Vol. 71, No.9. – P. 1393–1395. DOI: <https://doi.org/10.1002/art.40891>.
72. Кріль І.Й., Гаврилюк А.М., Стойка Р.С., Чоп'як В.В., Кіт Ю.Я. Характеристика ензиматичної активності та білкового складу сироватки крові щурів за умови індукованого імунізації запалення суглобів // *Експериментальна та клінічна фізіологія та біохімія*. – 2014. – №2. – С. 15–23.
73. Гладких Ф.В., Михайлова І.П., Манченко А.О. Вплив диклофенаку натрію та його комбінації з криоконсервованим екстрактом плаценти на ліпідний баланс в сироватці крові при експериментальному ревматоїдному артриті. Матеріали XXVII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Topical issues of new medicines development» (18–19 березня 2021 р.); Харків: Національний фармацевтичний університет МОЗ України. – 2021. – С. 272–273.

АВТОРЫ

Гладких Фёдор Владимирович – аспирант (доктор философии в области здравоохранения по специальности «222 – Медицина») отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины; младший научный сотрудник группы лучевой патологии и паллиативной медицины отдела радиологии, ГУ «Институт медицинской радиологии и онкологии им. С.П. Григорьева Национальной академии медицинских наук Украины». ORCID ID: 0000-0001-7924-4048. E-mail: fedir.hladkykh@gmail.com

Чиж Николай Алексеевич – кандидат медицинских наук, старший исследователь, и. о. заведующего отделом экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0003-0085-296X. E-mail: chizh.cryo@gmail.com

Манченко Анна Александровна – кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0001-5982-4504. E-mail: anna.gorlenko@gmail.com

Белочкина Ирина Владиславовна – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0003-0090-2971. E-mail: ibelochkina@ukr.net

Михайлова Ирина Павловна – научный сотрудник отдела экспериментальной криомедицины, Институт проблем криобиологии и криомедицины Национальной академии наук Украины. ORCID ID: 0000-0001-9388-2820. E-mail: expcryomed@gmail.com

УДК 615.038+ 615.21/.26



ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ АГОНИСТОВ ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРА EPOR/CD131 У ЖИВОТНЫХ С ЭНДОТЕЛИОСПЕЦИФИЧНОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ МУТАНТНОГО ГЕНА POLG

М.В. Корокин¹, М.В. Кубекина², А.В. Дейкин^{1,2}, О.В. Анциферов¹, В.М. Покровский¹, Л.В. Корокина¹,
Н.Л. Карташкина³, В.А. Солдатова¹, Е.В. Кузубова¹, А.И. Радченко¹, М.В. Покровский¹

¹ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Белгородский государственный национальный исследовательский университет»
308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена
Российской академии наук
119334, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, 34/5

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»
(Сеченовский Университет)
119991, Россия, г. Москва, ул. Трубецкая, 8/2

E-mail: mkorokin@mail.ru

Получено 05.05.2021

Принята к печати 15.08.2021

Цель. Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности пептидных производных, имитирующих α-спираль В эритропоэтина под лабораторными шифрами EP-11-1 (UEHLERLALNSS), EP-11-2, (UEQLERLALNCS), EP-11-3 (UEQLERLALNTS).

Материалы и методы. Исследование проведено на 96 самцах мышей с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE на фоне C57Bl/6J. Атеросклероз моделировали путем баллонного повреждения сосудистой стенки у животных, находящихся на западной диете. Затем в течение 27 дней вводили изучаемые соединения 1 раз в 3 дня в дозе 20 мкг/кг. На 28-й день животных эвтаназируют и оценивали площадь атеросклеротических бляшек. Также в тканях аорты определяли экспрессию генов, связанных с процессами воспаления, апоптоза и ангиогенеза. Кроме того, было изучено эндотелиопротективное действие пептидов на изолированных кольцах грудной аорты диких и трансгенных мышей Polg^{mut/mut}.

Результаты. При оценке размера бляшки у животных с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE на фоне применения изучаемых пептидов мы не обнаружили статистически значимого изменения размера бляшки. При проведении количественной полимеразной цепной реакции показано, что пептиды EP-11-1 и EP-11-2 статистически значимо в сравнении с контрольной группой животных, снижают экспрессию проапоптотических факторов p53 и Bax, а также увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2. Введение соединения EP-11-1 и исходного пептида rHBSP привело к статистически значимому снижению соотношения Bax/Bcl-2). Соединения EP-11-1, EP-11-2 и EP-11-3 более эффективно, чем исходный пептид, rHBSP, снизили повышенную на фоне баллонной травмы экспрессию генов воспалительных маркеров iNOS, молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. Применение EP-11-1 привело к более эффективному, в сравнении с rHBSP, восстановлению эндотелийзависимой вазодилатации кольца аорты мышей с эндотелий специфической гиперэкспрессией мутантного гена Polg.

Заключение. В исследовании, проведенном на мышинной модели эндотелиоспецифичной экспрессии мутантной полимеразы гамма, нами показано, что производные пептида HBSP с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3, полученные путем поиска групп родственных пептидов к молекуле rHBSP с помощью программы BLAST, обладают атеропротективной и эндотелиопротективной активностью, более выраженной в сравнении с исходным пептидом rHBSP.

Ключевые слова: атеросклероз; производные эритропоэтина; производные rHBSP, атеропротективное действие; эндотелиопротективное действие

Для цитирования: М.В. Корокин, М.В. Кубекина, А.В. Дейкин, О.В. Анциферов, В.М. Покровский, Л.В. Корокина, Н.Л. Карташкина, В.А. Солдатова, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко, М.В. Покровский. Изучение фармакологической активности новых агонистов гетерорецептора Epor/CD131 у животных с эндотелиоспецифичной экспрессией мутантного гена Polg. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):294-305. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-294-305

© М.В. Корокин, М.В. Кубекина, А.В. Дейкин, О.В. Анциферов, В.М. Покровский, Л.В. Корокина, Н.Л. Карташкина, В.А. Солдатова, Е.В. Кузубова, А.И. Радченко, М.В. Покровский, 2021

For citation: M.V. Korokin, M.V. Kubekina, A.V. Deikin, O.V. Antsiferov, V.M. Pokrovsky, L.V. Korokina, N.L. Kartashkina, V.A. Soldatova, E.V. Kuzubova, A.I. Radchenko, M.V. Pokrovsky. Study of the pharmacological activity of novel Epor/CD131 heteroreceptor agonists in mice with endothelial-specific expression of mutant Polg gene. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):294-305. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-294-305

Список сокращений: ПЦР – полимеразная цепная реакция; pHBP – pyroglutamate helix B surface peptide / пироглутаматный поверхностный пептид спирали В; HBSP – helix B surface peptide / поверхностный пептид спирали В; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; Polg – polymerase gamma / полимеразы гамма; ICAM-1 – Inter-Cellular Adhesion Molecule 1 / межклеточная молекула адгезии – 1; VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule 1 / молекула адгезии клеточного эндотелия 1; ЭПО – эритропоэтин; EpoR – рецептор эритропоэтина; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; HUVEC – Isolation of Human Umbilical Vein Endothelial Cells / культура эндотелиальных клеток из пупочной вены человека; AKT1 – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase / RAC-альфа-серин/треонин-протеинкиназа; eNOS/NOS3 – эндотелиальная синтаза оксида азота; NO – оксид азота; AX – ацетилхолин; PI3K – phosphoinositide 3-kinase / Фосфоинозитид-3-киназа; НП – нитропруссид натрия

STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF NOVEL EPOR/CD131 HETERORECEPTOR AGONISTS IN MICE WITH ENDOTHELIAL-SPECIFIC EXPRESSION OF MUTANT POLG GENE

M.V. Korokin¹, M.V. Kubekina², A.V. Deikin^{1,2}, O.V. Antsiferov¹, V.M. Pokrovsky¹, L.V. Korokina¹, N.L. Kartashkina³, V.A. Soldatova¹, E.V. Kuzubova¹, A.I. Radchenko¹, M.V. Pokrovsky¹

¹ Belgorod State National Research University

85, Pobeda Str., Belgorod, Russia, 308015

² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences

Bldg. 5, 34, Vavilov Str., Moscow, Russia, 119334

³ First Moscow State Medical University named after I. M. Sechenov (Sechenov University)

Bldg. 2, 8, Trubetskaya str., Moscow, Russia, 119991

E-mail: mkorokin@mail.ru

Received 5 May 2021

Accepted 15 Aug 2021

The aim of the research was to study antiatherosclerotic and endothelial kinds of a protective activity of peptides mimicking an erythropoietin a-helix B tertiary structure with laboratory codes EP-11-1 (UEHLERALNNS), EP-11-2. (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNNTS).

Materials and methods. The study was conducted on 96 C57Bl/6J male double transgenic Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE mice. Atherosclerosis was induced by a balloon injury accompanied by Western diet. Then, for 27 days, the drugs under study were administered once per 3 days at the dose of 20 µg/kg. On the 28th day, the animals were euthanized and the area of atherosclerotic plaques was collected for an assessment. The expression of genes associated with the processes of inflammation, apoptosis, and angiogenesis was determined in the tissues of the aorta. In addition, the endothelial protective effect of peptides in isolated segments of the thoracic aorta of wild and transgenic ransgenic Polg^{mut/mut} mice was studied.

Results. The assessment of the plaque size in the animals with the Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE genotype against the background of the peptides under study did not reveal statistically significant differences in comparison to control. However, a quantitative PCR showed a statistically significant decreased expression of pro-apoptotic factors p-53 and Bax, and also increase the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 against the background of the peptides EP-11-1 and EP-11-2 administration. The administration of EP-11-1 and the original peptide pHBP resulted in a statistically significant decrease in the Bax/Bcl-2 ratio. Compounds EP-11-1, EP-11-2, and EP-11-3 were more effective than the original peptide pHBP, in reducing the increased expression of genes for inflammatory markers iNos, intercellular adhesion molecules Icam-1, Vcam-1 and E-selectin. The use of EP-11-1 led to a more efficient, in comparison with pHBP, restoration of endothelial-dependent vasodilation of the aortic segments in mice with endothelial-specific overexpression of the mutant Polg gene.

Conclusion. The study carried out on a murine model of the endothelial-specific expression of mutant gamma polymerase has shown that derivatives of the pHBP peptide with laboratory codes EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3, obtained by BLAST-searching for groups of pHBP related peptides, have atheroprotective and endothelial protective kinds of a protective activity, which is more pronounced in comparison with the original peptide pHBP.

Keywords: atherosclerosis; erythropoietin derivatives; pHBP derivatives; atheroprotective effect; endothelial protective effect

Abbreviations: PCR – polymerase chain reaction; pHBP – pyroglutamate helix B surface peptide; HBSP – helix B surface peptide; iNOS – inducible NO synthase; Polg – polymerase gamma; ICAM-1 – Inter-Cellular Adhesion Molecule 1; VCAM-1 – Vascular cell adhesion molecule-1; EPO – erythropoietin; EpoR – erythropoietin receptor; mRNA – matrix ribonucleic acid; HUVEC – Human Umbilical Vein Endothelial Cells; AKT1 – RAC-alpha serine/threonine-protein kinase; eNOS / NOS3 – endothelial nitric oxide synthase; NO – nitrogen oxide; Ach – acetylcholine; PI3K – phosphoinositide 3-kinase; NP – sodium nitroprusside

ВВЕДЕНИЕ

Эритропоэтин (ЭПО) – один из гормонов, вырабатываемых почками, первоначально идентифицированный в качестве критически важного регулятора процесса кроветворения. Рекомбинантный эритропоэтин широко используется при лечении анемии, связанной с хроническим заболеванием почек, сердечной недостаточностью и раком [1]. В организме человека эритропоэтин стимулирует производство около 200 миллиардов эритроцитов ежедневно. ЭПО, после выработки в почках, секретируется в кровоток и его мишенью являются эритроидные клетки-предшественники, расположенные в костном мозге [2,3]. ЭПО действует путем связывания со своим специфическим рецептором на поверхности клеток-предшественников эритроцитов. Нокаут ЭПО (ЕРО -/-) или рецептора ЭПО (ЕРОR -/-) у мышей приводит к гибели эмбриона вследствие развития тяжелой анемии [4, 5].

За последнее десятилетие было выявлено множество не гемопоэтических эффектов эритропоэтина, включая его антиатеросклеротическое действие [6, 7]. При реализации негемопоэтических эффектов локально продуцируемый гипогликозилированный эритропоэтин действует паракринно-аутокринным путем и передает сигналы через взаимодействие с тканезащитным гетеродимерным рецептором эритропоэтина ЕРОR/CD131 [8, 9]. Доступность рекомбинантного эритропоэтина повлияла на появление работ, посвященных изучению негемопоэтической активности ЭПО, включая протективное действие на эндотелиоциты и нервные клетки. Сообщения о наличии рецепторов ЭПО (ЕРОR), экспрессии мРНК ЕРОR и/или белка ЕРОR за пределами органов эритропоэза предполагают возможность рецепторного негемопоэтического действия эритропоэтина [3]. Как сообщается в публикациях, эндотелиоциты из клеточной культуры HUVEC стали первыми клетками негемопоэтического ряда, которые экспрессируют рецепторы эритропоэтина, связывают эритропоэтин и показывают пролиферативный ответ на введение эритропоэтина *in vitro* [8, 10]. Было обнаружено, что ЭПО защищает культуры эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга крыс от повреждения, вызванного аноксией, путем активации AKT1, поддержания потенциала митохондриальной мембраны, а также предотвращения процессов апоптоза, индуцированного окислительным стрессом [11]. Важной функцией эндотелиальных клеток является экспрессия эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS/NOS3), которая участвует в синтезе оксида азота (NO) для регуляции сосудистого гомеостаза. С использованием клеточной культуры эндотелиоцитов было обнаружено, что сочетание пониженного содержания кислорода и добавления к клеточной культуре эритропоэтина увеличивает экспрессию мРНК и белка ЕРОR, увеличивает экспрессию eNOS и тем самым стимулирует продукцию оксида азота [13]. На экспериментальных моделях у трансгенных мышей, с высоким гематокритом, показано что артериальная гипертензия не развивается из-за значимого повышенного уровня eNOS и NO в сосудистой ткани и в кровотоке [14].

Сегодня очевидно, что протромботические побочные эффекты рекомбинантного эритропоэтина пре-

пятствуют его клиническому применению у пациентов, не страдающих анемией [15]. Для предотвращения тромботических осложнений, связанных с терапией ЭПО сегодня получены производные эритропоэтина, не обладающие гемопоэтической активностью, но обладающие тканепротективным действием. 11-аминокислотный пептид, имитирующий пространственную структуру цепи В эритропоэтина (HBSP) является одним из таких производных ЭПО, который проявляет не гемопоэтическую активность, сравнимую с рекомбинантным эритропоэтином [16–19].

Для поиска новых соединений, обладающих атеропротективным и эндотелиопротективным действием мы изменили аминокислотную последовательность HBSP путем поиска групп родственных пептидов исходного соединения с помощью программы BLAST. В результате получено 3 соединения, имитирующих а-спираль В эритропоэтина: EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2 (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS).

ЦЕЛЬ. Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности соединений EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**Животные и диета**

В исследование было включено 96 самцов мышей с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE на фоне C57Bl/6J, полученных из ФГБУН «Институт биологии гена» РАН. При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 г., правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 EC), правил Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997 г.) и Правил лабораторной практики, принятых в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708 от 29.08.2010 г.). Эксперименты были одобрены локальным этическим комитетом Белгородского государственного национального исследовательского университета, г. Белгород, протокол № 19/23 от 04.02.2020. Генотип Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE ассоциирован эндотелиоспецифичной экспрессией мутантного гена Polg, кодирующего фермент полимеразы гамма с мутацией D257A, приводящей к отсутствию 3'экзонуклеазной активности и накоплению мутаций при репликации генома митохондрий. Экспрессия мутантного белка приводит к развитию митохондриальной дисфункции с формированием нарушений процессов, протекающих в сосудистом эндотелии. За 2 недели до начала эксперимента животных помещали на западную диету с содержанием холестерина – 2% [20].

Моделирование балонного повреждения сосудистой стенки

Операцию выполняли на подогреваемом столике под препаративным микроскопом с применением наркоза (золазепам 2,5 мг/100 г (Virbac, Франция) + ксилазин 2 мг/100 г (Биогель, Россия); введение про-

водили внутривенно) животным через хирургический доступ в медиальной области бедра выделяли общую бедренную артерию наносили баллонное повреждение эндотелия как это было описано ранее. Для облегчения послеоперационного болевого синдрома в течение 3-х дней с момента операции животные получали метамизол натрия с питьевой водой *ad libitum* в концентрации 50 мг метамизола натрия (Фармстандарт-Уфавита, Россия) на 100 мл воды [20–22].

Дизайн исследования и введение препаратов

Перечень исследуемых пептидов, их лабораторные шифры и аминокислотные последовательности представлены в таблице 1.

Животные с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ были разделены на 6 равных групп:

- 1) Интактные;
- 2) Контроль – животные с моделированием баллонной травмы и получающие западную диету;
- 3) pHBSF – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид pHBSF в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг);
- 4) EP-11-1 – животные, с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид EP-11-1 в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг);
- 5) EP-11-2 – животные, с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид EP-11-2 в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг);
- 6) EP-11-3 – животные с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид EP-11-3 в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 28-ми дней (суммарная доза 180 мкг/кг).

Доза и путь введения изучаемых пептидов выбрана с учетом экспериментальных данных, полученных нами ранее при исследовании фармакологической активности пула соединений, производных pHBSF, полученных путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP к исходному пептиду [20].

Измерение площади атеросклеротической бляшки

Макроскопическое изучение атеросклеротических бляшек аорты было выполнено с использованием материала от 4-х животных из каждой группы. Для этого на 28-й день после моделирования баллонной травмы животных эвтаназировали передозировкой наркоза (золетил 10 мг/100 г внутривенно) и аккуратно извлекали брюшную аорту от бифуркации до участка на уровне диафрагмы. Затем препараты продольно рассекали, расправляли на пенопластовой подложке, промывали 50%-ным раствором спирта этилового и погружали в раствор Oil Red O на 15 минут. После этого препараты промывали дистиллированной водой и делали цифровые фотоснимки. С применением программы *imageJ* на полученных снимках рассчитывали отношение площади атеросклеротической бляшки (окрашенной красным) к интактной ткани [20].

Количественная ПЦР

У остальных животных после эвтаназии ткань аорты в области нанесения баллонного повреждения забирали, гомогенизировали и инкубировали при 37°C в растворе «Extract RNA» в течении 10 минут. После лизирования образца в реагенте его подвергли хлороформной чистке, надосадочную пробу собирали и промывали изопропиловым спиртом и 70%-ным спиртом этиловым. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре IMPELEN NanoPhotometer® (IMPELEN, Германия) и доводили до концентрации 300 нг/мкл. Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLVRTSK021 в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Evrogen, Россия). Исследование проводили в соответствии с ранее описанной нами методикой [20]. В таблице 2 представлены праймеры, используемые при проведении количественной ПЦР.

Изучение влияния препаратов колец аорты на сосудистый эндотелий

Для проведения эксперимента были сформированы следующие экспериментальные группы (n=8 животных в группе):

- 1) Интактная группа – мыши с диким генотипом C57BL/6;
- 2) Контрольная группа Мыши с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$;
- 3) pHBSF – $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ + pHBSF 20 мкг/кг;
- 4) EP-11-1 – $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ + EP-11-1 20 мкг/кг;
- 5) EP-11-2 – $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ + EP-11-2 20 мкг/кг;
- 6) EP-11-3 – $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ + EP-11-3 20 мкг/кг.

Исследуемые соединения – инновационные пептиды с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3 вводили внутривенно, в течение 7 дней в обозначенных дозах. На 8-й день от начала эксперимента животных наркотизировали с помощью внутривенного введения хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Далее у анестезированных мышей была открыта грудная клетка для изъятия грудной аорты. Грудная аорта была помещена в модифицированный ледяной раствор Кребса Ханселейта (118 мМ NaCl, 4,7 мМ KCl, 1,2 мМ Na_2PO_4 , 0,5 мМ $MgCl_2$, 1,12 мМ $CaCl_2$, 25 мМ $NaHCO_3$, 0,03 мМ ЭДТА) pH 7,4 с 11 мМ глюкозы. Аорту осторожно отделяли от окружающей жировой и соединительной ткани и разрезали на короткие поперечные сегменты размером 2 мм. Кольца аорты суспендировали в ванне для органов (Biopac Bas System Station, Biopac systems, США), содержащей 10 мл раствора КН, поддерживаемого при температуре 37°C, и барботировали 95% O_2 и 5% CO_2 между двумя параллельными крючками из нержавеющей стали. Изометрическое натяжение во время экспериментов измерялось и регистрировалось с помощью программно-аппаратного комплекса Biopac System, США. Регистрация и обработка данных производилась с помощью программного обеспечения Biopac Icq 4.2. Каждое кольцо аорты постепенно растягивали до исходного натяжения 0,8 г и давали уравновеситься в стандартной ванне для органов объемом 10 мл в течение 60 минут перед экспериментом. После уравновешивания кольца сначала контрактили с помощью 60 мМ KCl, чтобы вызвать их сократительную реакцию и достигнуть воспроизводимый максималь-

ный сократительный ответ, затем их трижды промывали раствором Кребса Ханселейта, чтобы восстановить напряжение до базального уровня. Ответ сокращения колец аорты на субмаксимальную концентрацию фенилэфрина (1 мкмоль/л) индуцировали через 30 мин после восстановления базального уровня. На плато сокращения, вызванного эpineфрином, проводили пробы на эндотелийзависимую и эндотелинезависимую вазодилатацию. В качестве агента, вызывающего эндотелийзависимую вазодилатацию, в ванну с аортой кумулятивно добавляли ацетилхолин (АХ) (10^{-9} – 10^{-4} М), в качестве агента, вызывающего эндотелийнезависимую вазодилатацию – нитропруссид натрия (НП) (10^{-9} – 10^{-5} М). Чувствительность определяли как процент релаксации от исходного значения, полученного на плато введения эpineфрина.

Статистическая обработка

Статистическая обработка выполнена с использованием программы Statistica 10.0. Полученные данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека normtest), оценку равенства дисперсий – с помощью критерия Левене (библиотека lawstat). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела-Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве post-hoc анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна-Уитни, соответственно, с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественную проверку гипотез. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Макроскопическая оценка бляшки

В соответствии с дизайном эксперимента про-

ведена макроскопическая оценка бляшки, сформированной после баллонной травмы у животных с диким генотипом (интактная группа) и у животных с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE (контрольная группа). Установлено, что в контрольной группе животных с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE во всех препаратах, окрашенных Oil Red O визуализировались липидные отложения, характерные для атеросклероза, что выразилось в увеличении размера бляшки в контрольной группе более чем в 11 раз. При проведении обработки данных, полученных при оценке размера бляшки у животных с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE на фоне применения изучаемых пептидов мы не обнаружили статистически значимого изменения размера бляшки (рис. 1).

