

УДК 615.04.038.032

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ГАСТРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА ПРИ ТРАНСДЕРМАЛЬНОМ СПОСОБЕ ВВЕДЕНИЯ

¹С.О. Лосенкова, ²Э.Ф. Степанова

¹Смоленский государственный медицинский университет, г. Смоленск

²Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России, г. Пятигорск

EXPERIMENTAL STUDY OF GASTROPROTECTIVE ACTIVITY OF TRANSDERMAL ETHYLMETHYLHYDROXYPYRIDINE SUCCINATE

¹S.O. Losenkova, ²E.F. Stepanova

¹Smolensk state medical university, Smolensk

²Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – a branch of Volgograd State Medical University, Pyatigorsk
E-mail: losenkova-so@mail.ru

Проведено экспериментальное исследование дозозависимой гастропротекторной активности этилметилгидроксипиридина сукцината (мексидола) в форме трансдермальной терапевтической системы (ТДТС), заключающееся в гистологическом исследовании слизистой оболочки желудка, определении в супернатанте ткани желудка активности перекисного окисления липидов (ПОЛ), изучении массы тимуса, селезенки, надпочечников. Этилметилгидроксипиридина сукцинат при трансдермальном введении в дозах 20-75 мг/кг проявляет гастропротекторный эффект на модели 18-часовой иммобилизации предварительно голодавших сутки животных.

Ключевые слова: 18-часовая иммобилизация, трансдермальная терапевтическая система, этилметилгидроксипиридина сукцинат, гастропротекторная активность.

Актуальной проблемой во всем мире является развитие гастропатий, индуцированных не только приемом этанола, нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), но и инициированных стрессом.

Предложено большое количество теорий ulcerogenesis, наиболее признанными

We have carried out an experimental study of dose-dependent gastroprotective activity of transdermal plaster with ethylmethylhydroxypyridine succinate (mexidol), the purpose of which was the histological study of gastric mucosa, determination of lipid peroxidation (LP) in gastric tissue supernatant, weight study of thymus, spleen, and adrenals. Ethylmethylhydroxypyridine succinate has gastroprotective action in transdermal implementation at 20-75 mg/kg dose on the model of 18-hour immobilization of animals which had been starving for 24 hours.

Keywords: 18-hour immobilization, transdermal therapeutic system, ethylmethylhydroxypyridine succinate, gastroprotective action.

из них являются сосудистая, гормональная, неврогенная теории [2]. Ведущее значение в ulcerogenesis принадлежит частным механизмам, из которых заслуживает особого внимания механизм развития эрозивных поражений в результате активации процессов перекисного окисления липидов в

плазме крови или ткани слизистой оболочки желудка.

В последние годы в клинической медицине возрастает интерес к разработке эффективных мер защиты от разрушающего воздействия активных форм кислорода и перекисных радикалов молекул биосубстрата, среди которых первое место принадлежит внедрению в медицинскую практику антиоксидантов, включение в комплексную терапию которых будет способствовать эффективной профилактике и терапии многочисленных заболеваний [5].

В настоящее время в гастроэнтерологии применяются несколько лекарственных препаратов антиоксидантов, синтезирован ряд новых оригинальных соединений с антигипоксантами и антиоксидантными свойствами, применяемые чаще всего перорально, не обладающие пролонгированным характером высвобождения.

Гастропротекторная и стресспротекторная активность субстанции этилметилгидроксипиридина сукцината при ее пероральном приеме в определенном спектре доз доказана на различных моделях ulcerogenesis [1].

Авторами сконструирована ТДТС матричного типа с этилметилгидроксипиридина сукцинатом согласно патента и доказана церебропротекторная активность мексидола в составе системы на модели черепно-мозговой травмы в дозах 30-50 мг/кг [3, 4, 7].

Изучение гастропротекторных свойств этилметилгидроксипиридина сукцината при его трансдермальном введении с использованием классической модели стресса позволит не только расширить знания в области патогенеза, но и выявить возможность использования трансдермального способа введения с целью доставки в организм этилметилгидроксипиридина сукцината.

Целью работы явилось изучение гастропротекторных свойств этилметилгидроксипиридина сукцината (мексидола) при его трансдермальном введении в форме ТДТС матричного типа на модели 18-часовой иммобилизации предварительно голодавших сутки животных.

