



2022 Том / Volume X

№ 6

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

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



Научно-практический журнал

ФАРМАЦИЯ И ФАРМАКОЛОГИЯ

Периодичность 6 номеров в год

Том 10, Выпуск 6, 2022

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 MD, PhD, профессор, г. Генуя, Италия

Организация и экономика фармацевтического дела / Экономика и менеджмент медицины

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

Егорова Светлана Николаевна доктор фармацевтических наук, профессор, г. Казань, Россия

Сомасундарам Субраманиан MD, Россия/Индия

Статьи, представленные в разделы **Обзоры, лекции / Фармацевтическое образование / 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, кандидат фармацевтических наук, г. Пятигорск, Россия

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

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

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

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

Адрес издательства: 357532, г. Пятигорск, пр-кт 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, 2022
© Пятигорский медико-фармацевтический институт –
филиал ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России, 2022
© Авторы, 2022

Editor-in-Chief

Vladimir I. Petrov

Academician RAS, Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Volgograd, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Aleksandr A. Ozerov

Doctor of Sciences (Chemistry), Professor, Volgograd, Russia

Maxim V. Chernikov

Doctor of Sciences (Medicine), Associate Professor, Pyatigorsk, Russia

Editorial Board**Pharmacognosy, Botany**

Vladimir A. Kurkin

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Samara, Russia

Ifrat N. Zilfikarov

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor of RAS, Moscow, Russia

Pharmaceutical Technology and Biotechnology

Elena I. Sakanyan

Doctor of Sciences (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

Doctor of Sciences (Medicine), Professor, Moscow, Russia

Pascal Bousquet

MD, PhD, Professor, Strasbourg, France

Campisi Corradino

MD, PhD, Professor, Genoa, Italy

Organization and Economy of Pharmacy / Economy and Management of Medicine

Igor A. Narkevich

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Saint-Petersburg, Russia

Svetlana. N. Egorova

Doctor of Sciences (Pharmacy), Professor, Kasan, 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., Candidate of Sciences (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Proofreader: Mischenko Ekaterina S., Candidate of Sciences (Pharmacy), Pyatigorsk, Russia

Translator: Davydenko Lubov G., Candidate of Sciences (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, 2022

© Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute –
branch of Volgograd State Medical University, 2022

©Authors, 2022

СОДЕРЖАНИЕ / CONTENTS

ОБЗОРЫ / REVIEWS

<i>О.А. Загубная, Я.Р. Нарциссов</i> МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВИТАМИНА В ₆500	<i>O.A. Zagubnaya, Y.R. Nartsissov</i> MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING THERAPEUTIC ACTION OF VITAMIN B ₆500
<i>О.А. Рачинская, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов</i> ОСОБЕННОСТИ СТРАТЕГИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК КОЖИ515	<i>O.A. Rachinskaya, E.V. Melnikova, V.A. Merkulov</i> FEATURES OF QUALITY CONTROL STRATEGY FOR DRUGS BASED ON VIABLE SKIN CELLS515

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ / RESEARCH ARTICLE

Фармакология и клиническая фармакология / Pharmacology and Clinical Pharmacology

<i>Е.А. Патраханов, В.М. Покровский, А.Ю. Карагодина, А.М. Крайшклина, Н.С. Жунусов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.Б. Алтухова</i> СОЗДАНИЕ КЛОНА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ С КОНДИЦИОННЫМ НОКАУТОМ ГУМАНИЗИРОВАННОГО ГЕНА SNCA525	<i>E.A. Patrakhanov, V.M. Pokrovsky, A.Yu. Karagodina, A.M. Krayushkina, N.S. Zhunusov, A.V. Deykin, M.V. Korokin, M.V. Pokrovsky, O.B. Altukhova</i> DEVELOPMENT OF MURINE STEM CELLS WITH CONDITIONAL KNOCKOUT OF HUMANIZED SNCA GENE 525
<i>Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, Ю.В. Горбунова, А.В. Сtryгин, Т.М. Андриашвили, А.А. Соколова, Н.С. Болохов, В.Э. Пустынников, Е.А. Фомичев</i> ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМБИНАЦИИ СИТАГЛИПТИНА С АМИНОГУАНИДИНОМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ536	<i>D.V. Kurkin, D.A. Bakulin, E.I. Morkovin, Yu.V. Gorbunova, A.V. Strygin, T.M. Andriashvili, A.A. Sokolova, N.S. Bolokhov, V.E. Pustynnikov, E.A. Fomichev</i> HYPOGLYCEMIC EFFECT OF SITAGLIPTIN AND AMINOGUANIDINE COMBINATION IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS536
<i>А.А. Спасов, О.Н. Жуковская, А.И. Ращенко, А.А. Бригадирова, Р.А. Литвинов, Н.А. Гурова, А.В. Смирнов, Н.Г. Паньшин, Х.С.А. Аббас, А.С. Морковник</i> СОЕДИНЕНИЕ ДФ-5 ЗАМЕДЛЯЕТ РАЗВИТИЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС549	<i>A.A. Spasov, O.N. Zhukovskaya, A.I. Rashchenko, A.A. Brigadirova, R.A. Litvinov, N.A. Gurova, A.V. Smirnov, N.G. Pan'shin, H.S.A. Abbas, A.S. Morkovnik</i> DF-5 COMPOUND DELAYS DEVELOPMENT OF DIABETIC NEPHROPATHY IN RATS549
<i>В.Б. Васильюк, А.Ю. Бородулева, П.Д. Соболев, А.Г. Никифорова, В.Г. Мозговая, О.В. Филон, А.В. Зинковская, В.Г. Игнатиев, М.Ю. Самсонов, И.С. Козлова, Е.К. Ханонина</i> ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ПРЕПАРАТА МОЛНУПИРАВИРА У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ562	<i>V.B. Vasilyuk, A.Yu. Boroduleva, P.D. Sobolev, A.G. Nikiforova, V.G. Mozgovaya, O.V. Filon, A.V. Zinkovskaya, V.G. Ignatiev, M.Yu. Samsonov, I.S. Kozlova, E.K. Khanonina</i> BIOEQUIVALENCE STUDY OF GENERIC MOLNUPIRAVIR IN HEALTHY VOLUNTEERS562
<i>Л.А. Балыкова, О.А. Радаева, К.Я. Заславская, П.А. Белый, В.Ф. Павелкина, Н.А. Пятаев, А.Ю. Иванова, Г.В. Родоман, Н.Э. Костина, В.Б. Филимонов, Е.Н. Симакина, Д.А. Быстрицкий, А.С. Агафьина, К.Н. Корянова, Д.Ю. Пушкар</i> ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ОРИГИНАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СУКЦИНАТА ГЕКСАПЕПТИДА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ COVID-19 У ВЗРОСЛЫХ ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ573	<i>L.A. Balykova, O.A. Radaeva, K.Ya. Zaslavskaya, P.A. Bely, V.F. Pavelkina, N.A. Pyataev, A.Yu. Ivanova, G.V. Rodoman, N.E. Kostina, V.B. Filimonov, E.N. Simakina, D.A. Bystritsky, A.S. Agafina, K.N. Koryanova, D.Yu. Pushkar</i> EFFICACY AND SAFETY OF ORIGINAL DRUG BASED ON HEXAPEPTIDE SUCCINATE IN COMPLEX COVID-19 THERAPY IN ADULTS HOSPITALIZED PATIENTS573
<i>С.Г. Дзугкоев, Ф.С. Дзугкоева, О.И. Маргиева, А.Е. Хубулова, И.В. Можяева</i> УЧАСТИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В МЕХАНИЗМАХ ТОКСИЧНОСТИ АЦЕТАТА СВИНЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ589	<i>S.G. Dzugkoev, F.S. Dzugkoeva, O.I. Margieva, A.E. Khubulova, I.V. Mozhaeva</i> EXPERIMENTAL PARTICIPATION OF PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES IN MECHANISMS OF LEAD ACETATE TOXICITY589

УДК 615.03 + 577.16



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ЛЕЖАЩИЕ В ОСНОВЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ВИТАМИНА В₆

О.А. Загубная^{1,2}, Я.Р. Нарциссов^{1,2}

¹ Научно-исследовательский институт цитохимии и молекулярной фармакологии, 115404, Россия, г. Москва, ул. 6-я Радиальная, д. 24, стр. 14

² Группа биомедицинских исследований (BiDiPharma GmbH), 22962, Германия, Зик, Бюльтбек, 5

E-mail: yn_brg@icmph.org

Получена 10.10.2022

После рецензирования 15.11.2022

Принята к печати 10.12.2022

Цель. Анализ молекулярных механизмов, определяющих возможность использования витамина В₆ в клинической практике для коррекции различных патологических состояний.

Материалы и методы. В качестве инструментов проведения исследования использовались информационно-поисковые (Scopus, PubMed) и библиотечные (eLibrary) базы данных. В ряде случаев для семантического поиска использовалось приложение ResearchGate. В работе осуществлялся анализ и обобщение научной литературы по теме исследования, охватывающей период с 1989 по настоящее время.

Результаты. Показано, что все химические формы витамина В₆ способны проникать через мембраны большинства клеток путем свободной диффузии, при этом внутри формируют фосфорилированные формы. Пиридоксальфосфат является биологически важным метаболитом, непосредственно участвующим в качестве кофактора во множестве внутриклеточных реакций. Потребности в данном кофакторе зависят от возраста, пола и состояния пациента. Особую роль в потреблении витамина В₆ играет беременность и период лактации. В большинстве случаев сбалансированное питание позволяет обеспечить приемлемый уровень данного витамина. В то же время его дефицит приводит к развитию целого ряда патологических состояний, включающих нейродегенеративные заболевания, воспаление и диабет. Также возможны негативные проявления со стороны центральной нервной системы при избыточном потреблении В₆.

Заключение. Восполнение уровня витамина В₆ при его выявленном дефиците является необходимым условием успешной терапии заболеваний центральной нервной системы, диабета и коррекции иммунного статуса пациентов. При этом необходимо соблюдать сбалансированный прием данного кофактора во избежание негативных эффектов на метаболизм при его переизбытке.

Ключевые слова: пиридоксин; пиридоксальфосфат; метаболизм; витамин В₆

Список сокращений: PN – пиридоксин; PM – пиридоксамин; PL – пиридоксаль; PNP – пиридоксинфосфат; PMP – пиридоксаминфосфат; PLP – пиридоксальфосфат; PNG – пиридоксингликозид; PDHK – пиридоксалькиназа; PNPO – пиридоксин(амин)фосфатоксидаза; ALP – тканенеспецифическая алкалинфосфатаза; PDXP – пиридоксаль(пиридоксин/пиридоксамин)фосфатаза; AT – аминотрансфераза; DH – альдегиддегидрогеназа; PNGH – пиридоксингликозидгидролаза; LPH – лактаза-флоретингидролаза; AOX – альдегидоксидаза; E-PLP – связанный с ферментом пиридоксальфосфат; E-PMP – связанный с ферментом пиридоксаминфосфат; PCP – рекомендуемая суточная потребность; POX – L-пипексалооксидаза; PYRC – Δ1-пирролин-5-карбоксилатредуктаза; AASA, α-аминоадипат-6-полуальдегид; AASDH – антиквитин (α-аминоадипат-6-полуальдегиддегидрогеназа); AADAT – α-аминоадипатаминотрансфераза; P6C – L-Δ1-пиперидин-6-карбоксилат; P5C – L-Δ1-пирролин-5-карбоксилат, KYN – кинуренин; KYNA – кинурениновая кислота; XA – ксантурениновая кислота; ПНЖК – полиненасыщенные жирные кислоты; КПГ – конечные продукты гликирования; АФК – активные формы кислорода; CRP – С-реактивный белок; TNF-α – фактор некроза опухоли-α; IL-1b – интерлейкин-1b; IL-6 – интерлейкин-6; WBC – число белых кровяных телец; ATP – аденозинтрифосфат; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; ЦНС – центральная нервная система; MMT – митохондриальный мембранный транспортер; ROS – реактивные формы кислорода; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер.

Для цитирования: О.А. Загубная, Я.Р. Нарциссов. Молекулярные механизмы, лежащие в основе терапевтического действия витамина В₆. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):500-514. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-500-514

© О.А. Загубная, Я.Р. Нарциссов, 2022

For citation: O.A. Zagubnaya, Y.R. Nartsissov. Molecular mechanisms underlying therapeutic action of vitamin В₆. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6):500-514. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-500-514

MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING THERAPEUTIC ACTION OF VITAMIN B₆

O.A. Zagubnaya^{1,2}, Y.R. Nartsissov^{1,2}

¹ Institute of Cytochemistry and Molecular Pharmacology,
Bldg 14, 24, 6th Radialnaya St., Moscow, Russia, 115404

² Biomedical Research Group, BiDiPharma GmbH,
5, Bültbek, Siek, Germany, 22962

E-mail: yn_brg@icmph.org

Received 10 Oct 2022

After peer review 15 Nov 2022

Accepted 10 Dec 2022

The aim of the study was to analyze the molecular mechanisms that determine the possibility of using vitamin B₆ in clinical practice for the correction of various pathological conditions.

Materials and methods. Information retrieval (Scopus, PubMed) and library (eLibrary) databases were used as research tools. In some cases, the ResearchGate application was used for a semantic search. The analysis and generalization of the scientific literature on the topic of research, covering the period from 1989 to the present, has been carried out in the work.

Results. It has been shown that all chemical forms of vitamin B₆ are able to penetrate the membranes of most cells by free diffusion, while forming phosphorylated forms inside. Pyridoxal phosphate is a biologically important metabolite that is directly involved as a cofactor in a variety of intracellular reactions. Requirements for this cofactor depend on the age, sex and condition of the patient. Pregnancy and lactation play a special role in the consumption of vitamin B₆. In most cases, a balanced diet will provide an acceptable level of this vitamin. At the same time, its deficiency leads to the development of a number of pathological conditions, including neurodegenerative diseases, inflammations and diabetes. Negative manifestations from the central nervous system are also possible with an excessive consumption of B₆.

Conclusion. Replenishment of the vitamin B₆ level in case of its identified deficiency is a necessary condition for the successful treatment of the central nervous system diseases, diabetes and correction of patients' immune status. At the same time, it is necessary to observe a balanced intake of this cofactor in order to avoid negative effects on metabolism in case of its excess.

Keywords: pyridoxine; pyridoxal phosphate; metabolism; vitamin B₆

Abbreviations: PN – pyridoxine; PM – pyridoxamine; PL – pyridoxal; PNP – pyridoxine phosphate; PMP – pyridoxamine phosphate; PLP – pyridoxal phosphate; PNG – pyridoxine glycoside; PDXK – pyridoxalkinase; PNPO – pyridoxine(amine) phosphate oxidase; ALP – tissue non-specific alkaline phosphatase; PDXP – pyridoxal(pyridoxine/pyridoxamine)phosphatase; AT – aminotransferase; DH – aldehyde dehydrogenase; PNGH – pyridoxine glycoside hydrolase; LPH – lactase-phloretin hydrolase; AOX – aldehyde oxidase; E-PLP – enzyme-linked pyridoxal phosphate; E-PMP – enzyme-bound pyridoxamine phosphate; RDM – recommended daily maintenance; POX – L-pipecolate oxidase; PYRC – Δ1-pyrroline-5-carboxylate reductase; AASA – α-amino adipate-6-semialdehyde; AASDH – antiquitin (α-amino adipate-6-semialdehyde dehydrogenase); AADAT – α-amino adipate aminotransferase; P6C – L-Δ1-piperidine-6-carboxylate; P5C – L-Δ1-pyrroline-5-carboxylate; KYN – kynurenine; KYNA – kynurenic acid; XA – xanthurenic acid; PUFAs – polyunsaturated fatty acids; AGEs – advanced glycation end product; ROS – reactive oxygen species; CRP – C-reactive protein; TNF-α – tumor necrosis factor-α; IL-1b – interleukin-1b; IL-6 – interleukin-6; WBCs – number of white blood cells; ATP – adenosine triphosphate; GABA – gamma aminobutyric acid; CNS – central nervous system; MMT – mitochondrial membrane transporter; BBB – blood-brain barrier.

ВВЕДЕНИЕ

Витамин B₆ – один из жизненно важных водорастворимых витаминов. Его открытие относится к началу XX века, которое произошло в результате поиска лекарственного средства от пеллагры [1]. В растворе данный витамин присутствует в виде 3 основных химических форм (витамеров) – спирта, альдегида и амина. В кислой среде витамин B₆ стабилен, но становится крайне нестабильным в нейтральной или щелочной среде, особенно при нагревании или на свету [2]. Хотя химические формы витамина B₆ относительно многообразны, только фосфорилированная форма альдегида выполняет функцию кофермента в организмах млекопитающих. Основной метаболизм данного витамина происходит в печени, однако и другие ткани обладают соответствующей метаболической активностью. При

этом продуктом катаболизма витамина B₆ является пиридоксин(амино)фосфат (4-pyridoxic acid, PA).

Среди биохимических реакций, непосредственно участвующих в метаболизме витамина B₆, необходимо выделить несколько ключевых ферментов (Рис. 1), в число которых входят:

- пиридоксалькиназа (PDXK, pyridoxal kinase, EC 2.7.1.35), кофакторы каталитической активности: ионы двухвалентных металлов (Mg²⁺, Zn²⁺, Co²⁺, Mn²⁺); соответствующая реакция:



- пиридоксин(амино)фосфатоксидаза (PNPO, pyridoxine-5'-phosphate oxidase, EC 1.4.3.5), кофактор каталитической активности: флавиномононуклеотид (FMN); соответствующая реакция:



- тканенеспецифическая алкалинфосфатаза (ALP, tissue nonspecific alkaline phosphatase, EC 3.1.3.1), кофакторы каталитической активности: Mg^{2+} , Zn^{2+} ; соответствующая реакция:



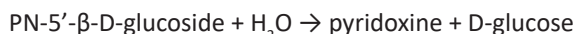
- пиридоксаль(пиридоксин/пиридоксамин) фосфатаза (PDXP pyridoxal(pyridoxine/pyridoxamine) phosphatase, EC 3.1.3.74), кофактор каталитической активности: Mg^{2+} ; соответствующая реакция:



- аминотрансфераза (AT, aminotransferase, EC 2.6.1.54); соответствующая реакция:



- пиридоксингликозидгидролаза (PNGH, PNG hydrolase, EC 3.2.1.62) и/или LPH – лактаза-флоретингидролаза (lactase-phloretin hydrolase, EC 3.7.1.4); соответствующая реакция:



- альдегидоксидаза (AOX, aldehyde oxidase, EC 1.2.3.1), кофакторы каталитической активности: [2Fe-2S] кластеры, FAD, Мо-молибдоптерин; соответствующая реакция:



Совокупность вышеупомянутых ферментов формирует пулы внутриклеточных производных витамина B_6 и предопределяет соответствующие уровни активности метаболических процессов, непосредственно сопряженных с участием пиридоксальфосфата. Примечательно, что отдельные типы бактерий кишечной микрофлоры человека способны синтезировать витамин B_6 в форме пиридоксальфосфата из дезоксиксилулозы 5'-фосфата и 4-фосфогидрокситреонина, а также из глицеральдегид-3-фосфата и D-рибулозы 5'-фосфата. Данными путями биосинтеза обладают следующие бактерии: бактероиды (*Bacteroides fragilis* и *Prevotella copri*), актинобактерии (*Bifidobacterium longum* и *Collinsella aerofaciens*) и протеобактерии (*Helicobacter pylori*) [3]. Несмотря на достаточно обширную информацию о воздействии на биохимические процессы данного представителя группы водорастворимых витаминов, на сегодняшний день нет до конца обоснованного представления о возможности его применения при различных патологических состояниях и молекулярных процессах, лежащих в основе предполагаемых положительных эффектов.

ЦЕЛЬ. Анализ молекулярных механизмов, лежащих в основе эффектов витамина B_6 , а также оценка возможности применения данного витамина при различных патологических состояниях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве инструментов проведения исследования использовались информационно-поисковые (Scopus, PubMed) и библиотечные

(eLibrary) базы данных. В ряде случаев для семантического поиска использовалось приложение ResearchGate. В работе осуществлялся анализ и обобщение научной литературы по теме исследования, охватывающей период с 1989 по ноябрь 2022 года. При поиске использовались следующие ключевые слова и комбинации слов: пиридоксальфосфат, рекомендуемая суточная потребность в витамине B_6 , дефицит витамина B_6 , pyridoxal phosphate, pyridoxine, PLP, vitamin B_6 metabolic pathways, PLP-dependent enzymes, pyridoxal phosphate-dependent reactions, vitamin B_6 daily intake, vitamin B_6 deficiency, pyridoxal phosphate and oxidative phosphorylation, PLP-dependent epilepsy, pyridoxal phosphate and diabetes, vitamin B_6 therapy, pyridoxine toxicity.

Для описания метаболизма производных B_6 с применением соответствующей классификации ферментов, катализируемых им реакций, а также участвующих кофакторов использовалась база данных BRENDA (<https://www.brenda-enzymes.org>). При детализации процессов поступления и распределения витамина B_6 в организме были использованы карты метаболических путей информационной базы данных KEGG (<https://www.kegg.jp>). Для построения химических формул и иллюстраций применялся программный пакет Corel Draw 2018/2022.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поступление и распределение витамина B_6 в организме

Отличительной особенностью пиридоксала (PL) и его производных является различие между биологически значимой активной формой витамина и той формой, которая способна проникать внутрь клеток.