Количественная ПЦР

В дополнение к макроскопической оценке бляшки мы провели молекулярно-биологический анализ ткани атеросклеротической бляшки после баллонного повреждения сосуда во всех экспериментальных группах. На рисунке 2 показано, что у животных с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE на фоне моделирования баллонного повреждения существенно возрастает экспрессия маркеров программируемой клеточной гибели p53 и Bax и снижается экспрессия антиапоптотического маркера Bcl-2. Как видно из тепловой карты, представленной на рисунке 2А, пептиды EP-11-1 и EP-11-2 статистически значимо в сравнении с контрольной группой животных ($p < 0,05$), снижают экспрессию проапоптотических факторов p53 и Bax, а также увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2 ($p < 0,05$). Наиболее эффективным в отношении изменения экспрессии факторов апоптоза оказалось соединение с лабораторным шифром EP-11-1 – значения экспрессии генов p53, Bax и Bcl-2 не отличались от таковых показателей в контрольной группе (рис. 2А).

Таблица 1 – Аминокислотная последовательность исследуемых соединений

Лабораторный шифр	Аминокислотная последовательность
pHBSF	QEQLERALNSS
EP-11-1	UEHLERALNSS
EP-11-2	QEQLERALNCS
EP-11-3	UEQLERALNTS

Таблица 2 – Праймеры, используемые для количественной ПЦР

Ген	F-праймер	R-праймер	Длина продукта	GenBank
Trp53 (p53)	CGACTACAGTTAGGGGGGCAC	CCATGGCAGTCATCCAGTCT	95	NM_001127233.1
Bcl2	TCACCCCTGGTGGACAACAT	TTCCACAAAGGCATCCCAGC	102	NM_009741.5
Bax	CCCGAGCTGATCAGAACCAT	GAGGCCTTCCCAGCCAC	96	NM_007527.3
Vegfa (VEGF-A)	GGGCCTCCGAAACCATGAA	TGCAGCCTGGGACCACTTG	95	NM_001025250.3
Flt-1 (VEGFR-1)	CCCATCGGCAGACCAATACA	CGGTGCAGTTGAGGACAAGA	96	NM_001363135.1
HIF-1a	AGAACAACCTTGAGCTGGCGT	TGGAGGTGAACTAGGCTCTGT	103	NM_001092957.1
NOS2 (iNOS)	GCTCTAGTGAAGCAAAGCCCA	GGGATTCTGGAACATTCTGTGC	103	NM_001313921.1
ICAM-1	CTCCGGACTTTCGATCTTCCA	CCTTCCAGGGAGCAAAACAAC	98	NM_010493.3
VCAM-1	TACTGTGTCAGTCTCTCAAGC	CGTAGTGCTGCAAGTGAGGG	101	NM_011693.3
Sele (E-селектин)	GGGAAGAAGACTGTCTAGCC	AGGGGAGCTGGCTTCTTAAG	96	XM_006496715.3
Gapdh	GGGTCCAGCTTAGGTTTCATC	CCCAATACGGCCAATCCGT	100	NM_001289726.1

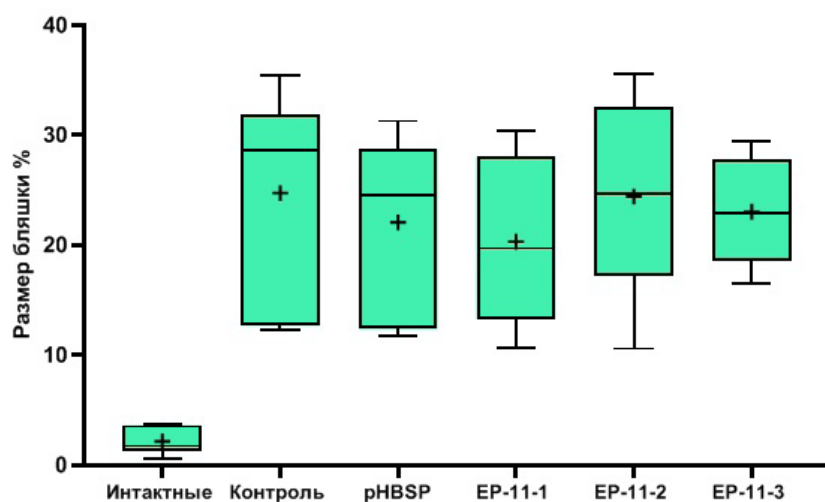


Рисунок 1 – Размер атеросклеротической бляшки в группах животных с диким генотипом и с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ на фоне применения изучаемых пептидов

Примечание: знаком «+» на графике показано среднее арифметическое для каждой экспериментальной группы

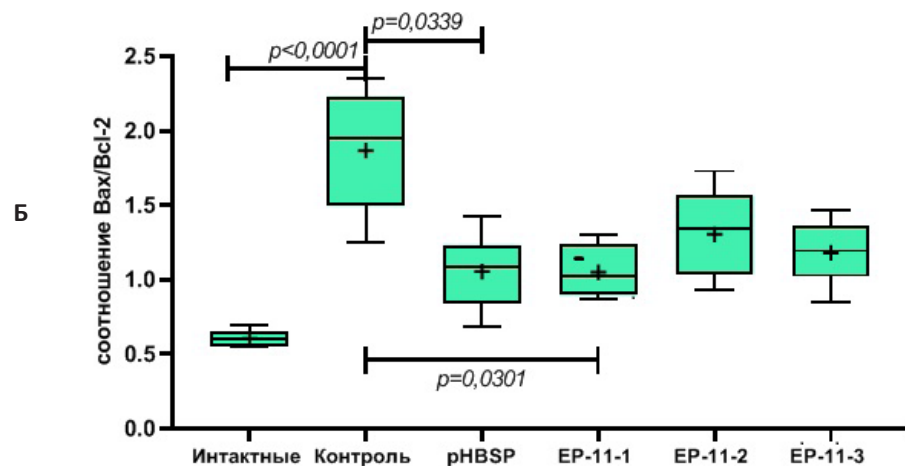
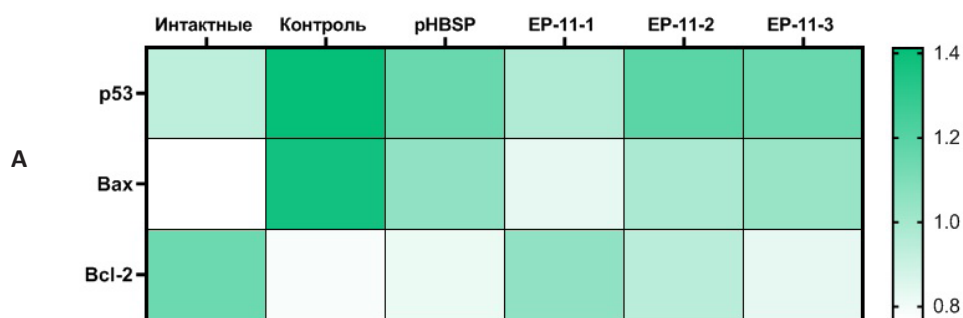


Рисунок 2 – Влияние исследуемых препаратов на относительную экспрессию маркеров апоптоза (2А) и соотношение Bax/Bcl-2 (2Б)

Примечание: знаком + на графике показано среднее арифметическое для каждой экспериментальной группы

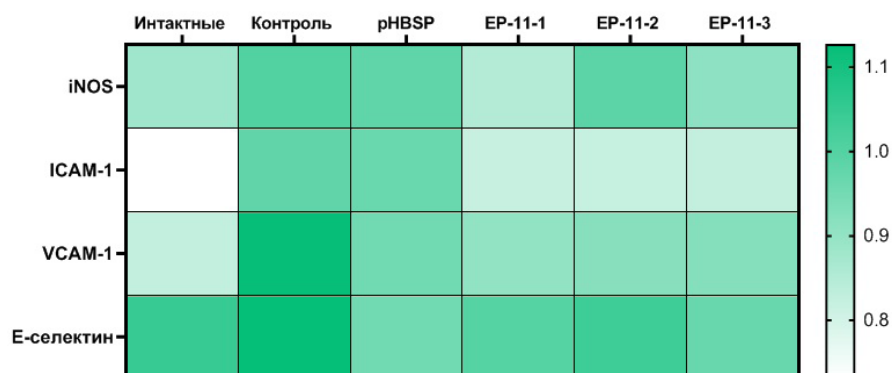


Рисунок 3 – Влияние исследуемых соединений на относительную экспрессию маркеров воспаления

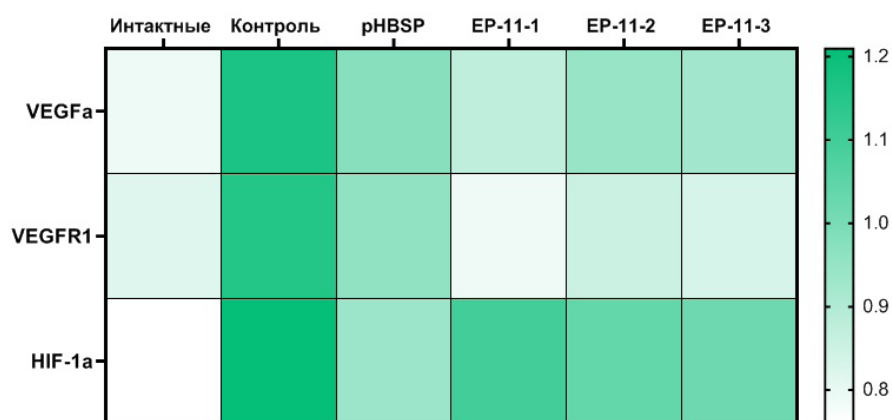
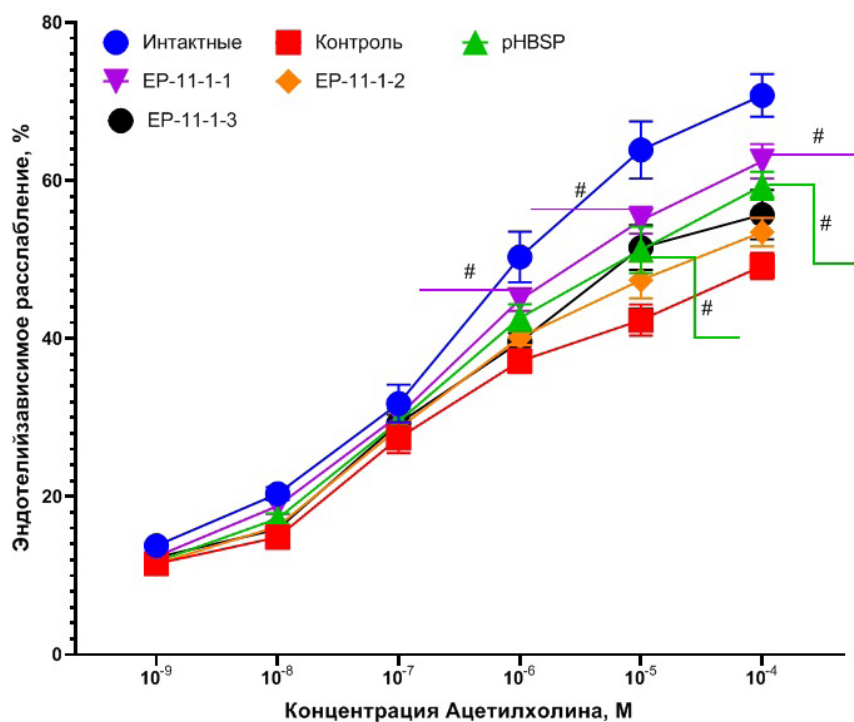


Рисунок 4 – Влияние исследуемых соединений на относительную экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом

Рисунок 5 – Результаты проведения пробы с эндотелийзависимой вазодилатацией в ответ на ацетилхолин на изолированном кольце грудной аорты животных с генотипом Polg^{mut/mut}/CdH5-CREПримечание: # – при $p < 0,05$ в сравнении с контрольной группой животных (Polg-CRE)

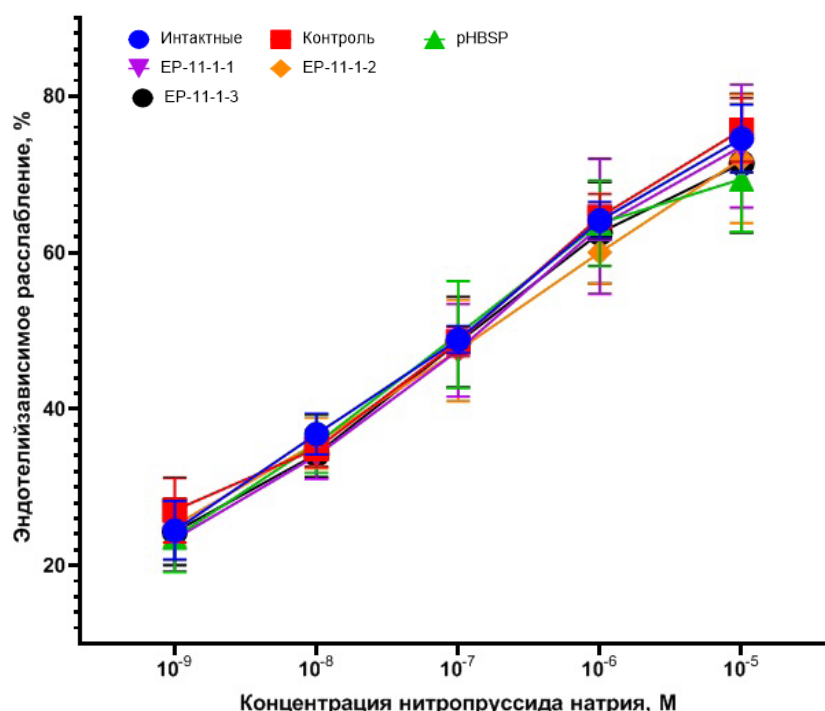


Рисунок 6 – Результаты проведения пробы с эндотелийнезависимой вазодилатацией в ответ на нитропруссид натрия на изолированном кольце грудной аорты животных с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$

На рисунке 2Б показано соотношение $Bax/Bcl-2$, характеризующее интегральную проапоптотическую направленность клетки, чем оно выше, тем более выражена активация каскадов программируемой клеточной гибели. Из рисунка видно, что у животных с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ соотношение $Bax/Bcl-2$ статистически значительно повышается, а введение соединения с лабораторным шифром EP-11-1 и исходного пептида pHBS статистически значительно снижают соотношение $Bax/Bcl-2$ (рис. 2Б).

При изучении экспрессии группы воспалительных маркеров показано, что в контрольной группе животных с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ статистически значительно повышается экспрессия $iNOS$, $ICAM-1$, $VCAM-1$ и Е-селектина (рис. 3). Изучаемые соединения с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2 и EP-11-3, более эффективно, чем исходный пептид pHBS, снизили повышенную на фоне баллонной травмы экспрессию генов воспалительных маркеров $iNOS$, молекул межклеточной адгезии $ICAM-1$, $VCAM-1$ и Е-селектина. Наиболее выраженный эффект был получен в группе с применением соединения EP-11-1 (рис. 3).

Кроме того, исследуемые соединения с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2, EP-11-3 эффективнее, чем исходный пептид pHBS, снизили экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом (рис. 4). Наиболее эффективным в данном тесте, как и в большинстве ранее проанализированных данных, оказалось соединение с лабораторным шифром EP-11-1 (рис. 4).

Оценка функционирования сосудистого эндотелия на препаратах изолированных колец аорты

Изучение влияния исследуемых соединений и исходного пептида pHBS на функционирование сосудистого эндотелия проведено на изолированных сегментах грудной аорты мышей с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$, получавших диету с высоким содержанием жиров. Эндотелиальную функцию оценивали путем проведения эндотелийзависимой вазодилатации в ответ на ацетилхолин (АХ). Как показано на рисунке 5 эндотелийзависимая вазодилатация, индуцированная ацетилхолином, была значительно снижена у мышей с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ по сравнению с интактными мышами дикого типа.

Важно отметить, что нарушение эндотелийзависимой вазодилатации, вызванной АХ у мышей с эндотелийспецифической гиперэкспрессией мутантного гена $Polg$, было восстановлено введением пептида с лабораторным шифром EP-11-1 и степень релаксации кольца аорты в данной группе статистически значительно отличалась от данного показателя в контрольной группе животных с генотипом $Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE$ при введении ацетилхолина в концентрациях $10^{-6}M$, $10^{-5}M$ и $10^{-4}M$ (рис. 5). Введение исходного пептида pHBS также привело к увеличению расслабления сосуда в ответ на введение ацетилхолина в концентрациях $10^{-5}M$ и $10^{-4}M$. Введение пептидов с лабораторными шифрами другого соединения-лидера EP-11-2 и EP-11-3 статистически значительно не влия-

ло на степень ответа сегмента сосуда на ацетилхолин (рис. 5).

В тоже время, при анализе результатов эндотелийнезависимой вазодилатации в ответ на нитропруссид натрия статистически значимых различий между экспериментальными группами не обнаружено (рис. 6).

ОБСУЖДЕНИЕ

Биологические эффекты рекомбинантного эритропоэтина широки и многогранны, и большое внимание исследователей привлекают его негематопотетические эффекты, в частности нас заинтересовало атеропротективное и эндотелиопротективное действие. В исследованиях *in vivo* показано, что эритропоэтин уменьшает проявления ишемии и реперфузионного повреждения кардиомиоцитов, что частично объясняется увеличением выработки оксида азота и острым ответом на повышение гематокрита. В этом же исследовании сообщается, что эритропоэтин опосредованная активация eNOS связана с передачей сигналов PI3K, а связанное с ЭПО снижение проявлений ишемии кардиомиоцитов не наблюдается у мышей с генотипом eNOS $-/-$ [23]. Предполагается, что эритропоэтин индуцированная продукция оксида азота эндотелиоцитами опосредуется, в первую очередь индукцией и активацией eNOS, особенно при пониженном содержании кислорода [24, 25]. Кроме того, у мышей с эктопической трансгенной экспрессией ЭПО обнаружена повышенная активность eNOS и повышенный уровень NO в плазме, что предотвращает сердечно-сосудистые заболевания, такие как гипертония и тромбоэмболия, а ингибирование NO-синтазы приводит к сердечно-сосудистой патологии и смерти [3].

Ввиду известного ограничения применения рекомбинантного эритропоэтина в эритропротективных дозах, проблема поиска новых производных эритропоэтина, обладающих его тканезащитными свойствами, но не стимулирующих кроветворение, является актуальной в современной медицине и фармакологии. Пептиды, являющиеся агонистами гетерорецептора EPOR/CD131 запускают каскады цитопротекции, ассоциированные эритропоэтином, но не оказывают эритропротективное действие. В ранее проведенных исследованиях продемонстрировано, что пептид, имитирующий пространственную структуру цепи В эритропоэтина rHBSP оказывает выраженное эндотелиопротективное действие при моделировании L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс [26, 27]. Однако, в этом исследовании нами также было показано протромботическое действие HBSP. С учетом вышесказанного, очевидна необходимость дальнейших модификаций данной молекулы. На наш взгляд, модификация HBSP для улучшения его фармакокинетических и фармакодинамических параметров может стать дальнейшим

многообещающим развитием фармакотерапии сердечно-сосудистых заболеваний на основе короткоцепочечных пептидов [28].

Поиск таких соединений может быть решен несколькими способами, включая присоединение аминокислотных мотивов с антикоагулянтными свойствами к аминокислотной последовательности или путем поиска групп родственных пептидов исходного соединения с помощью программы BLAST. На первом этапе исследования мы попробовали модернизировать исходную молекулу HBSP путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP, обладающих антиагрегантным действием. В результате были получены принципиально новые соединения, сочетающие в себе цитопротективный [29] и антиагрегантный эффекты [30]. Также нами показано, что используемые пептиды на основе эритропоэтина способны улучшать функциональное состояние сосудистой стенки на фоне атеросклеротического поражения и оказывают угнетающее влияние на патобиологические процессы, связанные с митохондриальной дисфункцией. Кроме того, исследуемые пептиды обладают выраженным эндотелиопротективным действием на фоне моделирования оксидативного стресса *in vitro* [20].

В данном исследовании мы изучили фармакологическую активность 3 пептидов, имитирующих а-спираль В эритропоэтина: EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2 (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS), полученных путем поиска групп родственных пептидов к молекуле rHBSP с помощью программы BLAST.

Для исследования нами выбрана линия животных, с эндотелиоспецифичной экспрессией мутантного гена Polg. Полимераза гамма – фермент, который играет ключевую роль в репликации митохондриальной ДНК. Патология данного фермента приводит к включению «неправильных» нуклеотидов без последующего исправления что вызывает митохондриальную дисфункцию с последующим увеличением выработки активных радикалов и повреждением клетки. Гомозиготные животные с системной мутацией Polg не выживают, поэтому в нашей работе мы использовали эндотелиоспецифичную экспрессию индуцируемого трансгена [20].

В используемой нами модели атеросклероз связан с травматическим воздействием на сосуд на фоне повреждения эндотелиоцитов вследствие дисфункции митохондрий. Проведенное исследование атеропротективной активности показало, что изучаемые пептиды, как и исходный пептид rHBSP, статистически значимо не влияют на гистологическое строение и размер атеросклеротической бляшки на выбранной модели патологии. Максимальное уменьшение размера атеросклеротической бляшки, установленное в группе животных, получавших EP-11-1, которое, однако, не носило статистически значимого характера. Возможно, в дальнейшем

следует изучить влияние полученных соединений лидеров на гистологическое строение и размер атеросклеротических бляшек на модели атерогенеза, не связанной с физическим повреждением эндотелия.

С использованием молекулярно-биологического анализа тканей сформированной атеросклеротической бляшки было обнаружено, что изучаемые пептиды EP-11-1 и EP-11-2 статистически значимо снижают экспрессию проапоптотических факторов p53 и Bax, а также увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2. При расчете соотношения экспрессии Bax к Bcl-2 обнаружено что у животных с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE соотношение Bax/Bcl-2 статистически значимо повышается более чем в 3 раза, а введение соединения с лабораторным шифром EP-11-1 и исходного пептида rHBSP статистически значимо снижают соотношение Bax/Bcl-2 на 57,2 и 56,4% соответственно. Полученные данные согласуются с результатами других исследований, показывающих, что введение эритропоэтина в течение 10 недель заметно снижает соотношение белка Bax/Bcl-2 в аорте мышей с дефицитом аполипопротеина E, получавших диету с высоким содержанием жиров [31]. Наряду с антиапоптотическим действием, изучаемые соединения с лабораторными шифрами EP-11-1, EP-11-2 и EP-11-3, более эффективно, чем исходный пептид rHBSP, снизили повышенную на фоне баллонной травмы экспрессию гена, кодирующего iNOS и снизили экспрессию генов и белков молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. При этом максимальная эффективность обнаружена в группе животных, получавших пептид с лабораторным шифром EP-11-1. Противовоспалительное действие эритропоэтина и его дериватов широко известно и изучено [32] и наше исследование подтвердило сохранение этого вида активности у дериватов, имитирующих цепь В эритропоэтина.