Доклинические фармакологические ис-

следования проводили с использованием экспериментальных животных – белых лабораторных крыс-самцов массой 220-240 г. Предварительно животные были разделены на 16 групп ($n = 7$): интактную (И), контрольные группы КТЭ 1-6, опытные ЭПТ 1-7. Также выделяли группу сравнения ЭВ и соответствующую ей контрольную группу животных, которые получали внутрижелудочно воду очищенную в том же объеме и с той же кратностью.

Животных содержали в условиях вивария на обычной лабораторной диете. Все экспериментальные процедуры выполнялись в полном соответствии с российскими и международными этическими нормами научных исследований [6].

При изучении гастропротекторной активности опытным группам животных (ЭПТ 1-7) накладывали ТДТС с мексидолом с определенной площадью на межлопаточную область спины за 5 дней до иммобилизации и в момент воздействия стресса с содержанием в 1 см² системы 2 мг лекарственного вещества (ЛВ) в дозах 5, 10, 15, 20, 40, 75 и в дозе 150 мг/кг с содержанием в 1 см² 4 мг ЛВ. Дозы мексидола выбраны исходя из литературных данных о применении 5% раствора мексидола для инъекций, а также с учетом степени высвобождения ЛВ из ТДТС по результатам биофармацевтического метода исследования (56,8%) [3]. Сверху ТДТС фиксировали полоской пластыря гипоаллергенного. ТДТС заменяли с периодичностью 1 раз в 3 дня. Предварительно перед наложением ТДТС пинцетом очищали от шерсти участок кожи межлопаточной области крысы, протирали его 20% этанолом и насухо вытирали.

Для контрольных групп конструировали серию ТДТС без лекарственного вещества, содержащую только компоненты трансдермальной матрицы. Контрольным группам животных (КТЭ 1-7) аналогичным образом накладывали ТДТС с той же площадью, что и в соответствующих опытных группах. После 18-часовой иммобилизации перед декапитацией животных ТДТС с поверхности кожи удаляли.

Животным группы сравнения (ЭВ)

мексидол вводили в дозе 20 мг/кг/сут внутривентрикулярно через зонд, предварительно растворив субстанцию препарата в 2 мл воды очищенной. Раствор мексидола вводили перорально в течение 5 дней до воздействия стресса, осуществляя последнее введение за 30 минут до иммобилизации. Для сравнения выбрана терапевтически эффективная доза мексидола с учетом литературных данных [1, 2].

Иммобилизацию проводили путем фиксации ремнями за конечности животных на платформах, расположенных под углом 45° в положении на спине. По истечении 18 часов иммобилизации животных повторно взвешивали, фиксируя степень снижения массы тела по сравнению с исходным уровнем и декапитуировали под легким эфирным наркозом. Из декапитуированного тела крысы извлекали желудок, разрезали его по малой кривизне и промывали изотоническим раствором натрия хлорида. Состояние слизистой желудка оценивали физическими и гистологическими методами.

На слизистой оболочке желудка (СОЖ) с помощью увеличительного стекла регистрировали количество эрозий и геморрагий в расчете на одно животное, общую площадь поражения слизистой в мм². Фрагменты биоптатов желудков крыс фиксировали в 10% растворе нейтрализованного формалина и подвергали стандартной гистологической проводке. Гистологические исследования гастробиоптатов выполнены на базе Смоленского областного института патологии при СГМА.

Гомогенат слизистой оболочки желудка готовили в день проведения эксперимента из расчета 500 мг ткани на 5 мл фосфатного буфера.

После центрифугирования в супернатанте гомогената ткани желудка определяли активность перекисного окисления липидов (ПОЛ), исследуя основные параметры биофлуоресценции на отечественном биофлуориметре З606М (Россия).

В качестве оценочных показателей использовали величину светосуммы (S), максимальную интенсивность хемилюминесцентного свечения (Ф_{макс.}), значение соотношения Ф_{макс.}/S, тангенса угла подъема быстрой вспышки (Lt_g), тангенса угла спада быстрой вспышки (Rt_g), времени достижения максимума (Т_{макс.}) [3]. После декапитации и извлечения органов на аналитических весах (ВЛР-200г-М 2 класса) определяли массу тимуса, селезенки, надпочечников, вычисляли коэффициент по формуле:

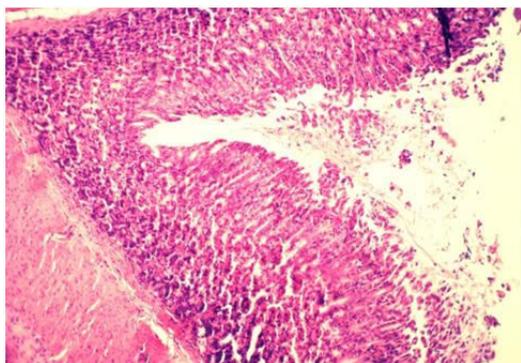
$$\begin{aligned} \text{коэффициент массы} &= \\ &= \text{масса органа} / \text{масса тела} * 1000. \end{aligned}$$

Результаты экспериментов подвергали статистической обработке с помощью пакета StatGraphics v 5.0.