Фосфорилированные формы витаминов B_6 и пиридоксингликозид не абсорбируются в кишечнике, поэтому они подлежат дефосфорилированию кишечными фосфатазами (PDXP) и дегликозилированию гидролазами (PNGH/LPH) [5]. Для витаминов B_6 показана абсорбция в кишечнике посредством пассивной диффузии [6, 7]. Возможно, существует транспорт витаминов B_6 при помощи переносчиков тиамина (THTR), которые относятся к семействам SLC19A2 и SLC19A3 и функционируют в кислой среде тонкого кишечника или других тканях [8]. Абсорбция витамина B_6 повышается при увеличении уровня транскрипции переносчиков (при дефиците пиридоксальфосфата), а также под действием протеинкиназы A. В свою очередь, при повышении внутриклеточного уровня цАМФ наблюдается значительное ингибирование абсорбции витамина B_6 , которая также чувствительна к действию диуретика амилорида [7].

После абсорбции клетками тонкого кишечника витамин B_6 рефосфорилируется соответствующими киназами (PDXK) и конвертируется в пиридоксальфосфат или с током крови доставляется в печень. В печени также происходит рефосфорилирование и конвертирование пиридоксинфосфата (PNP) и пиридоксаминфосфата (PMP) в пиридоксальфосфат (PLP) пиридоксин(амин)фосфатоксидазой (PNPO). Хотя данный процесс происходит в основном в печени, PNPO экспрессируется и во многих других тканях. Из печени через синусоидные капилляры PLP экспортируется в связанном состоянии с остатком лизина 190 альбумина [9].

Если потребление витаминов B_6 превышает необходимый уровень, PLP дефосфорилируется пиридоксальфосфатазой (PDXP) и окисляется альдегидоксидазой (AOX) до пиридоксиновой кислоты (PA). Показано также, что за процесс окисления PL может отвечать альдегиддегидрогеназа (ALDH, EC 1.2.1.4) и пиридоксаль оксидаза (PO, EC 1.2.3.8). Пиридоксиновая кислота выводится из организма с мочой, что составляет более 90% всего экскретируемого витамина B_6 [10].

Проникновение через клеточную мембрану большинства тканей осуществляется путем пассивной диффузии, исключением является проникновение через мембрану митохондрий и эритроцитов, после дефосфорилирования тканенеспецифичными алкалинфосфатазами (ALP) – эктоферментами, пришитыми к клеточным мембранам гликофосфатидилинозитолом (фосфоглицеридными якорями, GPI Anchors – glycosylphosphatidylinositol anchors). Возможно, PL проходит через гематоэнцефалический барьер посредством облегченной диффузии с использованием переносчика и «депонируется» внутри клеток мозга или сосудистого сплетения (CP) путем фосфорилирования PDXK [7]. Помимо печени, сосудистое сплетение является единственным органом, способным быстро мобилизовать PLP, что объясняет его высокую долю в цереброспинальной жидкости (CSF) относительно общего количества в организме, которая у человека составляет 38% [11].

Показано возможное участие переносчиков в процессе транспорта PL внутрь митохондрий, эритроцитов или через гематоэнцефалический барьер у человека, хотя соответствующие белки и кодирующие их синтез гены еще не определены. Тем не менее, у дрожжей за транспорт пиридоксина через цитоплазматическую мембрану отвечает белок Trp1, входящий в семейство пуриноцитозинового пермеаз, а белок Mtm1p отвечает за транспорт PLP в митохондрии [12].

В некоторых клетках, помимо печени, возможен катаболизм PLP до пиридоксаминфосфата под действием аминотрансферазы (AT), и последующий обратный процесс под действием PNPO, так называемый реутилизационный путь (salvage pathway) [11].

Гомеостаз PLP внутри клеток

Свободная внутриклеточная концентрация PLP поддерживается на низком уровне, равном 1 мкМ, во избежание «нежелательных» реакций альдегидного или карбонильного стресса. Для этого существуют связывающие PLP белки, такие как гликогенфосфорилаза в мышцах, гемоглобин в эритроцитах и альбумин в плазме крови [6].

Действие ферментов, синтезирующих PLP, а именно PDXK и PNPO ингибируется продуктом реакций. Более того, показано, что существует система переноса синтезированного пиридоксальфосфата непосредственно к целевым пиридоксальфосфатзависимым ферментам [11].

В клеточном гомеостазе пиридоксальфосфата играет роль связывающий его белок PROSC, нарушение функций которого приводит к накоплению пиридоксинфосфата внутри клеток [13].

Внутри митохондрий PLP тоже присутствует в связанной с белками форме: E-PLP – enzyme bound PLP, E-PMP – enzyme bound PMP, куда он поступает посредством переносчика митохондриальной мембраны (MMT) SLC25A39/40 [11]. Следует отметить пространственное распределение процессов превращения и транспорта витаминов в тканях. В большинстве случаев для переноса дефосфорилированной формы витамина B_6 нет особого переносчика. Это безусловно делает весьма перспективным использование данного кофермента в качестве активного компонента лекарственной формы. Основные пути транспорта и метаболических превращений витаминов B_6 показаны на рисунке 2.

Реакционные свойства витамина B_6

Все перечисленные далее реакционные свойства пиридоксальфосфата проявляются только в составе соответствующего фермента [14]. В состоянии покоя PLP ковалентно связана с ферментом (Рис. 3). При этом альдегидная группа пиридоксальфосфата и ϵ -аминогруппа остатка лизина в активном сайте фермента формируют основание Шиффа.

Такое состояние носит название внутреннего альдимины (Internal aldimine). Связывание субстрата с ферментом приводит к замещению ϵ -аминогруппы остатка лизина аминогруппой субстрата, процесс называется трансальдиминацией, а продукт носит название субстракт-PLP. Это состояние называется внешним альдимином (External aldimine). Состояние, формирующееся после разрыва одной из трех связей α -углеродного атома субстрата, является переходным и называется хиноноид (Quinonoid). Отрыв протона H^+ от α -углеродного атома субстрата соответствует реакциям трансаминции, β -элиминации или рацемизации, отрыв карбоксильной группы COO^- – декарбоксилированию, а отрыв боковой цепи R – ретроальдольному гидролизу (расщеплению). В ходе реакций PLP выступает в роли акцептора электронов, стабилизируя карбанион. Стабилизация возможна благодаря перераспределению отрицательного заряда внутри системы π -связей, образованной

основанием Шиффа и пиридиновым кольцом PLP. При этом необходимо, чтобы соответствующая связь была расположена перпендикулярно пиридиновому кольцу PLP, а соответствующие р-орбитали были параллельны. Это дает возможность отрицательному заряду α -углеродного атома субстрата наиболее оптимально стабилизироваться внутри системы п-связей [15].

Наряду с указанными выше свойствами можно отметить участие PLP в системе антиоксидантной защиты. За счет высокой реакционной способности PLP характеризуется значительной скоростью гашения $^1\text{O}_2$, сопоставимой с действием витаминов С и Е [16]. Кроме того, альдегидный витамин В₆ необходим для обеспечения синтеза глутатиона, поскольку PLP-зависимые ферменты синтезируют около 50% цистеина, одного из составных компонентов этого важнейшего антиоксиданта [17].

Суточная потребность в витамине В₆

Суточная потребность в витамине В₆ довольно сильно различается в зависимости от состояния пациента, возраста и пола (табл. 1). Причиной

различий суточной потребности в витамине В₆ можно с полной уверенностью считать индивидуальную вариативность в содержании и активности ферментов, использующих его в качестве субстрата или кофактора, а также увеличенный поток потребления В₆ во время беременности [18], грудного вскармливания [19] и при возрастных изменениях.

Потребление витамина В₆ может варьироваться в зависимости от возраста пациентов. Недавнее клиническое исследование количественного содержания витаминов В₆ в крови при приеме внутрь [20], показало, что в старшей возрастной группе (70,1±2,7 лет, 10 мужчин и 10 женщин) наблюдается сниженный уровень пиридоксина и пиридоксальфосфата в плазме крови, но повышенный уровень пиридоксиновой кислоты, по сравнению с данными младшей возрастной группы (24,2±2,8 года, 10 мужчин и 10 женщин). Общее количество принятых витаминов В₆ соответствовало рекомендованной Медицинской школой Гарварда суточной потребности: 1,3 мг для обоих полов в младшей возрастной группе; 1,5 мг и 1,7 мг для женщин и мужчин, соответственно, в старшей возрастной группе.

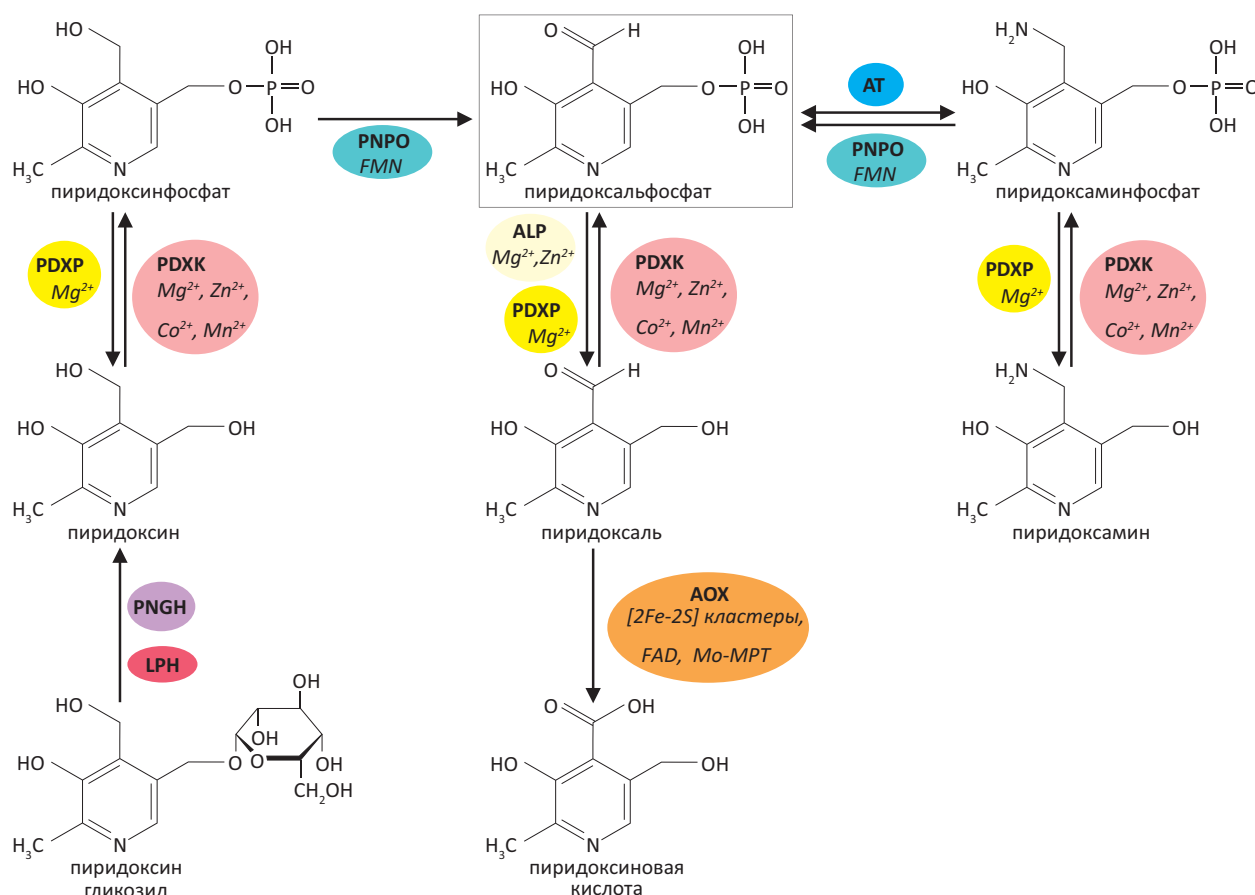


Рисунок 1 – Взаимное превращение трех витаминов В₆

Примечание: В составе метаболических процессов клеток участвуют три возможные формы, которые представляют собой спирт (пиридоксин, pyridoxine, PN), амин (пиридоксамин, pyridoxamine, PM) и альдегид (пиридоксаль, pyridoxal, PL). Каждый из витаминов может находиться в фосфорилированной форме: пиридоксинфосфат (pyridoxine 5'-phosphate, PNP), пиридоксаминфосфат (pyridoxamine 5'-phosphate, PMP) и пиридоксальфосфат (pyridoxal 5'-phosphate, PLP), соответственно [4]. В случае спиртового витамина возможно существование и гликозилированной формы: пиридоксингликозид (pyridoxine-5'-β-D-glucoside, PNG) [5].

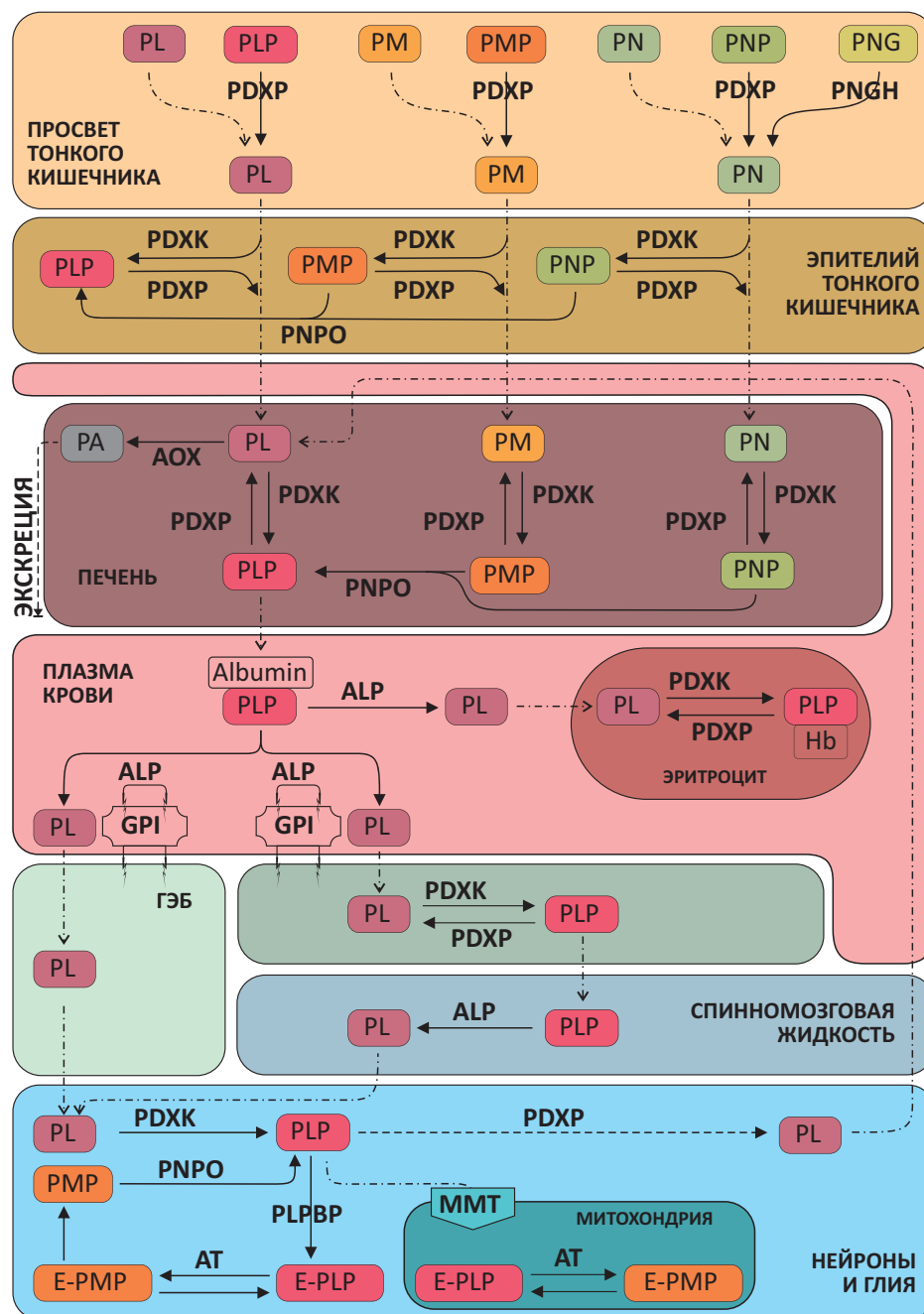
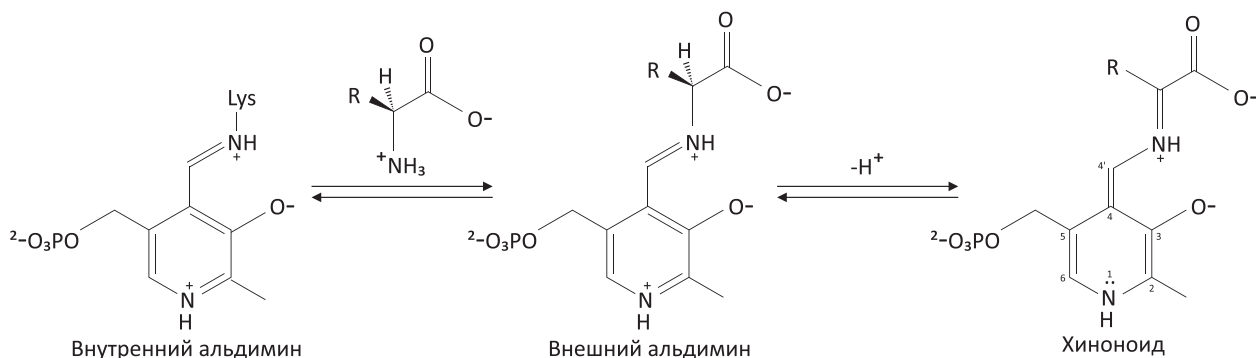
Рисунок 2 – Основные пути транспорта и тканевого распределения витаминов В₆

Рисунок 3 – Обобщенное представление состояний PLP в составе активного центра белка с учетом перехода внутреннего альдимина во внешний с последующим формированием хиноноида

Таблица 1 – Рекомендуемая суточная потребность (РСП) в витамине В₆, предлагаемая Европейским агентством по безопасности продуктов питания, в соответствии с определенным жизненным этапом (по данным Ali M.A. и соавт., 2022, [19])

Этап жизни	РСП, мг	Значимые процессы и эффекты на организм	Симптомы дефицита
Новорожденные	0–6 месяцев 0,1 7–12 месяцев 0,3	Жизненно важен для роста, развития и набора веса. Пожизненная терапия необходима новорожденным с врожденной недостаточностью глутаматдекарбоксилазы.	Дефицит может привести к возникновению резистентных к терапии полиморфных припадков.
Дети	1–3 года 0,5–0,6 4–9 лет 0,6	Требуется для биосинтеза тимидина и становления иммунитета.	
Подростки	Девочки 1–1,2 Мальчики 1–1,3	Эффективен при терапии симптомах поведенческих расстройств, ассоциированных с аутизмом, гиперактивностью и шизофренией. Адъювант к противоэпилептическим препаратам. Оказывает благоприятный эффект на стрессовое состояние, сопровождающее пубертатный период.	
Взрослые	Мужчины 1,3 Женщины Не беременные 1,3 Беременные 5,5–7,6 Кормящие 5,5–7,6	Чрезвычайно эффективен против колоректального рака у взрослых мужчин. Снижает уровень холестерина в плазме крови. Необходим для метаболизма эстрогенов. Показан женщинам с кистами молочных желез. Эффективен во время ПМС. Становление беременности, профилактика невынашивания. Коррекция проявлений гиперемезиса беременных. Необходим для синтеза гема и порфирина, а также надлежащей эксплуатации железа эритроцитами. Поддержание натального и постнатального развития в пределах нормы. То же, что и в предыдущем пункте. Перепады настроения. Уменьшение риска анемии.	Микроцитарная гипохромная анемия, лимфопения, судороги. Гиперемезис беременных, анемия, тошнота, рвота, самопроизвольные выкидыши. То же, что и в предыдущем пункте.
Пожилые	0,5–1,7	Снижение риска проявления синдрома раздраженного кишечника.	Дефицит может вызывать синдром раздраженного кишечника.