При проведении исследования фармакологической активности пептидов на изолированных сегментах легочной аорты в группе животных с генотипом Polg^{mut/mut}/Cdh5-CRE обнаружено, что эндотелийзависимая вазодилатация, индуцированная ацетилхолином, была значительно снижена (70,8% при концентрации ацетилхолина 10^{-4} М) по сравнению с интактными мышами дикого типа (49,2% при концентрации ацетилхолина 10^{-4} М). Применение пептида EP-11-1 привело к восстановлению эндотелийзависимой вазодилатации, вызванной ацетилхолином в концентрациях 10^{-6} М, 10^{-5} М и 10^{-4} М у мышей с

эндотелийспецифической гиперэкспрессией мутантного гена Polg. Введение исходного пептида rHBSP также привело к увеличению расслабления сосуда в ответ на введение ацетилхолина в концентрациях 10^{-5} М и 10^{-4} М. Введение пептидов с лабораторными шифрами другого соединения-лидера EP-11-2 и EP-11-3 статистически значимо не влияло на степень ответа сегмента сосуда на ацетилхолин. Обращает на себя внимание тот факт, что мы не обнаружили изменений в реакции эндотелийнезависимой вазодилатации ни в одной из экспериментальных групп. Указанный факт доказывает, что тканезащитный эффект изученных в настоящем исследовании пептидов включает нормализацию функции сосудистого эндотелия и обуславливает выраженную эндотелиопротективную активность соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе поиска новых производных эритропоэтина, обладающих тканезащитными свойствами без проявления гемопоэтической активности мы модернизировали исходный пептид HBSP путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP. Полученные соединения сочетали в себе цитопротективный и антиагрегантный эффекты, обладали эндотелиопротективной активностью и были способны защищать сосудистую стенку от атеросклеротического поражения. В настоящем исследовании мы проверили второй пул соединений – производных пептида HBSP с лабораторными шифрами EP-11-1 (UEHLERALNSS), EP-11-2. (UEQLERALNCS), EP-11-3 (UEQLERALNTS)., полученных путем поиска групп родственных пептидов к молекуле rHBSP с помощью программы BLAST. В исследовании, проведенном на мышинной модели эндотелийспецифичной экспрессии мутантного гена Polg нами показано, что наиболее активное соединение с лабораторным шифром EP-11-1 обладает более выраженной, чем исходный пептид rHBSP, атеропротективной и эндотелиопротективной активностью.

Результаты настоящего исследования, в совокупности с ранее полученными данными, характеризующими фармакологическую активность производных rHBSP, полученных путем добавления трипептидных мотивов RGD, KGD и PGP к исходной молекуле, доказывают эффективность и раскрывают перспективы дальнейшего использования рассматриваемых подходов к поиску новых пептидов – дериватов эритропоэтина, обладающих тканезащитными свойствами и не оказывающих гемопоэтического действия.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента РФ MD-757.2020.7 и гранта РФФИ проект №19-34-90073.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

М.В. Корокин – создание идеи, планирование исследования, проведение исследования, статистическая обработка, написание статьи; М.В. Кубекина – подготовка экспериментальных животных, выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии целевых генов; А.В. Дейкин – выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии целевых генов; О.В. Анциферов – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; В.М. Покровский – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; Л.В. Корокина – статистическая обработка, разработка дизайна исследования; Н.Л. Карташкина – статистическая обработка, написание статьи, формализация списка литературы; Солдатов В.А. – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; Е.А. Кузубова – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; А.И. Радченко – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов, исследование фармакологической активности; М.В. Покровский – планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, обеспечение качества.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Jelkmann W. Erythropoietin after a century of research: younger than ever // *European Journal of Haematology*. – 2007. – Vol. 78, No.3. – P. 183–205. DOI: 10.1111/j.1600-0609.2007.00818.x.
2. Heikal L., Ghezzi P., Mengozzi M., Stelmaszczyk B., Feelisch M., Ferns G.A. Erythropoietin and a nonerythropoietic peptide analog promote aortic endothelial cell repair under hypoxic conditions: role of nitric oxide // *Hypoxia (Auckl)*. – 2016. – Vol. 16, No.4. – P. 121–133. DOI: 10.2147/HP.S104377.
3. Zhang Y., Wang L., Dey S., Alnaeeli M., Suresh S., Rogers H., Teng R., Noguchi C.T. Erythropoietin action in stress response, tissue maintenance and metabolism // *International journal of molecular sciences*. – 2014. – Vol. 15, No.6. – P. 10296–10333. DOI: 10.3390/ijms150610296.
4. Wu H., Liu X., Jaenisch R., Lodish H.F. Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor // *Cell*. – 1995. – No.83. – P. 59–67. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90234-1.
5. Lin C.S., Lim S.K., D'Agati V., Costantini F. Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis // *Genes & Development*. – 1996. – No.10. – P. 154–164. DOI: 10.1101/gad.10.2.154.
6. Ueba H., Shiomi M., Brines M., Yamin M., Kobayashi T., Ako J., Momomura S., Cerami A., Kawakami M. Suppression of coronary atherosclerosis by helix B surface Peptide, a nonerythropoietic, tissue-protective compound derived from erythropoietin // *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*. – 2013. – Vol. 19, No.1. – P. 195–202. DOI: 10.2119/molmed.2013.00037.
7. Lu K.Y., Ching L.C., Su K.H., Yu Y.B., Kou Y.R., Hsiao S.H., Huang Y.C., Chen C.Y., Cheng L.C., Pan C.C., Lee T.S. Erythropoietin suppresses the formation of macrophage foam cells: role of liver X receptor alpha // *Circulation*. – 2010. – Vol. 121, No.16. – P. 1828–1837. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.876839.
8. Haine L., Yegen C.H., Marchant D., Richalet J.P., Boncoeur E., Voituron N. Cytoprotective effects of erythropoietin: What about the lung? // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – No.139. – P. 111547. DOI: 10.1016/j.biopha.2021.111547.
9. Brines M., Grasso G., Fiordaliso F., Sfacteria A., Ghezzi P., Fratelli M., Latini R., Xie Q.W., Smart J., Su-Rick C.J., Pobre E., Diaz D., Gomez D., Hand C., Coleman T., Cerami A. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2004. – Vol. 101, No.41. – P. 14907–14912. DOI: 10.1073/pnas.0406491101.
10. Anagnostou A., Liu Z., Steiner M., Chin K., Lee E.S., Kessimian N., Noguchi C.T. Erythropoietin receptor mRNA expression in human endothelial cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1994. – No.91. – P. 3974–3978. DOI: 10.1073/pnas.91.9.3974.
11. Anagnostou A., Lee E.S., Kessimian N., Levinson R., Steiner M. Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 1990. – No.87. – P. 5978–5982. DOI: 10.1073/pnas.87.15.5978.
12. Hou J., Wang S., Shang Y.C., Chong Z.Z., Maiese K. Erythropoietin employs cell longevity pathways of SIRT1 to foster endothelial vascular integrity during oxidant stress // *Current Neurovascular Research*. – 2011. – No.8. – P. 220–235. DOI: 10.2174/156720211796558069.
13. Beleslin-Cokic B.B., Cokic V.P., Wang L., Piknova B., Teng R., Schechter A.N., Noguchi C.T. Erythropoietin and hypoxia increase erythropoietin receptor and nitric oxide levels in lung microvascular endothelial cells // *Cytokine*. – 2011. – No.54. – P. 129–135. DOI: 10.1016/j.cyto.2011.01.015.
14. Kanagy N.L., Perrine M.F., Cheung D.K., Walker B.R. Erythropoietin administration *in vivo* increases vascular nitric oxide synthase expression // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2003. – No.42. – P. 527–533. DOI: 10.1097/00005344-200310000-00011.
15. Corwin H.L., Gettinger A., Fabian T.C., May A., Pearl R.G., Heard S., An R., Bowers P.J., Burton P., Klausner M.A., Corwin M.J. Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients // *The New England Journal of Medicine*. – 2007. – No.357. – P. 965–976. DOI: 10.1056/NEJMoa071533.
16. Brines M., Patel N.S., Villa P., Brines C., Mennini T., De Paola M., Erbayraktar Z., Erbayraktar S., Sepodes B., Thiemermann C., Ghezzi P., Yamin M., Hand C.C., Xie Q.W., Coleman T., Cerami A. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2008. – No.105. – P. 10925–10930. DOI: 10.1073/pnas.0805594105.
17. Erbayraktar Z., Erbayraktar S., Yilmaz O., Cerami A., Coleman T., Brines M. Nonerythropoietic tissue protective compounds are highly effective facilitators of wound healing // *Molecular Medicine*. – 2009. – No.15. – P. 235–241. DOI: 10.2119/molmed.2009.00051.
18. Ueba H., Brines M., Yamin M., Umemoto T., Ako J., Momomura S., Cerami A., Kawakami M. Cardioprotection by a nonerythropoietic, tissue-protective peptide mimicking the 3D structure of erythropoietin // *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. – 2010. – No.107. – P. 14357–14362. DOI: 10.1073/pnas.1003019107.
19. Ahmet I., Tae H.J., Juhaszova M., Riordon D.R., Boheler K.R., Sollott S.J., Brines M., Cerami A., Lakatta E.G., Talan M.I. A small nonerythropoietic helix B surface peptide based upon erythropoietin structure is cardioprotective against ischemic myocardial damage // *Molecular Medicine*. – 2011. – Vol. 17, No.3–4. – P. 194–200. DOI: 10.2119/molmed.2010.00235.
20. Пученкова О.А., Надеждин С.В., Солдатов В.О., Жученко М.А., Коршунова Д.С., Кубекина М.В., Коршунов Е.Н., Корокина Л.В., Куликов А.Л., Голубинская П.А., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Гурьев

- В.В., Денисюк Т.А., Беляева В.С., Мовчан Е.А., Лепетюха Е.И., Покровский М.В. Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности пептидных агонистов гетерорецептора EPO/CD131 // Фармация и фармакология. – 2020. – Т. 8, № 2 – С. 100–111. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-100-111.
21. Stubbendorff M., Hua X., Deuse T.I. Inducing myointimal hyperplasia versus atherosclerosis in mice: an introduction of two valid models // Journal of Visualized Experiments. – 2014. – No.87. – P. 51459. DOI: 10.3791/51459.
 22. Tediashvili G., Wang D., Reichensperner H., Deuse T., Schrepfer S. Balloon-based injury to induce Myointimal Hyperplasia in the Mouse Abdominal Aorta // Journal of Visualized Experiments. – 2018. – No. 132. – P. 56477. DOI: 10.3791/56477.
 23. Teng R., Calvert J.W., Sibmooh N., Piknova B., Suzuki N., Sun J., Martinez K., Yamamoto M., Schechter A.N., Lefler D.J., Noguchi C.T. Acute erythropoietin cardioprotection is mediated by endothelial response. Basic Res. Cardiol. – 2011. – No.106. – P. 343–354. DOI: 10.1007/s00395-011-0158-z.
 24. Yasuda H., Iwata Y., Nakajima S., Furuichi K., Miyake T., Sakai N., Kitajima S., Toyama T., Shinozaki Y., Sagara A., Miyagawa T., Hara A., Shimizu M., Kamikawa Y., Sato K., Oshima M., Yoneda-Nakagawa S., Kaneko S., Wada T. Erythropoietin signal protected human umbilical vein endothelial cells from high glucose-induced injury // Nephrology (Carlton). – 2019. – Vol. 24, No. 7. – P. 767–774. DOI: 10.1111/nep.13518.
 25. Beleslin-Cokic B.B., Cokic V.P., Yu X., Weksler B.B., Schechter A.N., Noguchi C.T. Erythropoietin and hypoxia stimulate erythropoietin receptor and nitric oxide production by endothelial cells // Blood. – 2004. – No.104. – P. 2073–2080. DOI: 10.1182/blood-2004-02-0744.
 26. Корокин М.В., Солдатов В.О., Титце А., Голубев И.В., Белых А.Е., Кубекина М.В., Пученкова О.А., Денисюк Т.А., Гуреев В.В., Покровская Т.Г., Гудырев О.С., Жученко М.А., Затолокина М.А., Покровский М.В. 11-аминокислотный пептид, имитирующий структуру α-спирали в эритропоэтина, улучшает функцию эндотелия, но стимулирует тромбообразование у крыс // Фармация и фармакология. – 2019. – Т. 7, № 6. – С. 312–320. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-312-320.
 27. Shokrzadeh M., Etebari M., Ghassemi-Barghi N. An engineered non-erythropoietic erythropoietin-derived peptide, ARA290, attenuates doxorubicin induced genotoxicity and oxidative stress // Toxicology in Vitro. – 2020. – No.66. – P. 104864. DOI: 10.1016/j.tiv.2020.104864.
 28. Belyaeva V.S., Stepenko Yu.V., Lyubimov I.I., Kulikov A.L., Tietze A.A., Kochkarova I.S., Martynova O.V., Pokopeyko O.N., Krupen'kina L.A., Nagikh A.S., Pokrovskiy V.M., Patrakhanov E.A., Belashova A.V., Lebedev P.R., Gureeva A.V. Non-hematopoietic erythropoietin-derived peptides for atheroprotection and treatment of cardiovascular diseases // Research Results in Pharmacology. – 2020. – Vol. 6, No.3. – P. 75–86. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.58891.
 29. Golubev I.V., Gureev V.V., Korokin M.V., Zatolokina M.A., Avdeeva E.V., Gureeva A.V., Rozhkov I.S., Serdyuk EA, Soldatova VA. Preclinical study of innovative peptides mimicking the tertiary structure of the α-helix B of erythropoietin // Research Results in Pharmacology. – 2020. – Vol. 6, No. 2. – P. 85–96. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.55385).
 30. Golubev I.V., Gureev V.V., Korokina L.V., Gudyrev O.S., Pokrovskaia T.G., Pokopeiko O.N., Pokrovskii V.M., Artyushkova E.B., Korokin M.V. The anti-aggregation activity of new 11-amino acid of erythropoietin derivate containing tripeptide motifs // Archivos venezolanos de farmacología y terapéutica. – 2020. – Vol. 39, No.5. – P. 588–591. DOI: 10.5281/zenodo.4264989.
 31. Warren J.S., Zhao Y., Yung R., Desai A. Recombinant human erythropoietin suppresses endothelial cell apoptosis and reduces the ratio of Bax to Bcl-2 proteins in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice // Journal of Cardiovascular Pharmacology. – 2011. – Vol. 57, No. 4. – P. 424–433. DOI: 10.1097/FJC.0b013e31820d92fd.
 32. Nairz M., Sonnweber T., Schroll A., Theurl I., Weiss G. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation // Microbes and Infection. – 2012. – Vol. 14, No. 3. – P. 238–246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005.

АВТОРЫ

Корокин Михаил Викторович – доктор медицинских наук, доцент, руководитель лаборатории НИИ Фармакологии живых систем НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: mkorokin@mail.ru

Кубекина Марина Владиславовна – аспирант, младший научный сотрудник Института биологии гена РАН. ORCID ID: 0000-0002-8834-1111. E-mail: kubekina@genebiology.ru

Дейкин Алексей Васильевич – кандидат биологических наук, руководитель объединенного центра генетических технологий НИУ «БелГУ», руководитель ЦКП «Геномное редактирование» ИБГ РАН. ORCID ID: 0000-0001-9960-0863. E-mail: alexei@deikin.ru

Анциферов Олег Владимирович – старший преподаватель кафедры факультетской терапии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0001-6439-2419. E-mail: antsiferov@bsu.edu.ru

Покровский Владимир Михайлович – студент 6 курса, Медицинский институт НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0003-3138-2075. E-mail: vmokrovsky@yandex.ru

Корокина Лилия Викторовна – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0002-4115-1564. E-mail: korokina@mail.ru

Карташкина Наталия Левоновна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова МЗ РФ (Сеченовский университет). ORCID ID: 0000-0003-4648-9027. E-mail: kartashkuna_n_l@staff.sechenov.ru

Солдатова Валерия Андреевна – аспирант кафедры фармакологии и клинической НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0001-6637-1654. E-mail: lorszoldatova@gmail.com

Кузубова Елена Валерьевна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0003-2425-5027. E-mail: 1015artek1015@mail.ru

Радченко Александра Игоревна – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0002-4554-2116. E-mail: sandrinkaradchenko@gmail.com

Покровский Михаил Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ». ORCID ID: 0000-0002-1493-3376. E-mail: pokrovskii@bsu.edu.ru

УДК 577.29



ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ D-МЕТАЛЛОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ, АГРЕГАЦИЮ И АМИЛОИДНУЮ ТРАНСФОРМАЦИЮ АЛЬБУМИНА В РЕАКЦИИ ГЛИКИРОВАНИЯ

Р.А. Литвинов^{1,2}, А.В. Гонтарева¹, Л.Э. Усмиянова¹, Д.Р. Клименко¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

² Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр»

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

E-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

Получено 13.05.2021

Принята к печати 22.08.2021

Цель. Исследование влияния фактора протекания реакции гликирования бычьего сывороточного альбумина (БСА) глюкозой и фактора присутствия в среде реакции гликирования катионов d-металлов (никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) или цинк (II)) на процесс агрегации и амилоидной трансформации БСА. Установление влияния указанных катионов на интенсивность образования конечных продуктов реакции гликирования (КПГ) и интенсивность флуоресценции аминокислот тирозин и триптофан.

Материалы и методы. Реагенты в реакции гликирования: глюкоза (в конечной концентрации 0,36 М), БСА (в конечной концентрации 1 мг/мл), деионизированная вода, один из катионов d-металлов, а именно никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) или цинк (II) (в виде соли хлорида, сульфата или нитрата, в конечной концентрации 40 мкМ). Условия протекания реакции гликирования: инкубация 24 ч при температуре 60°C. Исследовано влияние двух факторов (фактор протекания гликирования и фактор присутствия иона d-металла в реакционной среде) на концентрацию КПГ, образуемых в ходе реакции гликирования, на интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин, на агрегацию БСА и на способность БСА к амилоидной трансформации в описанных условиях.

Результаты. Установлено, что исследуемые факторы статистически значимо влияют на рассматриваемые параметры. Наивысшая активность установлена для иона меди (II), который интенсифицирует образование КПГ в пробах, где протекает гликирование, снижает интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин (самостоятельно и усиливая эффект на фоне гликирования), вызывает агрегацию БСА (самостоятельно и усиливая эффект на фоне гликирования), вызывает амилоидную трансформацию БСА (самостоятельно и усиливая эффект на фоне гликирования). Наименее выражены перечисленные эффекты были в реакционных средах с добавлением никеля (II) или кобальта (II). Данные катионы снижают интенсивность образования КПГ, не вызывают образования белковых агрегатов. В присутствии глюкозы никель (II) слабо подавляет интенсивность флуоресценции триптофана и тирозина, незначительно усиливает амилоидную трансформацию БСА. Кобальт (II) незначительно подавляет амилоидную трансформацию БСА. Катионы железа (II), железа (III) и цинка (II) по выраженности и характеру эффектов занимают промежуточное положение между медью (II) с одной стороны, и никелем (II) и кобальтом (II) с другой стороны, в разной степени сочетая влияние на образование КПГ, интенсивность флуоресценции триптофана и тирозина, агрегацию и амилоидную трансформацию БСА. В отсутствии глюкозы способность цинка (II) вызывать образование белковых агрегатов оказалась наивысшей, а его способность стимулировать амилоидную трансформацию БСА соответствовала таковой у меди (II).

Заключение. Присутствие катионов d-металлов влияет на интенсивность образования КПГ в реакции гликирования, влияет на интенсивность амилоидной трансформации БСА и на образование агрегатов белка. В ряду таких ионов, как никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) и цинк (II), ионы меди (II) оказались наиболее активными по способности ускорять образование КПГ, подавлять флуоресценцию триптофана и тирозина, усиливать агрегацию и амилоидную трансформацию БСА в реакции гликирования. Наименьшая выраженность указанных свойств отмечается для ионов никеля (II) и кобальта (II).

Ключевые слова: конечные продукты гликирования; гликирование; агрегация белка; амилоидная трансформация; d-металл

Список сокращений: КПГ – конечные продукты гликирования; БСА – бычий сывороточный альбумин; РКПГ – рецептор к конечным продуктам гликирования; ThT – тиаофлавин Т

Для цитирования: Р.А. Литвинов, А.В. Гонтарева, Л.Э. Усмиянова, Д.Р. Клименко. Влияние некоторых d-металлов на образование конечных продуктов гликирования, агрегацию и амилоидную трансформацию альбумина в реакции гликирования. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):306-317. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-306-317

© Р.А. Литвинов, А.В. Гонтарева, Л.Э. Усмиянова, Д.Р. Клименко, 2021

For citation: R.A. Litvinov, A.V. Gontareva, L.E. Usmyanova, D.R. Klimenko. Influence of certain d-metals on formation of advanced glycation end products, aggregation and amyloid transformation of albumin in glycation reaction. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):306-317. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-306-317

INFLUENCE OF CERTAIN D-METALS ON FORMATION OF ADVANCED GLYCATION END PRODUCTS, AGGREGATION AND AMYLOID TRANSFORMATION OF ALBUMIN IN GLYCATION REACTION

R.A. Litvinov^{1,2}, A.V. Gontareva¹, L.E. Usmyanova¹, D.R. Klimenko¹

¹ Volgograd State Medical University

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

² Volgograd Medical Research Center,

1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

Received 13 May 2021

Accepted 22 Aug 2021

The aim of the research is to investigate the influence of the factor of the glycation behavior of bovine serum albumin (BSA) by glucose, and the factor of d-metal cations (nickel (II), cobalt (II), iron (II), iron (III), copper (II) or zinc (II)) presence, on the process of aggregation and the amyloid transformation of BSA and, therefore, to establish the effect of these cations on the rate of the formation of advanced glycation end products (AGEs), and the intensity of fluorescence of the amino acids tyrosine and tryptophan.

Materials and methods. Reagents in the glycation are: glucose (at the final concentration of 0.36 M), BSA (at the final concentration of 1 mg/ml), deionized water, one of the d-metal cations, i. e. nickel (II), cobalt (II), iron (II), iron (III), copper (II) or zinc (II) (in the form of chloride, sulfate or nitrate salts, at the final concentration of 40 μ M). The conditions for the glycation reaction are the incubation for 24 hours at the temperature of 60°C. The influence of two factors (the factor of the glycation reaction and the factor of a d-metal ion presence in the reaction medium) on the concentration of glycation end products (AGEs) formed during the glycation reaction, on the fluorescence intensity of the amino acids tryptophan and tyrosine, on the aggregation of BSA, and on the ability of BSA to the amyloid transformation under the described conditions, have been studied.