Результаты экспериментов свидетельствовали о том, что острый иммобилизационный стресс у животных контрольной группы в 100% случаев сопровождался не только возникновением эрозий клиновидно-щелевидной формы, но и гипертрофией надпочечников, инволюцией тимуса, селезенки, активацией процессов липидной перекисидации в супернатанте гомогената ткани желудка. Это проявлялось в достоверном увеличении значений максимальной интенсивности хемилюминесцентного свечения в сравнении с интактом ($p < 0,05$), величины светосуммы хемилюминесценции ($p < 0,00001$), тангенса угла подъема быстрой вспышки ($p < 0,00001$), а также в снижении значений тангенса угла спада быстрой вспышки ($p < 0,05$) и времени достижения максимума ($p < 0,05$) в сравнении с интактной группой.

Гистологическое исследование гастробиоптатов контрольных групп животных подтвердило наличие острых эрозий и геморрагий в СОЖ (рис. 1).

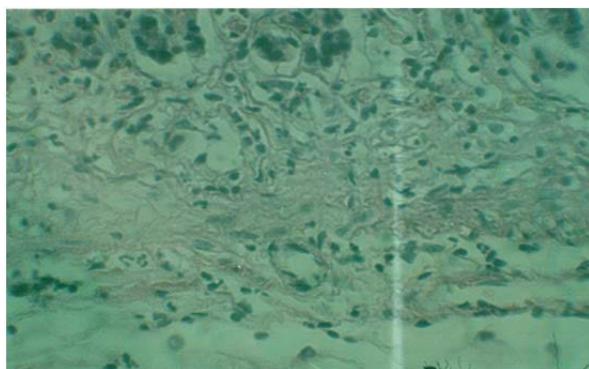
Применение ТДТС с мексидолом, а также внутривентрикулярное введение субстанции ЛВ с целью профилактики стрессиндуцированного язвенного поражения СОЖ изменяло картину и степень поражения СОЖ.



Крыса ♂, вес 224,8 г. Увеличение ×40 (объектив). Эрозия клиновидной формы. Слущивание эпителия валиков.

Рисунок 1 – СОЖ крыс контрольной группы

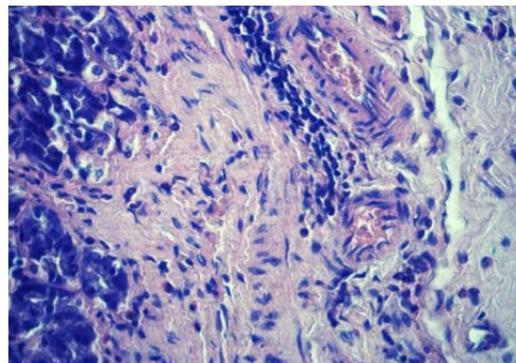
Гистологическое исследование гастро-биоптатов опытных групп на фоне применения ТДТС с антиоксидантом свидетельствовало об отсутствии эрозивных дефектов СОЖ. Наблюдали стазы в капиллярах, слущивание эпителия валиков, имеющее вторичный характер и, по-видимому, связанное



Крыса ♂, вес 223,8,0 г. Увеличение ×360. Лейкоцитарная инфильтрация

Рисунок 3 – СОЖ крыс группы сравнения на фоне фармакологической коррекции этилметилгидроксипиридина сукцинатом в дозе 20 мг/кг при внутрижелудочном введении