Таблица 2 – Механизмы, приводящие к нарушению функций PLP-зависимых ферментов и формирующие в последующем клинические или биохимические нарушения

Клинические и/или биохимические проявления нарушений метаболизма витамина В ₆	PLP-зависимые ферменты, связанные с клиническими и/или биохимическими проявлениями нарушений	Механизм	Ссылки
Эпилепсия (Seizures)	Аминотрансфераза разветвленных аминокислот (Branched-chain amino acid aminotransferase, BCAT1 + 2; EC 2.6.1.42)	Ингибирование синтеза глутамата в мозге за счет нарушения трансаминирования аминокислот с разветвленной цепью валина, лейцина, изолейцина и α-кетоглутарата до соответствующей α-кетокислоты и глутамата.	[24]
	Глутаматдекарбоксилаза (Glutamate decarboxylase, GAD; EC 4.1.1.15)	Нарушение регуляции взаимного превращения ГАМК/глутамата и, следовательно, нейронной возбудимости, в связи с ингибированием одного из процессов: синтеза тормозного нейромедиатора ГАМК трансаминированием α-кетоглутарата до глутамата (возбуждающего нейромедиатора), который, в свою очередь, декарбоксилируется обратно до ГАМК.	[25]
	ГАМК-трансаминаза (GABA-transaminase, GABA-T; EC 2.6.1.19)		

Клинические и/или биохимические проявления нарушений метаболизма витамина В ₆	PLP-зависимые ферменты, связанные с клиническими и/или биохимическими проявлениями нарушений	Механизм	Ссылки
Гипотензия, двигательные расстройства (паралич зрения, дистония, гипокинезия), вегетососудистая дистония	Декарбоксилаза ароматических аминокислот (Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC; EC 4.1.1.28)	Ингибирование катализа финальной стадии синтеза дофамина и серотонина и, в последствии, норэпинефрина и эпинефрина.	[26]
Дефекты нейротрансдачи, синаптогенеза, долговременной потенциации синаптической передачи, развития ЦНС и эксайтотоксичность	L-серин рацемизаза (Serine racemase, SRR; EC 5.1.1.18)	Ингибирование катализа реакции рацемизации L-серина в D-серин, важнейшего ко-агониста рецептора N-метил-D-аспартата (NMDA-R) с последующим нарушением функций ЦНС.	[27]
Анемия и лактоацидоз	Синтаза дельта-аминолевулиновой кислоты (Δ-Aminolevulinic acid synthase, ALAS1 + 2; EC 2.3.1.37) Цистеиндесульфураза (Cysteine desulfurase, NFS1; EC 2.8.1.7)	Нарушение синтеза гема и Fe-S-кластеров.	[28, 29]
Гипогликемия	Аспаратаминотрансфераза (Aspartate transaminase, AST или Glutamate oxaloacetate transaminase, GOT; EC 2.6.1.1) Аланинаминотрансфераза (Alanine transaminase, ALT или GPT; EC 2.6.1.2) L-сериндегидратаза (L-Serine dehydratase, SDH, хотя BRENDA дает более точное название L-serine ammonia-lyase, SDS; EC 4.3.1.17) Гликогенфосфоорилаза (мышц, печени, мозга) (Glycogen phosphorylase, GP, EC 2.4.1.1)	Нарушение работы малат-аспартатного челночного механизма при ингибировании аспаратаминотрансферазы; ингибирование синтеза пирувата аланинаминотрансферазой и L-сериндегидратазой. Распределение многих аминотрансфераз в тканях используется при диагностике их повреждений. Так, повышение количества указанных аминотрансфераз в плазме крови является признаком нарушения работы печени. Гликогенфосфоорилаза катализирует один из этапов глюконеогенеза. Дефицит витамина В ₆ ведет к невозможности мобилизации достаточного количества глюкозы из запасенного в печени гликогена.	[6, 30, 31]
Гипераммониемия, гиратная атрофия	Орнитинаминотрансфераза (Ornithine aminotransferase, OAT, EC 2.6.1.13)	Дефицит орнитин аминотрансферазы характеризуется увеличением концентрации орнитина в крови и моче и сопровождается прогрессирующей дегенерацией сосудистой оболочки и ретины глаз и гипераммониемией.	[32]
Изменение количества серина, треонина и глицина в плазме крови и спинномозговой жидкости	Серингидрокси метилтрансфераза (Serine hydroxymethyltransferase, SHMT; EC 2.1.2.1) Глициндегидрогеназа (Glycine dehydrogenase, GLDC; EC 1.4.4.2) Серин/треониндеаминаза (Serine/threonine deaminase, SDS; EC 4.3.1.17) Фосфосеринаминотрансфераза (Phosphoserine aminotransferase, PSAT1; EC 2.6.1.52) Глицинацетилтрансфераза (Glycine C-acetyltransferase, GCAT; EC 2.3.1.29)	Данные ферменты необходимы для биосинтеза и катаболизма серина, треонина и глицина. Значительный дефицит витамина В ₆ приводит к повышению концентраций указанных аминокислот в плазме крови и спинномозговой жидкости.	[33]
Повышение уровня ксантуреновой кислоты в моче	Кинурениназа (Kynureninase, KYNU; EC 3.7.1.3) Кинуренинаминотрансфераза (Kynurenine aminotransferase, KYAT1 & 2; EC 2.6.1.7)	Нарушение метаболизма триптофана.	[11, 34]
			[35]



Рисунок 4 – Схема взаимного влияния процессов, приводящих к дефициту витамина B_6 и формированию сахарного диабета

Время максимальной концентрации пиридоксала в плазме крови после приема витамина B_6 в форме пиридоксина гидрохлорида в фармакокинетических исследованиях составляет 1 ч, в то время как для пиридоксальфосфата время максимальной концентрации достигает 10 ч [10], и отражает время, необходимое для метаболизма пиридоксала клетками печени.

От 40% до 60% всего потребляемого витамина B_6 экскретируется с мочой [10]. По данным клинического исследования у младшей возрастной группы наблюдается большая экскреция пиридоксина с мочой по сравнению со старшей, после единичного приема витаминно-минерального комплекса и завтрака. При этом заметной разницы в уровне экскреции с мочой других витаминов B_6 у данных возрастных групп не наблюдается [20]. Что указывает на большую биологическую доступность пиридоксина для людей старшей возрастной группы.

Дефицит витамина B_6

Дефицит только лишь витамина B_6 встречается редко в развивающихся странах, хотя низкий уровень циркулирующего в крови PLP отмечается при применении оральных контрацептивов и некоторых других лекарственных средств, при курении и алкоголизме, целиакии и диабете [4]. Несмотря на пониженную биодоступность растительных витаминов B_6 (преобладание пиридоксингликозида) относительно витаминов из животной пищи, у лиц, придерживающихся вегетарианства, дефицит данного витамина не наблюдается [21].

С биохимической точки зрения, витамины группы В имеют четкую взаимосвязь, играя значительную

роль в ключевых метаболических путях человеческого организма. Сочетанный с другими витаминами дефицит B_6 имеет и другие клинические проявления. Например, проявление пеллагры обычно вызвано дефицитом пиридоксина, ниацина и рибофлавина [22]. Клинические и/или биохимические проявления нарушений метаболизма витамина B_6 характеризуются ингибированием функций PLP-зависимых ферментов, и могут быть зафиксированы при измерении уровней концентрации соответствующих метаболитов в плазме крови, моче или спинномозговой жидкости [6, 23] (табл. 2).

Из представленной таблицы № 2 очевидно, что PLP теснейшим образом связан с метаболизмом нейромедиаторов и состоянием ЦНС. Изменение взаимного превращения ГАМК, глицина и глутаминовой кислоты может приводить к дисбалансу процессов возбуждения и торможения в нейронах [36]. При этом процесс синтеза PLP является АТФ-зависимым, что, в свою очередь, требует энергетических затрат и активации митохондриального окислительного фосфорилирования в нейронах и астроцитах. Увеличение содержания PLP, активирующее глициндегидрогеназу, которая является частью системы расщепления глицина, что приведет к его снижению в плазме и спинномозговой жидкости и, возможно, повлияет на микроциркуляцию [37] и снабжение нервной ткани ключевыми метаболитами, в частности глюкозой [38, 39].

Клинические проявления дефицита витамина B_6

Кофакторами метионинового цикла и цикла трикарбоновых кислот являются тиамин (B_1) и

пиридоксин (B_6). Нарушение метионинового цикла ассоциировано с расстройством когнитивных функций и сопровождается низкими уровнями пиридоксина (B_6) и кобаламина (B_{12}). Поэтому совместный прием тиамина, пиридоксина и кобаламина, даже без доказанного дефицита одного из них, может улучшить клиническую картину при нейропатии, нарушении моторных функций, ноцицептивной и нейропатической боли [40].

Метаболизм гомоцистеина зависит от нескольких кофакторов, в числе которых PLP (B_6), фолат (B_9) и кобаламин (B_{12}). Их недостаток приводит к накоплению гомоцистеина [41]. Его избыток – гипергомоцистеинемия – является одной из стадий развития повышенной свертываемости крови, сопровождаемой ишемическими цереброваскулярными и сердечно-сосудистыми расстройствами, а также является одной из причин мигрени [42].

Дефицит витамина B_6 имеет прямую взаимосвязь с развитием гипертонии [43] и повышенным риском сердечно-сосудистых заболеваний, инсульта и венозного тромбоза [44]. При системном воспалении, сопровождающемся повышенным уровнем С-реактивного белка, изменение пиридоксальфосфата в плазме крови служит методом диагностики инфаркта миокарда [4].

Низкий уровень витамина B_6 отмечается при некоторых видах рака: рака желудочков мозга, колоректального рака, рака легких, груди и почек. Повышение уровня пиридоксальфосфата в плазме крови пациентов с раком почек связывают с понижением уровня смертности [10].

Недостаток витамина B_6 наблюдается при ревматоидном артрите, причем его уровень в плазме обратно пропорционален тяжести заболевания. Примечательно, что при низком уровне пиридоксальфосфата в плазме крови у таких пациентов наблюдается нормальный уровень эритроцитарного PLP. Этот феномен не объясняется низким потреблением витаминов B_6 , врожденными дефектами метаболизма B_6 или его дефицитом. На моделях крыс низкий уровень пиридоксальфосфата в плазме крови соответствует его низкому уровню в печени, в то время как количество данного кофактора в мышцах, обладающих наибольшим пулом витамина B_6 в организме, оставалось без изменений. Повышение уровня катаболизма витамина B_6 также не наблюдалось ни у крыс, ни у человека, так как экскреция с мочой пиридоксиновой кислоты не была повышена [45].

Связанные с дефицитом пиридоксина судорожные расстройства (эпилептические эпизоды) являются одними из первых описанных генетических расстройств [46]. Клинические проявления могут наблюдаться уже в первые 24–48 ч после рождения, в отдельных ситуациях эпилептические эпизоды

замечены и в перинатальный период, нередкими являются и случаи проявления заболевания спустя месяцы и годы после рождения. В легкой форме такие расстройства сопровождаются чрезмерной возбудимостью, раздражительностью, дрожью, ненормальным плачем, частыми вздрагиваниями при реакции на звук или прикосновение. Более серьезные клинические проявления судорожных расстройств обычно сопровождаются энцефалопатией, которая скорее является предшествующей эпилепсии, нежели ее следствием, и системными нарушениями: гипер- или гипотермией, вздутием живота, рвотой (возможно, с примесями желчи), гепатомегалией, затрудненным дыханием с гипоксемией и метаболический ацидоз. Положительную динамику дает терапия высокими дозами витамина B_6 , предпочтительно внутривенно, или орально, в случае более старшего возраста, хотя описан случай трансбуккального применения раствора пиридоксина кормящей матерью [47].

В ряде случаев дефицит PLP может приводить к эпилептическим расстройствам. Пиридоксин-зависимая эпилепсия часто сопровождается задержкой умственного развития и требует незамедлительной терапии, которая должна включать в себя не только пиридоксин, но и другие лекарственные средства, поскольку лежащие в основе задержки умственного развития механизмы уникальны. Действительно, различные мутации генов ведут к накоплению разных реактивных компонентов: мутации *ALDH7A1* и *MOCS2* – к накоплению α -аминоадипат-6-полуальдегида (α -aminoadipic semialdehyde, AASA) и L- Δ^1 -пиперидин-6-карбоксилата (L- Δ^1 -piperidine-6-carboxylate, P6C), а мутация *ALDH4A1* – γ -глутамилполуальдегида (γ -glutamyl semialdehyde, GGSA) и L- Δ^1 -пирролин-5-карбоксилата (L- Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate, P5C) [48]. Данные компоненты являются наиболее патогенными факторами в проявлении задержки умственного развития, т.к. накапливаются в тканях мозга и их количество не обязательно снижается при терапии пиридоксином [49].

Благодаря своим альдегидным группам, AASA и GGSA могут неферментативно взаимодействовать с глутатионом и другими ключевыми макромолекулами организма и изменять их функциональность. К этим макромолекулам относятся ДНК, РНК, белки и фосфолипиды, а также содержащие –SH-группы молекулы. Указанные взаимодействия приводят к накоплению конечных продуктов гликирования [48]. P6C и P5C образуют комплекс с PLP, что снижает уровень биодоступного PLP и проявляется эпилептическим расстройством у пациентов [6, 50].

За синтез AASA отвечает антиквитин – α -аминоадипат-6-полуальдегиддегидрогеназа (α -aminoadipate semialdehyde dehydrogenase, AASDH). Дефицит антиквитина, помимо указанных

особенностей, сопровождается окислительным стрессом, что является одной из основных причин гибели клеток мозга при эпилепсии, поэтому диагностика пиридоксин-зависимой эпилепсии, мониторинг динамики заболевания и коррекция терапевтического плана может производиться путем измерения связанных с окислительным стрессом метаболитов [48]. Клинические исследования терапии высокими дозами витамина B₆ в сочетании с диетой, ограничивающей потребление лизина, показали снижение нейротоксических эффектов вследствие накопления субстратов пиридоксин-зависимых ферментов, вызывающих задержку развития и когнитивные нарушения, по сравнению с применением монотерапии [51]. В настоящее время стандартом является тройная терапия, включающая в себя высокие дозы витамина B₆ (15-30 мг/кг/сут, в 3 приема), ограничение потребления лизина и поддержку аргинином (150 мг/кг/сут, в 3 приема) [52].

В случае позднего проявления пиридоксин-зависимой эпилепсии с дефицитом антиквитина возможна невыраженная реакция на терапию высокими дозами пиридоксина. В таком случае терапию дополняют высокими дозами фолиевой кислоты (3-5 мг/кг/сут) [53].

Дефицит витамина B₆ и диабет строго ассоциированы. Согласно литературным источникам, дефицит витамина B₆ может быть как следствием, так и причиной диабета (Рис. 4). Эффект воздействия витамина B₆ на диабет 1 типа отличается от его эффекта на диабет 2 типа в связи с разницей патофизиологических процессов [54].

В случае сахарного диабета 1 типа, в контексте, включающем беременность и ожирение, повышенная необходимость в витамине B₆ для специфических PLP-зависимых ферментов, а также запуск воспалительных путей, могут снижать его доступность. В случае же сахарного диабета 2 типа, понижение уровня витамина B₆ может приводить к усугублению клинических проявлений диабета, влияя на секрецию инсулина или его биологическую активность. При этом, механизмы, включающие в себя усиление катаболизма триптофана через кинурениновый путь, снижение скорости адипогенеза (липогенеза), нарушение метаболизма липидов или снижение способности противостоять формированию конечных продуктов гликирования, могут вносить вклад в развитие заболевания. Более того, нарушение антиоксидантной активности витамина B₆ также может способствовать развитию осложнений при диабете и онкологических заболеваний [55].

Возможности терапевтического применения витамина B₆

Прием витамина B₆ в соответствующих

дозировках, несомненно, оправдан в случае его подтвержденного дефицита.

Пиридоксин может оказывать влияние не только на функции центральной нервной системы, но и на выполняемые периферической нервной системой физиологические процессы [56]. Участие B₆ в синтезе нейромедиаторов серотонина и ГАМК (табл. 2), которые оказывают ингибирующее действие на передачу болевых нервных импульсов в спинном и головном мозге, указывает на возможность облегчения болевых ощущений при синдроме запястного канала. В научной литературе описаны случаи данного положительного эффекта от приема пиридоксина в дозах от 50 до 200 мг в сут, при более высоких дозах зафиксированы токсические побочные эффекты, однако тема требует дальнейшего изучения [57].

Следует также отметить, что прием витамина B₆ может приводить к неоднозначному результату. Являясь кофактором декарбоксилазы ароматических аминокислот (ЕС 4.1.1.28), PLP способствует повышенному синтезу дофамина в нейронах гипоталамуса, что приводит к ингибированию действия пролактина. Данный механизм лежит в основе снижения эффективности терапии синдрома Паркинсона леводопой при совместном приеме с витамином B₆. Однако, согласно недавнему анализу соответствующих клинических исследований, ингибирование лактации пиридоксином носит противоречивый и необоснованный характер и требует дальнейших изысканий [58]. Тем не менее, в ряде стран в качестве лекарственного средства при терапии тошноты и рвоты у беременных используют сочетание доксиламина и пиридоксин гидрохлорида [59–61].

Существуют предпосылки к использованию высоких доз пиридоксина и магния при расстройствах аутистического спектра. Однако слепое плацебо контролируемое исследование не выявило статистически значимых различий действия пиридоксина и магния от эффекта плацебо [62]. Тем не менее сочетанное применение пиридоксина и катионов, а также включение солей катионов в состав лекарственной формы представляется вполне обоснованным, также как проанализированное ранее возможное сочетанное применение аминокислоты глицин и соединений цинка [63].

В настоящее время появились предпосылки к применению пиридоксина в качестве профилактики ладотно-подошвенного синдрома (побочного эффекта химиотерапии) [64].

Витамин B₆ используется также как антидот при острых интоксикациях изониазидом (противотуберкулезным лекарственным средством), гиромитрином из строчка обыкновенного (*Gyromitra esculenta*), монометилгидразином (компонентом ракетного топлива) и воздействии гидразина (ингибитора коррозии) [65].

Дефицит витамина B_6 оказывает сильное влияние на клеточный иммунитет и, в меньшей степени, на гуморальный иммунитет. Заметное снижение уровня пролиферации лимфоцитов, цитотоксическое действие Т-клеток, гиперчувствительность замедленного типа, отторжение аллотрансплантата и измененный цитокиновый профиль были продемонстрированы в экспериментах на крысах с дефицитом B_6 . У человека наблюдается схожая ситуация, причем терапия дозами витамина B_6 , превышающими рекомендованную суточную потребность, улучшает данную ситуацию [4]. Восполнение дефицита PLP можно рекомендовать и при воспалении. В случае сердечно-сосудистых заболеваний и рака считается, что именно воспалительный процесс играет ключевую роль в патологическом течении или прогрессировании заболеваний. Показано, что дефицит витамина B_6 сопровождается воспалительными заболеваниями кишечника [4].

Воспаление характеризуется снижением концентрации сывороточного альбумина и повышением тканеспецифичной алкалинфосфатазы (ALP). В общем случае это усиливает процесс мобилизации PLP, снижая долю связанного с альбумином состояния и повышая скорость его дефосфорилирования до PL. Такое изменение распределения витамина B_6 может не быть ограниченным лишь областями воспаления, но также может затрагивать и другие неповрежденные ткани и клетки [45].

С-реактивный белок (CRP) – маркер воспалительного пути IL-1b/TNF- α /IL-6. IL-6 – интерлейкин-6 – вызывает повышение ALP. Интерлейкин-1b (IL-1b) и интерлейкин-6 (IL-6) входят в число активаторов гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси (hypothalamic–pituitary–adrenal (HPA) axis), ключевую роль в которой играет кортизол. Кортизол оказывает множественные эффекты на организм и является главным регулятором физиологической реакции на стресс, которая включает в себя усиление гликонеогенеза и распада белка в мышцах и соединительной ткани. Высвобожденные аминокислоты могут быть затем утилизированы для производства энергии, синтеза белков-иммуномодуляторов, пролиферации иммунных клеток и восстановления тканей. Все эти процессы требуют участия PLP и потому клеточная потребность в этом кофакторе возрастает [10].

Уровень PLP в плазме крови демонстрирует обратную зависимость от содержания клинических маркеров воспаления – CRP, рецептора к IL-6 (IL-6 receptor), α -1-антихимотрипсина (alfa-1-antichymotrypsin), сывороточного амилоида A (serum amyloid A), числа белых кровяных телец (white blood cell count, WBC), отношения кинуренин/триптофан (kynurenine/tryptophan ratio, KTR), неоптерина

(neopterin); суммарных показателей воспаления (overall inflammatory summary score) и показателей различных видов воспаления (summary scores representing different inflammatory modalities) [45].

Более того, увеличение внутриклеточного уровня PLP связано с изменением клеточного ответа на действие глюкокортикоидов при терапии преднизолом. В ходе такой терапии происходит увеличение концентрации PLP, PL и PM в плазме крови. Этому процессу сопутствует усиление активности пиридоксальфосфатсинтезирующих ферментов – PDCK, PMPO/PNPO – и подавление активности PDXP в печени, в то время как действие ALP в плазме остается неизменным [11].

Токсическое действие витамина B_6

Избыточное потребление витамина B_6 (от 2 до 6 г в сут) ведет к развитию тяжелой сенсорной нейропатии, хотя описаны и случаи моторной нейропатии. При этом отмена B_6 ведет к заметному улучшению клинических проявлений. Данный эффект схож с клиническим проявлением наследственной мутации гена, кодирующего PDCK, т.к. высокое количество циркулирующего пиридоксина может ингибировать действие этого фермента [66]. Однако терапевтическая доза B_6 , составляющая 200 – 500 мг в сут, при гомоцистеинурии на протяжении многих лет не дает ни клинических симптомов, ни электрофизиологических подтверждений периферической нейропатии [67]. Следует отметить, что несмотря на положительный эффект от приема пиридоксина при различных расстройствах периферической нервной системы, необходимо учитывать и возможный риск его токсического действия, несомненно зависящий как от дозы, так и от длительности приема [65].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, восполнение дефицита витаминов B_6 при их выявленном дефиците представляет собой необходимое условие успешной терапии заболеваний центральной нервной системы, воспалительных процессов и диабета и является необходимым для коррекции иммунного статуса пациентов. В большинстве случаев улучшение состояния будет обусловлено нормализацией баланса окислительно-восстановительных реакций с участием PLP. Целесообразно рассматривать комбинированное применение производных витамина B_6 с различными метаболитами. При этом необходимо учитывать, что для всасывания необходимы дефосфорилированные формы производных пиридоксина, а также то обстоятельство, что сочетанный прием метаболитов повлечет за собой сдвиг биохимических процессов в клетке, что может привести к проявлению негативных эффектов на метаболизм в условиях его переизбытка.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «МНПК «БИОТИКИ».