Results. It was found out that the studied factors have a statistically significant effect on the considered parameters. The highest activity was found for the copper ion (II), which intensifies the formation of the AGEs in the samples where glycation occurs, reduces the fluorescence intensity of the amino acids' tryptophan and tyrosine (independently and increasing the effect against the background of glycation). Besides, it independently causes the aggregation of BSA hereby intensifying the effect against the background of glycation, it independently causes the amyloid transformation of BSA enhancing the effect against the background of glycation. The above-listed effects were the least pronounced in the reaction media with the addition of nickel (II) or cobalt (II). These cations reduce the rate of the AGEs formation, do not cause the formation of protein aggregates. In the presence of glucose, nickel (II) weakly suppresses the fluorescence intensity of tryptophan and tyrosine, and slightly enhances the amyloid transformation of BSA. Cobalt (II) slightly inhibits the amyloid transformation of BSA. In terms of the severity and nature of the effects, the iron (II), iron (III) and zinc (II) cations occupy an intermediate position between copper (II), on the one hand, and nickel (II) and cobalt (II), on the other hand, combining the influence on the AGEs formation, the intensity of fluorescence of tryptophan and tyrosine, the aggregation and amyloid transformation of BSA. In the absence of glucose, the ability of zinc (II) to induce the formation of protein aggregates turned out to be the highest, and its ability to stimulate the amyloid transformation of BSA corresponded to that of copper (II).

Conclusion. The presence of d-metal cations affects the rate of the AGEs formation in the glycation reaction, affects the rate of the BSA amyloid transformation and the protein aggregates formation. Among such ions as nickel (II), cobalt (II), iron (II), iron (III), copper (II) and zinc (II), copper (II) ions turned out to be the most active in their ability to accelerate the AGEs formation, suppress the fluorescence of tryptophan and tyrosine, enhance the aggregation and amyloid transformation of BSA in the glycation reaction. The least manifestation of these properties is observed for nickel (II) and cobalt (II) ions.

Keywords: advanced glycation end products; glycation; protein aggregation; amyloid transformation, d-metal

Abbreviations: AGEs – advanced glycation end products; BSA – bovine serum albumin; RAGEs – Receptor for advanced glycation end products; ThT – thioflavine T

ВВЕДЕНИЕ

Неферментативное гликирование служит источником образования токсичных конечных продуктов гликирования (КПГ). КПГ представляют собой группу молекул числом более 20 [1, 2], различных по своим свойствам, включая способность к аутофлуоресценции и образованию поперечных сшивок. КПГ являются важными патогенетическими факторами развития когнитивных нарушений (диабетическая энцефалопатия, конформационные болезни мозга) [3–6]. Структуры некоторых КПГ представлены на рисунке 1.

КПГ вовлечены в патогенез когнитивных нарушений с помощью различных механизмов. В культуре гиппокампальных нейронов КПГ вызывали апоптоз, повышали продукцию проапоптотического белка Вах и ацетилхолинэстеразы, снижали уровень антиапоптотического белка Bcl-2, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и холинацетилтрансферазы, уве-

лия, конформационные болезни мозга) [3–6]. Структуры некоторых КПГ представлены на рисунке 1. КПГ вовлечены в патогенез когнитивных нарушений с помощью различных механизмов. В культуре гиппокампальных нейронов КПГ вызывали апоптоз, повышали продукцию проапоптотического белка Вах и ацетилхолинэстеразы, снижали уровень антиапоптотического белка Bcl-2, глутатионпероксидазы, супероксиддисмутазы и холинацетилтрансферазы, уве-

личивали концентрацию малонового диальдегида и др. [7]. КПП способны активировать рецептор к КПП (РКПП). Предполагается, что РКПП связывает патогены сахарного диабета и болезни Альцгеймера [8]. РКПП может быть активирован белком Аβ [9] и принимает участие в его интранейрональном транспорте из крови [10]. Активация РКПП может приводить к развитию нейронального окислительного стресса [11]. В условиях, если амилоидные пептиды гликированы, то их РКПП-опосредованное действие может усиливаться [12]. По этим причинам целесообразно рассматривать амилоидную трансформацию и гликирование белков как патогенетически связанные процессы.

Помимо рецептор-опосредованной связи, КПП способны напрямую влиять на амилоидную трансформацию белков. Модифицируя боковые цепи аминокислот и N-концевой остаток некоторых белков, КПП могут повлечь изменение поверхностного заряда белка, изменение его гидрофобных свойств и, как следствие, привести к амилоидной трансформации [13]. Предполагается, что гликирование способствует стабилизации протофибриллярных структур, а способность КПП к поперечному сшиванию белков позволяет формировать из амилоидных агрегатов более крупные конгломераты [13, 14]. В определенных условиях гликирование замедляет формирование зрелых амилоидных фибрилл, однако это связано с продлением срока существования цитотоксичных олигомерных форм [15, 16]. Олигомерные формы амилоида способны разрушать мембраны клеток, приводя к дисбалансу кальция, вызывать дисфункцию митохондрий, напрямую взаимодействовать с мембранными белками, приводя к изменению их нативного состояния [14]. Таким образом, как ускорение, так и замедление амилоидной трансформации на фоне гликирования имеет негативные последствия, что делает актуальной задачу изучения влияния гликирования на данный процесс.

Протекание реакций гликирования зависит от многих факторов, в частности, от присутствия ионов d-металлов в следовых концентрациях (включая переходные металлы и близкие к ним по свойствам), присутствия активных форм кислорода и др. [17, 18]. К переходным металлам относятся химические элементы, чьи атомы имеют частично заполненный *d*-подуровень или способные образовывать катионы с неполностью заполненным *d*-подуровнем (IUPAC¹). К металлам, близким по свойствам к переходным (некоторые из них иногда именуются пост-переходными) относится подгруппа цинка и сам цинк. Многие свойства цинка идентичны таковым переходных металлов, однако *d*-орбитали его заполнены². В значительной степени

биологическая роль переходных металлов обуславливается наличием незавершенного *d*-подуровня и того, как этот подуровень заполнен электронами, так как это, свою очередь, определяет склонность конкретного переходного металла к образованию тех или иных химических связей и их устойчивость. Кроме того, электронная конфигурация *d*-подуровня обуславливает наличие специфических устойчивых степеней окисления, и, как следствие, окислительно-восстановительные свойства самого металла и его ионов [19]. Было установлено, что способность к изменению степени окисления является важным свойством, благодаря которому некоторые переходные металлы способны стимулировать протекание гликирования [20, 21]. Так, в реакциях гликирования медь (II) восстанавливается до меди (I), а кислород преобразуется в супероксид-анион при участии перекиси водорода, источником которой служат некоторые этапы гликирования. После этого ионы меди (I) окисляются до меди (II), катализируя разложение перекиси водорода до гидроксил-радикала [20]. Следует отметить, что d-металлы (цинк, железо, медь и др.) вовлечены в патогенез конформационных болезней мозга и по независимым от гликирования механизмам, связанным как с прямым действием иона на белок (поперечное сшивание остатков тирозина и др.), так и опосредованно, через влияние на активность ферментов (секретазы и др.) [22–25, 10]. Таким образом, патогенетически связанными оказываются реакция гликирования, амилоидная трансформация белков, и активность ионов d-металлов, способных влиять на оба указанных процесса.

Амилоидная трансформация белка может быть смоделирована с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) [26, 27]. БСА склонен к усиленному образованию β-листов и протеканию амилоидной трансформации при физико-химическом воздействии (например, при нагревании), что обуславливает его частое использование в качестве модельного белка при изучении процессов амилоидной трансформации [28]. При температуре, пограничной для инициации амилоидной агрегации БСА, появляется возможность оценить способность изучаемого фактора ускорить или замедлить течение агрегации и амилоидной трансформации.

Интерес представляет сравнительное исследование способности ионов d-металлов влиять на интенсивность образования КПП в реакции гликирования, а также их способность стимулировать или подавлять образование амилоидных и неамилоидных агрегатов белка на фоне реакции гликирования и независимо от нее.

ЦЕЛЬ. Оценить сочетанное и независимое влияние фактора протекания реакции гликирования БСА и фактора присутствия в реакционной среде катионов d-металлов, а именно никеля (II), кобальта (II), железа (II), железа (III), меди (II) или цинка (II), на процесс трансформации БСА в агрегаты амилоидной и неамилоидной природы. Оценить влияние указан-

¹ IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the «Gold Book»). Compiled by A.D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019-) created by S. J. Chalk. DOI: 10.1351/goldbook.

² General Properties of Transition Metals. (2020, December 7). Retrieved: June 28, 2021. [Электронный ресурс]. URL: <https://chem.libretexts.org/@go/page/24341>.

ных факторов на интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин. Оценить способность указанных катионов d-металлов влиять на интенсивность образования КПГ в реакции гликирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Моделирование реакции гликирования

Субстрат гликирования – БСА (фракция V, 1 мг/мл, Химмед, Россия); гликирующий агент – глюкоза (0,36 М, Вектон, Россия); среда протекания реакции – деионизированная вода (pH 6,2, деионизатор Milli-Q, Германия) с добавлением одного из катионов переходных металлов, а именно никеля (II), кобальта (II), железа (II), железа (III), меди (II) или цинка (II) в конечной концентрации 40 мкМ в виде солей $\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, FeSO_4 , $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ или $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ соответственно (или без них). Изучаемая концентрация солей металлов выбрана на основе ранее настроенной модели гликоокислации БСА глюкозой в присутствии $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, с модификациями [29, 30]. Интерес к сравнительному исследованию активностей d-металлов определяет необходимость их изучения в равных концентрациях. В организме концентрации изучаемых металлов переменны. Так, физиологические концентрации меди и цинка в сыворотке здоровых людей составляют ~1 мг/л (~15,7 мкМ и ~15,3 мкМ соответственно) [31, 32]. В то же время сообщается о значительно более высокой концентрации меди в амилоидных бляшках при болезни Альцгеймера (~400 мкМ) [10, 25]. При нейрональной активности цинк высвобождается в синаптическую щель и может достигать концентрации 300 мкМ [25]. По указанным причинам отобранная концентрация (40 мкМ) является компромиссной по отношению к широкому разбросу концентраций d-металлов в организме в норме и патологии, и в большей степени связана с установленной ранее активностью катиона меди (II).

Условия протекания реакции: температура 60°C, длительность инкубации: 24 часа. Указанные условия отобраны на основе данных литературы [33], свидетельствующих о том, что воздействие указанной температуры на БСА (автор использует трис-буфер с содержанием NaCl) благоприятно для трансформации α -спиралей белка в β -листы (чего может не происходить при более низких температурах), при этом с повышением температуры процесс трансформации интенсифицируется. В другом исследовании показано, что агрегации БСА при воздействии данной температуры не происходит (для БСА в Na-фосфатном буферном растворе) [34].

Определение конечных продуктов гликирования и интенсивности флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин

После инкубации аликвоты образцов (200 мкл) вносили в 96-луночный плоскодонный черный планшет, определяли интенсивность флуоресценции проб

при длинах волн возбуждения/испускания, специфичных для следующих КПГ: пентозидин (335/385 нм), весперлизин С (345/405 нм), весперлизины А и В (366/442 нм), кросслайн (379/463 нм) [35], а также измеряли интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения, превышающих 400 нм (440/520 нм) [36]. Имеются сведения о том, что флуоресцирующий при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм продукт (или продукты), относится к КПГ и способен образовывать поперечные сшивки белков [37]. Помимо КПГ определяли интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин, при длинах волн возбуждения/испускания 295/335 нм, более специфичных для триптофана, и 270/330 нм, характерных для обеих аминокислот (спектрофлуориметр Infinite M200 Pro, TECAN, Австрия) [38-40]. Оценка влияния гликирования и действия ионов d-металлов на флуоресценцию данных аминокислот информативна ввиду чувствительности показателя интенсивности их флуоресценции к изменению конформации белка и гликированию их аминокислотного окружения [41, 42]. Кроме этого, катионы меди (II) способствуют формированию дитиразиновых сшивок, что имеет значение для патогенеза болезни Альцгеймера [43], и в результате чего флуоресцентные характеристики тирозина изменяются. Нельзя исключить и возможности изменения флуоресценции при окислении триптофана и/или тирозина, а также активации тирозина и его прямого взаимодействия с продуктами реакции при гликировании его окружения [44, 42]. Это делает определение флуоресценции данных аминокислот актуальным для настоящего исследования, и позволяет косвенно отмечать изменения в протекании как гликирования, так и агрегации белка.

Исследование агрегации и амилоидной трансформации белков

В исследовании с применением спектрофотометрии дана оценка интенсивности образования белковых агрегатов и проведено спектрофлуориметрическое определение их амилоидной принадлежности в реакции с тιοфлавином Т (ThT). Спектрофотометрическое детектирование агрегатов БСА проведено по приросту оптической плотности при длине волны 405 нм [45] в аликвотах 200 мкл в 96-луночном плоскодонном прозрачном планшете (спектрофлуориметр Infinite M200 Pro, TECAN, Австрия). В исследовании [45] показано, что оптическая плотность при данной длине волны прямо пропорциональна степени агрегации. Подтверждение амилоидной принадлежности агрегатов проведено в реакции с ThT (Sigma Aldrich, США), в конечной концентрации ThT 20 мкМ [46], путем определения интенсивности флуоресценции проб при длинах волн возбуждения/испускания 450/482 нм (спектрофлуориметр Infinite M200 Pro, TECAN, Австрия).

Таблица 1 – Влияние исследуемых факторов на интенсивность флуоресцентной эмиссии, характерной для различных КПГ, а также аминокислот триптофан и тирозин, абсолютные значения флуоресценции ($M \pm SEM$)

Фактор глюкозы	Параметры флуоресценции ($\lambda_{возб}/\lambda_{исп}$), нм и соответствующий продукт	Фактор катиона металла						
		Нет	Никель (II)	Кобальт (II)	Железо (II)	Медь (II)	Железо (III)	Цинк (II)
Глюкоза	270/330	83147,2 $\pm$ 1561,7	75475,8 $\pm$ 1415,6	78131,2 $\pm$ 1441,9	68838,8 $\pm$ 1290,9	30211,8 $\pm$ 1680,2	63999,6 $\pm$ 1399,6	70210,8 $\pm$ 1417,6
	Без глюкозы	83063,0 $\pm$ 1000,5	80763,0 $\pm$ 664,4	78733,8 $\pm$ 926,2	76121,0 $\pm$ 279,1	56691,4 $\pm$ 1055,4	62589,2 $\pm$ 1609,8	76616,8 $\pm$ 837,1
Глюкоза	295/335	41994,3 $\pm$ 1290,6	37012,8 $\pm$ 1205,5	39814,8 $\pm$ 1459,9	34861,6 $\pm$ 1056,5	14637,2 $\pm$ 587,9	31014,8 $\pm$ 845,1	33909,6 $\pm$ 707,4
	Без глюкозы	43126,5 $\pm$ 303,6	40918,8 $\pm$ 757,4	38680,0 $\pm$ 881,2	36587,8 $\pm$ 813,1	27971,5 $\pm$ 785,8	30535,0 $\pm$ 1180,7	37617,0 $\pm$ 456,1
Глюкоза	335/385	752,8 $\pm$ 13,4	538,6 $\pm$ 15,8	580,6 $\pm$ 17,2	490,2 $\pm$ 15,0	757,0 $\pm$ 29,5	395,0 $\pm$ 11,9	748,8 $\pm$ 17,7
	Без глюкозы	284,5 $\pm$ 6,9	278,0 $\pm$ 4,0	268,5 $\pm$ 3,1	244,3 $\pm$ 4,2	250,5 $\pm$ 6,5	202,8 $\pm$ 6,3	302,5 $\pm$ 12,7
Глюкоза	345/405	812,4 $\pm$ 14,6	578,8 $\pm$ 15,3	609,4 $\pm$ 14,5	594,0 $\pm$ 10,2	1058,2 $\pm$ 19,1	452,4 $\pm$ 7,3	861,8 $\pm$ 8,6
	Без глюкозы	313,0 $\pm$ 14,1	291,3 $\pm$ 6,8	313,0 $\pm$ 12,1	273,3 $\pm$ 4,5	302,3 $\pm$ 11,1	229,0 $\pm$ 11,1	391,3 $\pm$ 30,2
Глюкоза	366/442	921,0 $\pm$ 22,8	744,0 $\pm$ 17,0	728,2 $\pm$ 13,6	874,0 $\pm$ 61,5	2009,8 $\pm$ 37,0	666,0 $\pm$ 13,2	977,0 $\pm$ 5,6
	Без глюкозы	491,0 $\pm$ 11,0	477,2 $\pm$ 9,2	561,2 $\pm$ 33,9	504,8 $\pm$ 49,4	594,8 $\pm$ 21,5	390,0 $\pm$ 27,6	661,4 $\pm$ 40,8
Глюкоза	379/463	826,6 $\pm$ 21,7	675,4 $\pm$ 18,7	644,2 $\pm$ 10,9	786,6 $\pm$ 47,2	1917,8 $\pm$ 34,9	618,8 $\pm$ 12,1	828,6 $\pm$ 7,6
	Без глюкозы	477,8 $\pm$ 11,2	471,6 $\pm$ 9,8	500,0 $\pm$ 23,9	439,3 $\pm$ 5,9	594,4 $\pm$ 22,9	365,2 $\pm$ 20,7	603,6 $\pm$ 32,9
Глюкоза	440/520	451,6 $\pm$ 8,1	355,4 $\pm$ 9,2	348,8 $\pm$ 9,3	416,2 $\pm$ 9,9	727,4 $\pm$ 9,3	372,4 $\pm$ 8,2	496,0 $\pm$ 8,0
	Без глюкозы	323,4 $\pm$ 4,9	282,6 $\pm$ 6,3	300,0 $\pm$ 4,7	291,2 $\pm$ 6,3	310,0 $\pm$ 4,9	233,8 $\pm$ 6,7	375,0 $\pm$ 15,0

Примечание: уровень значимости r при сравнении с соответствующими пробами без металла (**** соответствует $p < 0,0001$; *** соответствует $p < 0,001$; ** соответствует $p < 0,01$; * соответствует $p < 0,05$).
 Уровень значимости r при сравнении с соответствующими пробами без глюкозы (#### соответствует $p < 0,0001$; ### соответствует $p < 0,001$; ## соответствует $p < 0,01$; # соответствует $p < 0,05$ (two-way ANOVA, пост-тест Тьюки)

Таблица 2 – Влияние исследуемых факторов на образование агрегатов БСА, оптическая плотность проб при длине волны 405 нм, абсолютные значения ($M \pm SEM$)

Фактор глюкозы	Фактор катиона металла						
	Нет	Никель (II)	Кобальт (II)	Железо (II)	Медь (II)	Железо (III)	Цинк (II)
Глюкоза	0,06±0,0004	0,06±0,0006	0,06±0,0020	0,19±0,0021 *****	1,08±0,0122 *****	0,37±0,0188 ****	0,65±0,0236 *****
Без глюкозы	0,05±0,0004	0,06±0,0007	0,05±0,0007	0,06±0,0007	0,18±0,0036 ****	0,4±0,0090 ****	1,02±0,0180 ****

Примечание: уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без металла (**** соответствует $p < 0,0001$; *** соответствует $p < 0,001$; ** соответствует $p < 0,01$; * соответствует $p < 0,05$). Уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без глюкозы: ##### соответствует $p < 0,0001$; #### соответствует $p < 0,001$; ### соответствует $p < 0,01$; # соответствует $p < 0,05$ (two-way ANOVA, пост-тест Тьюки)

Таблица 3 – Влияние исследуемых факторов на амилоидную трансформацию БСА, интенсивность флуоресцентной эмиссии ThT при длинах волн возбуждения/испускания 450/482 нм, абсолютные значения ($M \pm SEM$)

Фактор глюкозы	Фактор катиона металла						
	Нет	Никель (II)	Кобальт (II)	Железо (II)	Медь (II)	Железо (III)	Цинк (II)
Глюкоза	6051,0±320,2 ####	7954,2±391,5 *****	5740,8±283,3 ####	6083,4±241,7 ####	18277,3±792,1 *****	2704,8±190,4 *****	13415,2±238,7 *****
Без глюкозы	11693,8±280,2	13841,6±109,3 **	9695,4±132,0 **	10887,6±157,8	16304,8±335,2 ****	7266,0±257,3 ****	17900,0±672,5 ****

Примечание: уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без металла (**** соответствует $p < 0,0001$; *** соответствует $p < 0,001$; ** соответствует $p < 0,01$; * соответствует $p < 0,05$). Уровень значимости p при сравнении с соответствующими пробами без глюкозы (##### соответствует $p < 0,0001$; #### соответствует $p < 0,001$; ### соответствует $p < 0,01$; # соответствует $p < 0,05$ (two-way ANOVA, пост-тест Тьюки).

Влияние d-металлов на интенсивность образования КПГ в реакции гликирования

Интенсивность флуоресценции при длинах волн, характерных для различных КПГ, отражает интенсивность протекания реакции гликирования. Как и ожидалось, во всех случаях в глюкоза-содержащих пробах установлен прирост интенсивности флуоресценции КПГ в сравнении с соответствующими пробами без глюкозы (табл.1). Однако обращают на себя внимание различия в характере и степени влияния катионов d-металлов на реакцию гликирования. При сравнении интенсивностей флуоресценции КПГ металлсодержащих проб, в которых протекало гликирование, с показателями соответствующих проб без металлов установлено, что только катионы меди (II) (при всех длинах волн возбуждения/испускания, кроме 335/385 нм) и цинка (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 440/520 нм) обладали способностью усиливать образование КПГ. Остальные металлы, напротив, или со статистической значимостью препятствовали нарастанию флуоресценции при длинах волн, характерных для КПГ, или не изменяли значений показателя. При длинах волн, характерных для пентозидина (335/385 нм), ни один металл не оказался способным интенсифицировать образование КПГ в сравнении с пробами без металлов. В то же время никель (II), кобальт (II), железо (II) и железо (III) оказались способными снижать интенсивность сигнала, определяемого на данных длинах волн. Установленная активность позволяет выделить медь (II) и цинк (II) в разряд d-металлов, способных ускорять

протекание гликирования в описываемых условиях. Суммарные результаты представлены в таблице 1.