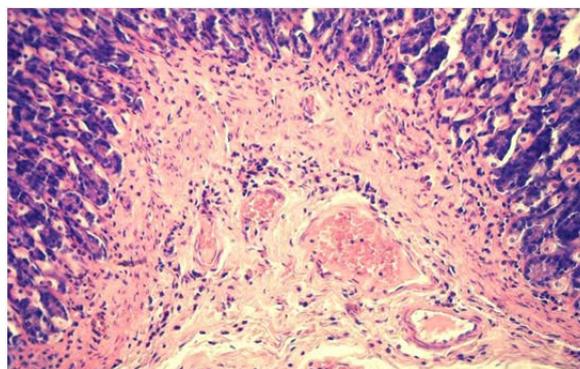
На фоне стрессорного повреждения трансдермальный мексидол оказывал защитное действие: пятидневное лечебно-профилактическое трансдермальное введение мексидола в дозах 20-75 мг/кг способствовало достоверному уменьшению не



Крыса ♂, вес 224,6 г. Увеличение ×40 (объектив). Стаз в капиллярах. Лейкоцитарная инфильтрация вокруг сосудов, спазм сосудов.

Рисунок 2 – СОЖ крыс на фоне коррекции этилметилгидроксипиридина сукцинатом в форме ТДТС в дозе 40 мг/кг

с дисциркуляторным повреждением в подслизистом слое (рис. 2, 4). Достоверных различий в гистологической картине гастро-биоптатов на фоне применения ТДТС с этилметилгидроксипиридина сукцинатом в дозах 20-75мг/кг, а также группы сравнения выявлено не было (рис. 2, 3, 4).



Крыса ♂, вес 231,3 г. Увеличение ×20. Полнокровные сосуды подслизистого слоя. Лейкоцитарная инфильтрация вокруг сосудов

Рисунок 4 – СОЖ крыс на фоне фармакологической коррекции этилметилгидроксипиридина сукцинатом в форме ТДТС в дозе 75 мг/кг

только количества дефектов слизистой относительно контрольных значений ($p < 0,001$), но и общей площади поражения (табл. 1) относительно значений группы сравнения ($p < 0,05$).

Таблица 1 – Результаты исследования количества дефектов СОЖ крыс и общей площади поражения при трансдермальном и внутрижелудочном введении этилметилгидроксипиридина сукцината, (M+m)

Группа	Количество дефектов СОЖ на 1 животное, шт.	Общая площадь поражения, кв. мм
Интактная группа	-	-
КТЭ-1	4,29±0,70	3,66±0,72
ЭПТ-1 5мг/кг	3,29±0,45 p<0,05; p ₁ <0,01	0,75±0,24 p<0,0001; p ₁ <0,0001
КТЭ-2	5,63±0,76	3,84±0,61
ЭПТ-2 10мг/кг	3,75±1,16 p<0,01; p ₁ <0,05	1,20±0,47 p<0,001; p ₁ <0,01
КТЭ-3	4,38±0,89	4,07±0,83
ЭПТ-3 15мг/кг	3,34±0,83 p<0,05; p ₁ <0,05	1,10±0,16 p<0,00001; p ₁ <0,00001
КТЭ-4	5,14±0,83	6,00±1,17
ЭПТ-4 20мг/кг	2,00±1,19 p<0,001	0,38±0,22 p<0,00001; p ₁ <0,00001
КТЭ-5	5,00±0,63	5,14±0,75
ЭПТ-5 40мг/кг	2,50±0,77 p<0,0001	0,88±0,15 p<0,00001; p ₁ <0,00001
КТЭ 6-7	5,14±0,83	1,95±0,44
ЭПТ-6 75мг/кг	1,62±0,62 p<0,0001	0,24±0,09 p<0,00001; p ₁ <0,00001
ЭПТ-7 150мг/кг	0,88±0,54 p<0,00001; p ₁ <0,05	0,06±0,04 p<0,00001; p ₁ <0,00001
ЭВ 20мг/кг	2,00±0,76 p<0,0001	2,07±0,23 p<0,00001
К	5,83±1,39	6,80±0,83

Примечание: в табл. 1,2,3 - p<0,05- достоверные отличия по отношению к контрольной группе; p₁<0,05 – достоверные отличия по отношению к группе сравнения.

Этилметилгидроксипиридина сукцинат в форме ТДТС в вышеуказанном спектре доз способствовал достоверному снижению активности реакций липидной пероксидации в супернатанте гомогената ткани желудка и повышению антиоксидантного статуса организма относительно значений контрольных групп животных (p < 0,001), корректируя патологически сниженные или завышенные параметры биоиндуцированной хемилюминесценции, не уступая по эффективности группе сравнения и в некоторых случаях даже превосходя ее (p₁ < 0,001).