Спонсор не оказывал влияния на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.А. Загубная – сбор литературного материала, анализ источников, написание статьи; Я.Р. Нарциссов – идея и концепция обзора, сбор литературного материала, анализ источников, написание статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Shtyrlin Y.G., Petukhov A.S., Strel'nik A.D., Shtyrlin N.V., Iksanova A.G., Pugachev M.V., Pavelyev R.S., Dzyurkevich M.S., Garipov M.R., Balakin K.V. Chemistry of pyridoxine in drug design // *Russ. Chem. Bull.* – 2019. – Vol. 68, No. 5. – P. 911–945. DOI: 10.1007/s11172-019-2504-5
2. Ofoedu C.E., Iwouno J.O., Ofoedu E.O., Ogueke C.C., Igwe V.S., Agunwah I.M., Ofoedum A.F., Chacha J.S., Muobike O.P., Agunbiade A.O., Njoku N.E., Nwakaudu A.A., Odimegwu N.E., Ndukauba O.E., Ogbonna C.U., Naibaho J., Korus M., Okpala C.O.R. Revisiting food-sourced vitamins for consumer diet and health needs: a perspective review, from vitamin classification, metabolic functions, absorption, utilization, to balancing nutritional requirements // *PeerJ.* – 2021. – Vol. 9. – Art. ID: e11940. DOI: 10.7717/peerj.11940
3. Magnúsdóttir S., Ravcheev D., de Crécy-Lagard V., Thiele I. Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes // *Front Genet.* – 2015. – Vol. 6. – Art. ID: 148. DOI: 10.3389/fgene.2015.00148
4. Ueland P.M., McCann A., Midttun Ø., Ulvik A. Inflammation, vitamin B6 and related pathways // *Mol. Aspects Med.* – 2017. – Vol. 53. – P. 10–27. DOI: 10.1016/j.mam.2016.08.001
5. Mackey A.D., McMahon R.J., Townsend J.H., Gregory J.F. Uptake, hydrolysis, and metabolism of pyridoxine-5'-beta-D-glucoside in Caco-2 cells // *J. Nutr.* – 2004. – Vol. 134, No. 4. – P. 842–846.
6. Wilson M.P., Plecko B., Mills P.B., Clayton P.T. Disorders affecting vitamin B₆ metabolism // *J. Inher. Metab. Dis.* – 2019. – Vol. 42, No. 4. – P. 629–646. DOI: 10.1002/jimd.12060
7. Said H.M. Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 437, No. 3. – P. 357–372. DOI: 10.1042/BJ20110326
8. Yamashiro T., Yasujima T., Said H.M., Yuasa H. pH-dependent pyridoxine transport by SLC19A2 and SLC19A3: Implications for absorption in acidic microclimates // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295, No. 50. – P. 16998–17008. DOI: 10.1074/jbc.RA120.013610
9. Bohnet J.P., Fonda M.L., Feldhoff R.C. Identification of Lys190 as the primary binding site for pyridoxal 5'-phosphate in human serum albumin // *FEBS Lett.* – 1992. – Vol. 298, No. 2–3. – P. 266–268. DOI: 10.1016/0014-5793(92)80073-p
10. Ueland P.M., Ulvik A., Rios-Avila L., Midttun Ø., Gregory J.F. Direct and Functional Biomarkers of Vitamin B₆ Status // *Annu. Rev. Nutr.* – 2015. – Vol. 35. – P. 33–70. DOI: 10.1146/annurev-nutr-071714-034330
11. Wang H.S., Kuo M.F. Vitamin B6 related epilepsy during childhood // *Chang Gung Med. J.* – 2007. – Vol. 30, No. 5. – P. 396–401.
12. Whittaker J.W. Intracellular trafficking of the pyridoxal cofactor. Implications for health and metabolic disease // *Archives of biochemistry and biophysics.* – 2016. – Vol. 592. – P. 20–26.
13. Ito T., Ogawa H., Hemmi H., Downs D.M., Yoshimura T. Mechanism of Pyridoxine 5'-Phosphate Accumulation in Pyridoxal 5'-Phosphate-Binding Protein Deficiency // *J. Bacteriol.* – 2022. – Vol. 204, No. 3. – Art. ID: e0052121. DOI: 10.1128/JB.00521-21
14. Du Y.L., Ryan K.S. Pyridoxal phosphate-dependent reactions in the biosynthesis of natural products // *Natural Product Reports.* – 2019. – Vol. 36, No. 3. – P. 430–457.
15. Hoffarth E.R., Rothchild K.W., Ryan K.S. Emergence of oxygen- and pyridoxal phosphate-dependent reactions // *FEBS J.* – 2020. – Vol. 287, No. 7. – P. 1403–1428. DOI: 10.1111/febs.15277
16. Bisello G., Longo C., Rossignoli G., Phillips R.S., Bertoldi M. Oxygen reactivity with pyridoxal 5'-phosphate enzymes: biochemical implications and functional relevance // *Amino Acids.* – 2020. – Vol. 52, No. 8. – P. 1089–1105. DOI: 10.1007/s00726-020-02885-6
17. Dalto D.B., Matte J.J. Pyridoxine (Vitamin B₆) and the Glutathione Peroxidase System; a Link between One-Carbon Metabolism and Antioxidation // *Nutrients.* – 2017. – Vol. 9, No. 3. – Art. ID: 189. DOI: 10.3390/nu9030189
18. Thaver D., Saeed M.A., Bhutta Z.A. Pyridoxine (vitamin B₆) supplementation in pregnancy // *Cochrane Database Syst. Rev.* – 2006. – No. 2. – Art. ID: CD000179. DOI: 10.1002/14651858.CD000179.pub2
19. Ali M.A., Hafez H.A., Kamel M.A., Ghamry H.I., Shukry M., Farag M.A. Dietary Vitamin B Complex: Orchestration in Human Nutrition throughout Life with Sex Differences // *Nutrients.* – 2022. – Vol. 14, No. 19. – Art. ID: 3940. DOI: 10.3390/nu14193940
20. Sharma P., Han S.M., Gillies N., Thorstensen E.B., Goy M., Barnett M.P.G., Roy N.C., Cameron-Smith D., Milan A.M. Circulatory and Urinary B-Vitamin Responses to Multivitamin Supplement Ingestion Differ between Older and Younger Adults // *Nutrients.* – 2020. – Vol. 12, No. 11. – Art. ID: 3529. DOI: 10.3390/nu12113529
21. Schorrg P., Bärnighausen T., Rohrmann S., Cassidy A., Karavasiloglou N., Kühn T. Vitamin B6 Status among Vegetarians: Findings from a Population-Based Survey // *Nutrients.* – 2021. – Vol. 13, No. 5. – Art. ID: 1627. DOI: 10.3390/nu13051627
22. McCormick D.B. Two interconnected B vitamins: riboflavin and pyridoxine // *Physiol. Rev.* – 1989. – Vol. 69, No. 4. – P. 1170–1198. DOI: 10.1152/physrev.1989.69.4.1170
23. Wang D., Wang X., Kong J., Wu J., Lai M. GC-MS-

- Based metabolomics discovers a shared serum metabolic characteristic among three types of epileptic seizures // *Epilepsy Res.* – 2016. – Vol. 126. – P. 83–899. DOI: 10.1016/j.epilepsyres.2016.07.003
24. Nong X., Zhang C., Wang J., Ding P., Ji G., Wu T. The mechanism of branched-chain amino acid transferases in different diseases: Research progress and future prospects // *Front. Oncol.* – 2022. – Vol. 12. – Art. ID: 988290. DOI: 10.3389/fonc.2022.988290
 25. Treiman D.M. GABAergic mechanisms in epilepsy // *Epilepsia.* – 2001. – Vol. 42 Suppl. 3. – P. 8–12. DOI: 10.1046/j.1528-1157.2001.042suppl.3008.x
 26. Rizzi S., Spagnoli C., Frattini D., Pisani F., Fusco C. Clinical Features in Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (AADC) Deficiency: A Systematic Review // *Behav. Neurol.* – 2022. – Vol. 2022. – Art. ID: 2210555. DOI: 10.1155/2022/2210555
 27. Wu S., Zhou J., Zhang H., Barger S.W. Serine Racemase Expression Differentiates Aging from Alzheimer's Brain // *Curr. Alzheimer. Res.* – 2022. – Vol. 19, No. 7. – P. 494–502. DOI: 10.2174/1567205019666220805105106
 28. Taylor J.L., Brown B.L. Structural basis for dysregulation of aminolevulinic acid synthase in human disease // *J. Biol. Chem.* – 2022. – Vol. 298. – No. 3. – P. 101643. DOI: 10.1016/j.jbc.2022.101643
 29. Lill R., Freibert S.A. Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis // *Annu. Rev. Biochem.* – 2020. – Vol. 89. – P. 471–499. DOI: 10.1146/annurev-biochem-013118-111540
 30. Sookoian S., Pirola C.J. Liver enzymes, metabolomics and genome-wide association studies: from systems biology to the personalized medicine // *World J. Gastroenterol.* – 2015. – Vol. 21, No. 3. – P. 711–25. DOI: 10.3748/wjg.v21.i3.711
 31. Kashii T., Gomi T., Oya T., Ishii Y., Oda H., Maruyama M., Kobayashi M., Masuda T., Yamazaki M., Nagata T., Tsukada K., Nakajima A., Tatsu K., Mori H., Takusagawa F., Ogawa H., Pitot H.C. Some biochemical and histochemical properties of human liver serine dehydratase // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2005. – Vol. 37, No. 3. – P. 574–589. DOI: 10.1016/j.biocel.2004.08.004
 32. Donnier-Maréchal M., Vidal S. Glycogen phosphorylase inhibitors: a patent review (2013–2015) // *Expert. Opin. Ther. Pat.* – 2016. – Vol. 26, No. 2. – P. 199–212. DOI: 10.1517/13543776.2016.1131268
 33. Kaczmarczyk A., Baker M., Diddle J., Yuzyuk T., Valle D., Lindstrom K. A neonate with ornithine aminotransferase deficiency; insights on the hyperammonemia-associated biochemical phenotype of gyrate atrophy // *Mol. Genet. Metab. Rep.* – 2022. – Vol. 31. – Art. ID: 100857. DOI: 10.1016/j.ymgmr.2022.100857
 34. Wang D., Kong J., Wu J., Wang X., Lai M. GC-MS-based metabolomics identifies an amino acid signature of acute ischemic stroke // *Neurosci. Lett.* – 2017. – Vol. 642. – P. 7–13. DOI: 10.1016/j.neulet.2017.01.039
 35. Tanaka M., Tóth F., Polyák H., Szabó Á., Mándi Y., Vécsei L. Immune Influencers in Action: Metabolites and Enzymes of the Tryptophan-Kynurenine Metabolic Pathway // *Biomedicines.* – 2021. – Vol. 9, No. 7. – Art. ID: 734. DOI: 10.3390/biomedicines9070734
 36. Nartsissov Y.R. Amino Acids as Neurotransmitters. The Balance between Excitation and Inhibition as a Background for Future Clinical Applications. COVID-19, Neuroimmunology and Neural Function / edited by Thomas Heinbockel, Robert Weissert, IntechOpen, 2022. DOI: 10.5772/intechopen.103760
 37. Nartsissov Y.R. Geometries of vasculature bifurcation can affect the level of trophic damage during formation of a brain ischemic lesion // *Biochem. Soc. Trans.* – 2017. – Vol. 45, No. 5. – P. 1097–1103. DOI: 10.1042/BST20160418
 38. Nartsissov Y.R., Tyukina E.S., Boronovsky S.E., Sheshhegova E.V. Computer modeling of spatial-time distribution of metabolite concentrations in phantoms of biological objects by example of rat brain pial // *Biophys.* – 2013. – Vol. 58, No. 5. – P. 703–711. DOI: 10.1134/S0006350913050102
 39. Nartsissov Y.R. Application of a multicomponent model of convectional reaction-diffusion to description of glucose gradients in a neurovascular unit // *Front. Physiol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. ID: 843473. DOI: 10.3389/fphys.2022.843473
 40. Calderón-Ospina C.A., Nava-Mesa M.O. B Vitamins in the nervous system: Current knowledge of the biochemical modes of action and synergies of thiamine, pyridoxine, and cobalamin // *CNS Neurosci. Ther.* – 2020. – Vol. 26, No. 1. – P. 5–13. DOI: 10.1111/cns.13207
 41. Liampas I.N., Siokas V., Aloizou A.M., Tsouris Z., Dastamani M., Aslanidou P., Brotis A., Dardiotis E. Pyridoxine, folate and cobalamin for migraine: A systematic review // *Acta Neurol. Scand.* – 2020. – Vol. 142, No. 2. – P. 108–120. DOI: 10.1111/ane.13251
 42. Liampas I., Siokas V., Mentis A.A., Aloizou A.M., Dastamani M., Tsouris Z., Aslanidou P., Brotis A., Dardiotis E. Serum Homocysteine, Pyridoxine, Folate, and Vitamin B₁₂ Levels in Migraine: Systematic Review and Meta-Analysis // *Headache.* – 2020. – Vol. 60, No. 8. – P. 1508–1534. DOI: 10.1111/head.13892
 43. Dakshinamurti S., Dakshinamurti K. Antihypertensive and neuroprotective actions of yridoxine and its derivatives // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 93, No. 12. – P. 1083–90. DOI: 10.1139/cjpp-2015-0098
 44. Eichinger S. Homocysteine, vitamin B6 and the risk of recurrent venous thromboembolism // *Pathophysiol. Haemost. Thromb.* – 2004. – Vol. 33, No. 5–6. – P. 342–344. DOI: 10.1159/000083825
 45. Du X., Yang Y., Zhan X., Huang Y., Fu Y., Zhang Z., Liu H., Zhang L., Li Y., Wen Q., Zhou X., Zuo D., Zhou C., Li L., Hu S., Ma L. Vitamin B6 prevents excessive inflammation by reducing accumulation of sphingosine-1-phosphate in a sphingosine-1-phosphate lyase-dependent manner // *J. Cell. Mol. Med.* – 2020. – Vol. 24, No. 22. – P. 13129–13138. DOI: 10.1111/jcmm.15917
 46. Gospe S.M. Pyridoxine-dependent seizures: findings from recent studies pose new questions // *Pediatr. Neurol.* – 2002. – Vol. 26, No. 3. – P. 181–185. DOI: 10.1016/s0887-8994(01)00407-6
 47. Gospe S.M. Jr. Pyridoxine-Dependent Epilepsy – *ALDH7A1*. 2001 Dec 7 [updated 2022 Sep 22]. In: Adam M.P., Everman D.B., Mirzaa G.M., Pagon R.A., Wallace S.E., Bean L.J.H., Gripp K.W., Amemiya A., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993–2022.
 48. Yazdani M., Elgstøen K.B.P. Is oxidative stress an overlooked player in pyridoxine-dependent epilepsy? A focused review // *Seizure.* – 2021. – Vol. 91. – P. 369–373. DOI: 10.1016/j.seizure.2021.07.014
 49. Hassel B., Rogne A.G., Hope S. Intellectual Disability Associated With Pyridoxine-Responsive Epilepsies: The Need to Protect Cognitive Development // *Front Psychiatry.* – 2019. – Vol. 10. – Art. ID: 116. DOI: 10.3389/fpsy.2019.00116

50. Surtees R., Mills P., Clayton P. Inborn errors affecting vitamin B6 metabolism // *Future Neurology*. – 2006. – Vol. 1, No. 5. – P. 615–620. DOI: 10.2217/14796708.1.5.615
51. Machado A., Vural S., Mercimek-Mahmutoglu S. Pyridoxine dependent epilepsy: Seizure onset, seizure types and EEG features // *J. Pediatric Epilepsy*. – 2014. – Vol. 3, No. 4. – P. 235–240. DOI: 10.3233/PEP-14095
52. Pena I.A., MacKenzie A., Van Karnebeek C.D.M. Current knowledge for pyridoxine-dependent epilepsy: a 2016 update // *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* – 2017. – Vol. 12, No. 1. – P. 5–20. DOI: 10.1080/17446651.2017.1273107
53. Stockler S., Plecko B., Gospe S.M. Jr., Coulter-Mackie M., Connolly M., van Karnebeek C., Mercimek-Mahmutoglu S., Hartmann H., Scharer G., Struijs E., Tein I., Jakobs C., Clayton P., Van Hove J.L. Pyridoxine dependent epilepsy and antiquitin deficiency: clinical and molecular characteristics and recommendations for diagnosis, treatment and follow-up // *Mol. Genet. Metab.* – 2011. – Vol. 104, No. 1–2. – P. 48–60. DOI: 10.1016/j.ymgme.2011.05.014
54. Mascolo E., Verni F. Vitamin B6 and Diabetes: Relationship and Molecular Mechanisms // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 21, No. 10. – Art. ID: 3669. DOI: 10.3390/ijms21103669
55. Merigliano C., Mascolo E., La Torre M., Saggio I., Verni F. Protective role of vitamin B₆ (PLP) against DNA damage in *Drosophila* models of type 2 diabetes // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, No. 1. – Art. ID: 11432. DOI: 10.1038/s41598-018-29801-z
56. Gospe S.M. Jr. Pyridoxine-dependent seizures: new genetic and biochemical clues to help with diagnosis and treatment // *Curr. Opin. Neurol.* – 2006. – Vol. 19, No. 2. – P. 148–153. DOI: 10.1097/01.wco.0000218230.81301.12
57. Aufiero E., Stitik T.P., Foye P.M., Chen B. Pyridoxine hydrochloride treatment of carpal tunnel syndrome: a review // *Nutr. Rev.* – 2004. – Vol. 62, No. 3. – P. 96–104. DOI: 10.1111/j.1753-4887.2004.tb00030.x
58. AlSaad D., Awaisu A., Elsaleh S., Abdulrouf P.V., Thomas B., AlHail M. Is pyridoxine effective and safe for post-partum lactation inhibition? A systematic review // *J. Clin. Pharm. Ther.* – 2017. – Vol. 42, No. 4. – P. 373–382. DOI: 10.1111/jcpt.12526
59. Cada D.J., Demaris K., Levien T.L., Baker D.E. Doxylamine succinate/pyridoxine hydrochloride // *Hosp. Pharm.* 2013. – Vol. 48, No. 9. – P. 762–766. DOI: 10.1310/hpj4809-762
60. Nuangchamnon N., Niebyl J. Doxylamine succinate-pyridoxine hydrochloride (Diclegis) for the management of nausea and vomiting in pregnancy: an overview // *Int. J. Womens Health*. – 2014. – Vol. 6. – P. 401–409. DOI: 10.2147/IJWH.S46653
61. Madjunkova S., Maltepe C., Koren G. The delayed-release combination of doxylamine and pyridoxine (Diclegis®/Diclectin®) for the treatment of nausea and vomiting of pregnancy // *Paediatr Drugs*. – 2014. – Vol. 16, No. 3. – P. 199–211. DOI: 10.1007/s40272-014-0065-5
62. Findling R.L., Maxwell K., Scotese-Wojtila L., Huang J., Yamashita T., Wiznitzer M. High-dose pyridoxine and magnesium administration in children with autistic disorder: an absence of salutary effects in a double-blind, placebo-controlled study // *J. Autism. Dev. Disord.* – 1997. – Vol. 27, No. 4. – P. 467–478. DOI: 10.1023/a:1025861522935
63. Шишкова В.Н., Нарциссов Я.Р., Титова В.Ю., Шешегова Е.В. Молекулярные механизмы, определяющие применение комбинации глицина и цинка в коррекции основных проявлений стресса и тревоги // *Фармация и фармакология*. – 2022. – Т. 10, № 5. – С. 404–415. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-5-404-415
64. Lian S., Zhang X., Zhang Y., Zhao Q. Pyridoxine for prevention of hand-foot syndrome caused by chemotherapy agents: a meta-analysis // *Clin. Exp. Dermatol.* – 2021. – Vol. 46, No. 4. – P. 629–635. DOI: 10.1111/ced.14486
65. Lheureux P., Penalzoa A., Gris M. Pyridoxine in clinical toxicology: a review // *Eur. J. Emerg. Med.* – 2005. – Vol. 12, No. 2. – P. 78–85. DOI: 10.1097/00063110-200504000-00007
66. Hadtstein F., Vrolijk M. Vitamin B-6-Induced Neuropathy: Exploring the Mechanisms of Pyridoxine Toxicity // *Adv. Nutr.* – 2021. – Vol. 12, No. 5. – P. 1911–1929. DOI: 10.1093/advances/nmab033
67. Ghavanini A.A., Kimpinski K. Revisiting the evidence for neuropathy caused by pyridoxine deficiency and excess // *J. Clin. Neuromuscul. Dis.* – 2014. – Vol. 16, No. 1. – P. 25–31. DOI: 10.1097/CND.0000000000000049

АВТОРЫ

Загубная Ольга Анатольевна – младший научный сотрудник сектора математического моделирования и статистической обработки результатов НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия; научный сотрудник, группы биомедицинских исследований, BiDiPharma GmbH, Германия. ORCID ID: 0000-0001-6623-6938. E-mail: oz_brg@icmph.org

Нарциссов Ярослав Рюрикович – кандидат физико-математических наук, доцент по специальности «Биофизика», заведующий сектором математического моделирования и статистической обработки результатов НИИ цитохимии и молекулярной фармакологии, Москва, Россия; руководитель группы биомедицинских исследований, BiDiPharma GmbH, Германия. ORCID ID: 0000-0001-9020-7686. E-mail: yn_brg@icmph.org

УДК 616.5-089-74



ОСОБЕННОСТИ СТРАТЕГИИ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ КЛЕТОК КОЖИ

О.А. Рачинская, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
127051, Россия, г. Москва, Петровский бульвар, д. 8, стр. 2

E-mail: Rachinskaya@expmed.ru

Получена 28.04.2022

После рецензирования 07.07.2022

Принята к печати 15.09.2022

Цель. Изучение международного опыта обеспечения качества препаратов на основе клеток кожи с целью выявления особенностей стратегии их контроля качества при разработке, производстве, а также при экспертной оценке качества в рамках процедуры государственной регистрации в РФ.

Материалы и методы. В статье приведен анализ материалов, представленных в экспертных отчетах регуляторных органов США и Японии, а также на официальных сайтах производителей, в обзорных и научных работах по исследованию структуры и свойств тканеинженерных аналогов кожи.