В отсутствие глюкозы незначительный прирост флуоресценции наблюдался при действии на альбумин катионов меди (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 379/463 нм) и цинка (II) (при длинах волн возбуждения/испускания 345/405 нм, 366/442 нм, 379/463 нм и 440/520 нм). Частично подобный эффект, как и способность железа (III) снижать интенсивность флуоресценции при длинах волн возбуждения/испускания, характерных для КПГ, может быть связан с действием на остаточные количества глюкозы, присутствие которой, вероятно, объяснимо технологией получения альбумина. В то же время, было показано, что в идентичной тест-системе присутствие катионов цинка также ведет к появлению флуоресценции при длинах волн 320/438 нм, обусловленной координированием (или комплексованием) катионов цинка аминокислотными остатками в различных сайтах альбумина [47], что в нашем случае позволяет предположить формирование координационных структур, аналогичных ранее описанным в работе Wu F.-Y. и соавторов [47]. В случае меди возможность ее взаимодействия с остатком лизина с образованием продукта, флуоресцирующего при длинах волн 370/440 нм, рассмотрена в работе Zhang M. и соавторов [48]. Приведенные сведения не исключают возможности образования иных продуктов, связанных со специфическим воздействием иона металла на белок и значимых для рассматриваемых в статье патогенезов.

Влияние d-металлов на агрегацию и амилоидную трансформацию БСА

Из данных литературы известно, что катионы переходных металлов (медь (II), железо (III)) способны стимулировать амилоидную трансформацию белков [10, 49]. Интерес представляет изучение влияния реакции гликирования на данное свойство металлов. Исследование оптической плотности реакционной среды при длине волны 405 нм используется для оценки кинетики образования белковых агрегатов при моделировании амилоидной трансформации [45]. Полученный в ходе настоящего исследования результат подтверждает способность некоторых из исследованных d-металлов (в ходе реакции гликирования и/или независимо) стимулировать агрегацию БСА. Результаты представлены в таблице 2.

Рассматривая собственную (независимую от гликирования) способность исследуемых d-металлов вызывать агрегацию БСА, следует отметить, что активность металлов можно расположить по возрастанию: никель (II) (не активен) = кобальт (II) (не активен) = железо (II) (не активен) < медь (II) < железо (III) < цинк (II) (табл. 2).

Протекание гликирования в среде без металлов не приводило к статистически значимой агрегации БСА. При этом гликирование влияло на способность некоторых катионов вызывать агрегацию БСА. Катионы никеля (II) и кобальта (II) не вызывали агрегации БСА ни самостоятельно, ни в присутствии глюкозы. Способность усиливать агрегацию БСА только в присутствии глюкозы, но не без нее, установлена для катионов железа (II). Для меди (II), железа (III) и цинка (II) агрегация БСА наблюдалась как в отсутствии глюкозы (вследствие собственной активности), так и при действии катионов на фоне реакции гликирования. В случае меди (II) интенсивность агрегации была выше в пробах с глюкозой, для железа (III) – результат одинаков для глюкоза-содержащих и безглюкозных проб, а в случае цинка (II) интенсивность агрегации была выше в пробах, не содержащих глюкозы.

Для исследованных катионов металлов наблюдается рассогласование между способностью влиять на образование КПГ в реакции гликирования и способностью стимулировать агрегацию БСА. Так, в присутствии глюкозы железо (II) и железо (III), вызывая агрегацию (табл. 2), не стимулируют образование КПГ (табл.1). Способность этих катионов к агрегации БСА не зависит от образования КПГ, а в случае железа (II) – не зависит от образования КПГ, но очевидно связана с присутствием глюкозы. В то же время при проведении корреляционного анализа по Спирмену установлена статистически значимая обратная корреляция между способностью ионов металлов агрегировать БСА в гликированных пробах и интенсивностью флуоресценции аминокислот тирозин и триптофан, при длинах волн 270/330 нм, специфичных для обеих аминокислот ($r = -0,85$, $p = 0,03$), и 295/335 нм, более специфичных для триптофана ($r = -0,93$, $p = 0,01$).

Параллельно изучению агрегации БСА, пробы были исследованы на предмет амилоидной принадлежности агрегатов в реакции с тиюфлавином Т (ThT) – амилоид-специфичным агентом. Обращает на себя внимание более выраженная амилоидная трансформация БСА в безглюкозных пробах по сравнению с глюкоза-содержащими во всех случаях, кроме протекания реакции в присутствии меди (II). Медь (II) стимулирует амилоидную трансформацию БСА в присутствии глюкозы интенсивнее, чем без нее (табл. 3). В отношении остальных металлов и реакционной среды без таковых равномерно повышенная интенсивность флуоресценции ThT в безглюкозных пробах в сравнении с соответствующими им глюкоза-содержащими пробами указывает на то, что в описанных экспериментальных условиях гликирование препятствует амилоидной трансформации БСА. В то же время статистически значимая более высокая интенсивность флуоресценции ThT в пробах, гликированных в присутствии катионов меди (II), указывает на взаимное усиливающее действие факторов глюкозы и меди на интенсивность амилоидной трансформации (табл. 3). Из результата следует, что медь проявила как независимую от гликирования способность стимулировать амилоидную трансформацию БСА, так и нивелировала способность протекающей реакции гликирования замедлять таковую.

При оценке влияния фактора присутствия катионов каждого элемента на амилоидную трансформацию БСА установлено, что как в глюкозных, так и в безглюкозных пробах усиливают данный процесс катионы меди (II) и цинка (II) (в наибольшей степени), а также никеля (II) (в наименьшей степени). Катионы кобальта (II) незначительно подавляют реакцию (статистически значимо только в отсутствии глюкозы), а катионы железа (II) оказались неактивными. Для железа (III) установлена способность снижать флуоресценцию ThT как в глюкоза-содержащих, так и в безглюкозных пробах. Способность меди и цинка трансформировать белки в амилоидную форму ранее была неоднократно описана. Полученные нами неожиданные результаты в отношении слабой активности никеля согласуются с недавно установленной ролью никеля в образовании человеческого β -амилоида [24].

ОБСУЖДЕНИЕ

В результате исследования установлено, что при отсутствии металлов реакция гликирования не влияет на интенсивность флуоресценции тирозина и триптофана (интенсивность флуоресценции гликированных и негликированных проб одинакова). Однако гликирование может усиливать способность металлов подавлять флуоресценцию данных аминокислот. В случае тирозина, возможный механизм снижения его флуоресценции описан для реакции коллагена с рибозо-5-фосфатом [41], и может быть связан с такими событиями, как гликирование аминокислот, расположенных в пространственной близости от тирозина (что

приводит к гашению его флуоресценции), изменение пространственной организации белка (что приводит к гашению флуоресценции тирозина), вступление в реакцию самого тирозина (не ожидается, что тирозин будет напрямую взаимодействовать с гликирующим агентом, но участие в реакции близлежащих остатков лизина или аргинина может привести к активации тирозина и последующему его гликированию или окислению). В то же время, для триптофана показано, что при протекании гликирования его остаток может окисляться [44], и этот процесс может усиливаться в присутствии меди (II) [42]. Так, снижение интенсивности флуоресценции триптофана в ходе реакции гликирования в присутствии меди (II) обусловлено как окислением остатка аминокислоты, так и изменением конформации белка [42]. Резюмируя сказанное, можно полагать, что d-металлы, способные более интенсивно подавлять флуоресценцию тирозина и/или триптофана в ходе гликирования, проявляют активность, влияя на указанные механизмы.

Известно, что способность некоторых d-металлов ускорять образование КПГ в реакции гликирования связана со стимулированием ими окислительных реакций. Это свойство характерно для таких металлов, как медь, а реакция, протекающая при их участии, именуются реакцией гликоксидации [20]. Так, роль меди (II) в протекании гликоксидации, предположительно, заключается в катализе переноса электронов от ендигенов, образуемых из восстановленных моносахаридов или при фрагментации оснований Шиффа и продуктов Амадори, что приводит к образованию активных форм кислорода и дикарбонильных соединений. В этих реакциях медь (II), вероятно, восстанавливается до меди (I), а кислород преобразуется в супероксид-анион при участии перекиси водорода, источником которой служат некоторые этапы гликирования. Затем ионы меди (I) окисляются до меди (II), катализируя разложение перекиси водорода до гидроксил-радикала. С учетом этого можно заключить, что интенсификация реакции гликирования в присутствии некоторых исследованных нами переходных металлов может происходить по описанному механизму гликоксидации.

Особый интерес представляет анализ активности цинка как металла, не относящегося к переходным, но являющегося d-металлом. Согласно представлению о механизме гликоксидации при участии меди (II), для протекания реакции необходимо, чтобы ион металла был способен к изменению степени окисления. Ион цинка имеет постоянную степень окисления, однако он оказался способен слабо повышать интенсивность флуоресценции при некоторых длинах волн возбуждения/испускания, характерных для КПГ. Согласно данным литературы [50], цинк может проявлять антигликирующие, антиоксидантные и антиапоптотические свойства, а его дефицит может способствовать ускоренному образованию КПГ. Однако согласно исследованиям Zhuang X. и соавторов [51], в реакции гликирования, протекающей *in vitro*, цинк (II) способен усиливать образование флуорес-

цирующих КПГ, что согласуется с полученными нами результатами. По данным того же исследования [51] переходный металл марганец проявляет способность подавлять образование КПГ подобно тому, как это описано для никеля, кобальта и железа, также, относящихся к переходным металлам. Все это указывает на то, что принадлежность металла к переходным и способность его иона к изменению степени окисления, вероятно, не является необходимым и достаточным условием для ускорения реакции гликирования. Также это указывает на уникальность свойств цинка в ряду изученных металлов.

Обобщая результаты исследования о влиянии d-металлов на флуоресценцию аминокислот тирозина и триптофана и о влиянии d-металлов на реакцию гликирования, можно сделать предположение о том, что механизмы влияния металлов на оба процесса различаются (по меньшей мере, имеются компоненты активности, связанные с влиянием только на один процесс). Результаты позволяют сделать предположение о дополнительном, обусловленном фактором гликирования (не ограниченном собственным действием иона металла) механизме повреждения тирозина и/или триптофана, проявляющемся в ходе протекания реакции в присутствии катионов меди (II), железа (II), цинка (II) и, возможно, никеля (II). При этом повышение интенсивности флуоресценции при длинах волн, характерных для КПГ, расцениваемое как интенсификация реакции гликирования, отмечено только при протекании гликирования в присутствии катионов меди (II) (в большей степени) и цинка (II) (в меньшей степени).

Обсуждая результаты изучения агрегации альбумина, следует отметить, что согласно данным литературы [43], одним из факторов патогенетического действия катионов меди (II) при болезни Альцгеймера является ее участие в формировании димеров амилоидов, связанных дитирозиновыми сшивками. Это согласуется с наблюдаемым в настоящем исследовании интенсивным подавлением флуоресценции аминокислот в присутствии меди, а также с наличием статистически значимой обратной корреляции интенсивности флуоресценции этих аминокислот и степени агрегации БСА для исследованных катионов. Таким образом, снижение интенсивности флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин в присутствии ионов d-металлов, очевидно, сопровождает процесс агрегации БСА. С наибольшей интенсивностью агрегация БСА протекала в присутствии ионов, показавших способность усиливать образование КПГ (медь, цинк).

Как сказано выше, амилоидная трансформация белка при гликировании зависит от многих факторов, и, в частности, от типа белка. Так, согласно данным литературы, усиление амилоидной трансформации наблюдается при гликировании альбумина (бычьего и человеческого), Аβ-белка, β2 микροглобулина и др. В противоположность этому способность α-синуклеина к образованию амилоидных фибрилл после воздействия на него гликирующим агентом метилг-

лиоксалем была сниженной, и полученные агрегаты имели характер расплавленной глобулы [52]. Согласно полученным нами результатам, гликирование в описанных экспериментальных условиях препятствует образованию ThT-чувствительных форм амилоида. Подобный результат наблюдается при протекании гликирования в присутствии никеля (II), кобальта (II), железа (II), железа (III) и цинка (II), но не меди (II), проявившей способность усиливать амилоидную трансформацию и агрегацию БСА. Banerjee S. описывает снижение интенсивности амилоидной трансформации лизоцима куриного белка после воздействия на белок метилглиоксалем. Основываясь на данном результате, автор выдвигает спорное предположение о том, что карбонильные соединения могут быть использованы в фармакологических целях [53]. Несмотря на сомнительность терапевтического использования карбонильных соединений, данное исследование и подобные ему подтверждают тот факт, что гликирование способно не только потенцировать амилоидную трансформацию [13], но и препятствовать ей [13, 53]. В то же время известно, что замедление амилоидной трансформации под действием гликирования может быть связано продлением времени пребывания амилоида в олигомерной форме – форме, имеющей наивысшую цитотоксичность. Последнее нивелирует потенциальную полезность замедления амилоидной трансформации под действием гликирования. Согласно данным литературы [54, 55], ThT может не выявлять образования олигомерных форм амилоида, в отличие от иных форм (мономеры, фибриллы). Можно выдвинуть предположение о том, что сравнительно меньшая интенсивность флуоресценции ThT в пробах, гликированных в присутствии всех ионов d-металлов за исключением меди (II), соотносится с возможностью замедления реакции на стадии образования олигомеров, что, однако, будет являться предметом дальнейших исследований. Для гликирования в присутствии меди (II) подобное свойство установлено не было.

Очевидно, что при оценке полученных результатов следует учитывать все условия протекания эксперимента (не только факторы гликирования и присутствия металла, но и нагревание, состав и pH

реакционной среды и др.). Можно полагать, что неучтенные факторы также могут влиять на способность альбумина претерпевать амилоидную трансформацию при гликировании, и в иных условиях протекание реакции может приводить к иному результату. Таким образом, для всесторонней оценки способности гликирования влиять на амилоидную трансформацию следует учитывать способность белка трансформироваться в амилоидную форму в различных экспериментальных условиях (различные значения pH, температуры, ионной силы буферного раствора и др.), включая проведение исследований в условиях, близких к физиологическим.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведения исследований было показано, что протекание реакции гликирования влияет на амилоидную трансформацию БСА, а в присутствии ионов d-металлов оказывает влияние на способность некоторых из них вызывать агрегацию и амилоидную трансформацию. Катионы меди (II) в описанных экспериментальных условиях оказались единственными способными усиливать образование КППГ, глюкоза-опосредованно и глюкоза-независимо снижать интенсивность флуоресценции аминокислот триптофан и тирозин, вызывать агрегацию и амилоидную трансформацию БСА. Ионы прочих металлов проявляли данные эффекты лишь частично, в различных сочетаниях. Это позволяет выдвинуть предположение о том, что в ряду ионов d-металлов, таких как никель (II), кобальт (II), железо (II), железо (III), медь (II) и цинк (II), только ионы меди (II), вероятно, выступают наиболее значимым фактором усиления амилоидной трансформации и агрегации БСА, и являются наиболее активным катализатором образования КППГ в реакции гликирования. Таким образом, мы полагаем, что данный элемент является перспективной мишенью для разработки методов фармакологического контроля патологических состояний, связанных со всеми рассмотренными процессами – гликированием, агрегацией и амилоидной трансформацией белков (поздние осложнения сахарного диабета, включая диабетическую энцефалопатию, конформационные болезни мозга и др.).

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа проведена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых – кандидатов наук МК-1887.2020.7.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Р.А. Литвинов – разработка идеи исследования, планирование, подготовка и написание текста публикации, организация и контроль проведения исследования на всех его этапах; А.В. Гонтарева – постановка и проведение реакции гликирования, подготовка реагентов, получение первичных данных; Л.Э. Усминова – постановка и проведение реакции гликирования, подготовка реагентов, получение первичных данных; Д.Р. Клименко – подготовка реагентов, статистическая обработка первичных данных, коррективная работа публикации на этапе ее подготовки, работа с источниками литературы.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Perrone A., Giovino A., Benny J., Martinelli F. Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects // *Oxid Med Cell Longev.* – 2020. – Vol. 2020. – Art. No.3818196. DOI: 10.1155/2020/3818196.
- Chaudhuri J., Bains Y., Guha S., Kahn A., Hall D., Bose N., Gugliucci A., Kapahi P. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality // *Cell Metab.* – 2018. – Vol. 28, No.3. – P. 337–352. DOI: 10.1016/j.cmet.2018.08.014.
- Yu L., Chen Y., Xu Y., He T., Wei Y., He R. D-ribose is elevated in T1DM patients and can be involved in the onset of encephalopathy // *Aging (Albany NY).* – 2019. – Vol. 11, No.14. – P. 4943–4969. DOI: 10.18632/aging.102089.
- Akhter F., Chen D., Akhter A., Sosunov A.A., Chen A., McKhann G.M., Yan S.F., Yan S.S.D. High Dietary Advanced Glycation End Products Impair Mitochondrial and Cognitive Function // *J Alzheimers Dis.* – 2020. – Vol. 76, No.1. – P. 165–178. DOI: 10.3233/JAD-191236.
- Vitek M., Bhattacharya K., Glendening J., Stopa E., Vlassara H., Bucala R., Manogue K., Cerami A. Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1994. – Vol. 91, No.11. – P. 4766–4770. DOI: 10.1073/pnas.91.11.4766.
- König A., Vicente M.H., Outeiro T.F. Alpha-Synuclein Glycation and the Action of Anti-Diabetic Agents in Parkinson's Disease // *J Parkinsons Dis.* – 2018. – Vol. 8, No.1. – P. 33–43. DOI: 10.3233/JPD-171285.
- Gan W.J., Gao C.L., Zhang W.Q., Gu J.L., Zhao T.T., Guo H.L., Zhou H., Xu Y., Yu L.L., Li L.F., Gui D.K., Xu Y.H. Kuwanon G protects HT22 cells from advanced glycation end product-induced damage // *Exp Ther Med.* – 2021. – Vol. 21, No.5. – Art. No.425. DOI: 10.3892/etm.2021.9869.
- Kong Y., Wang F., Wang J., Liu C., Zhou Y., Xu Z., Zhang C., Sun B., Guan Y. Pathological Mechanisms Linking Diabetes Mellitus and Alzheimer's Disease: the Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) // *Front. Aging Neurosci.* – 2020. – Vol. 12. – Art. No.217. DOI: 10.3389/fnagi.2020.00217.
- Yan S.S., Chen D., Yan S., Guo L., Du H., Chen J.X. RAGE is a key cellular target for Abeta-induced perturbation in Alzheimer's disease // *Front Biosci (Schol Ed).* – 2012. – Vol. 4. – P. 240–250. DOI: 10.2741/265.
- Kim D.K., Song J.W., Park J.D., Choi B.S. Copper induces the accumulation of amyloid-beta in the brain // *Mol. Cell. Toxicol.* – 2013. – Vol. 9. – P. 57–66. DOI: 10.1007/s13273-013-0009-0.
- Piras S., Furfaro A.L., Domenicotti C., Traverso N., Marinari U.M., Pronzato M.A., Nitti M. RAGE Expression and ROS Generation in Neurons: Differentiation versus Damage // *Oxid Med Cell Longev.* – 2016. – Vol. 2016. – Art. No.9348651. DOI: 10.1155/2016/9348651.
- Li X.-H., Du L.-L., Cheng X.-S., Jiang X., Zhang Y., Lv B.-L., Liu R., Wang J.-Z., Zhou X.-W. Glycation exacerbates the neuronal toxicity of β -amyloid // *Cell Death Dis.* – 2013. – Vol. 4, No.6. – e673. DOI: 10.1038/cddis.2013.180.
- Iannuzzi C., Irace G., Sirangelo I. Role of glycation in amyloid: Effect on the aggregation process and cytotoxicity // *IntechOpen* – 2016. – 165 p. DOI: 10.5772/62995.
- Sirangelo I., Iannuzzi C. Understanding the Role of Protein Glycation in the Amyloid Aggregation Process // *Int J Mol Sci.* – 2021. – Vol. 22, No.12. – Art. No. 6609. DOI: 10.3390/ijms22126609.
- Milordini G., Zacco E., Percival M., Puglisi R., Dal Piaz F., Temussi P., Pastore A. The Role of Glycation on the Aggregation Properties of IAPP // *Front Mol Biosci.* – 2020. – Vol. 7. – Art. No. 104. DOI: 10.3389/fmolb.2020.00104.
- Emendato A., Milordini G., Zacco E., Sicorello A., Dal Piaz F., Guerrini R., Thorogate R., Picone D., Pastore A. Glycation affects fibril formation of A β peptides // *J Biol Chem.* – 2018. – Vol. 293, No.34. – P. 13100–13111. DOI: 10.1074/jbc.RA118.002275.
- Bhuiyan M.N., Mitsuhashi S., Sigetomi K., Ubukata M. Quercetin inhibits advanced glycation end product formation via chelating metal ions, trapping methylglyoxal, and trapping reactive oxygen species // *Biosci Biotechnol Biochem.* – 2017. – Vol. 81, No.5. – P. 882–890. DOI: 10.1080/09168451.2017.1282805.
- Wu Q., Li S.Y., Yang T., Xiao J., Chua Q.M., Li T., Xie B.J., Sun Z.D. Inhibitory effect of lotus seedpod oligomeric procyanidins on advanced glycation end product formation in a lactose-lysine model system // *Electronic Journal of Biotechnology.* – 2015. – Vol. 18, No.2. – P. 68–76. DOI: 10.1016/j.ejbt.2014.10.005.
- Clayton P.T. Inherited disorders of transition metal metabolism: an update // *J Inherit Metab Dis.* – 2017. – Vol. 40, No.4. – P. 519–529. DOI: 10.1007/s10545-017-0030-x.
- Serban A.I., Condac E., Costache M., Dinischiotu A. The relationship between ages, Cu²⁺ and crosslinking of collagen // *Revue Roumaine de Chimie.* – 2009. – Vol. 54, No.1. – P. 93–101.
- Bavkar L.N., Patil R.S., Rooge S.B., Nalawade M.L., Arvindekar A.U. Acceleration of protein glycation by oxidative stress and comparative role of antioxidant and protein glycation inhibitor // *Mol Cell Biochem.* – 2019. – Vol. 459. – P. 61–71. DOI: 10.1007/s11010-019-03550-7.
- Sadakane Y., Kawahara M. Implications of Metal Binding and Asparagine Deamidation for Amyloid Formation // *Int J Mol Sci.* – 2018. – Vol. 19, No.8. – Art. No. 2449. DOI:10.3390/ijms19082449.
- Xu Y., Xiao G., Liu L., Lang M. Zinc transporters in Alzheimer's disease // *Mol Brain.* – 2019. – Vol. 12. – Art. No. 106. DOI: 10.1186/s13041-019-0528-2.
- Benoit S.L., Maier R.J. The nickel-chelator dimethylglyoxime inhibits human amyloid beta peptide in vitro aggregation // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 11, No.1. – Art. No. 6622. DOI: 10.1038/s41598-021-86060-1.
- Lovell M.A., Robertson J.D., Teesdale W.J., Campbell J.L., Markesbery W.R. Copper, iron and zinc in Alzheimer's disease senile plaques // *J Neurol Sci.* – 1998. – Vol. 158. – P. 47–52. DOI: 10.1016/S0022-510X(98)00092-6.
- de la Arada I., Seiler C., Mäntele W. Amyloid fibril formation from human and bovine serum albumin followed by quasi-simultaneous Fourier-transform infrared (FT-IR) spectroscopy and static light scattering (SLS) // *Eur Biophys J.* – 2012. – Vol. 41, No.11. – P. 931–938. DOI: 10.1007/s00249-012-0845-1.
- Holm N.K., Jespersen S.K., Thomassen L.V., Wolff T.Y., Sehgal P., Thomsen L.A., Christiansen G., Andersen C.B., Knudsen A.D., Otzen D.E. Aggregation and fibrillation of bovine serum albumin // *Biochim Biophys Acta.* – 2007. – Vol. 1774, No.9. – P. 1128–1138. DOI: 10.1016/j.bbapap.2007.06.008.
- Ma X.J., Zhang Y.J., Zeng C.M. Inhibition of Amyloid Aggregation of Bovine Serum Albumin by Sodium Dodecyl Sulfate at Submicellar Concentrations // *Biochemistry (Mosc).* – 2018. – Vol. 83, No.1. – P. 60–68. DOI: 10.1134/S000629791801008X.
- Литвинов Р.А., Косолапов В.А., Муравьева Е.А., Скачко И.В., Шамшина Д.Д. Модифицированный метод изучения реакции гликоксидации // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* – 2020. – Т. 2, № 74. – С. 61–66.
- Литвинов Р.А., Усмирянова Л.Э., Клименко Д.Р., Гонтарева А.В. Парадоксальная активность аминоксидина в модели гликоксидации в присутствии катионов Cu(II) // *Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.* – 2020. – № 3 (75). – С. 159–165.
- Ramirez Segovia A.S., Wrobel K., Acevedo Aguilar F.J., Corrales Escobosa A.R., Wrobel K. Effect of Cu(II) on in vitro glycation of human serum albumin by methylglyoxal: a LC-MS-based proteomic approach // *Metallomics.* – 2017. – 9(2). – P. 132–140. DOI: 10.1039/c6mt00235h.
- Michalska-Mosiej M., Socha K., Soroczyńska J., Karpińska E., Łazarczyk B., Borawska M.H. Selenium, Zinc, Copper, and Total Antioxidant Status in the Serum of Patients with Chronic Tonsillitis // *Biol Trace Elem Res.* – 2016. – Vol. 173, No.1. – P. 30–34. DOI:10.1007/s12011-016-0634-2.