Курсовое трансдермальное введение этилметилгидроксипиридина сукцината в дозах 40-150 мг/кг способствовало достоверному уменьшению степени гипертрофии надпочечников, инволюции тимуса и селезенки (p < 0,05), при этом стресс-протекторный эффект трансдермального этилметилгидроксипиридина сукцината был сопоставим с эффектом группы сравнения, а в дозах 75-150 мг/кг даже превышал его (табл. 2, 3).

Таблица 2 – Результаты исследования влияния иммобилизационного стресса на массу надпочечников крыс при применении ТДТС с этилметилгидроксипиридина сукцинатом, (M±m)

Группа животных	К массы надпочечников	% к интакту
Интактная группа	0,0825±0,009	100%
КТЭ-1	0,101±0,009	122,42%
ЭПТ-1 5мг/кг	0,094±0,009 p<0,05	113,94%
КТЭ-2	0,090±0,002	109,58%
ЭПТ-2 10мг/кг	0,094±0,002 p<0,05	113,94%
КТЭ-3	0,109±0,008	132,12%

Продолжение таблицы 2

Группа животных	К массы надпочечников	% к интакту
ЭПТ-3 15мг/кг	0,100±0,007 p<0,01	121,21%
КТЭ-4	0,099±0,009	120,0%
ЭПТ-4 20мг/кг	0,094±0,007 p<0,05	113,94%
КТЭ-5	0,119±0,009	144,24%
ЭПТ-5 40мг/кг	0,092±0,005 p<0,01; p ₁ <0,001	111,52%
КТЭ 6-7	0,102±0,008	123,64%
ЭПТ-6 75мг/кг	0,088±0,004 p ₁ <0,01; p ₂ <0,01	106,67%
ЭПТ-7 150мг/кг	0,096±0,004 p<0,01	116,36%
ЭВ 20мг/кг	0,093±0,003 p<0,05; p ₁ <0,001	112,73%
К	0,104±0,004	126,06%

Примечание: p₂<0,05 - достоверные отличия по отношению к группе сравнения; p₃<0,05 – достоверные отличия между опытными группами.

Таблица 3 – Результаты исследования влияния иммобилизационного стресса на массу тимуса и селезенки крыс при применении этилметилгидроксипиридина сукцината в форме ТДТС, (M±m)

Группа животных	Тимус К массы тимуса	Тимус % к интакту	Селезенка К массы селезенки	Селезенка % к интакту
1	2	3	4	5
Интактная группа	1,023±0,01	100%	3,35±0,26	100%
КТЭ-1	0,65 ± 0,056	63,54%	2,11±0,12	62,98%
ЭПТ-1 5мг/кг	0,66±0,07 p<0,0001; p ₂ <0,05	64,52%	2,12±0,11 p<0,00001; p ₂ <0,00001	63,28%
КТЭ-2	0,57±0,05	55,72%	2,01±0,09	60,0%
ЭПТ-2 10мг/кг	0,65± 0,07 p <0,00001; p ₂ <0,05	63,54%	2,36±0,19 p <0,00001; p ₁ <0,01; p ₂ <0,001	70,45%
КТЭ-3	0,61± 0,05	59,63%	1,92±0,11	57,31%
ЭПТ-3 15мг/кг	0,67 ± 0,06 p <0,00001	65,49%	2,25±0,17 p <0,00001; p ₁ <0,01; p ₂ <0,0001	67,16%
КТЭ-4	0,59± 0,03	57,67%	1,73±0,11	51,64%
ЭПТ-4 20мг/кг	0,61 ± 0,04 p <0,00001; p ₂ <0,01	59,63%	2,50±0,24 p <0,0001; p ₁ <0,0001; p ₂ <0,01	74,63%
КТЭ-5	0,62±0,02	60,61%	1,72±0,09	51,34%
ЭПТ-5 40мг/кг	0,71± 0,02 p <0,00001; p ₁ <0,0001	69,40%	2,54±0,24 p <0,001; p ₁ <0,00001 p ₂ <0,01	75,82%
КТЭ 6-7	0,69±0,04	67,45%	2,46±0,16	73,43%
ЭПТ-6 75мг/кг	0,79 ± 0,05 p<0,00001; p ₁ <0,001	77,22%	2,77±0,23 p <0,01; p ₁ <0,05	82,69%
ЭПТ-7 150мг/кг	1,05±0,04 p ₁ <0,00001; p ₂ <0,001	102,64%	3,79±0,11 p <0,01; p ₁ <0,00001; p ₂ <0,00001	113,13%

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4	5
ЭВ 20мг/кг	0,79±0,11 p < 0,001; p ₁ < 0,01	77,22%	2,94±0,17 p < 0,01; p ₁ < 0,0001	87,76%
К	0,58±0,10	56,70%	1,87±0,31	55,82%

Примечание: p < 0,05 – достоверные отличия по отношению к интактной группе; p₁ < 0,05 – достоверные отличия по отношению к контрольной группе; p₂ < 0,05 – достоверные отличия по отношению к группе сравнения; p₃ < 0,05 – достоверные отличия между опытными группами.