Результаты. Производство препаратов, содержащих клетки кожи человека, сопряжено с такими рисками, как возможность загрязнения продукта инфекционными агентами при использовании материалов животного происхождения, фидерных клеток, клеток донора или в процессе производства; небольшой объем биопсийного материала; сложность трехмерной структуры препаратов при комбинировании клеток с носителем; непрерывность процесса производства и небольшой срок хранения продукта. Контроль сырья и материалов, создание банков клеток, использование фидерных клеток животных только из аттестованных банков, внутрипроизводственный контроль и тестирование препарата при выпуске в соответствии с требованиями спецификации на готовый продукт позволяют получить продукт с воспроизводимым качеством. Спецификация должна содержать сведения о подлинности, безопасности и активности продукта. Для каждого препарата выбор подходов для оценки качества индивидуален и зависит от его состава и механизма действия.

Заключение. Особенности стратегии контроля качества препаратов на основе клеток кожи человека заключаются в проведении контрольных мероприятий с целью получения надлежащего качества клеточного (жизнеспособность, стерильность, подлинность, активность и другие) и неклеточного (физико-химических свойств носителя) компонентов или целого графта (биоагрегат, барьерные свойства). Подходы и методы для определения активности должны выбираться индивидуально для каждого продукта и отражать число, жизнеспособность и подлинность клеток, пролиферативную и секреторную способность клеточного компонента.

Ключевые слова: эквиваленты кожи; кератиноциты; фибробласты кожи; органические и синтетические носители; контроль качества препарата; показатели качества

Список сокращений: ЭК – эквивалент кожи (полнослойный); ЭЭ – эпидермальный эквивалент; ДЭ – дермальный эквивалент; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (США); PMDA – Агентство по фармацевтической продукции и медицинским приборам (Япония); МБК – мастер банк клеток; РБК – рабочий банк клеток; ПЦР – полимеразная цепная реакция; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов.

FEATURES OF QUALITY CONTROL STRATEGY FOR DRUGS BASED ON VIABLE SKIN CELLS

O.A. Rachinskaya, E.V. Melnikova, V.A. Merkulov

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
Bldg 2, 8, Petrovsky Blvd., Moscow, Russia, 127051

E-mail: Rachinskaya@expmed.ru

Received 28 Apr 2022

After peer review 07 July 2022

Accepted 15 Sep 2022

Для цитирования: О.А. Рачинская, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов. Особенности стратегии контроля качества препаратов на основе жизнеспособных клеток кожи. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):515-524. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-515-524

© О.А. Рачинская, Е.В. Мельникова, В.А. Меркулов, 2022

For citation: O.A. Rachinskaya, E.V. Melnikova, V.A. Merkulov. Features of quality control strategy for drugs based on viable skin cells. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6): 515-524. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-515-524

The aim of the study was to research the international experience in quality assurance of the products based on skin cells in order to identify the features of the quality control strategy in the development, production, as well as during an expert quality assessment as a part of the state registration procedure in the Russian Federation.

Materials and methods. The article provides an analysis of the materials presented in the assessment reports of the USA and Japanese regulatory authorities, as well as on the official websites of manufacturers, in review and scientific papers on the study of the structure and properties of tissue-engineered skin analogs.

Results. The manufacture of products containing human skin cells is associated with such risks as the possibility of contamination of the preparation with infective agents transmitted by materials of the animal origin, feeder cells, donor cells, or during the manufacturing process; a small amount of biopsy materials; a complexity of a three-dimensional product structure when combining cells with a scaffold; continuity of the manufacture process and a short product expiry date. The raw materials and reagents control, the creation of cell banks, using animal feeder cells only from qualified cell banks, an in-process control and release testing in accordance with the requirements of the finished product specification, make it possible to obtain a preparation with a reproducible quality. The specification should contain information about the identity, safety and potency of the product. For each preparation, the choice of approaches for assessing the quality is individual and depends on its composition and mode of action.

Conclusion. The features of the quality control strategy for the drugs based on human skin cells, consist in the implementation of control measures in order to obtain a proper quality of cellular (viability, sterility, identity, potency, et al) and non-cellular (physico-chemical scaffold properties) components or the whole graft (bioburden, barrier properties). The approaches and methods for determining the potency should be selected individually for each product and reflect the number, viability and identity of cells, a proliferative activity and secretory ability of the cellular component.

Keywords: skin substitute; keratinocytes; skin fibroblasts; organic and synthetic scaffolds; product quality control; quality attributes

Abbreviations: SS – skin substitute (complete full-thickness skin replacement); ES – epidermal substitute; DS – dermal substitute; MSC – mesenchymal stem cell; FDA – U.S. Food and Drug Administration; PMDA – Pharmaceuticals and Medical Devices Agency; MCB – Master Cell Bank; WCB – Working Cell Bank; PCR – Polymerase Chain Reaction; VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor.

ВВЕДЕНИЕ

Эквиваленты кожи (ЭК) – тканеинженерные аналоги кожи, являющиеся трехмерными конструкциями на основе культивируемых *in vitro* клеток кожи и различных синтетических или органических носителей (скаффолдов, матриц, матриксов), применяемых в медицине для временной или постоянной замены поврежденных эпидермальных, дермальных или полнослойных участков кожи [1–3]. С этой же целью возможно применение культивируемых клеток кожи, например, фибробластов или кератиноцитов, без создания на их основе трехмерной структуры с использованием носителя в виде суспензии клеток [4].

Применение ЭК и клеток кожи без носителя направлено на восстановление структуры и функций кожи, прежде всего, барьерной (защита организма от инфицирования патогенами из окружающей среды и предотвращение потери воды и минеральных солей организмом через раневую поверхность). Также отдельно важно отметить ускорение процессов заживления и уменьшения болевого синдрома при ожогах, острых и хронических ранах, рубцах, диабетических язвах, невусов, нарушениях структуры кожи в результате генетических и других заболеваний [5–9].

Ключевым этапом в разработке и производстве ЭК является выделение определенных типов клеток из кожи донора с последующим культивированием этих клеток *in vitro* с целью получения необходимого для терапевтического эффекта количества клеточного материала. Все ЭК, разрешенные к клиническому использованию в мире на данный момент, содержат только два типа клеток (по отдельности, либо совместно): кератиноциты и фибробласты. Использование кератиноцитов, способных к

образованию слоя ороговеющего эпителия, лежит в основе создания эпидермальных графтов (эпидермальный тканеинженерный эквивалент, ЭЭ), а использование фибробластов в совокупности с органическими или синтетическими носителями позволяет создать аналог дермы – дермальный графт (дермальный тканеинженерный эквивалент, ДЭ), что увеличивает вероятность последующего успешного приживления с 15 до 45–75% [10]. Существуют препараты, получившие разрешение на клиническое применение в разных странах мира, сочетающие в себе как ЭЭ, так и ДЭ, и являющиеся композитными двуслойными ЭК (полнослойные ЭК) [11]. Полнослойные эквиваленты кожи являются альтернативой кожных трансплантатов, получаемых как из здоровых участков кожи самих пациентов (ауто трансплантатов), так и от здоровых доноров (алло трансплантатов).

Проводились разработки по улучшению функциональности тканеинженерных конструкций и достижения большей схожести со здоровой кожей человека посредством использования и других типов клеток: эндотелиальных, клеток Лангерганса, меланоцитов [12–14]. Труднодоступность сложности культивирования кератиноцитов и фибробластов привели к попыткам применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) различного происхождения, обладающих высоким пролиферативным потенциалом и возможностью к дифференцировке, отдельно или в сочетании с носителем [15]. Однако все эти исследования находятся на стадии разработки или клинических испытаний: в данный момент в мире нет зарегистрированных ЭК, основанных на использовании этих типов клеток.

Среди препаратов, содержащих клетки кожи и получивших разрешение на клиническое

применение, существуют продукты, созданные на основе клеток как аутологичного (чаще ЭЭ), так и аллогенного происхождения (чаще ДЭ и полнослойные ЭК) [16]. При этом продукт может являться суспензией клеток и наноситься на раневую поверхность методом распыления (в виде спрея), либо в виде тканеинженерного графта покрывать рану в результате аппликации [4]. В ряде препаратов применяется внутрикожное введение клеток с помощью иглы и шприца. Для создания графта ЭК клетки помещают на носитель (матрицы, скаффолды, матриксы), в качестве которого чаще всего используют коллаген животного происхождения (бычий, свиной, мышинный) и синтетические носители (силикон, гиалуроновую кислоту и другие). Это позволяет получить многослойную структуру с хорошо выраженными барьерной функцией, биомеханической устойчивостью, стратификацией кератиноцитов, образованием межклеточных взаимодействий, синтезом базальной мембраны и важных компонентов внеклеточного матрикса [17, 18].

Все ЭК могут быть использованы в качестве временных биологически активных повязок, выполняющих барьерную функцию, однако ряд продуктов, в основном содержащих биоразлагаемые носители, могут быть использованы в качестве постоянной замены поврежденного участка кожи.

При производстве и осуществлении процедуры регистрации ЭК встает вопрос об адекватной и всеобъемлющей оценке их качества, которая осложняется комбинированным составом этих препаратов, включающих как компонент из жизнеспособных клеток, так, зачастую, и неклеточный компонент – носитель.

ЦЕЛЬ. Изучение международного опыта обеспечения качества препаратов на основе клеток кожи для выявления особенностей стратегии их контроля качества при разработке, производстве, а также при экспертной оценке качества в рамках процедуры государственной регистрации в Российской Федерации. Выявление особенностей стратегии контроля качества препаратов, содержащих клетки кожи, является актуальной задачей в сфере государственного регулирования и фармакологического надзора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Основой исследования по анализу особенностей стратегии контроля качества препаратов на основе жизнеспособных клеток кожи послужили материалы, представленные в экспертных отчетах регуляторных органов США (Food and Drug Administration – FDA) и Японии (Pharmaceuticals and Medical Devices Agency – PMDA) для следующих препаратов, получивших разрешения на клиническое использование [Fda.gov](http://www.fda.gov) и [Pmda.go.jp](http://www.pmda.go.jp): Apligraf и GINTUIT (Organogenesis, Inc., США)¹;

¹ Food and Drug Administration (FDA). Gintuit – Summary Basis for Regulatory Action, 2012. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://wayback.archive-it.org/7993/20170723023240/> <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM297753.pdf>

LAVIV (Fibrocell Technologies, Inc., США)²; STRATAGRAFT (Sratatech Corporation, США)³; Epicel (Genzyme Biosurgery, США)⁴; Invitrx (Ortec International, Inc., США)⁵; JACE (Japan Tissue Engineering Co., Ltd., Япония)⁶.

Информация по другим препаратам, применяемым в странах Евросоюза (ЕС), Республике Корея, Российской Федерации (РФ) и других странах мира, была получена с официальных сайтов производителей, а также из обзорных и научных работ по исследованию структуры и свойств тканеинженерных аналогов кожи.

Для проведения исследования были использованы следующие электронные ресурсы: PubMed, Scopus, Google Scholar, eLibrary, Ema.europa.eu., Fda.gov, Pmda.go.jp. Запросы проводились по комбинациям ключевых слов: «skin substitutes», «scaffolds for skin repair and regeneration», «skin tissue engineering», «skin cells products quality control», «skin cells products quality attributes», а также по торговым названиям препаратов, разрешенных к медицинскому применению. Поиск осуществляли за период с октября 2021 года по апрель 2022 года.

В работе были использованы логические методы системного анализа и моделирования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время (по состоянию на апрель 2022 г.) были выданы разрешения на клиническое применение более, чем для двух десятков препаратов, содержащих жизнеспособные клетки кожи человека, в странах ЕС, США, Австралии, Японии, Республике Корея и РФ (для некоторых продуктов срок действия разрешения истек и не был продлен).

В таблице 1 представлены препараты на основе клеток кожи человека, используемые для восстановления кожного покрова (ЭЭ, ДЭ, полнослойные ЭК и препараты на основе клеток кожи без носителя), получившие разрешение на клиническое применение в разных странах мира, информация о которых представлена на официальных сайтах производителей и в экспертных отчетах регуляторных органов (см. раздел «Материалы и методы»).

² Food and Drug Administration (FDA). LAVIV – Summary Basis for Regulatory Action, 2011. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://wayback.archive-it.org/7993/20170723023939/> <https://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/UCM262780.pdf>

³ Food and Drug Administration (FDA). SRTATAGRAFT – Package Insert, 2021. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/media/150129/download>

⁴ Food and Drug Administration (FDA). Epicel – Summary of safety and probable benefit, 1998. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.fda.gov/media/103308/download>

⁵ Food and Drug Administration (FDA). Invitrx – Summary of safety and probable benefit, 1998. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf/H990013B.pdf

⁶ Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). JACE – Review Report, 2007. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://www.pmda.go.jp/files/000223079.pdf>

Таблица 1 – Примеры препаратов на основе клеток кожи человека, получившие разрешение на клиническое применение в мире

Название препарата	Производитель и страна регистрации	Клеточный компонент препарата	Вид носителя	Происхождение клеток	Заболвания, для лечения которых предназначен
ЭПИДЕРМАЛЬНЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ И ПРЕПАРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ КЕРАТИНОЦИТЫ					
Episcel (культивированный эпидермальный аутографт)	Genzyme Biosurgery, США	Слой кератиноцитов (толщиной 2–8 клеток), культивированных в присутствии неделящихся фибробластов мыши (фидерный слой)	–	Аутологичное	Глубокие ожоги (более 30% поверхности тела)
JACE (пласт аутологичных эпидермальных клеток человека)	Japan Tissue Engineering Co., Ltd. (J-TEC), Япония	Слой кератиноцитов толщиной в несколько клеток, культивированных в присутствии облученных клеток 3T3-J2, полученных из эмбриона мыши (фидерный слой)	–	Аутологичное	Обширные (более 30 % поверхности тела) ожоги II–III степени
KeraHeal	Biosolution Co., Ltd., Республика Корея	Суспензия культивированных кератиноцитов	–	Аутологичное	Глубокие ожоги II ст. (более 30 % поверхности тела) и III ст. (более 10 % поверхности тела)
KeraHeal-Allo	Biosolution Co., Ltd., Республика Корея	Суспензия кератиноцитов	Термочувствительный гидрогель	Аллогенное	Глубокие ожоги II ст.
Holoderm	Tego Science, Inc., Республика Корея	Культивированные предшественники кератиноцитов с образованием эпидермального лоскута	–	Аутологичное	Ожоги III ст. (более 50 % поверхности тела)
Kaloderm	Tego Science, Inc., Республика Корея	Культивированные кератиноциты с образованием эпидермального лоскута	–	Аллогенное	Глубокие ожоги II ст.; Диабетическая язва стопы
EpiDex	Modex Therapeutics, Швейцария	Культивированные кератиноциты	н/д	Аутологичное	н/д
EPiBASE	Laboratoires Genevriex, Франция	Культивированные до конфлюэнтного монослоя кератиноциты	–	Аутологичное	н/д
MySkin	CellTran Ltd., Великобритания	Культивированные до субконфлюэнтного монослоя кератиноциты	Силиконовая матрица с поверхностным покрытием	Аутологичное	Невропатические, пролежневые, диабетические язвы стопы; Ожоги
Laserskin (Vivoderm)	Fidia Advanced Biopolymers, Италия	Культивированные до конфлюэнтного монослоя кератиноциты	Микроперфорированная мембрана из гиалуроновой кислоты	Аутологичное	Диабетические и венозные язвы нижних конечностей; Неглубокие ожоги; Витилиго
Bioseed-S	BioTissue Technologies GmbH, Германия	Культивированные до субконфлюэнтного монослоя кератиноциты	Матрикс на фибриновом герметике	Аутологичное	Резистентные к терапии хронические венозные язвы нижних конечностей
CellSpray	Clinical Cell Culture (C3), Австралия	Некультивированные / культивированные до субконфлюэнтного монослоя кератиноциты	–	Аутологичное	н/д
Пласт кератиноцитов многослойный	Институт цитологии РАН, Россия	Культивированные кератиноциты	н/д	н/д	Ожоги разной степени тяжести, в том числе критические и сверхкритические; Язвы разной этиологии; Раны в результате травм; Свищи, пролежни
ДЕРМАЛЬНЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ И ПРЕПАРАТЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФИБРОБЛАСТЫ					
LAVIV (Azficel-T)	Fibrocell Technologies Inc., США	Культивированные фибробласты	–	Аутологичное	Средне-глубокие и глубокие морщины носогубных складок
TransCyte (DermagraftTC)	Advanced BioHealing Inc., США	Культивированные неонатальные фибробласты	Подложка из силиконовой пленки, нейлоновой сетки из коллагена свиней	Аллогенное	Поверхностные и глубокие ожоги; Хронические язвы нижних конечностей, в том числе диабетические и венозные; Пролежни

Название препарата	Производитель и страна регистрации	Клеточный компонент препарата	Вид носителя	Происхождение клеток	Заболевания, для лечения которых предназначен
Dermagraft	Shire Regenerative Medicine, Inc., США	Культированные неонатальные фибробласты	Биорезорбируемый коллаген на губке из полилактида или полилактина-910	Аллогенное	Хронические диабетические язвы нижних конечностей, затрагивающие дерму, но не достигшие сухожилий, мышц и костей; Хронические и инфицированные раны
CureSkin Inj.	S.Biomedics Co., Ltd., Республика Корея	Культированные фибробласты	–	Аутологичное	Послеугревые депрессивные рубцы
Rosmir	Tego Science, Inc., Республика Корея	Культированные фибробласты	–	Аутологичное	Уменьшение носослезной борозды
Hyalograft 3D	Fidia Advanced Biopolymers, Италия	Культированные фибробласты	Микроперфорированная мембрана из гиалуроновой кислоты	Аутологичное	Диабетические и венозные язвы нижних конечностей; Неглубокие ожоги; Витилиго
Клеточная технология SPRG-терапия	Институт стволовых клеток человека, Россия	Культированные фибробласты	–	Аутологичное или аллогенное	Коррекция возрастных изменений кожи; Рецессия и дефицит слизистой оболочки в области зубов и зубных имплантатов
Эквивалент дермальный	Институт цитологии РАН, Россия	Культированные фибробласты	Коллагеновый гель	Аллогенное	Ожоги разной степени тяжести, в том числе критические и сверхкритические; Язвы разной этиологии; Раны в результате травм; Свищи, пролежни
ПОЛНОСЛОЙНЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ КОЖИ					
Apligraf	Organogenesis, Inc., США	Слой из культивированных кератиноцитов и фибробластов	Матрикс из бычьего коллагена и белков внеклеточного матрикса	Аллогенное	Раны мягких тканей полости рта
GINTUIT (Аллогенные культивированные кератиноциты и фибробласты бычьего коллагена)	Organogenesis, Inc., США	Слой из культивированных кератиноцитов и фибробластов	Бычий коллаген I типа	Аллогенное	Дефекты и поражения слизистой оболочки десны
STRATAGRAFT (Аллогенные культивированные кератиноциты и дермальные фибробласты мышинного коллагена)	Sratch Corporation, США	Стратифицированный эпителиальный слой, содержащий дифференцированные кератиноциты, нанесенные на дермоподобную структуру, образованную фибробластами	Мышинный коллаген I типа	Аллогенное	Термические ожоги при неповрежденных дермальных элементах (глубокие ожоги IIIA ст.)
InVitrX (композиционная кожа)	Ortec International, Inc., США	Слой из культивированных кератиноцитов и фибробластов	Губка из бычьего коллагена I типа с тонким гелеобразным слоем бычьего коллагена	Аллогенное	Дистрофический буллезный эпидермолиз (после операции по реконструкции руки)
OrCel	Ortec International, Inc., США	Слой из культивированных кератиноцитов и фибробластов	Губка из бычьего коллагена I типа	Аллогенное	Дистрофический буллезный эпидермолиз (после операции по реконструкции руки); Ожоги и раны
PolyActive	HC Implants BV, Нидерланды	Культированные кератиноциты и фибробласты	Синтетическая матрица из производных терефталата	Аутологичное	Неглубокие раны

Примечание: Препараты Laserskin и Hyalograft 3D могут применяться совместно. Такой комплексный препарат имеет торговое название TissueTech Autograft System. SPRG – Service for Personal Regeneration of Gum.

**Таблица 2 – Некоторые особенности аттестации
производственных банков кератиноцитов и фибробластов**

Показатель	Подход к тестированию	Методы анализа
Вирусная безопасность	In vitro и in vivo тестирование на вирусы (в том числе, ретровирусы), специфичные для человека, свиней, крупного рогатого скота	Трансмиссивная электронная микроскопия; Обратная транскрипция
Стерильность, микоплазменная контаминация	Выявление всех видов микробиологических контаминантов: бактерий и грибов	Микробиологические методы; ПЦР
Туморогенность	In vitro исследования стабильности генома клеток; In vivo образование опухолей	Кариотипирование; Изоферментный анализ; Тесты на старение культуры клеток; Тесты на образование опухолей
Подлинность	Экспрессия инволюкрина кератиноцитами; Биосинтез коллагена фибробластами	Изоферментный анализ; Иммунохимические методы; ПЦР
Активность	Жизнеспособность; Параметры роста культуры клеток	Подсчет клеток с помощью автоматического счетчика или с помощью гемоцитометра; Проточная цитометрия; Морфологический анализ
Сопоставимость (с ранее охарактеризованными клетками)	In vitro тесты, в том числе подтверждение клеточной чистоты, степень и интенсивность чрескожной абсорбции, анализ цитокинового профиля и количественный анализ VEGF; In vivo исследования на иммунодефицитных животных уровня экспрессии инволюкрина, приживления, интеграция, морфология и деформация графта, уменьшение раневой поверхности посредством раневой контракции	Гистология; Иммунохимические методы; MTT-тест

Примечание: ПЦР – полимеразная цепная реакция; VEGF – фактор роста эндотелия сосудов; MTT – колориметрический метод с использованием соли тетразолия.