33. Shanmugam G., Polavarapu P.L. Vibrational circular dichroism spectra of protein films: thermal denaturation of bovine serum albumin // *Biophys Chem.* – 2004. – Vol. 111, No.1. – P. 73–77. DOI: 10.1016/j.bpc.2004.04.005.
34. Chebotareva N.A., Roman S.G., Borzova V.A., Eronina T.B., Mikhaylova V.V., Kurganov B.I. Chaperone-Like Activity of HSPB5: The Effects of Quaternary Structure Dynamics and Crowding. // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, No.14. – Art. No.4940. DOI: 10.3390/ijms21144940.
35. Séro L., Sanguinet L., Blanchard P., Dang B.T., Morel S., Richomme P., Séraphin D., Derbré S. Tuning a 96-well microtiter plate fluorescence-based assay to identify AGE inhibitors in crude plant extracts // *Molecules.* – 2013. – Vol. 18, No.11. – P. 14320–14339. DOI: 10.3390/molecules181114320.
36. Beisswenger P.J., Howell S., Mackenzie T., Corstjens H., Muizzuddin N., Matsui M.S. Two fluorescent wavelengths, 440(ex)/520(em) nm and 370(ex)/440(em) nm, reflect advanced glycation and oxidation end products in human skin without diabetes // *Diabetes Technol Ther.* – 2012. – Vol. 14, No.3. – P. 285–292. DOI: 10.1089/dia.2011.0108.
37. Zhang Y., Baloglu F.K., Ziemer L.E.H., Liu Z., Lyu B., Arendt L.M., Georgakoudi I. Factors associated with obesity alter matrix remodeling in breast cancer tissues // *J Biomed Opt.* – 2020. – Vol. 25, No.1. – P. 1–14. DOI: 10.1117/1.JBO.25.1.014513.
38. Oto N., Oshita S., Makino Y., Kawagoe Y., Sugiyama J., Yoshimura M. Non-destructive evaluation of ATP content and plate count on pork meat surface by fluorescence spectroscopy // *Meat Sci.* – 2013. – Vol. 93, No.3. – P. 579–585. DOI: 10.1016/j.meatsci.2012.11.010.
39. Yang H., Xiao X., Zhao X., Wu Y. Intrinsic fluorescence spectra of tryptophan, tyrosine and phenylalanine // *Selected Papers of the Chinese Society for Optical Engineering Conferences held October and November 2016.* – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Vol. 10255. – 102554M. DOI: 10.1117/12.2268397.
40. Lakowicz J.R. *Protein Fluorescence. Principles of Fluorescence Spectroscopy.* Springer, Boston, MA. (2006). DOI: 10.1007/978-0-387-46312-4_16.
41. Bansode S., Bashtanova U., Li R., Clark J., Müller K.H., Puzkarska A., Goldberga I., Chetwood H.H., Reid D.G., Colwell L.J., Skepper J.N., Shanahan C.M., Schitter G., Mesquida P., Duer M.J. Glycation changes molecular organization and charge distribution in type I collagen fibrils // *Sci Rep.* – 2021. – Vol. 10. – Art. No. 3397. DOI: 10.1038/s41598-020-60250-9.
42. Hunt J.V., Wolff S.P. Oxidative glycation and free radical production: a causal mechanism of diabetic complications // *Free Radic Res Commun.* – 1991. – Vol. 12–13. – P. 115–123. DOI: 10.3109/10715769109145775.
43. Ejaz H.W., Wang W., Lang M. Copper Toxicity Links to Pathogenesis of Alzheimer's Disease and Therapeutics Approaches // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21, No.20. – Art. No. 7660. DOI: 10.3390/ijms21207660.
44. Chetyrkin S.V., Mathis M.E., Ham A.J., Hachey D.L., Hudson B.G., Voziyan P.A. Propagation of protein glycation damage involves modification of tryptophan residues via reactive oxygen species: inhibition by pyridoxamine // *Free Radic Biol Med.* – 2008. – Vol. 44, No.7. – P. 1276–1285. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2007.09.016.
45. Wang S.S., Chen Y.T., Chou S.W. Inhibition of amyloid fibril formation of beta-amyloid peptides via the amphiphilic surfactants // *Biochim Biophys Acta.* – 2005. – Vol. 1741, No.3. – P. 307–313. DOI: 10.1016/j.bbdis.2005.05.004.
46. Khurana R., Coleman C., Ionescu-Zanetti C., Carter S.A., Krishna V., Grover R.K., Roy R., Singh S. Mechanism of thioflavin T binding to amyloid fibrils // *J Struct Biol.* – 2005. – Vol. 151, No.3. – P. 229–238. DOI: 10.1016/j.jsb.2005.06.006.
47. Wu F.Y., Zhang L.N., Ji Z.J., Wan X.F. Spectroscopic investigation of the interaction between thiourea-zinc complex and serum albumin // *Journal of Luminescence.* – 2010. – Vol. 130. – P. 1280–1284.
48. Zhang M., Qiao J., Zhang S., Qi L. Copper nanoclusters as probes for turn-on fluorescence sensing of L-lysine // *Talanta.* – 2018. – Vol. 182. – P. 595–599. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.02.035.
49. Tahmasebinia F., Emadi S. Effect of metal chelators on the aggregation of beta-amyloid peptides in the presence of copper and iron // *Biometals.* – 2017. – Vol. 30, No.2. – P. 285–293. DOI: 10.1007/s10534-017-0005-2.
50. Kheirouri S., Alizadeh M., Maleki V. Zinc against advanced glycation end products // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2018. – Vol. 45, No.6. – P. 491–498. DOI: 10.1111/1440-1681.12904.
51. Zhuang X., Pang X., Zhang W., Wu W., Zhao J., Yang H., Qu W. Effects of zinc and manganese on advanced glycation end products (AGEs) formation and AGEs-mediated endothelial cell dysfunction // *Life Sci.* – 2012. – Vol. 90, No.3–4. – P. 131–139. DOI: 10.1016/j.lfs.2011.10.025.
52. Iannuzzi C., Irace G., Sirangelo I. Differential effects of glycation on protein aggregation and amyloid formation // *Front Mol Biosci.* – 2014. – Vol. 1. – Art. No. 9. DOI: 10.3389/fmolb.2014.00009.
53. Banerjee S. Effect of glyoxal and 1-methylisatin on stress-induced fibrillation of Hen Egg White Lysozyme: Insight into the anti-amyloidogenic property of the compounds with possible therapeutic implications // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020. – Vol. 165. – P. 1552–1561. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.017.
54. Persichilli C., Hill S.E., Mast J., Muschol M. Does Thioflavin-T Detect Oligomers Formed During Amyloid Fibril Assembly // *Biophysical Journal.* – 2011. – Vol. 100, No.3. (Suppl 1). – Art. No. 538A. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.12.3140.
55. Hanczyc P., Fita P. Laser Emission of Thioflavin T Uncovers Protein Aggregation in Amyloid Nucleation Phase // *ACS Photonics.* – 2021. DOI: 10.1021/acsp Photonics.1c00082.

АВТОРЫ

Литвинов Роман Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболитов лекарственных средств отдела фармакологии и биоинформатики Научного центра инновационных лекарственных средств с опытно-промышленным производством Волгоградского государственного медицинского университета; научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр». ORCID ID: 0000-0002-0162-0653. E-mail: litvinov.volggu@mail.ru

Гонтарева Арина Владимировна – студент 6-го курса, специальность «Медицинская биохимия», ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, соиспол-

нитель гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых, кандидатов наук МК-1887.2020.7. E-mail: arinaarinag@gmail.com

Усмьянова Людмила Эдуардовна – студент 6-го курса, специальность «Медицинская биохимия», ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, соисполнитель гранта Президента Российской Федерации для поддержки молодых ученых, кандидатов наук МК-1887.2020.7. E-mail: mila.getmanets@gmail.com

Клименко Дарья Романовна – студентка 4-го курса, специальность «Фармация», ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. E-mail: vip.klimenko.darya@mail.ru

УДК 615.011.5



ИЗУЧЕНИЕ АНТИМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ НОВЫХ ХИНАЗОЛИН-4(3Н)-ОНОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* И *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

М.А. Сомотруева¹, А.А. Озеров^{2,4}, А.А. Старикова¹, Н.М. Габитова^{1,3},
Д.В. Мережкина², А.А. Цибизова¹, И.Н. Тюренков^{2,4}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Астраханский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
414000, Россия, г. Астрахань, ул. Бакинская, 121

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»

Министерства здравоохранения Российской Федерации
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт
по изучению лепры» Министерства здравоохранения Российской Федерации
414057, Россия, г. Астрахань, пр. Николая Островского, 3

⁴ Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр»
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

E-mail: alhimik.83@mail.ru

Получено 08.01.2021

Принята к печати 29.08.2021

Производные хиназолин-4(3Н)-она, проявляющие широкий спектр фармакологической активности, представляют перспективный класс веществ, используемых для получения антибактериальных средств, что особенно актуально в условиях возникновения резистентности патогенных микроорганизмов к используемым в медицине лекарственным препаратам. Доказано, что соединения, имеющие в молекуле нафтильный радикал, а также амидную группу, связанную с бензольным кольцом, в качестве заместителей хиназолинона, характеризуются выраженной противомикробной активностью в отношении *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*.

Цель. Первичный микробиологический скрининг антимикробной активности *in vitro* новых производных хиназолин-4(3Н)-она по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, а также оценка взаимосвязи между проявляемым фармакологическим действием и структурным преобразованием молекулы вещества, липофильностью и возможностью формирования устойчивости к ним.

Материалы и методы. Экспериментальные исследования были выполнены с использованием общеизвестных нозокомиальных возбудителей инфекционно-воспалительных заболеваний *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* методом серийных разведений.

Результаты. Соединение, содержащее в структуре нафтильный радикал, вносящий вклад в увеличение гидрофобности вещества и его растворимости в мембране бактериальной клетки, обладает бактериостатическим действием как в отношении *Staphylococcus aureus*, так и к *Streptococcus pneumoniae*. Сходный фармакологический эффект проявляет производное с амидной группой в качестве заместителя хиназолинонового ядра, связанной с фенильным радикалом, которая, вероятно, способствует увеличению степени связывания с активными сайтами ферментов, принимающих участие в процессах репликации ДНК и синтеза белков. Очевидно, повышенная липофильность, способствующая лучшему связыванию с белком оттока, не может служить объективной характеристикой возможности возникновения резистентности патогенов к данному веществу.

Заключение. Среди синтезированных соединений были выявлены вещества-лидеры, проявляющее антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. Оценка химического строения позволила обосновать их фармакологическое действие и сделать выводы о возможности развития устойчивости к нему у микробных клеток.

Для цитирования: М.А. Сомотруева, А.А. Озеров, А.А. Старикова, Н.М. Габитова, Д.В. Мережкина, А.А. Цибизова, И.Н. Тюренков. Изучение антимикробной активности новых хиназолин-4(3Н)-онов по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*. *Фармация и фармакология*. 2021;9(4):318-329. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329

© М.А. Сомотруева, А.А. Озеров, А.А. Старикова, Н.М. Габитова, Д.В. Мережкина, А.А. Цибизова, И.Н. Тюренков, 2021

For citation: M.A. Somotrueva, A.A. Ozerov, A.A. Starikova, N.M. Gabitova, D.V. Merezhkina, A.A. Tsbizova, I.N. Tyurenkov. Antimicrobial activity study of new quinazolin-4(3h)-ones against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. *Pharmacy & Pharmacology*. 2021;9(4):318-329. DOI: 10.19163/2307-9266-2021-9-4-318-329

Ключевые слова: производные хиназолинона; антимикробная активность; соединение-лидер; электронодонорные центры; активный сайт фермента; минимальная подавляющая концентрация; минимальная ингибирующая концентрация; бактериостатическое действие; бактерицидная активность; резистентность; АТФ-зависимый эффлюксный насос; плазмиды; транспозоны; большой мобильный элемент

Список сокращений: PBP – пенициллин-связывающий белок; MRSA – метициллин – резистентный *Staphylococcus aureus*; PBP2a – пенициллин-связывающий белок 2a; АТФ – аденозинтрифосфат, МПК – минимальная подавляющая концентрация; ДМСО – диметилсульфоксид; ДМФА – диметилформамид; МПБ – мясопептонный бульон; МПА – мясопептонный агар; АК – атипичные колонии; ТК – типичные колонии; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; ТСХ – тонкослойная хроматография; НК – нуклеиновая кислота; FnBPs – фибронектин-связывающие белки

ANTIMICROBIAL ACTIVITY STUDY OF NEW QUINAZOLIN-4(3H)-ONES AGAINST *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* AND *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE*

M.A. Samotrueva¹, A.A. Ozerov^{2,4}, A.A. Starikova¹, N.M. Gabitova^{1,3},
D.V. Merezhkina², A.A. Tsibizova¹, I.N. Tyurenkov^{2,4}

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

² Volgograd State Medical University
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

³ Scientific Research Institute for the Study of Leprosy
3, Nikolay Ostrovsky Ave., Astrakhan, Russia, 414057

⁴ Volgograd Medical Research Center
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

E-mail: alhimik.83@mail.ru

Received 08 Jan 2021

Accepted 29 Aug 2021

Quinazolin-4(3H)-one derivatives exhibiting a wide spectrum of a pharmacological activity, represent a promising class of substances used to obtain antibacterial agents, which is especially important in the context of the emergence of pathogenic microorganisms' resistance to drugs used in medicine. It has been proved that compounds having a naphthyl radical in the molecule, as well as an amide group bound to the benzene ring as quinazolinone substituents, are characterized by a pronounced antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*.

The aim of the research is a primary microbiological screening of the *in vitro* antimicrobial activity of new quinazolin-4(3H)-one derivatives against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, as well as the assessment of the relationship between the pharmacological effect and the structural transformation of the substance molecule, lipophilicity and the possibility of forming resistance to them.

Materials and methods. The experimental studies have been carried out using well-known nosocomial pathogens of infectious and inflammatory diseases *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* by a serial dilution method.

Results. A compound containing a naphthyl radical in its structure, which contributes to an increase in the hydrophobicity of the substance and its solubility in the membrane of a bacterial cell, has a bacteriostatic effect against both *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. A similar pharmacological effect is exhibited by a derivative with an amide group as a substituent of the quinazolinone nucleus linked to a phenyl radical, which probably contributes to an increase in the degree of binding to active sites of enzymes involved in the DNA replication, and protein synthesis. Obviously, the increased lipophilicity, which promotes better binding to the efflux protein, cannot serve as objective characteristics of the emergence possibility of the pathogen's resistance to this substance.

Conclusion. Among the synthesized compounds, the leading substances that exhibit an antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, have been identified. The assessment of the chemical structure made it possible to substantiate their pharmacological action and draw conclusions about the possibility of developing resistance to it in microbial cells.

Keywords: quinazolinone derivatives; antimicrobial activity; lead-compound; electron-donating centers; enzyme active site; minimum inhibitory concentration; minimum suppressing concentration; bacteriostatic action; bactericidal activity; resistance; ATP-dependent efflux pump; plasmids; transposones; large mobile element

Abbreviations: PBP – penicillin-binding protein; MRSA – methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; PBP2a – penicillin-binding protein; ATP – adenosine triphosphate, MIC – minimum inhibitory concentration; DMSO – dimethyl sulfoxide; DMF – dimethylformamide; MIB – meat infusion broth; MIA – meat infusion agar; AC – atypical colonies; TC – typical colonies; NMR – nuclear magnetic resonance; TLC – thin layer chromatography; NA – nucleic acid; FnBPs – fibronectin-binding proteins

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время мультирезистентность патогенных бактерий к используемым в медицинской практике противомикробным средствам составляет серьезную проблему здравоохранения [1-6]. Как правило, формирование резистентности происходит в процессе антибиотикотерапии, особенно в отделениях с более интенсивным использованием препаратов данной группы. Клиническими исследованиями установлено доминирование антибиотикоустойчивых штаммов в структуре нозокомиальных инфекций. Таким образом, возникает необходимость поиска новых антибактериальных веществ, характеризующихся высокой эффективностью, низкой токсичностью и нечувствительных к подавляющему их активности действию патогенов [7-9].

Доказано, что наибольшей резистентностью к антибиотикам, среди грамположительных микроорганизмов, обладают золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) и пневмококк (*Streptococcus pneumoniae*), являющиеся наиболее часто встречающимися и выражающими различные факторы вирулентности, возбудителями широкого спектра заболеваний у людей и животных [2, 10-14].

Возникновение устойчивости *Staphylococcus aureus* к β -лактамам антибиотикам, как и к другим антимикробным средствам, вследствие мутации и отбора, а также за счет приобретения нового генетического материала от других устойчивых организмов в ходе процессов трансформации, трансдукции и конъюгации, предполагающей изменение адгезивных свойств поверхности клетки, ограничивает их применение в медицине. Известно, что функционирование АТФ-зависимых эффлюксных насосов, которые являются белками-переносчиками, выталкивающими противомикробные агенты из клетки, способствует формированию резистентности *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* к фторхинолонам и лекарственным веществам группы тетрациклинов [15-18].

Хиназолин-4(3H)-он и его производные, которые относятся к конденсированным гетероциклическим азотсодержащим соединениям, известны как перспективный класс веществ, проявляющих антибактериальную, противогрибковую, противотуберкулезную, противовирусную активность [3]. Описана ее зависимость от природы и количества заместителей хиназолинового ядра. Установлено, что соединения данной группы оказывают фармакологический эффект в отношении *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* [3, 5, 19].

Доказано, что производные хинолина, составляющего основу структуры хиназолинов, ингибируют синтез ДНК, способствуя расщеплению бактериальной ДНК-гиразы и топоизомеразы типа IV, вследствие

чего происходит гибель бактериальной клетки [20-24]. Описана способность соединений хиназолинового ряда, подобно β -лактамам антибиотикам, применяемым для предотвращения патогенных процессов в организме, вызванных *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, участвовать в необратимом ацилировании серина активного центра транспептидазы – пенициллин-связывающего белка (PBP), катализирующего образование пептидогликана (муреина), важнейшего компонента клеточной стенки бактерий. В результате образования стабильного лактам-ацил-ферментного комплекса происходит ингибирование транспептидазной и карбоксипептидазной активности фермента, приводящее к гибели патогена.

Установлена уникальная способность хиназолинов, реализуемая в синергизме с пиперациллином и тазобактамом, образовывать связи с аллостерическим сайтом пенициллин-связывающего белка 2a (PBP2a) метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* (MRSA) и коагулазонегативных стафилококков, который не может ингибироваться β -лактамами [15, 25-27]. Доказана возможность совместного использования производных хиназолина с хлорамфениколом для увеличения его внутриклеточной концентрации в патогенных штаммах, использующих для сопротивления действию антимикробных лекарственных средств эффлюксные насосные системы [28, 29]. Вероятно, при их прохождении хиназолинов, имея меньшую полярность, в большей степени связывается с эффлюксным насосом, легче подвергается оттоку и облегчает проникновение антибиотика в микробную клетку с неизменной концентрацией [16-18, 20, 21, 30].

Уникальность структуры новых производных хиназолин-4(3H)-она, возможность использования совместно с другими противомикробными средствами с целью повышения их фармакологического эффекта и предотвращения возникновения устойчивости к ним, создает необходимость всестороннего изучения их активности.

ЦЕЛЬ. Изучение антимикробной активности *in vitro* производных хиназолин-4(3H)-она по отношению к *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, а также оценка влияния структурных изменений на биологическую активность анализируемых веществ, липофильность их молекулы для прогнозирования возможности вызывать устойчивость по механизму активного оттока.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования

Объектами исследования были новые производные хиназолин-4(3H)-она.

Химическое строение новых хиназолиновых соединений может быть описано общей формулой, представленной на рисунке 1. Выход и физико-химические свойства новых веществ представлены в таблице 1.

Синтез новых производных хиназолин-4(3H)-она

Синтез новых производных был осуществлен по классической схеме алкилирования нуклеиновых оснований алкилгалогенидами в безводном диметилформамиде (ДМФА) в присутствии избытка калия карбоната. Спектры ЯМР¹H регистрировали на спектрометре «BrukerAvance 400» (400 МГц) в ДМСО-d₆, внутренний стандарт – тетраметилсилан. Интерпретацию спектров осуществляли с помощью лицензионной программы ACD/HNMR PredictorPro 3.0 фирмы Advanced Chemistry Development (Канада). Температуры плавления измерены в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США). Чистоту и индивидуальность соединений контролировали методом ТСХ.