Результаты экспериментов, представленные в таблицах 1, 2, 3 и на рисунках 2, 4, свидетельствуют о том, что трансдермальный этилметилгидроксипиридина сукцинат при применении в течение 5 дней до 18-часовой иммобилизации и в момент воздействия стресса (лечебно-профилактическая схема) в дозах 20-75 мг/кг проявляет высокую гастропротекторную активность, а в дозах 40-150 мг/кг стресс-протекторную активность, однако в дозе

150 мг/кг этилметилгидроксипиридина сукцинат инициирует гемолиз эритроцитов после его 14-дневного трансдермального введения, что было выявлено в ходе исследования субхронической токсичности.

Таким образом, спектр терапевтических доз этилметилгидроксипиридина сукцината в форме ТДТС на модели 18-часовой иммобилизации составил 20-75 мг/кг.

Выводы

1. Пятидневное лечебно-профилактическое трансдермальное введение этилметилгидроксипиридина сукцината в дозах 20-75 мг/кг способствует достоверному уменьшению количества дефектов слизистой относительно контрольных значений, общей площади поражения относительно значений группы сравнения с внутрижелудочным введением препарата.
2. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в форме ТДТС в дозах 20-75 мг/кг способствует достоверному снижению активности реакций липидной перекисидации в ткани желудка и повышению антиоксидантного статуса организма относительно значений контрольных групп животных.
3. Этилметилгидроксипиридина сукцинат в форме ТДТС в дозах 40-150 мг/кг способствует достоверному уменьшению степени гипертрофии надпочечников, инволюции тимуса и селезенки относительно контрольной группы животных.

Библиографический список

1. Крюкова Н.О. Сравнительное изучение гастропротекторных свойств антигипоксантов разного химического строения: Автореф. дис. канд. мед. наук. – Смоленск, 2010. – 21 с.
2. Лосенкова С.О. Изучение гастропротекторных свойств веществ с антиоксидантной и антигипоксантной активностью: Автореф. дис. канд. фарм. наук. – Пятигорск, 2005. – 22 с.
3. Лосенкова С.О. Теоретическое и экспериментальное обоснование создания трансдермальных лекарственных форм с антиоксидантами и антигипоксантами: Автореф. дис. д. фарм. наук. – М., 2013. – 44 с.
4. Лосенкова, С.О. Экспериментальное изучение церебропротекторной активности этилметилгидроксипиридина сукцината при трансдермальном способе введения / С.О. Лосенкова, В.Е. Новиков, Э.Ф. Степанова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2015. - №1 (10). – С.158-161.
5. Новиков, В.Е. Экспериментальное изучение гастропротекторных свойств мексидола / В.Е. Новиков, С.О. Лосенкова, Л.Д. Смирнов // Вятский медицинский вестник. – 2004. – №2-4. – С.43-46.

6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под об. ред. чл.-корр. РАМН, проф. Р.У.Хабриева. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 827с.

7. Патент 2445123 Рос. Федерация: МПК А 61 L 15/44, А 61 К 31/44 / Трансдермальный пластырь / С.О. Лосенкова, Э.Ф.Степанова, В.Е. Новиков. – № 2010123973/15; заявл. 11.06.2010; опубл. 20.03.2012, Бюл. №8. – 10 с.

* * *

Лосенкова Светлана Олеговна – доктор фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой фармацевтической технологии Смоленского государственного медицинского университета. Область научных интересов: разработка и фармакотехнологические исследования трансдермальных лекарственных форм: ТДТС, мазей, гелей, разработка технологии сиропов. E-mail: losenkova-so@mail.ru.

Степанова Элеонора Федоровна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры технологии лекарств Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ГБОУ ВПО ВолгГМУ Минздрава России. Область научных интересов: разработка составов и фармакотехнологические исследования мягких, жидких ЛФ. E-mail: EFStepanova@yandex.ru.