Следует отметить, что не все продукты на основе клеток кожи первоначально были зарегистрированы как лекарственные препараты. Ряд продуктов, например, Epicel (Genzyme Biosurgery) и Invetrx (Ortec International) получили в FDA разрешение на клиническое применение как медицинские изделия (Humanitarian Device Exemption, HDE), но затем были переклассифицированы как биологические продукты на основе тканей «Tissue & Tissue Products», регулируемые в FDA подразделением по оценке и исследованию биологических препаратов (Center for Biologics Evaluation and Research – CBER). В РФ в настоящее время отсутствует опыт государственной регистрации препаратов, содержащих жизнеспособные клетки кожи человека, как биомедицинских клеточных продуктов в рамках действующего в настоящее время на территории РФ Федерального закона от 23 июня 2016 г. № 180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах», или как высокотехнологических лекарственных препаратов в рамках Решения Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 78 «О Правилах регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения». Ранее три тканеинженерных продукта (клеточная технология SPRG-терапия Института стволовых клеток человека, эквивалент дермальный и пласт кератиноцитов многослойный Института цитологии РАН) [6] получили

разрешение Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения (Росздравнадзора) на клиническое применение в медицинской практике как клеточные технологии для персонализированного лечения кожи⁷. На данный момент сроки действия разрешений на применение клеточных технологий и регистрационные удостоверения на изделия медицинского назначения истекли, или их коммерческое использование приостановлено вследствие изменившейся законодательной базы РФ в сфере разработки и регистрации препаратов на основе жизнеспособных клеток человека.

В настоящее время в открытом доступе имеются лишь экспертные отчеты по продуктам, зарегистрированным FDA и PMDA, зачастую содержащие неполную информацию, касающуюся проведения оценки качества при внутрипроизводственном контроле и контроле при выпуске препарата. Основываясь на имеющихся данных, можно обозначить представленные далее особенности стратегии контроля качества ЭК и препаратов на основе жизнеспособных клеток кожи, а также выявить основные проблемы, связанные с их производством.

⁷ Федеральная служба Российской Федерации по надзору в сфере здравоохранения. Перечень медицинских технологий, разрешенных к применению в медицинской практике на 30 декабря 2011 г. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://roszdravnadzor.gov.ru/documents/12545>

Входной контроль сырья и материалов

Использование сырья человеческого и животного происхождения (сыворотки для культивирования клеток, экстракта бычьего гипофиза, коллаген для матрикса) связано с такой проблемой безопасности использования продукта, как риск микробиологического и вирусного загрязнения, а в случае с материалами, полученными от крупного рогатого скота, дополнительно возникает риск передачи трансмиссивной губчатой энцефалопатии. С целью снижения этих рисков материалы и реагенты животного происхождения подвергаются тестированию на стерильность (присутствие бактерий, грибов, микоплазмы), наличие вирусной контаминации и бактериальных эндотоксинов. Весь материал от крупного рогатого скота должен быть получен из стран, где случаи заболеваемости трансмиссивной губчатой энцефалопатии не были зарегистрированы [22].

В случае производства большинства препаратов осуществляется тестирование доноров клеток на наличие возбудителей инфекционных заболеваний. Однако, для препарата с аутологичным применением Epicel (Genzyme Biosurgery) доноры клеточного материала такому тестированию не подвергаются, что приводит к риску возможного инфицирования персонала, работающего с биоматериалом и продуктом. Это требует соблюдения особых мер предосторожности на производстве⁸.

Кроме того, материал, используемый для создания носителей клеток и образования трехмерной структуры продукта должен тестироваться на физико-химические свойства.

Создание банков клеток

Еще одна особенность производства препаратов на основе клеток человека, предназначенных для аллогенного использования – необходимость создания банков клеток.

Для производства ЭЭ, ДЭ и полнослойных ЭК для аллогенного применения используются кератиноциты и фибробласты человека, полученные из биопсийного материала здоровых доноров, культивированные с целью наработки необходимого для терапевтического эффекта клеточного материала. Получение необходимого количества клеток, которое возможно использовать для одного или даже нескольких пациентов, из небольшого донорского участка кожи было бы затруднительно без создания производственных банков клеток: мастер банка (МБК) и рабочего банка клеток (РБК). Как правило, количество пассажей между МБК и РБК небольшое⁹. Банки клеток должны быть аттестованы и банкируемые клеточные линии охарактеризованы по таким показателям качества, как стерильность, отсутствие микоплазменной контаминации и занесенных вирусных агентов, цитогенетическая стабильность, туморогенность, чистота, активность

и подлинность, пролиферативная активность и жизнеспособность. Особенности тестирования клеточных линий по некоторым показателям качества, приведенные в экспертных отчетах регуляторных органов, выдавших разрешение на клиническое использование препаратов (раздел «Материалы и методы»), приведены в таблице 2.

Риск использования фидерного слоя из клеток животных

Для культивирования клеток кожи человека при производстве ряда препаратов, например, Epicel (Genzyme Biosurgery), STRATAGRAFT (Sratatech Corporation) и JACE (Japan Tissue Engineering Co.) используется фидерный слой клеток мыши, которые могут в остаточном количестве присутствовать в готовом продукте. FDA причисляет данные продукты к ксенотрансплантатам и несмотря на возможность использования фидерных клеток только из аттестованных банков клеток и признание низким риска передачи возбудителей инфекционных заболеваний через эти клетки, рекомендует реципиентам препаратов отказаться от донорства крови, плазмы, тканей, яйцеклеток, грудного молока и других биоматериалов.

Внутрипроизводственный контроль

Основной характеристикой производства препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека, является проведение всех процессов в асептических условиях. Отсутствие возможности стерилизации получаемого готового препарата приводит к необходимости контроля продукта на стерильность и отсутствие микоплазмы в качестве внутрипроизводственного контроля.

Особенности строения^{10,11} препаратов на основе клеток кожи, представляющих собой многослойную структуру на носителе, приводят к необходимости отслеживания морфологии продукта с помощью визуальной оценки и гистологического исследования, физических свойств после стадии промывки графта, пролиферативной активности кератиноцитов и подсчета жизнеспособных клеток [23, 24]. Предоставление отчета о морфологии клеток в виде фотографий, контроля образования многослойной структуры в культуре клеток и характеристику других типов клеток (кроме фибробластов), присутствующих в культуре клеток, консультационный комитет FDA потребовал и для препарата Laviv, содержащего фибробласты кожи без носителя.

Результаты тестирования по вышеизложенным показателям качества, наряду с некоторыми другими, например, «бионагрузкой», могут входить в спецификацию на готовый продукт, но быть получены в процессе производства. Это связано с небольшим сроком годности готового продукта (без криозаморозки) [25], не позволяющим проводить долгосрочные тесты при выпуске препарата. Так срок годности Apligraf и Gintuit (Organogenesis, Inc.) после

⁸ Food and Drug Administration (FDA). Epicel – Summary of safety and probable benefit, 1998.

⁹ Food and Drug Administration (FDA). Gintuit – Summary Basis for Regulatory Action, 2012.

¹⁰ Там же.

¹¹ Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA). JACE – Review Report, 2007.

размораживания составляет 15 суток, а срок годности STRATAGRAFT (Sratatech Corporation) – и вовсе 4 ч.

Тестирование готового препарата при выпуске

Все зарегистрированные на настоящий момент в мире препараты, содержащие жизнеспособные клетки кожи человека, получены в результате непрерывного процесса производства, и, следовательно, имеют только одну конечную спецификацию на готовый продукт. В зависимости от строения препарата, наличия многослойной структуры или носителя спецификации могут различаться по набору показателей качества, по которым происходит тестирование продукта при выпуске. Такое тестирование может частично производиться на стадии до заморозки готового препарата, а частично на стадии после фасовки на размороженных образцах, как указано в экспертном отчете на препарат LAVIV (Fibrocell Technologies, Inc.).

В общем виде спецификация на готовый продукт, содержащий жизнеспособные клетки кожи человека, включает следующие показатели качества:

- Визуальная оценка внешнего вида продукта (описание);
- Жизнеспособность и общее число клеток;
- Стерильность;
- Микоплазма;
- Бактериальные эндотоксины;
- Подлинность (для фибробластов и кератиноцитов);
- Чистота;
- Активность (эффективность);
- Целостность системы упаковки.

В показателе качества «Описание» должны быть отражены такие параметры как цветность, прозрачность препарата, внешний вид ЭЭ или ДЭ (если применимо): наличие неровностей на поверхности конструкции, сморщивания, деформации, изменения толщины слоев¹².

Оценка стерильности в основном осуществляется с помощью стандартного микробиологического теста, с последующей окраской микробиологических препаратов по Грамму^{13,14}. Тест на микоплазму при выпускающем контроле препарата JACE (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.) осуществлялся цитохимическим методом при помощи окрашивания ДНК флуоресцентным красителем (с использованием индикаторных линий клеток). Допускается, что результаты тестирования на стерильность и микоплазму могут быть получены уже после клинического применения препарата, вследствие превышения продолжительности проведения испытания над сроками годности некоторых препаратов¹⁵. Возможность клинического применения препарата без результатов оценки

стерильности и контаминации микоплазмой приводит к требованию предоставления информации для врача с планом лечения пациента в случае инфицирования контаминирующими препарат агентами на вкладыше в упаковку готового продукта.

В экспертном отчете на препарат JACE (Japan Tissue Engineering Co., Ltd.) указывается необходимость контроля содержания остаточного количества бычьего сывороточного альбумина, определение остаточного числа фидерных клеток и физических свойств лоскута (возможно на стадии внутрипроизводственного контроля). Подобные тесты могут быть отнесены к показателю качества «чистота» и доказывать отсутствие в готовом продукте примесей, образующихся в результате технологического процесса.

Одним из самых сложных и спорных моментов в подборе адекватных методов анализа при оценке качества препаратов, используемых для заживления ран и повреждений кожи, является подтверждение их активности. Чаще всего механизм действия препаратов не продемонстрирован (не установлен) или не приведен в нормативной документации к продукту. В ряде экспертных отчетов к препаратам указывается возможность заживление ран за счет активации деления клеток реципиента при секреции клетками продукта биологически активных веществ (факторы роста тромбоцитов, фибробластов, эндотелия сосудов, эпидермальный фактор роста, цитокины, коллаген IV типа, тенасцин, фибронектин и другие). Подобный механизм действия отмечается для препаратов Apligraf, GINTUIT, STRATAGRAFT, KeraHeal-Allo, OrCel, TransCyte и Dermagraft. Способность фибробластов ускорять механизмы регенерации тканей за счет секреции ими биологически активных веществ считается доказанной [26, 27]. При этом такие продукты находятся на раневой поверхности временно, с постепенной элиминацией клеток и резорбцией неклоточного материала (если применимо). Для другой группы препаратов (KeraHeal, TissueTech Autograft System, CellSpray) показано уменьшение раневой поверхности вследствие пролиферации и дифференцировки клеток самого препарата с образованием структур кожи, необходимых для выполнения барьерной функции. Данные препараты используются в качестве постоянных аппликаций для закрытия раневой поверхности вследствие возможной пролиферации, миграции и дифференцировки клеток с образованием многослойного эпителия [28].

Выбор методов и подходов для оценки активности (являющейся мерой эффективности препарата при клиническом использовании) каждого препарата, содержащего клетки кожи человека происходит в индивидуальном порядке и согласуется производителями препарата с регуляторными органами стран, где будет осуществляться их клиническое применение. Например, вывод об эффективности LAVIV (Fibrocell Technologies, Inc.) был сделан на основе определения общего количества клеток в препарате, подтверждения подлинности

¹² Food and Drug Administration (FDA). SRTATAGRAFT – Package Insert, 2021.

¹³ Food and Drug Administration (FDA). Epicel – Summary of safety and probable benefit, 1998.

¹⁴ Food and Drug Administration (FDA). LAVIV – Summary Basis for Regulatory Action, 2011.

¹⁵ Food and Drug Administration (FDA). Gintuit – Summary Basis for Regulatory Action, 2012.

фибробластов и анализа коллагена, секретируемого клетками. Для оценки эффективности GINTUIT (Organogenesis, Inc.) проводилось гистологическое исследование графта. Однако консультационный комитет признал данный подход только как доказательство структурной целостности продукта, и предложил дополнительно осуществить анализ секретируемых клетками цитокинов.

Кроме того, в спецификацию на готовый продукт могут быть добавлены при необходимости дополнительные показатели качества: pH, бионагрузка¹⁶, барьерные свойства графтов, которые подтверждают образование внешнего ороговеющего слоя эпителия и исследуются на основе гистологического анализа¹⁷. Подтверждение барьерной функции и исследования проницаемости графта проводят с помощью разных подходов, например, посредством определения толщины эпидермиса и исследования липидного профиля [29]. Формирование правильной базальной мембраны возможно подтверждением наличия коллагена IV типа в дермо-эпидермальном соединении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ввиду непрерывности технологического процесса производства, небольшого срока годности и невозможности проведения процедур стерилизации готового препарата, содержащего жизнеспособные клетки кожи человека, а также сложности комбинированных препаратов (применимо к графтам), заключающейся в присутствии в готовом продукте неклеточного компонента – носителя (скаффолдов, матриц, матриксов), зачастую, сложно

отделимого от клеток, большое значение приобретает соблюдение ряда требований к технологическому процессу и учет особенностей стратегии контроля качества подобных препаратов. К таким требованиям относятся: создание программы квалификации сырья и исходных материалов, которая бы предусматривала риски их использования; контроль материалов животного происхождения; создание банков клеток кожи, используемых для производства аллогенного продукта; использование фидерных клеток только из аттестованных банков; проведение ряда исследований по показателям качества при внутрипроизводственном контроле с включением результатов этих исследований в спецификацию на готовый продукт. Контроль качества препаратов, содержащих клетки кожи, включает помимо стандартных тестов (описание, жизнеспособность, общее число клеток, стерильность, микоплазма, бактериальные эндотоксины, подлинность, чистота, активность), характерных для контроля качества любых препаратов, содержащих жизнеспособные клетки человека, дополнительно исследования физико-химических свойств носителя и/или целого графта (бионагрузка, барьерные свойства графта).

В связи со сложностью демонстрации активности препаратов, используемых для заживления ран, и не полной изученностью природы их действия, подходы и методы для определения этого показателя качества должны выбираться индивидуально для каждого продукта и отражать такие свойства клеточного компонента, как число, жизнеспособность и подлинность клеток, а также их пролиферативную и/или секреторную способность.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00052-23-00 на проведение прикладных научных исследований (государственный учет НИР № 121021800098-4).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

О.А. Рачинская – информационно-аналитический поиск по теме исследования, обработка данных, написание статьи; Е.В. Мельникова – определение цели и задачи исследования, корректировка текста; В.А. Меркулов – планирование концепции статьи, консультирование по нормативно-правовым актам, регулирующим обращение препаратов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Loyd C., Besse J., Boyce S. Controlled-rate freezing to regulate the structure of collagen-glycosaminoglycan scaffolds in engineered skin substitutes // J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. – 2015. – Vol. 103, No. 4. – P. 832–840. DOI:10.1002/jbm.b.33253
- Mahjour S.B., Fu X., Yang X., Fong J., Sefat F., Wang H. Rapid creation of skin substitutes from human skin cells and biomimetic nanofibers for acute full-thickness wound repair // Burns. – 2015. – Vol. 41, No. 8. – P. 1764–1774. DOI:10.1016/j.burns.2015.06.011
- Wang Y., Xu R., Luo G., Lei Q., Shu Q., Yao Z., Li H., Zhou J., Tan J., Yang S., Zhan R., He W., Wu J. Biomimetic fibroblast-loaded artificial dermis with «sandwich» structure and designed gradient pore sizes promotes wound healing by favoring granulation tissue formation and wound re-epithelialization // Acta Biomater. – 2016. – Vol. 30. – P. 246–257. DOI:10.1016/j.actbio.2015.11.035
- Ter Horst B., Chouhan G., Moimen N.S., Grover L.M. Advances in keratinocyte delivery in burn wound care // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2018. – Vol. 123. – P. 18–32. DOI:10.1016/j.addr.2017.06.012.
- Zhong S.P., Zhang Y.Z., Lim C.T. Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction // Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed Nanobiotechnol. – 2010. – Vol. 2, No. 5. – P. 510–525. DOI:10.1002/wnan.100
- Блинова М.И., Юдинцева Н.М., Александрова О.И., Баллзек М.Ф., Хабарова И.Г., Маркин С.М.,

¹⁶ Там же.

¹⁷ Food and Drug Administration (FDA). SRTATAGRAFT – Package Insert, 2021.

- Чагунова О.Л. Клинический опыт заживления трофических язв с использованием клеточного продукта «Эквивалент дермальный» // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2015. – № 2. – С. 690–694.
7. Sun B.K., Sipsrashi Z., Khavari P.A. Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds // *Science*. – 2014. – Vol. 346, No. 6212. – P. 941–945. DOI:10.1126/science.1253836
8. Fernandes S., Vyas C., Lim P., Pereira R.F., Virós A., Bártolo P. 3D Bioprinting: An Enabling Technology to Understand Melanoma // *Cancers (Basel)*. – 2022. – Vol. 14, No. 14. – P. 3535. DOI:10.3390/cancers14143535
9. Shoji-Pietraszkiewicz A., Sakamoto M., Katsube M., Ogino S., Tsuge I., Yamanaka H., Arata J., Morimoto N. Treatment of giant congenital melanocytic nevi with cultured epithelial autografts: clinical and histopathological analysis // *Regen. Ther.* – 2021. – Vol. 18. – P. 1–6. DOI:10.1016/j.reth.2021.02.003.
10. Orgill D.P., Butler C., Regan J.F., Barlow M.S., Yannas I.V., Compton C.C. Vascularized collagen-glycosaminoglycan matrix provides a dermal substrate and improves take of cultured epithelial autografts // *Plast. Reconstr. Surg.* – 1998. – Vol. 102. – P. 423–429. DOI:10.1097/00006534-199808000-00020
11. Jones I., Currie L., Martin R. A guide to biological skin substitutes // *Br. J. Plast. Surg.* – 2002. – Vol. 55. – P. 185–193. DOI:10.1054/bjps.2002.3800
12. Tonello C., Vindigni V., Zavan B., Abatangelo S., Abatangelo G., Brun P., Cortivo R. *In vitro* reconstruction of an endothelialized skin substitute provided with a microcapillary network using biopolymer scaffolds // *FASEB J.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1546–1548. DOI:10.1096/fj.05-3804fje
13. Dezutter-Dambuyant C., Black A., Bechetoille N., Bouez C., Maréchal S., Auxenfans C., Cenizo V., Pascal P., Perrier E., Damour O. Evolutive skin reconstructions: From the dermal collagen-glycosaminoglycan-chitosane substrate to an immunocompetent reconstructed skin // *Biomed. Mater. Eng.* – 2006. – Vol. 16, Suppl. 4. – P. 85–94.
14. Lee J.H., Kim J.E., Kim B.J., Cho K.H. *In vitro* phototoxicity test using artificial skin with melanocytes // *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* – 2007. – Vol. 23. – P. 73–80. DOI:10.1111/j.1600-0781.2007.00279.x
15. Proding C.M., Reichelt J., Bauer J.W., Laimer M. Current and Future Perspectives of Stem Cell Therapy in Dermatology // *Ann. Dermatol.* – 2017. – Vol. 29. – P. 667–687. DOI:10.5021/ad.2017.29.6.667
16. Morimoto N., Saso Y., Tomihata K., Taira T., Takahashi Y., Ohta M., Suzuki S. Viability and function of autologous and allogeneic fibroblasts seeded in dermal substitutes after implantation // *J. Surg. Res.* – 2005. – Vol. 125. – P. 56–67. DOI:10.1016/j.jss.2004.11.012
17. Linares-Gonzalez L., Rodenas-Herranz T., Campos F., Ruiz-Villaverde R., Carriel V. Basic Quality Controls Used in Skin Tissue Engineering // *Life*. – 2021. – Vol. 11. – Art. ID: 1033. DOI:10.3390/life11101033
18. Николаева Е.Д. Биополимеры для клеточной и тканевой инженерии // Журнал сибирского федерального университета. Серия: Биология. – 2014. – Т. 7. – С. 222–233.
19. Shevchenko R.V., James S.L., James S.E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction // *J. R. Soc. Interface*. – 2010. – Vol. 7, No. 43. – P. 229–258. DOI:10.1098/rsif.2009.0403.
20. Мелешина А.В., Быстрова А.С., Роговая О.С., Воротеяк Е.А., Васильев А.В., Загайнова Е.В. Тканеинженерные конструкторы кожи и использование стволовых клеток для создания кожных эквивалентов (Обзор) // Современные технологии в медицине – 2017. – Т. 9, № 1. – С. 198–218. DOI:10.17691/stm2017.9.1.24.21
21. Мельникова Е.В., Меркулова О.А., Борисевич И.В., Меркулов В.А. От клеточных технологий к биомедицинским клеточным продуктам: опыт использования препаратов на основе жизнеспособных клеток человека Российской Федерации // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 4. – С. 231–240. DOI:10.31116/tsitol.2018.04.01
22. Vodiakova M.A., Sayfutdinova A.R., Melnikova E.V., Goryaev A.A., Sadchikova N.P., Gegechkori V.I., Merkulov V.A. Production of biomedical cell products: requirements for the quality of donor material and excipients of animal origin (review) // *RSC Med. Chem.* – 2020. – Vol. 11, No. 3. – P. 349–357. DOI:10.1039/c9md00529c
23. Aleynik D.Ya., Zagaynova E.V., Egorikhina M.N., Charykova I.N., Rogovaya O.S., Rubtsova Yu.P., Popova A.N., Vorotelyak E.A. Methods for Assessing the Quality of Biomedical Cell Products for Skin Replacement // *CTM*. – 2019. – Vol. 11, No. 4. – P. 34–41.
24. Egorikhina M.N., Aleynik D.Ya., Rubtsova Y.P., Levin G.Ya., Charykova I.N., Semenycheva L.L., Bugrova M.L., Zakharychev E.A. Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics // *Bioactive Materials*. – 2019. – Vol. 4. – P. 334–345. DOI:10.1016/j.bioactmat.2019.10.003
25. Королева Т.А. Клеточные технологии в лечении детей с глубокими ожогами кожи (обзор литературы) // Российский вестник детской хирургии, анестезиологии и реаниматологии. – 2013. Т. 3, № 3. – С. 35–42.
26. Costa-Almeida R., Soares R., Granja P.L. Fibroblasts as maestros orchestrating tissue regeneration // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2018. – Vol. 12, No. 1. – P. 240–251. DOI:10.1002/term.2405
27. Петручук Е.М., Шалунова Н.В., Олефир Ю.В., Борисевич И.В., Перекрест В.В., Шевцов В.А., Рукавишников А.В., Хантимирова Л.М. Культуры клеток в заместительной терапии // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2017. – Т. 17, № 4. – С. 197–204.
28. Lootens L., Brusselaers N., Beele H., Monstrey S. Keratinocytes in the treatment of severe burn injury: an update // *Int. Wound J.* – 2013. – Vol. 10, No. 1. – P. 6–12. DOI:10.1111/j.1742-481X.2012.01083.x
29. Van Drongelen V., Danso M.O., Mulder A., Miereme A., van Smeden J., Bouwstra J.A., El Ghalbzouri A. Barrier Properties of an N/TERT-Based Human Skin Equivalent // *Tissue Eng. Part A*. – 2014. – Vol. 20, No. 21–22. – P. 3041–3049. DOI:10.1089/ten.tea.2014.0011

АВТОРЫ

Рачинская Ольга Анатольевна – кандидат биологических наук, ведущий эксперт, ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-8377-9205. E-mail: Rachinskaya@expmed.ru

Мельникова Екатерина Валерьевна – кандидат биологических наук, начальник лаборатории биомедицинских клеточных продуктов, ФГБУ

«Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-9585-3545. E-mail: MelnikovaEV@expmed.ru

Меркулов Вадим Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, заместитель генерального директора ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России по экспертизе лекарственных средств. ORCID ID: 0000-0003-4891-973X. E-mail: Merkulov@expmed.ru

УДК 616.8-056.7



СОЗДАНИЕ КЛОНА ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК МЫШЕЙ С КОНДИЦИОННЫМ НОКАУТОМ ГУМАНИЗИРОВАННОГО ГЕНА *SNCA*

Е.А. Патраханов, В.М. Покровский, А.Ю. Карагодина, А.М. Краюшкина,
Н.С. Жунусов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.Б. Алтухова

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

E-mail: mkorokin@mail.ru

Получена 10.09.2022

После рецензирования 01.11.2022

Принята к печати 20.11.2022

Одним из ключевых молекулярных звеньев в патогенезе болезни Паркинсона является белок α -синуклеин. Накопленные данные свидетельствуют о том, что патогенные мутации в гене *Snca* ассоциированы с развитием нейродегенеративного повреждения головного мозга, тем самым указывая на актуальность изучения нейробиологической роли α -синуклеина.