N-[4-(Диметиламино)фенил]-2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетамид (Лабораторный шифр: VMA-10-10).

Смесь 2,0 г (13,7 ммоль) хиназолин-4(3H)-она, 4,0 г (28,9 ммоль) безводного карбоната калия и 50 мл ДМФА перемешивают при температуре 100–105°C в течение 30 мин, добавляют 3,2 г (15,1 ммоль) 2-хлор-N-[4-(диметиламино)фенил]ацетамида и перемешивают при той же температуре в течение 1 ч. Охлаждают до комнатной температуры, фильтруют. Фильтрат выдерживают при температуре 0–5°C в течение суток. Выделившийся осадок отфильтровывают, промывают холодным ДМФА, водой и сушат на воздухе. Перекристаллизовывают из ДМФА и получают 2,95 г соединения VMA-10-10, выход 67%, Т. пл. 261–264°C. Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 2,78 с (6H, CH₃); 4,76 с (2H, CH₂); 6,63 д (8 Гц, 2H, фенил); 7,34 д (8 Гц, 2H, фенил); 7,51 т (7 Гц, 1H, H⁶); 7,66 д (8 Гц, 1H, H⁸); 7,78 т (7 Гц, 1H, H⁷); 8,09 д (8 Гц, 1H, H⁵); 8,29 с (1H, H²); 10,08 с (1H, NH).

Остальные соединения получают аналогично.

N-(4-Метоксифенил)-2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетамид (Лабораторный шифр: VMA-10-18). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 3,72 с (3H, OCH₃); 4,85 с (2H, CH₂); 7,51 д (8 Гц, 2H, фенил); 6,90 д (8 Гц, 2H, фенил); 7,57 т (7 Гц, 1H, H⁶); 7,73 д (8 Гц, 1H, H⁸); 7,86 т (7 Гц, 1H, H⁷); 8,16 д (8 Гц, 1H, H⁵); 8,37 с (1H, H²); 10,31 с (1H, NH).

3-[2-Оксо-2-(4-фенилпиперазин-1-ил)этил]хиназолин-4(3H)-он (Лабораторный шифр: VMA-10-21). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 3,14–3,32 м (4H, пиперазин); 3,62–3,78 м (4H, пиперазин); 5,01 с (2H, CH₂); 6,96–7,01 м (2H, фенил); 7,23–7,29 м (3H, фенил); 7,55 т (7,5 Гц, 1H, H⁶); 7,71 д (8 Гц, 1H, H⁸); 7,86 т (7,5 Гц, 1H, H⁷); 8,17 д (8 Гц, 1H, H⁵); 8,26 с (1H, H²).

N-(2-Нафтил)-2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетамид (Лабораторный шифр: VMA-13-05). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 5,81 с (2H, CH₂); 7,55–8,89 м (11H, H⁵, H⁶, H⁷, H⁸, нафтил); 8,42 с (1H, H²).

N-Фенил-2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]ацетамид (Лабораторный шифр: VMA-17-01). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 5,67 с (2H, CH₂); 7,54–7,77 м (5H, H⁶, H⁸, фе-

нил); 7,87 т (1H, 8 Гц, H⁷); 8,07–8,19 м (3H, H⁵, фенил); 8,39 с (1H, H²).

N-Фенил-2-[4-оксо-3(4H)-хиназолинил]пропанамид (Лабораторный шифр: VMA-17-04). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 1,53 д (3H, 7 Гц, CH₃); 5,49 кв (1H, 7 Гц, CH); 7,56–7,80 м (5H, H⁶, H⁸, фенил); 7,85 т (1H, 8 Гц, H⁷); 8,06–8,19 м (3H, H⁵, фенил); 8,40 с (1H, H²).

N-[6-Бромхиназолин-3(4H)-ил]ацетилгуанидин (Лабораторный шифр: VMA-13-17). Спектр ЯМР ¹H, δ, м. д.: 4,37 с (2H, CH₂); 7,47 уш. с (4H, NH); 7,60 д (1H, 8 Гц, H⁸); 7,90 д (1H, 8 Гц, H⁷); 8,17 с (1H, H²); 8,28 с (1H, H⁵).

Тестовые культуры

Первичный микробиологический скрининг антимикробной активности синтезированных соединений с целью выявления соединения-лидера проводили с использованием культур *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, выделенных от больных пациентов, предоставленных клинико-диагностической лабораторией, Городская клиническая больница № 3 им. С.М. Кирова, г. Астрахань. Исследования одобрены Этическим комитетом ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России (протокол № 6 от 27.11.2018 г.).

Методы исследования

Анализ веществ, с присвоенными им шифрами: VMA-10-10, VMA-10-18, VMA-10-21, VMA-13-05, VMA-17-01, VMA-17-04, VMA-13-17 проводили *in vitro* методом серийных разведений в соответствии с требованиями международного стандарта ISO 20776-1:2006¹ и Национального Стандарта ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010², идентичного международному.

Определение чувствительности микроорганизмов к производным хиназолинона проводили макрометодом (пробирочным) в среде мясоептонного бульона (МПБ), приготовленного в соответствии с ГОСТ 20729-75.

Приготовление рабочего раствора

Рабочий раствор готовили, растворяя навеску испытуемого вещества массой 4 мг в 0,5 мл диметилсульфоксидом (ДМСО), с последующим добавлением к нему 4,5 мл физиологического раствора. Выбор растворителя осуществлялся в соответствии с Методическими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактери-

¹ CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

² Национальный Стандарт ГОСТ Р ИСО 20776-1-2010 Клинические лабораторные исследования и диагностические тест-системы *in vitro*. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам. Часть 1. Референтный метод лабораторного исследования активности антимикробных агентов против быстрорастущих аэробных бактерий, вызывающих инфекционные болезни.

альным препаратам»³, а также с учетом растворимости исследуемых соединений, с предварительной оценкой воздействия ДМСО на используемые штаммы микроорганизмов [33]. Было установлено, что исследуемые соединения нерастворимы в воде, малорастворимы в 40 и 90% спирте этиловом и хорошо растворимы в ДМСО. Из полученного исходного раствора получали серию растворов с убывающей в геометрической прогрессии концентрацией: 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 и 0,25 мкг/мл. В качестве препарата сравнения использовали раствор цефтриаксона (ОАО «Синтез», г. Курган, Р N000750/01) с эквивалентной рабочему раствору концентрацией. Рабочие растворы вносили в пробирки по 1 мл.

Приготовление инокулята

Приготовление инокулята вели в соответствии с требованиями, предъявляемыми к методу прямого суспендирования морфологически схожих колоний, собранных при помощи стерильной бактериологической петли, в стерильном изотоническом растворе.

Методика

Суспензии *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, разведенные в жидкой питательной среде до 10^6 КОЕ/мл, вносили по 1 мл в пробирки с растворами исследуемых веществ.

Посевы в пробирках, закрытых стерильными ватно-марлевыми пробками, инкубировали в течение суток при температуре +37°C. По истечении срока инкубации проводили их визуальную оценку в проходящем свете. В контрольных пробирках, в которых выращивали нативную культуру без добавления референтного препарата или исследуемых соединений, отмечалось полное помутнение питательной среды, свидетельствующее об интенсивном росте культуры.

Определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) исследуемого вещества предполагало установление наименьшей концентрации субстанции, при которой отсутствовал бактериальный рост, о чем свидетельствовало отсутствие помутнения раствора, которое фиксировали визуально.

Оценка роста микроорганизмов

Оценку жизнеспособности бактерий проводили по величине наименьшей концентрации исследуемого вещества, предотвращающей видимый рост бактерии, или иными словами минимальной ингибирующей концентрации. Выполняли посев 0,05 мл осадка, полученного центрифугированием содержимого каждой пробирки серии при 1500 об/мин, в течение 10 мин и отделении супернатанта, на мясопептонный агар (МПА), помещенный в чашки Петри. Питательную среду готовили растворением сухого

агара с последующим автоклавированием. После инокуляции чашки Петри помещали в термостат. Спустя 24 ч после инкубации посева при температуре +37°C проводили анализ характерного роста [33].

Определение антимикробной активности испытуемых веществ предполагало шестикратное воспроизведение выбранной методики анализа [31–32]. За бактерицидный эффект, проявляемый веществом, принимали отсутствие роста культуры, тогда как угнетение роста культуры, ее прерывистый рост, образование единичных колоний свидетельствовало о бактериостатическом эффекте.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли с помощью пакетов программ: Microsoft Office Excel 2007 («Microsoft», США), BIostat 2008 Professional 5.1.3.1. («Analyst-Soft» Inc., США). При обработке полученных результатов использовали параметрический метод с определением t-критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия в группах сравнения оценивали при постоянно выбранном уровне значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Анализ антимикробной активности веществ с шифрами: VMA-10-10, VMA-10-18, VMA-10-21, VMA-13-05, VMA-17-01, VMA-17-04, VMA-13-17 показал, что ее проявление зависит от кратности разведения и вида патогенного микроорганизма.

Полученные экспериментальные данные обобщены в таблицах 2–5.

Анализ характера роста *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* в мясопептонном бульоне и на мясопептонном агаре с ДМСО показал умеренный рост микроорганизмов в концентрации 128 и 64 мкг/мл, а также интенсивный рост в диапазоне концентраций от 32 до 0,25 мкг/мл.

При визуальном контроле посевов *Staphylococcus aureus* на мясопептонном бульоне признаки роста в пробирках с цефтриаксоном просматривались при низких концентрациях препарата – 2–0,5 мкг/мл. Умеренный рост культуры отмечали в присутствии соединения VMA-10-10 в диапазоне концентраций 128–4 мкг/мл, а в случае VMA-17-01 – 16–8 мкг/мл. Интенсивное развитие клеток, сопровождающееся сильным помутнением питательной среды, образованием хлопьев и обильного осадка, наблюдали в пробирках при концентрациях соединения VMA-10-21 – 128–0,25 мкг/мл.

Значительный рост культуры также зафиксирован в пробирках с веществами VMA-17-04 с концентрацией 4–0,25 мкг/мл и VMA-13-17 при его содержании 2–0,25 мкг в 1 мл раствора.

В таблице 3 представлены результаты посевов

³ МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

Staphylococcus aureus на плотную питательную среду – мясопептонный агар.

Данные таблицы 3 свидетельствуют о том, что в присутствии контроля, цефтриаксона в концентрациях 128–64 мкг/мл, полностью подавляется рост культуры, тогда как при его содержании 32–4 мкг в 1 мл раствора отмечается рост единичных колоний патогена.

Фиксируется интенсивный рост на мясопептонном агаре *Staphylococcus aureus* при использовании соединений VMA-10-10 в концентрациях 128–0,25 мкг/мл и VMA-10-21 – при 64–0,25 мкг/мл. В диапазонах концентраций 128–16 мкг/мл вещества VMA-17-04, 128–64 мкг/мл – VMA 13-05, 128–32 мкг/мл – VMA-17-01 роста колоний не наблюдалось. Результаты указывают на способность данных соединений подавлять развитие *Staphylococcus aureus* и, как следствие, проявлять ярко выраженную противомикробную активность в отношении патогена.

В таблице 4 представлены результаты посевов *Streptococcus pneumoniae* на жидкую питательную среду (мясопептонный бульон).

При визуальном контроле посевов *Streptococcus pneumoniae* на мясопептонный бульон признаки роста в пробирках с цефтриаксоном просматривались при концентрации 4–0,25 мкг/мл. Умеренный рост культуры отмечали в присутствии соединения VMA-10-21 в диапазоне концентраций 64–0,25 мкг/мл, вещества VMA-10-18 – при его содержании 8–0,25 мкг в 1 мл. Более низкие значения установлены для производных VMA-13-17, VMA-13-05 – 2–0,25 мкг/мл и VMA-10-10, VMA-17-01 – 1–0,25 мкг/мл.

Полная прозрачность среды наблюдалась в пробирках с хиназолиновым производным VMA-13-05 при концентрации 128–32 мкг/мл, соединениями VMA-17-01 и VMA-17-04 при содержании 128–64 мкг активного компонента в 1 мл. Полученные результаты указывают на ярко выраженную антипневмококковую активность веществ.

Из данных таблицы 5 следует, что культура *Streptococcus pneumoniae* дает обильный рост на МПА в присутствии соединений VMA-10-10, VMA-10-18 в концентрациях 4–0,25 мкг/мл, вещества VMA-13-05 – при 8–0,25 мкг/мл и производного VMA-17-04 при концентрациях 2–0,25 мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии чувствительности патогена к указанным веществам при данном разведении.

При содержании VMA-13-05 в концентрации 128–16 мкг/мл рост колоний патогенного штамма не наблюдается, что аналогично эффектам VMA-17-04 и VMA-17-01 в диапазоне концентрации 128–64 мкг/мл. Следовательно, вещества характеризуются высокой противомикробной активностью в отношении *Streptococcus pneumoniae* при таком содержании в растворе.

В таблице 6 показаны среднестатистические ре-

зультаты оценки антибактериального действия наиболее активных субстанций в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*.

Анализируя среднестатистические результаты антибактериального действия наиболее активных субстанций в отношении патогенных микроорганизмов, можно сделать вывод о том, что бактерицидная активность соединений VMA-13-05, VMA-17-01 и VMA-17-04 сопоставима с действием цефтриаксона в концентрациях 128 и 64 мкг/мл; в отношении *Staphylococcus aureus* – в концентрации 32 мкг/мл. При анализе антимикробного действия наиболее активных соединений хиназолина в последующих концентрациях установлено, что бактерицидная активность VMA-13-05, VMA-17-01 и VMA-17-04 статистически значимо снижается по мере уменьшения концентрации веществ по отношению к препарату сравнения – цефтриаксону.

Гетероциклическая природа веществ хиназолинового ряда обуславливает их способность ингибировать активность РВР2а за счет образования водородных связей с аминокислотами аллостерического сайта фермента: лизином, глутамином и аспарагином. Вследствие такого взаимодействия происходит открытие активного сайта, в котором карбонильная группа и атом азота другой молекулы противомикробного агента ковалентно связываются с карбоксильной и аминогруппой лизина и аргинина. Происходит подавление работы фермента и, как следствие, блокирование биосинтеза клеточной стенки бактерии [37–40]. Анализ влияния различных заместителей в молекуле производных хиназолинона позволил выявить функциональные группы и структурные фрагменты, принимающие участие в образовании химической связи с остатками аминокислот фермента за счет чего, вероятно, реализуется фармакологический эффект веществ. Исследования взаимосвязи структуры и активности производных хиназолинона показали, что наличие замещенного ароматического кольца в положении 3 и метильной группы, является существенным для проявления соединением противомикробной активности [34]. При этом соединения хиназолинонов, содержащие фенильный радикал, характеризуются более высокой аффинностью связывания, чем вещества с метильной группой, что может быть объяснено увеличением числа гидрофобных связей с аминокислотами активного сайта [35]. Показано, что заместитель в фенильном кольце также оказывает значительное влияние на антибактериальную активность. Метокси-, метил-, гидроксигруппы, а также атомы брома и хлора, увеличивают противомикробный эффект [24]. Доказано, что объединение двух или более биологически активных фрагментов в одной молекуле также способствует повышению антибактериального эффекта вследствие изменения степени полярности молекулы лекарственного вещества [1].

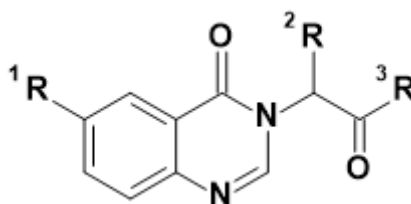


Рисунок 1 – Общая формула производных хиназолин-4(3H)-она

Таблица 1 – Химическое строение новых производных хинозолин-4(3H)-она

Соединение	R ¹	R ²	R ³	Выход, %	Т. пл., °С
VMA-10-10	H	H	4-диметиламинофенил	67	261–264
VMA-10-18	H	H	4-метоксифенил	61	228–229
VMA-10-21	H	H	4-фенилпиперазин-1-ил	73	222–224
VMA-13-05	H	H	β-нафтил	56	199–201
VMA-17-01	H	H	фениламино	83	156–158
VMA-17-04	H	CH ₃	фениламино	72	222–224
VMA-13-17	Br	H	NHC(NH)NH ₂	89	242–244

Таблица 2 – Показатели визуальной оценки активности соединений в отношении роста *Staphylococcus aureus* (среда МПБ)

Серии (соединения, препараты)	Концентрация, мкг/мл									
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
ДМСО	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Цефтриаксон	–	–	–	–	–	+	++	+++	+++	+++
VMA-10-10	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++
VMA-10-18	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++++	++++
VMA-10-21	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VMA-13-05	–	–	–	++	++	++	+++	+++	+++	+++
VMA-17-01	–	–	–	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
VMA-17-04	–	–	–	–	++	++	++++	++++	++++	++++
VMA-13-17	+	+	++	++	++	++	+++	+++	+++	+++

Примечание: «–» – полная прозрачность среды; «+» – неполная прозрачность среды; «+» – слабый рост; «++» – умеренный рост; «+++» – интенсивный рост

Таблица 3 – Показатели визуальной оценки активности субстанций в отношении роста *Staphylococcus aureus* (среда – МПА)

Серии (соединения, препараты)	n	Концентрация, мкг/мл									
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
ДМСО	6	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Цефтриаксон	6	–	–	+AK	+AK	+AK	+AK	+++AK	+++AK	+++AK	+++AK
VMA-10-10	6	+++AK	+++AK	+++AK	+++AK	+++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK
VMA-10-18	6	+AK	+AK	+AK	+AK	+++AK	+++TK	+++TK	+++TK	++++TK	++++TK
VMA-10-21	6	++AK	+++TK	+++TK	+++TK	++++TK	++++TK	++++TK	++++TK	++++TK	++++TK
VMA-13-05	6	–	–	+AK	+++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK
VMA-17-01	6	–	–	–	++ AK	++ AK	+++ TK	+++ TK	+++ TK	+++ TK	+++ TK
VMA-17-04	6	–	–	–	–	++ AK	++AK	++++ AK	++++ AK	++++ AK	++++AK
VMA-13-17	6	+ AK	+ AK	++ AK	++ AK	++ AK	++ AK	+++ TK	+++ TK	+++ TK	+++ TK

Примечание: «–» – отсутствие колоний; «+» – единичные колонии; «+++» – ≤ 50%, «++++» – ≤ 75%; «++++» – ≤ 100% заселения площади чашки Петри; AK – атипичные колонии; TK – типичные колонии

Таблица 4 – Показатели визуальной оценки активности соединений в отношении роста *Streptococcus pneumoniae* (среда МПБ)

Серии (соединения, препараты)	Концентрация, мкг/мл									
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
ДМСО	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Цефтриаксон	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
VMA-10-10	+-	+-	+-	+	+	++	++	+++	+++	+++
VMA-10-18	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++	++++	
VMA-10-21	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
VMA-13-05	–	–	–	+	+-	++	+++	+++	+++	+++
VMA-17-01	–	–	+-	+-	+	++	++	+++	+++	+++
VMA-17-04	–	–	+	+	+	+	++	++	+++	+++
VMA-13-17	+	+	+	+	+	+	+++	+++	+++	+++

Примечание: «–» – полная прозрачность среды; «+-» – неполная прозрачность среды; «+» – слабый рост; «++» – умеренный рост; «+++» – интенсивный рост

Таблица 5 – Показатели активности субстанций в отношении роста *Streptococcus pneumoniae* (среда МПА)

Серии (соединения, препараты)	n	Концентрация, мкг/мл									
		128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
ДМСО	6	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Цефтриаксон	6	–	–	–	+AK	+AK	+AK	++AK	++AK	++AK	++AK
VMA-10-10	6	++AK	++AK	++AK	++AK	++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK
VMA-10-18	6	++ AK	++AK	++ AK	++ AK	+++AK	+++TK	+++TK	+++TK	++++TK	++++TK
VMA-10-21	6	+AK	+TK	++TK	++TK	+++TK	+++TK	+++TK	+++TK	++++TK	++++TK
VMA-13-05	6	–	–	–	–	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK	++++AK
VMA-13-17	6	+ AK	+ AK	++ AK	++ AK	++ AK	++ AK	+++ TK	+++ TK	+++ TK	+++ TK
VMA-17-04	6	–	–	+ AK	+AK	++ AK	++ AK	++++ TK	++++ TK	++++ TK	++++ TK
VMA-17-01	6	–	–	+AK	++ AK	++ AK	+++ TK	+++ TK	+++ TK	+++ TK	+++ TK

Примечание: «–» – отсутствие колоний; «+» – единичные колонии; «++» – ≤ 50%, «+++» – ≤ 75%; «++++» – ≤ 100% заселения площади чашки Петри; AK – атипичные колонии; TK – типичные колонии.

Таблица 6 – Среднестатистические результаты антибактериального действия наиболее активных субстанций в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*

Серии (соединения, препараты)	Концентрация, мкг/мл									
	128	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25
Цефтриаксон	0	0	0	0	0	18,1±2,3	18,8±2,2	19,3±2,2	22,5±3,6	22,7±3,2
В отношении штаммов <i>Staphylococcus aureus</i>										
VMA-13-05	0	0	0	29,5±2,4 ***	32,1±3,1 ***	38,4±3,8 **	59,4±4,7 ***	65,3±4,2 ***	65,8±5,6 ***	68,3±5,4 ***
VMA-17-01	0	0	0	28,3±2,1 ***	33,8±3,7 ***	39,9±4,2 **	64,4±4,3 ***	65,7±4,1 ***	65,6±6,6 ***	69,3±6,1 ***
VMA-17-04	0	0	0	0	27,3±3,1 ***	28,1±2,8 *	78,4±5,9 ***	81,3±7,1 ***	83,6±7,3 ***	85,2±6,5 ***
В отношении штаммов <i>Streptococcus pneumoniae</i>										
VMA-13-05	0	0	0	14,3±1,8 ***	16,4±2,1 ***	26,3±1,8 *	61,3±4,8 ***	63,8±5,6 ***	66,4±5,2 ***	71,6±6,9 ***
VMA-17-01	0	0	12,3±1,8 ***	14,9±2,0 ***	15,7±1,9 ***	25,9±1,8 *	27,3±2,0 *	56,4±4,6 ***	62,3±4,9 ***	68,3±6,0 ***
VMA-17-04	0	0	10,2±1,3 ***	12,7±1,8 ***	12,8±1,4 ***	13,2±1,9 *	26,2±1,9 *	28,6±2,2 **	53,8±5,2 ***	55,7±5,2 ***

Примечание: * – p<0,05; ** – p<0,01; *** – p<0,001 – по отношению к показателям антибактериального действия цефтриаксона

Описан механизм взаимодействия веществ с ДНК-гиразой, который также зависит от природы заместителей, определяющих полярность молекулы, ее способность образовывать различные химические связи с ферментом. Известно, что в данном случае гибель бактериальной клетки опосредована нарушением синтеза ДНК при ингибировании ДНК-гиразы, участвующей в раскручивании (отрицательной суперспирализации) молекулы нуклеиновой кислоты (НК), производным хиназолинона [37]. Установлено, что его влияние может быть объяснено образованием промежуточного комплекса «ДНК-топоизомераза-хиназолинон» за счет донорно-акцепторного взаимодействия атома кислорода карбонильной группы антимикробного агента и фосфатной группы ДНК, азота с гуанином и аспарагином НК, заместителей хиназолиноновой молекулы с ее неполярными группами. Связывание с активным сайтом фермента происходит за счет водородных связей производного хиназолинона с аминокислотными остатками серина и аргинина [37].