Цель. Создание генетически-модифицированного клона стволовых клеток мышей с кондиционным нокаутом гуманизированного α -синуклеина, который может быть использован для реинъекции в мышинные бластоцисты, а также для фундаментальных и прикладных *in vitro* исследований в области патофизиологии и нейрофармакологии.

Материалы и методы. Для создания мышинных стволовых клеток с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca* был использован прежде полученный клон с фланкированными LoxP-сайтами первым экзоном *Snca*. Для гуманизации IV и V экзона была использована система CRISPR/Cas9-опосредованной гомологичной рекомбинации с донорными ДНК олигонуклеотидами человеческих сайтов соответствующих генов. Нуклеаза Cas9, гидовые РНК и донорная ДНК были трансфицированы в клетки мыши.

Результаты. Нами был предложен и реализован подход к получению клонов мышинных генетически-модифицированных стволовых клеток, экспрессирующих патологический гуманизированный α -синуклеин. Полученные клоны были высеяны на чашки Петри для размножения и дальнейшего генетического анализа. Был обнаружен клон 126-2F4, несущий необходимые генетические модификации. Результаты проведенного исследования принципиально важны не только для понимания развития патологического процесса при α -синуклеинопатиях, но и, что ещё важнее, для разработки новых терапевтических подходов, которые позволят остановить распространение агрегационной патологии человеческого α -синуклеина по нервной системе и валидации этих подходов в доклинических испытаниях.

Заключение. В результате проведенного исследования разработана стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Snca*, кодирующего α -синуклеин. Выполнено редактирование генома клона эмбриональных стволовых клеток мыши с использованием CRISPR технологии. Синтезированы РНК и ДНК олигонуклеотиды, необходимые для создания рибонуклеопротеиновых комплексов, осуществляющих направленную гомологическую рекомбинацию в *Snca* локусе генома мыши. Разработанный клон клеток может служить для создания линии генетически-модифицированных мышей, служащих тест-системой для патофизиологических и нейрофармакологических исследований, связанных с синуклеинопатиями. При этом до индукции Cre-зависимой рекомбинации данная линия является репрезентативной моделью для исследования биологической роли мутантного *Snca*. В то же время, после Cre-зависимая активация нокаута позволяет имитировать фармакологическое ингибирование α -синуклеина, что представляет особый интерес для прикладных исследований в нейрофармакологии.

Ключевые слова: α -синуклеин; нейродегенерация; болезнь Паркинсона; кондиционный нокаут; CRISPR/Cas9

Список сокращений: НЗ – нейродегенеративные заболевания; оРНК – одиночная гидовая рибонуклеиновая кислота; РНП – рибонуклеопротеины; ПЦР – полимеразная цепная реакция; NAC – неамилоидный компонент; БП – болезнь Паркинсона.

Для цитирования: Е.А. Патраханов, В.М. Покровский, А.Ю. Карагодина, А.М. Краюшкина, Н.С. Жунусов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.Б. Алтухова. Создание клона эмбриональных стволовых клеток мышей с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca*. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):525-535. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-525-535

© Е.А. Патраханов, В.М. Покровский, А.Ю. Карагодина, А.М. Краюшкина,
Н.С. Жунусов, А.В. Дейкин, М.В. Корокин, М.В. Покровский, О.Б. Алтухова, 2022

For citation: E.A. Patrakhonov, V.M. Pokrovsky, A.Yu. Karagodina, A.M. Krayushkina, N.S. Zhunusov, A.V. Deykin, M.V. Korokin, M.V. Pokrovsky, O.B. Altukhova. Development of murine stem cells with conditional knockout of humanized *Snca* gene. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6): 525-535. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-525-535

DEVELOPMENT OF MURINE STEM CELLS WITH CONDITIONAL KNOCKOUT OF HUMANIZED *SNCA* GENE

E.A. Patrakhanov, V.M. Pokrovsky, A.Yu. Karagodina, A.M. Krayushkina,
N.S. Zhunusov, A.V. Deykin, M.V. Korokin, M.V. Pokrovsky, O.B. Altukhova

Belgorod State National Research University,
85, Pobedy Str., Belgorod, Russia, 308015

E-mail: mkorokin@mail.ru

Received 10 Sep 2022

After peer review 01 Nov 2022

Accepted 20 Nov 2022

α -synuclein is one of the key molecular links in the pathogenesis of Parkinson's disease. The accumulated data indicate that pathogenic mutations in the *Snc*a gene are associated with the development of neurodegenerative brain damage, indicating the relevance of studying the synuclein neurobiological role.

The aim of the study was to create a genetically modified clone of mouse stem cells with a conditional knockout of humanized α -synuclein, which can be used for the reinjection into mouse blastocysts, as well as for basic and applied *in vitro* research in the field of pathophysiology and neuropharmacology.

Materials and methods. To create mouse stem cells with a conditional knockout of the humanized *Snc*a gene, a previously obtained clone with the first *Snc*a exon flanked by LoxP sites, was used. The CRISPR/Cas9-mediated homologous recombination system with donor DNA oligonucleotides of the human sites of the corresponding gene sites was used to humanize the fourth and fifth exons. Cas9 nuclease, single guide RNA, and donor DNA were transfected into mouse cells.

Results. An approach to obtaining clones of mouse genetically modified stem cells expressing pathological humanized α -synuclein, has been proposed and implemented. The resulting clones were plated on Petri dishes for propagation and a further genetic analysis. Clone 126-2F4 was found out carrying the necessary genetic modifications. The results obtained are fundamentally important not only for understanding the development of the pathological process in α -synucleinopathies, but which is more important, for the development of new therapeutic approaches that will stop the extension of the human α -synuclein aggregation pathology throughout the nervous system, and the validation of these approaches in preclinical trials.

Conclusion. As a result of the study, a strategy for CRISPR/Cas9-assisted homologous recombination in the genome of mouse embryonic stem cells has been developed to create a fully humanized *Snc*a gene encoding α -synuclein, and the clone genome of mouse embryonic stem cells has been edited using a CRISPR technology. The RNA and DNA oligonucleotides necessary for the creation of RNP complexes that carry out a directed homologous recombination in the *Snc*a locus of the mouse genome have been synthesized. The developed cell clone can serve to create a line of genetically modified mice that serve as a test system for pathophysiological and neuropharmacological studies associated with synucleinopathies. Herewith, before the induction of the Cre-dependent recombination, this line is a representative model for studying a biological role of mutant *Snc*a. At the same time, after a Cre-dependent knockout activation, it is possible to imitate the pharmacological inhibition of α -synuclein, which is of particular interest for applied research in neuropharmacology.

Keywords: α -synuclein; neurodegeneration; Parkinson's disease; conditional knockout; CRISPR/Cas9

Abbreviations: NDs – neurodegenerative diseases; sgRNA – single-guide RNA; NAC – non-amyloid- β component; RNP – ribonucleoprotein; PCR – polymerase chain reaction; PD – Parkinson's disease.

ВВЕДЕНИЕ

Гетерогенная группа патологий, объединенная понятием нейродегенеративные заболевания (НЗ), продолжает приобретать все большую медицинскую и социальную значимость. Ввиду увеличения средней продолжительности жизни, бремя НЗ, классически ассоциированных с пожилым возрастом, становится одной из наиболее актуальных медико-биологических проблем [1]. При этом, несмотря на высокие темпы развития нейробиологии, многие аспекты патогенеза НЗ остаются раскрытыми лишь фрагментарно. Одним из подобных аспектов является роль α -синуклеина в основных процессах, связанных с дегенеративной гибелью нейронов.

В качестве основного компонента белковых

агрегатов был обнаружен α -синуклеин при целом ряде НЗ, которые объединены в группу синуклеинопатии, включая болезнь Паркинсона, деменцию с тельцами Леви, расстройство поведения во сне с быстрыми движениями глаз и истинную вегетативную недостаточность [2].

Альфа-синуклеин является продуктом гена *Snc*a, расположенного на хромосоме 4 в положении q22.1 [3], и представляет собой небольшой белок (140 аминокислот), экспрессируемый преимущественно в нейронах, а также в некоторых опухолевых клетках [4]. Его структура представлена тремя основными доменами: N-концевой домен (1–60), содержащий консервативный мотив из нескольких повторяющихся последовательностей аминокислот

(консенсусная последовательность ХКТКЕГVXXXX); центральный домен (61–95), известный как неамилоидный компонент (NAC), который обладает высокой гидрофобностью и участвует в агрегации α -синуклеина при образовании β -складчатой структуры; С-концевой домен (96–140), обогащенный отрицательно заряженными остатками и пролином, обеспечивающим гибкость полипептида [5].

Несмотря на то, что физиологическая функция α -синуклеина остается малоизученной, его локализация в пресинаптических окончаниях [6], связь с резервным пулом синаптических пузырьков [7] и наблюдаемые недостатки синаптической передачи в ответ на нокдаун или сверхэкспрессию гена предполагают, что α -синуклеин играет роль в регуляции высвобождения нейротрансмиттеров, а также в нейропластичности [8].

Возможная роль α -синуклеина в регуляции синаптического гомеостаза связана не только с его непосредственным взаимодействием с синаптическими везикулами: взаимодействует с синаптическими белками, контролирующими экзоцитоз везикул, такими как фосфолипаза D и семейство малых гуанозинтрифосфатаз Rab [9]. Накопленные данные свидетельствуют о том, что α -синуклеин может действовать как шаперон, контролировать деградацию и влиять на сборку, поддержание и распределение пресинаптического белкового комплекса SNARE, который участвует в высвобождении нейротрансмиттеров, в том числе дофамина [10]. В совокупности эти наблюдения указывают на то, что α -синуклеин играет важную роль в перемещении и экзоцитозе везикул [8].

В данной работе мы описываем процедуру создания клона эмбриональных стволовых клеток мышей с CRISPR/Cas9-опосредованной гуманизацией гена *Snca* с фланкированным LoxP-сайтами первым экзоном.

ЦЕЛЬ. Создание генетически-модифицированного клона стволовых клеток мышей с кондиционным нокаутом гуманизированного α -синуклеина, который может быть использован для реинъекции в мышинные бластоцисты, а также для фундаментальных и прикладных *in vitro* исследований в области патофизиологии и нейрофармакологии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Этическая экспертиза исследования

Эксперименты выполнены в НИИ фармакологии живых систем НИУ «БелГУ» с соблюдением этических стандартов, регламентируемых руководством ARRIVE. Экспериментальные исследования были одобрены биоэтической комиссией Белгородского государственного национального исследовательского университета (протокол № 08/21 от 08.02.2021).

Получение клона клеток с фланкированным первым экзоном гена *Snca*

Клон мышинных эмбриональных стволовых клеток, несущих одинаково ориентированные LoxP-сайты, фланкирующие первый кодирующий экзон гена *Snca* (Клон 126), был получен в предыдущих исследованиях лаборатории и был использован для получения мышей с кондиционным нокаутом этого гена. Полученная линия мышей и доказательства истощения α -синуклеина, кодируемого *Snca* геном, в нервной системе после индукции LoxP/Cre рекомбинации описаны в опубликованных статьях [11–13]. Клон был использован для дальнейшего геномного редактирования с целью получения стволовых клеток с гуманизированным геном *Snca*.

Поверхности всех пластиковых чашек Петри, флаконов и планшетов, использованных для культивирования мышинных эмбриональных стволовых клеток, были предварительно покрыты слоем желатина: 0,1% раствор желатина (Merk, Германия) наслаивали на рабочую поверхность пластика и отсасывали через 15–30 мин инкубации при комнатной температуре. Непосредственно после этого поверхность покрывали слоем культуральной среды.

Хранившиеся в жидком азоте клетки клона с фланкированным первым экзоном α -синуклеина были разморожены, промыты средой ESGRO Complete Basal Medium (Sigma-Aldrich, США), ресуспендированы в 4 мл среды с GSK3 ингибитором ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium (Sigma-Aldrich, США) и высеяны на пластиковые чашки Петри диаметром 6 см (Nunc, Дания). Через 16 ч инкубации при 37°C в атмосфере 5% CO₂, меняли среду на свежую ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium, предварительно промыв чашки ESGRO Complete Basal Medium, а через 48 ч подсчитывали концентрацию клеток в камере Горяева и высевали 200 000 клеток на каждую из подготовленных пластиковых чашек Петри, используя ESGRO Complete Accutase (Merk, Германия).

Подготовка клеток к нуклеофекции

Через 48 ч после посева обрабатывали клетки раствором Accutase, как описано выше, отбирали 2 аликвоты по 200 000 клеток, центрифугировали, тщательно удаляли супернатант и ресуспендировали каждый осадок в 20 мкл Complete P3 буфера, приготовленного непосредственно перед употреблением, смешивая 34,2 мкл Nucleofector TM Solution и 7,6 мкл P3 Primary Cell 4D-Nucleofector® X kit S (Lonza, Швейцария).

Для введения направленных разрывов в редактируемые области гена *Snca* были использованы рекомбинантный белок Cas9, одиночная гидовая рибонуклеиновая кислота (огРНК), а также одноцепочечные ДНК олигонуклеотиды

для гомологической рекомбинации, несущие нуклеотидные замены, соответствующие последовательности *Sncs* гена человека.

Формировали рибонуклеопротеиновые (РНП) комплексы, смешивая 1 мкл 100 μ M раствора sgRNA4, 1 мкл 100 μ M раствора орPHK5 и 1 мкл 10 мг/мл раствора Cas9. Инкубировали 10 мин при 20°C, добавляли 0,4 мкл свежеприготовленной смеси растворов донорной ДНК (ssODN4 и ssODN5) с концентрацией 250 μ M для каждого из олигонуклеотидов и немедленно добавляли 20 мкл клеток ресуспендированных в Complete P3 буфере как описано выше.

Стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Sncs*, экспрессирующего вариант α -синуклеина человека с повышенной склонностью к агрегации, ассоциированной с развитием наследственной формы болезни Паркинсона показана на рисунках 1 и 5.

Доставка РНП комплексов в клетки с помощью нуклеофекции

Клеточную суспензию переносили в Nucleocuvette TM (Lonza, Швейцария) и проводили нуклеофекцию в приборе 4D-Nucleofector TM (Амаха, Украина), используя программу CA-120. По окончании переносили клетки в 5 мл ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium, ресуспендировали для получения моноклеточной суспензии, подсчитывали концентрацию выживших клеток в камере Горяева и высевали по 200, 400, 600, 800 и 1000 клеток на каждую из пяти подготовленных

чашек Петри диаметром 10 см в 10 мл той же среды предварительно отобрав аликвоту для выделения геномной ДНК.

Клетки дорастивали до появления отдельно лежащих колоний, происходящих из одной клетки, разделяли аккутазой в лунке 96-луночного планшета, инкубировали 3 мин при комнатной температуре, добавляли 0,2 мл ESGRO Complete Plus Clonal Grade Medium, ресуспендировали и растили клетки до достижения 30–50-процентного монослоя. На этом этапе пересевали клетки в ячейки 4-луночных чашек в триплетах. Последнюю из трёх параллельных чашек использовали для выделения геномной ДНК.

Выделение геномной ДНК и анализ редактирования экзонов гена *Sncs*

Клетки лизировали непосредственно на поверхности лунок после удаления среды и выделяли ДНК с использованием кита Wizard Mammalian Cell DNA Extraction (Promega, США) согласно инструкции производителя. ДНК использовали для ПЦР амплификации фрагментов ДНК, содержащих последовательности экзонов гена *Sncs* мыши, с помощью GenPak PCR Core набора (Isogen, Россия), согласно инструкции производителя.

Оценка наличия гомологической рекомбинации с донорной ДНК проводили с помощью аллель-специфичной ПЦР и рестрикционного анализа. Реакционную смесь инкубировали с рестрикционными эндонуклеазами специфичными к мутантной последовательности и электрофоретически разделяли для оценки наличия гомологической рекомбинации с донорной ДНК. Продукты реакции анализировали в 1,5% агарозном геле.