Не исключается возможность взаимодействия производных хиназолинона с предшественниками пептидогликана, что приводит к ингибированию его полимеризации (трансгликозилирования) и последующей стадии перекрестного связывания (транспептидации). Бактерицидное действие лекарственного вещества реализуется при образовании промежуточного комплекса «хиназолинон – производное пептидогликана», вследствие чего возникает деполяризация оболочки, увеличивается ее проницаемость и происходит утечка ионов калия и цитоплазматического АТФ, приводящая к гибели клетки [41, 42].

Представление о функционировании эффлюксных насосов увеличивает ряд требований, предъявляемых к исследуемым противомикробным веществам, в виде сочетания высокой эффективности с устойчивостью к оттоку, одним из вариантов достижения которой может являться диссипация мембранного потенциала [29, 34]. Доказано, что присутствие кето-группы, бензильного радикала и атомов азота в хиназолиноновой структуре способствует снижению липофильности; ковалентно связанный бром в ядре хиназолина, метоксифенильный и метильный заместители, наоборот, повышают гидрофобность [35, 36]. Насыщенность молекул хиназолиноновых производных центрами, снижающими гидрофобность, позволяет сделать предположение о незначительной степени связывания с белками оттока и, как следствие, низкой вероятности возникновения резистентности к этим веществам с точки зрения теории оттока [5, 7, 28].

Анализ полученных результатов показывает, что соединение VMA-17-04, и в меньшей мере VMA-13-05, активны в отношении *Staphylococcus aureus* и обладают бактериостатическим действием. Структура веще-

ства VMA-13-05 содержит нафтильный заместитель, который делает молекулу более липофильной и, как следствие, повышает ее проникновение в клеточную мембрану патогенной культуры. Полярность VMA-17-04, обусловленная амидной группой, связанной с хиназолиноновой составляющей и бензольным кольцом, обуславливает увеличение степени взаимодействия электронодонорного центра в виде атома азота с активными сайтами ферментов, катализирующих процессы репликации ДНК и синтеза белков.

Оценка антимикробной активности исследуемых соединений в отношении *Streptococcus pneumoniae* показывает проявление бактериостатического эффекта производным VMA-13-05. Соединения VMA-17-04 и VMA-17-01 характеризуются слабо выраженным противомикробным действием.

Вещество VMA-10-10 практически не влияет на *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*.

Вероятно, различие в химическом составе компонентов мембраны грамположительных бактерий может служить причиной неодинакового проявления фармакологической активности веществами VMA-17-04 и VMA-13-05 в отношении патогенов. Присутствие в молекулах производных хиназолинона отличающихся по строению заместителей обуславливает различие в механизме их связывания с веществами клеточной оболочки патогенов, выполняющих роль адгезивов, являющихся одним из факторов вирулентности данных микроорганизмов. Установлено, что основную роль в процессе адгезии *Streptococcus pneumoniae* играют коллагенсвязывающий и фибронектинсвязывающий протеины, липотейхоевая кислота, а также поверхностный фосфорил-холин, входящий в состав тейхоевой кислоты с прикрепленными к нему холинсвязывающими белками. Адгезивная активность *Staphylococcus aureus* осуществляется за счет фибриноген-связывающего белка, молекулы которого связаны с пептидогликаном клеточной стенки, коллагенового адгезина, внеклеточного белка, связывающих фибронектин белков, тейхоевой кислоты, а также стафилококкового гаптоглобинового рецептора, состоящего из 145 остатков аминокислот [43].

Природа заместителей в молекуле обуславливает различную степень липофильности соединений, которая, согласно Гиббсонсу, является важным свойством вещества, характеризующим его растворимость в бактериальной мембране и степень связывания с белками оттока или субстратами помпы. Гидрофобность производных служит фактором, снижающим распознавание и транспортировку откачиваемым насосом антимикробных агентов, что особенно важно при поиске ингибиторов их оттока [29]. Липофильность структуры VMA-13-05 хоть и предполагает лучшее связывание с белком эффлюксного насоса, что может привести к возникновению резистентности у *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae* за счет уменьшения концентрации ан-

тимикробного средства, однако не может служить объективной характеристикой данного процесса без дополнительных данных, полученных альтернативными методами анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, среди синтезированных производных хиназолин-4(3H)-она были выявлены вещества, проявляющие выраженную антимикробную активность в отношении *Staphylococcus aureus* (VMA-

17-04) и *Streptococcus pneumoniae* (VMA-13-05), что, очевидно, обусловлено влиянием липофильного участка их молекул на проявление противомикробного действия. Результаты, полученные в ходе данного исследования, определяют перспективность дальнейшего изучения противомикробных свойств новых соединений хиназолин-4(3H)-она с целью повышения их фармакологического эффекта и предотвращения развития резистентности патогенных микроорганизмов.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данная работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ в части проведения НИР по теме «Поиск и разработка перспективных соединений с антибактериальной активностью среди производных пиримидина для создания лекарственных препаратов» 48.2-2021.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

М.А. Самотруева – разработка концепции и дизайна исследования, планирование исследования, проверка критически важного интеллектуального содержания, окончательное утверждение для публикации рукописи; А.А. Озеров – разработка схемы синтеза производных, получение данных по физико-химическим свойствам и спектральным характеристикам веществ, редактирование рукописи, окончательное ее утверждение для публикации; А.А. Старикова – сбор данных, написание текста, химическое обоснование протекающих процессов с учетом строения исследуемых веществ, подготовка черновика рукописи; Н.М. Габитова – проведение микробиологического исследования, оценка, обоснование и статистическая обработка полученных данных; Д.В. Мережкина – осуществление синтеза производных хиназолина; А.А. Цибизова – сбор данных, оценка, обоснование и статистическая обработка полученных данных; И. Н. Тюренков – планирование исследования, методология исследования, редактирование рукописи, оценка результатов, полученных микробиологическими методами; окончательное утверждение публикации рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Abrusán G., Marsh J.A. Ligands and receptors with broad binding capabilities have common structural characteristics: An antibiotic design perspective // J. Med. Chem. – 2019. – Vol. 62. – P. 9357–9374. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00220.
2. Beyzaei H., Ghasemi B. *In vitro* Antibacterial evaluation of newly synthesized heterocyclic compounds against *Streptococcus Pneumoniae* // Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran. – 2018. – Vol. 29, No.3. – P. 211–220. DOI: 10.22059/JSCIENCES.2018.67436.
3. Цибизова А.А., Ясенявская А.Л., Озеров А.А., Самотруева М.А., Тюренков И.Н. Оценка острой токсичности нового пиримидинового производного // Астраханский медицинский журнал. – 2021. – Т. 16, № 1. – С. 82–87. DOI: 10.17021/2021.16.1.82.87.
4. Jampilek J. Heterocycles in Medicinal Chemistry // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – Art. No.3839. DOI: 10.3390/molecules24213839.
5. Patel P.R., Joshi H., Shah U., Bapna M., Patel B. New generation of quinazolinone derivatives as potent antimicrobial agents // Asian Pac. J. Health Sci. – 2021. – Vol. 8, No.2. – P. 61–66. DOI: 10.21276/apjhs.2021.8.2.12.
6. Etebu E., Arikepar I. Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives // Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res. – 2016. – Vol. 4. – P. 90–101.
7. Alanazi A.M., Abdel-Aziz A.A.M., Shawer T.Z., Ayyad R.R., Al-Obaid A.M., Al-Agamy M.H.M., Maarouf A.R., El-Azab A.S. Synthesis, antitumor and antimicrobial activity of some new 6-methyl-3-phenyl-4(3H)-quinazolinone analogues: *in silico* studies // Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 31, No.5. – P. 721–735. DOI: 10.3109/14756366.2015.1060482.
8. El-Sayed N.N.E., Al-Otaibi T.M., Alonazi M., Masand V.H., Barakat A., Almarhoon Z.M., Ben Bacha A. Synthesis and characterization of some new quinoxalin-2(1H)-one and 2-methyl-3H-quinazolin-4-one derivatives targeting the onset and progression of CRC with SRA, Molecular Docking, and ADMET analyses // Molecules. – 2021. – Vol. 26. – Art. No.3121. DOI: 10.3390/molecules26113121.
9. Hassan K.A., Liu Q., Elbourne L.D.H., Ahmad I., Sharples D., Naidu V., Chan C.L., Li L., Harborne S.P.D., Pokhrel A., Postis V.L.G., Goldman A., Henderson P.J.F., Paulsen I.T. Pacing across the membrane: the novel PACE family of efflux pumps is widespread in gram-negative pathogens // Research in Microbiology. – 2018. – Vol. 169. – P. 450–454. DOI: 10.1016/j.resmic.2018.01.001.
10. Vila J., Moreno-Morales J., Balleste-Delpierre C. Current landscape in the discovery of novel antibacterial agents // Clinical Microbiology and Infection. – 2020. – Vol. 26. – P. 596–603. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.09.015.
11. Nagaraja V., Godbole A.A., Henderson S.R., Maxwell A. DNA topoisomerase I and DNA gyrase as targets for TB therapy // Drug Discovery Today. – 2017. – Vol. 22, No. 3. – P. 510–518. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.11.006.

12. D'Atanasio N., Capezzone de Joannon A., Di Sante L., Mangano G., Ombrato R., Vitiello M., Antibacterial activity of novel dual bacterial DNA type II topoisomerase inhibitors // *Plos One*. – 2020. – Vol. 15, No. 2. – P. 1–21. DOI: 10.1371/journal.pone.0228509.
13. Karaman R., Jubeh B., Breijyeh Z., Karaman R. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, No.12. – Art. No.2888. DOI: 10.3390/molecules25122888.
14. Lepak A.J., Seiler P., Surivet J.P., Ritz D., Kohl C., Andes D.R. *In vivo* pharmacodynamic target investigation of two bacterial topoisomerase inhibitors, ACT-387042 and ACT-292706, in the neutropenic murine thigh model against *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2016. – Vol. 60, No. 6. – P. 3626–3632. DOI: 10.1128/AAC.00363-16.
15. Li L., Wang Q., Zhang H., Yang M., Khan M.I., Zhou X. Sensor histidine kinase is a β -lactam receptor and induces resistance to β -lactam antibiotics // *Microbiology*. – 2016. – Vol. 113, No.6. – P. 1648–1653. DOI: 10.1073/pnas.1520300113.
16. Qiao Y., Srisuknimit V., Rubino F., Schaefer K., Ruiz N., Walker S., Kahne D. Lipid II overproduction allows direct assay of transpeptidase inhibition by β -lactams // *Nat Chem Biol*. – 2017. – Vol. 13, No.7. – P. 793–798. DOI: 10.1038/nchembio.2388.
17. Janardhanan J., Bouley R., Martınez-Caballero S., Peng Z., Batuecas-Mordillo M., Meisel J.E., Ding D., Schroeder V.A., Wolter W.R., Mahasenan K.V., Hermoso J.A., Mobashery S., Chang M. The quinazolinone allosteric inhibitor of PBP 2a synergizes with piperacillin and tazobactam against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2019. – Vol. 63, No.5. – P. 1–12. DOI: 10.1128/AAC.02637-18.
18. Liu J., Chen D., Peters B.M., Li L., Li B., Xu Z., Shirriff M.E. Staphylococcal chromosomal cassettes mec (SCCmec): A mobile genetic element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Microbial Pathogenesis*. – 2016. – Vol. 101. – P. 56–67. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.10.028.
19. Cai Z.Q., Jin Z.S., Zheng D.Q., Hou L., Huang G.W., Tian J.Q., Wang G.J. Synthesis of several new quinazolin-4-amines containing p-toluenesulfonate moiety // *Journal of chemical research*. – 2016. – Vol. 40. – P. 573–575. DOI: 10.3184/174751916X14725679922221.
20. Khan I., Zaib S., Batool S., Abbas N., Ashraf Z., Iqbal J., Saeed A. Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification // *Bioorg. Med. Chem*. – 2016. – Vol. 24. – P. 2361–2381. DOI: 10.1016/j.bmc.2016.03.031.
21. Badshah S.L., Ullah A. New developments in non-quinolone-based antibiotics for the inhibition of bacterial gyrase and topoisomerase IV // *European Journal of Medicinal Chemistry*. – 2018. – Vol. 152. – P. 393–400. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.04.059.
22. Qian Y., Allegretta G., Janardhanan J., Peng Z., Mahasenan K.V., Lastochkin E., Gozun M.M.N., Tejera S., Schroeder V.A., Wolter W.R., Feltzer R., Mobashery S., Chang M. Exploration of the structural space in 4(3H)-quinazolinone antibacterials // *J Med Chem*. – 2020. – Vol. 63, No.10. – P. 5287–5296. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00153.
23. Masri A., Anwar A., Khan N.A., Shahbaz M.S., Khan K.M., Shahabuddin S., Siddiqui R. Antibacterial effects of quinazolin-4(3H)-one functionalized-conjugated silver nanoparticles // *Antibiotics*. – 2019. – Vol. 8. – P. 179. DOI: 10.3390/antibiotics8040179.
24. Bouley R., Ding D., Peng Z., Bastian M., Lastochkin E., Song W., Suckow M.A., Schroeder V.A., Wolter W.R., Mobashery S., Chang M. Structure–activity relationship for the 4(3H)-quinazolinoneantibacterials // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2016. – Vol. 59. – P. 5011–5021. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00372.
25. Nakano S., Fujisawa T., Ito Y., Chang B., Matsumura Y., Yamamoto M., Suga S., Ohnishi M., Nagao M. Penicillin-binding protein typing, antibiotic resistance gene identification, and molecular phylogenetic analysis of meropenem-resistant *Streptococcus pneumoniae* serotype 19A-CC3111 strains in Japan // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2019. – Vol. 63. – P. 1–9. DOI: 10.1128/AAC.00711-19.
26. Brouwers R., Vass H., Dawson A., Squires T., Tavaddod S., Allen R.J. Stability of β -lactam antibiotics in bacterial growth media // *PLoS One*. – 2020. – Vol. 15, No.7. – P. e0236198. DOI: 10.1371/journal.pone.0236198.
27. Ligozzi M., Galia L., Bertocelli A., Mazzariol A. Intrinsic role of coagulase negative staphylococci A-like efflux system in fluoroquinolones resistance // *AIMS Microbiology*. – 2017. – Vol. 3, No.4. – P. 908–914. DOI: 10.3934/microbiol.2017.4.908.
28. Ankireddy A.R., Rambabu G., Balaraju T., Banothu V., Gundla P.L., Addepally U., Mantipally M. Synthesis, characterization and antibacterial activity of some novel C-7-Substituted-2-morpholino-N-(pyridin-2-ylmethyl) quinazolin-4-amine derivatives // *Der PharmaChemica*. – 2018. – Vol. 10, No.11. – P. 40–48.
29. Ghorab M.M., Alqahtani A.S., Soliman A.M., Askar A.A. Novel N-(Substituted) thioacetamide quinazolinone benzene sulfonamides as antimicrobial agents // *International Journal of Nanomedicine*. – 2020. – Vol. 15. – P. 3161–3180. DOI: 10.2147/IJN.S241433.
30. De Rosa M., Verdino A., Soriente A., Marabotti A. The Odd Couple(s): An overview of Beta-Lactam antibiotics bearing more than one pharmacophoric group // *Int. J. Mol. Sci*. – 2021. – Vol. 22. – P. 2–21. DOI: 10.3390/ijms22020617.
31. Kahlmeter G., Brown D. F. J., Goldstein F. W., MacGowan A. P., Mouton R. W., Odenholt I., Rodloff A., Soussy C.-J., Steinbakk M., Soriano F., Stetsiouk O. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) Technical Notes on antimicrobial susceptibility testing // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2006. – Vol. 12, No. 6. – P. 501–503. DOI:10.1111/j.1469-0691.2006.01454.x.
32. Turnidge J., Kahlmeter G., Kronvall G. Statistical characterisation of bacterial wild-type MIC value distributions and the determination of epidemiological cut-off values // *Clin Microbiol Infect*. – 2006. – Vol. 12, No.5. – P. 418–425. DOI:10.1111/j.1469-0691.2006.01377.x.
33. Лужнова С.А., Воронков А.В., Кодониди И.П., Габитова Н.М., Храпова А.В., Бель С. Активность новых производных 1,3-диазинона-4 и их нециклических предшественников в отношении *Staphylococcus aureus* // Астраханский медицинский журнал. – 2017. – Т. 12, № 2. – С. 56–63.
34. Gajdacs M. The continuing threat of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // *Antibiotics*. – 2019. – Vol. 8. – P. 52. DOI: 10.3390/antibiotics8020052.

35. Nandwana N.K., Singh R.P., Patel O.P.S., Dhiman S., Saini H.K., Jha P.N., Kumar A. Design and synthesis of Imidazo/Benzimidazo[1,2-c]quinazolinederivatives and evaluation of their antimicrobial activity // ACS Omega. – 2018. – Vol.3, No. 11. – P. 16338–16346. DOI: 10.1021/acsomega.8b01592.
36. Maruthamuthu D., Rajam S., Christina Ruby Stella P., BharathiDileepan A.G., Ranjith R. The chemistry and biological significance of imidazole, benzimidazole, benzoxazole, tetrazole and quinazolinone nucleus // J. Chem. Pharm. Res. – 2016. – Vol. 8, No. 5. – P. 505–526.
37. Mahato A., Shrivastava B., Shanthi N. Synthesis, Molecular Docking and Biological Evaluation of Substituted Quinazolinones as Antibacterial Agents // Chemical Science Transactions. – 2015. – Vol. 4, No. 2. – P. 595–603. DOI: 10.7598/cst2015.995.
38. Fisher J.F., Mobashery S. Constructing and deconstructing the bacterial cell wall // Protein Science. – 2020. – Vol. 29. – P. 629–646. DOI: 10.1002/pro.3737.
39. Ibrahim M.A.A., Abdeljawaad K.A.A., Abdelrahman A.H.M., Alzahrani O.R., Alshabmi F.M., Khalaf E., Moustafa M.F., Alrumaihi F., Allemailem K.S., Soliman M.E.S., Paré P.W., Hegazy M.E.F., Atia M.A.M. Non-β-Lactam allosteric inhibitors target methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: an in silico drug discovery study // Antibiotics. – 2021. – Vol. 10, No. 8. – Art. No. 934. DOI:10.3390/antibiotics10080934.
40. Mahasenan K.V., Molina R., Bouley R., Batuecas M.T., Fisher J.F., Hermoso J.A., Chang M., Mobashery S. Conformational dynamics in penicillin-binding protein 2a of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, allosteric communication network and enablement of catalysis // J Am Chem Soc. – 2017. – Vol. 139, No. 5. – P. 2102–2110. DOI: 10.1021/jacs.6b12565.
41. Higgins D.L., Chang R., Debabov D.V., Leung J., Wu T., Krause K.M., Sandvik E., Hubbard J.M., Kaniga K., Schmidt D.E. Jr, Gao Q., Cass R.T., Karr D.E., Benton B.M., Humphrey P.P. Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* // Antimicrobial agents and chemotherapy. – 2005. – Vol. 49, No. 3. – P. 1127–1134. DOI: 10.1128/AAC.49.3.1127-1134.2005.
42. Bayer A.S., Schneider T., Sahl H.G. Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall // Ann N Y Acad Sci. – 2013. – Vol. 1277, No. 1. – P. 139–158. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2012.06819.x.
43. Зубарева И.В., Беренштейн Т.Ф., Федянин С.Д. Об адгезии грамположительных кокков // Вестник ВГМУ. – 2010. – Т. 9, №1. – С. 1–15.

АВТОРЫ

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

Озеров Александр Александрович – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4721-0959. E-mail: prof_ozarov@yahoo.com

Старикова Алла Андреевна – ассистент кафедры химии фармацевтического факультета ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5210-5248. E-mail: alhimik.83@mail.ru

Габитова Нармина Муталлимага-кызы – ассистент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, младший научный сотрудник

ФГБУ «НИИЛ» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-3867-8330. E-mail: narmina85@inbox.ru

Мережкина Дарья Владимировна – аспирант кафедры фармацевтической и токсикологической химии, ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, ORCID ID: 0000-0002-9848-7149. E-mail: merezhkinad@mail.ru.

Цибизова Александра Александровна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, ORCID ID: 0000-0002-9994-4751. E-mail: sasha3633@yandex.ru

Тюренов Иван Николаевич – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, заведующий кафедрой фармакологии и фармации Института непрерывного медицинского и фармацевтического образования факультета усовершенствования врачей ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-7574-3923. E-mail: fibfuv@mail.ru



**Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

Проводит обучение по следующим специальностям:

Код специальности	Наименование специальности	Квалификация	Срок обучения
СРЕДНЕЕ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ			
33.02.01	Фармация очно	ФАРМАЦЕВТ	2 года 10 месяцев
31.02.05	Стоматология ортопедическая очно	ЗУБНОЙ ТЕХНИК	2 года 10 месяцев
БАКАЛАВРИАТ			
38.03.02	Менеджмент очно-заочно, заочно	БАКАЛАВР	5 лет
СПЕЦИАЛИТЕТ			
31.05.03	Стоматология очно	ВРАЧ-СТОМАТОЛОГ ОБЩЕЙ ПРАКТИКИ	5 лет
33.05.01	Фармация	ПРОВИЗОР	5 лет
30.05.01	Медицинская биохимия очно	ВРАЧ-БИОХИМИК	6 лет
МАГИСТРАТУРА			
32.04.01	Общественное здравоохранение очно-заочно	МАГИСТР	2 года
АСПИРАНТУРА			
31.06.01	Клиническая медицина очно/заочно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	3 года/4 года
33.06.01	Фармация очно/заочно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	3 года/4 года
30.06.01	Фундаментальная медицина очно/заочно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	3 года/4 года
ОРДИНАТУРА			
33.08.01	Фармацевтическая технология очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
33.08.02	Управление и экономика фармации очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
33.08.02	Фармацевтическая химия и фармакогнозия очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
31.08.73	Стоматология терапевтическая очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года
31.08.75	Стоматология ортопедическая очно	ИССЛЕДОВАТЕЛЬ. ПРЕПОДАВАТЕЛЬ-ИССЛЕДОВАТЕЛЬ	2 года

Адрес: 357532, Российская Федерация, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр-т Калинина, 11.