Таблица 1 – Компоненты смеси, трансфицированные в клон 126 эмбриональных стволовых клеток, для гуманизации мышинного гена *Sncs*

Компонент	Последовательность	Вид молекулы
sgRNA4 (Alt® CRISPR-Cas9 sgRNA для гуманизации экзона IV гена <i>Sncs</i>)	5'- mG*mU*mC*CUUCUUGACAAAGCCAGGUUUUAG AGCUAGAAAUAGCAAG UUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U -3'	РНК
sgRNA5 (Alt® CRISPR-Cas9 sgRNA для гуманизации экзона V гена <i>Sncs</i>)	5'- mG*mG*mG*UGAGGAGGGUACCCACGUUUUAGAGCUArGAAAUAGCAAG UUAUUUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGC mU*mU*mU*U -3'	РНК
ssODN4 (Alt-RTM HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона IV гена <i>Sncs</i>)	5'- /Alt-R-HDR1/G*T*T ATT ACT GAG CAT AAA ACA GGC AGC CAT ACC TTG CCC AAC TGG TCC TTC TTG ACA AAG CCA GTT GCA GCA GCT ATG CTC CCA GCT CCC TCC ACT GTC TTC TGA GCG ACA GCT GTC* A*C/Alt-R-HDR2/ -3'	ДНК
ssODN5 (Alt-RTM HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона V гена <i>Sncs</i>)	5'- /Alt-R-HDR1/A*A*A ACA CTC TCT TAT TGT GCT TTC TCT TCC CTC TCT GTA GAA TGA GGA GGG GGC CCC ACA AGA AGG AAT CCT GGA AGA CAT GCC TGT GGA TCC TGA CAA TGA GGC TTA TGA AAT GCC TTC AGA GGT AAA TGC CTG TA*T*A/Alt-R-HDR2/ -3'	ДНК
Нуклеаза Cas9	–	Белок

Последовательность нуклеотидов экзона IV фланкирующих областей *Snsa* гена мыши

Зелёный фон: экзон IV

Голубой фон: прямой праймер

Жёлтый фон: обратный праймер

Жирный шрифт: CRISPR-Cas9 crRNA и PAM последовательность (подчёркнута)

Красный шрифт: нуклеотиды, подлежащие замене для гуманизации экзона IV

TGTTATAATTAACTCCCAATATTTTCTAATTTCTGCACTAAATTCATATTCAGTGTTTGGCTGAAACATGTCTCTTCTACCTTGCTGTCTTG
 TTCTTTCAGACTCCTGTTACCTATGATATATGTGTCTATAGAAGTTGACAGCTGCTAGAAGTGAATTATTAAAGTCTCTGTACACCATCAT
 CTTTACTCTGTTGCTACTCTTGATTTTCTTAAGTGGCTGAGAAGACCAAGAGCAAGTGACAAATGTTGGAGGAGCAGTGGTGACTGGTGTG
 V A E K T K E Q V T N V G G A V V T G V
 ACAGCAGTCGCTCAGAAGACAGTGGAGGGAGCTGGGAATATAGCTGCTGCCACTGGCTTTGTCAAGAAGGACCAGATGGGCAAGGTATGGCTG
 T A V A Q K T V E G A G N I A A A T G F V K K D Q M G K
 CCTGTTTTATGCTCAGTAATAACCCCTGGACACCATGTCCTTGCATGCATCATAGAGCATGCACATGATGCACACTGTGGGGAACACTGCCTTT
 AAAGGGCTCTTATTTTGATGCACTGATGTCCTTGGGAAATGTCATGCACACAATAACCCCTGATTGTTTGTAGTTTCTGGAAGAAAGATATAGAA

Последовательность нуклеотидов, гомологичная ssODN4 (Alt-R™ HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона IV *Snsa* гена)

Курсив: «мисматч» праймер

Красный строчный шрифт: нуклеотидные замены, приводящие к гуманизации экзона IV или создающие новые сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами

ACAGCAGTCGCTCAGAAGACAGTGGAGGGAGCTGGGAATATAGCTGCTGCCACTGGCTTTGTCAAGAAGGACCAGATGGGCAAGGTATGGCTG
 PvuII
 CCTGTTTTATGCTCAGTAATAAC

Последовательность нуклеотидов экзона V и фланкирующих областей *Snsa* гена мыши

Зелёный фон: экзон V

Голубой фон: прямой праймер

Жёлтый фон: обратный праймер

Жирный шрифт: CRISPR-Cas9 crRNA и PAM последовательность (подчёркнута)

Красный шрифт: нуклеотиды, подлежащие замене для гуманизации экзона V

TAGATTGGTAACCCATGCATGCACAATGTTTTTCCAGTGGTTTGGTACACTTAGAATCCATCAATAATACAGAAGAAATGCACCTTCTGATAAC
 ACTTCGTGCAGCACTTGAAGATAAGGTGTCTTTTCAAGCTGGTTTTCAGAAGTTAAACACTCTCTTATTGTGCTTTCTCTTCCCTCTCTG
 TAGGCTGAGGAGGGGTACCCACAGGAAGGAATCCTGGAAGACATGCCTGTGGATCCTGACAGTGAGGCTTATGAAATGCCTTCAGAGGTAAT
 G E E G Y P Q E G I L E D M P V D P G S E A Y E M P S E
 GCCTGTATAAAGAAACCTAAGCAAAACACTTTAGGTGTTTAAATTTGGAACACATACCATCAAAACCCCTGCCACTATCAGATCTCTCTCACATT
 ATGCTTGGCATAGTTCAATCAAGAAATATTTTAGAGCAAAATGATTTTAACTTTGTGGGAGAGGTAAGGGATATAGTAGGTCAAAATTAAT

Последовательность нуклеотидов ssODN4 (Alt-R™ HDR Donor одноцепочечный олигонуклеотид для гуманизации экзона V *Snsa* гена)

Курсив: «мисматч» праймер

Красный строчный шрифт: : нуклеотидные замены, приводящие к гуманизации экзона V или создающие новые сайты узнавания рестрикционными эндонуклеазами

AAAACACTCTCTTATTGTGCTTTCTCTTCCCTCTCTG
 TAGAATGAGGAGGGGTACCCACAGGAAGGAATCCTGGAAGACATGCCTGTGGATCCTGACATGAGGCTTATGAAATGCCTTCAGAGGTAAT
 ApaI
 GCCTGTATA

Рисунок 1 – Стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Snsa*

Примечание: для некоторых праймеров и CRISPR-Cas9 crRNA показаны их позиции на приведённой цепи ДНК. Актуальные последовательности приведены в тексте.

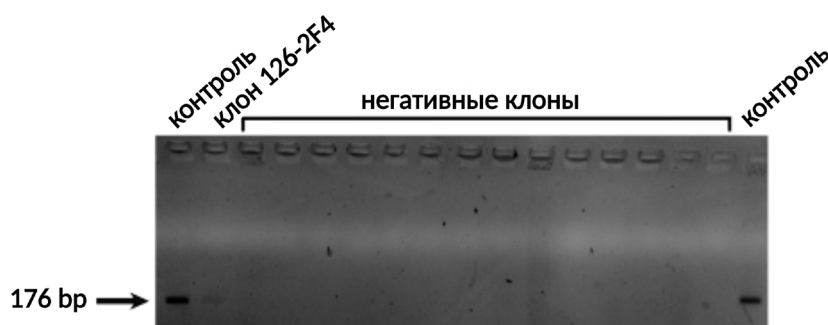


Рисунок 2 – Анализ продуктов ПЦР амплификации ДНК проанализированных клонов после нуклеофекции клеток клона 126 эмбриональных стволовых клеток мыши РНП комплексами

Примечание: амплификация 176- нуклеотидного фрагмента при использовании праймеров *texVfor-out* и *exV-rev-mism* свидетельствует об успешной гомологической рекомбинации и, как следствие, гуманизации экзона V в геноме клеток субклона 126-2-F4. В качестве положительного контроля использовали амплификацию с теми же праймерами матрицы синтетического фрагмента, соответствующего гуманизированному экзону V мыши с фланкирующими последовательностями.

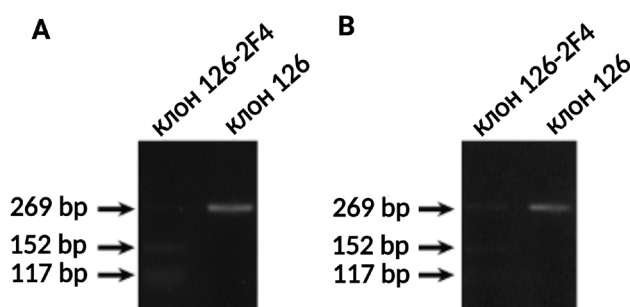


Рисунок 3 – Анализ двух клонов, в которых при первичном скрининге была выявлена гомологическая рекомбинация в экзоне V гена *Snca*, с помощью обработки 269-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации рестрикционной эндонуклеазой *ApaI*

Примечание: полное расщепление этого фрагмента на фрагменты размером 152 и 117 пар нуклеотидов свидетельствует о том, что клон 126-2-F4 является гомозиготным гуманизации экзона V (A), а только частичное расщепление в случае клона 126-3-B6 – о том, что в этом клоне была гуманизирована только одна из двух аллельных копий (B) гена *Snca*.

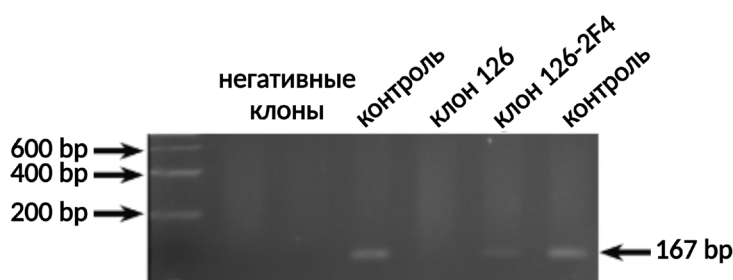


Рисунок 4 – Анализ гуманизации экзона IV в геноме клеток клона 126-2-F4. ДНК материнского клона 126, клон 126-2-F4

Примечание: в качестве положительного контроля использовали амплификацию с теми же праймерами с матрицы синтетического фрагмента, соответствующего гуманизированному экзону IV мыши с фланкирующими последовательностями. Выявление 167-нуклеотидного фрагмента при анализе ДНК клона 126-2-F4 свидетельствует о том, что в геноме клеток этого клона был гуманизирован экзон IV гена *Snca*.

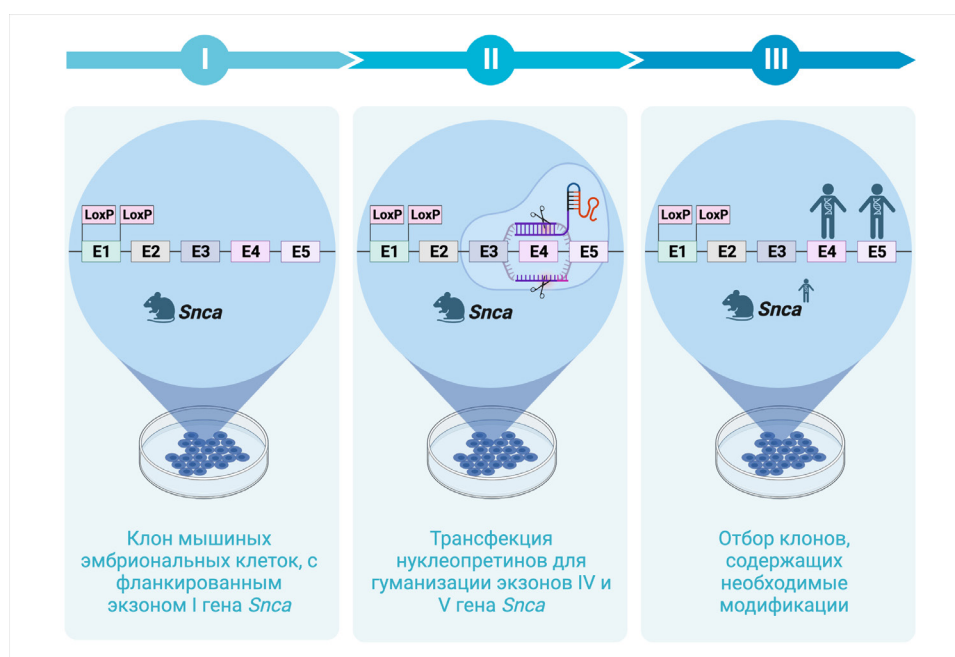


Рисунок 5 – Стратегия создания клона эмбриональных стволовых клеток мыши с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca*

Примечание: I – для создания клона эмбриональных стволовых клеток мыши с кондиционным нокаутом гуманизированного гена *Snca* были взяты клетки с фланкированным LoxP-сайтами первым экзоном *Snca*; II – путем трансфекции CRISPR/Cas9, гидовых РНК и фрагментов экзонов IV и V человеческого *Snca* для гомологичной репарации была произведена гуманизация мышиного гена *Snca*; III – после модификации методами аллель-специфичной ПЦР и рестрикционного анализа был проведен отбор клонов, несущих необходимую модификацию.

Список праймеров, использованных для ПЦР анализа гомологической рекомбинации в *Snca* локусе клеток клона 124 эмбриональных стволовых клеток мыши:

mexIV-for: 5'-GTCTCTGTACACCATCATC-3'
 mexIV-rev: 5'-AGTGTGCATCATGTGCATGC-3'
 exIV-rev-mism: 5'-CAGTaGCAGCAGCTATgc-3'
 mexVfor-out: 5'-CCAGTGGTTTGGTACACTTAG-3'
 mexVfor-ins: 5'-CTGATAACACTTCGTGCAGC-3'
 mexVrev-ins: 5'-TAGTGGCAGGGTTTGTATGG-3'
 mexVrev-out: 5'-CTATGCCAACCATAATGTGAG-3'
 exV-rev-mism: 5'-tGTGGGgcCCCCCTCCTCAtt-3'

РЕЗУЛЬТАТЫ

Первичный скрининг клонов на наличие гуманизированного экзона V

Для анализа на наличие 176-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации при использовании праймеров mexVfor-out и exV-rev-mism после нуклеофекции, были отобраны 162 клон. Два 3'-концевых нуклеотида в exV-rev-mism соответствовали нуклеотидам, присутствующим в экзоне V гена *Snca* человека, в то время как в гене мыши в этих положениях находятся 2 других нуклеотида. Кроме указанных в 5'-концевой части этого праймера, имеются ещё 3 нуклеотида, характерные только для гена человека. Таким образом, продукт амплификации с этим праймером образуется только тогда, когда матрицей является ДНК человека или гуманизированная по этому гену ДНК мыши. Когда

же матрицей является нативная ДНК мыши, никаких продуктов амплификации не образуется. Пример такого анализа продуктов ПЦР амплификации ДНК, выделенной из клеток 15 отобранных клонов, приведён на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, один из 15 клонов, проверенных на наличие 176-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации, дал положительный результат, т.е. в ДНК клеток этого клона произошла гомологическая рекомбинация в экзоне V, что являлось свидетельством того, что в клоне, обозначенном 126-2-F4, в соответствии с его положением в лунке одного из начальных 96-луночных планшетов, этот экзон оказался гуманизированным.

Проверка на гомозиготность модификации в клоне 126-2-F4

ДНК клона 126-2-F4 и материнского клона 126 амплифицировали, используя праймеры mexVfor-ins и mexVrev-ins, соответствующие последовательностям, фланкирующим экзон V мыши. Как и предполагалось, в обоих случаях выявлялся одинаковый продукт амплификации – 269-нуклеотидный фрагмент. Обработка реакционной смеси рестрикционной эндонуклеазой *ApaI* не приводила к расщеплению фрагмента амплифицированного с матрицы ДНК материнского клона 126, т.к. в геноме мыши в анализируемой области отсутствует сайт узнавания этим ферментом. Однако точечные замены, использованные при гуманизации экзона V,

приводили к появлению такого сайта. Фрагмент, амплифицированный с матрицы ДНК клона 126-2-F4 разрезался рестрикционной эндонуклеазой *ApaI* на 152-нуклеотидный и 117-нуклеотидный фрагменты (Рис. 3А). Важно отметить, что при этом оригинальный 269-нуклеотидный фрагмент полностью исчезал, что свидетельствовало о том, что в геноме клеток клона 126-2-F4 гомологическая рекомбинация и, следовательно, гуманизация экзона V произошла в обоих аллелях гена *Snca*. Ещё в одном клоне 126-3-B9, отобранном в первичном скрининге, наблюдалось лишь частичное расщепление 269-нуклеотидного фрагмента рестрикционной эндонуклеазой *ApaI* (Рис. 3Б), что свидетельствовало о том, что в геноме этого клона гомологическая рекомбинация произошла только в одной аллельной копии гена или то, что этот клон произошёл не из одной, а из двух клеток, в геноме одной из которых не произошло редактирование последовательностей ДНК экзона V.

Проверка наличия гуманизированного экзона IV в геноме клеток клона 126-2-F4

ДНК клонов 126-2-F4, материнского клона 126 и двух негативных клонов из описанного выше скрининга амплифицировали, используя праймеры *texIV-for* и *exIV-rev-mism*. В качестве положительного контроля использовали амплификацию с теми же праймерами матрицы синтетического фрагмента, соответствующего гуманизированному экзону IV мыши с фланкирующими последовательностями. Результат анализа продуктов ПЦР амплификации приведён на рисунке 4.

Фрагмент ожидаемого размера (167 пар нуклеотидов) был выявлен только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК клеток клона 126-2-F4, что свидетельствовало о том, что в этом клоне произошла гомологическая рекомбинация и в экзоне IV гена *Snca* мыши. Проверка на гомозиготность модификации этого экзона проводилась по той же схеме, что использовалась для экзона V с применением праймера *texIV-for* и *texIV-rev* и обработку продуктов амплификации рестрикционной эндонуклеазой *PvuII*. Было выявлено, что 280-нуклеотидный фрагмент, продукт ПЦР амплификации ДНК клеток клона 126-2-F4, полностью разрезался этим ферментом на фрагменты размером 164 и 116 пар нуклеотидов (Рис. 4), что свидетельствует о том, что в геноме клеток клона 126-2-F4 гомологическая рекомбинация и, следовательно, гуманизация экзона IV произошла в обоих аллелях гена *Snca*. Как и ожидалось, при отсутствии сайта узнавания *PvuII* в исследуемом фрагменте генома мыши, 280-нуклеотидный продукт ПЦР амплификации ДНК клеток материнского клона 126 не расщеплялся этим ферментом. Частичное расщепление было отмечено для 280-нуклеотидного продукта ПЦР амплификации ДНК клеток клона 126-3-B9, что свидетельствует в пользу сделанного

ранее предположения, что это клон произошёл не из одной, а из двух клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ

В связи с прогрессирующим старением популяции, заболеваемость и распространённость болезни Паркинсона (БП) значительно увеличились и будут продолжать расти – таким образом, это серьёзная медико-социальная проблема. Поиск эффективных терапевтических подходов требует использования оптимальных моделей развития патологического процесса при спорадической форме (~90% случаев) БП. Модели, используемые в настоящее время, не соответствуют этой задаче (не гуманизированы или некорректно гуманизированы, отсутствует возможность регуляции) и не могут быть использованы в экспериментальной нейрофармакологии.

Важнейшая роль α -синуклеина в дегенеративной гибели клеток была показана при целом спектре нейродегенеративных заболеваний. Более того, мутации (A53T и A30P) были одними из первых обнаруженных генетических коррелятов болезни [14, 15]. Эта находка интенсифицировала изучение молекулярных механизмов α -синуклеин-индуцированной нейропатологии. В настоящее время известно, что при патологических условиях α -синуклеин склонен к образованию структур, богатых β -скалками, включая олигомеры, протофибриллы и нерастворимые фибриллы, которые в конечном итоге накапливаются, образуя тельца Леви. Хотя заболевание традиционно связывается с нерастворимыми формами агрегированного α -синуклеина, именно растворимые промежуточные олигомеры характеризуются нейротоксичными эффектами. Было обнаружено, что олигомеры опосредуют aberrантный кальциевый сигналинг, перекисное окисление липидов, оксидативный стресс, митохондриальную дисфункцию и гибель нейронов [16–18]. В *in vivo* исследованиях было продемонстрировано, что формы α -синуклеина, склонные к образованию олигомеров и ингибирующие образование фибрилл, приводят к гибели дофаминергических нейронов. Напротив, формы, образующие фибриллы, не приводят к потере этих нейронов [19].

В целом, молекулярные каскады, связанные с aberrантной функцией α -синуклеина, продолжают оставаться важнейшей темой изучения для современной нейробиологии [20, 21].

В этой связи, нами был предложен и реализован подход к получению генетически-модифицированных мышей, экспрессирующих патологический гуманизированный α -синуклеин. Для получения данной линии мы использовали стратегию создания генетически-модифицированных животных через CRISPR/Cas9-опосредованное редактирование эмбриональных стволовых клеток. Полученный клон стволовых клеток может быть использован

для реинъекции в бластоцисты, которые затем будут трансплантированы мышам реципиентам для вынашивания генетически-измененных эмбрионов.

Описанная в данной работе генетическая модель позволяет проводить исследования, направленные на прецизионную оценку роли патологического α -синуклеина у мышей.

Так, гуманизация экзона IV и V позволит оценить фенотипические эффекты патогенного человеческого α -синуклеина на репрезентативной тест-системе. Кроме того, наличие LoxP-сайтов, фланкирующих первый экзон, позволяют осуществлять пространственный и временной контроль экспрессии гуманизированного *Snca* за счет возможности Cre-индуцированного нокаута гена. Данная особенность позволяет прецизионно изучать эффекты тканеспецифичного нарушения экспрессии белка, предоставляя информацию о его роли в конкретной популяции клеток [22–25]. Более того, возможность индуцирования нокаута во взрослом возрасте позволяет исключить эффект антенатальной адаптации к генетической модификации.

Cre-зависимая индукция нокаута подразумевает, что скрещивание линии, содержащей фланкированный LoxP-сайтами участок гена, с трансгенными животными экспрессирующими Cre-рекомбиназу, приводит к удалению данного участка и утрате функциональной активности гена [18]. На сегодняшний день репертуар Cre-мышей характеризуется огромным разнообразием и отличие между разными штаммами заключается в тканеспецифичности экспрессии рекомбиназы. Более того, существуют линии, в которых проникновение Cre-рекомбиназы в ядро и, соответственно, ее активность зависят от тамоксифена. У данного типа мышей, сайт-специфическая рекомбинация между двумя LoxP-сайтами происходит только после обработки тамоксифеном, что позволяет регулировать экспрессию гена во времени [19].

Параллельно с созданием генетически-модифицированного клона эмбриональных стволовых клеток нашим коллективом также реализуется подход с прямым редактированием мышинных бластоцитов. Иными словами, смесь, содержащая ДНК матрицу для гомологичной рекомбинации, мРНК Cas9 и гидовые РНК была микроинъектирована в оплодотворенные яйцеклетки мышей линии CBA×C57Bl6J. После 24 ч инкубации выжившие эмбрионы были трансплантированы в яйцеводы самок-реципиентов, которые служили

суррогатными матерями для мутантов. В настоящее время, подобным способом уже было получено первичное потомство мутантных мышей, которое проходит генетический анализ на наличие желаемых нуклеотидных замен.

Полученные результаты принципиально важны не только для понимания развития патологического процесса при альфа-синуклеинопатиях, но и, что еще важнее, для разработки новых терапевтических подходов, которые позволят остановить распространение агрегационной патологии человеческого α -синуклеина по нервной системе, и валидации этих подходов в доклинических испытаниях.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования разработана стратегия CRISPR/Cas9-ассистированной гомологической рекомбинации в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши для создания полностью гуманизированного гена *Snca*, кодирующего α -синуклеин и выполнено редактирование генома клон эмбриональных стволовых клеток мыши с использованием CRISPR технологии.

Синтезированы РНК и ДНК олигонуклеотиды, необходимые для создания РНП комплексов, осуществляющих направленную гомологическую рекомбинацию в *Snca* локусе генома мыши.

Скрининг клонов, полученных в результате нуклеофекции клеток материнского клон 126 эмбриональных стволовых клеток мыши созданными РНП комплексами, позволил идентифицировать клон 126-2-F4, отвечающий первичным критериям успешной гуманизации обеих аллелей эндогенного гена *Snca* в геноме эмбриональных стволовых клеток мыши.

Таким образом, разработанный клон клеток может служить для создания линии генетически-модифицированных мышей, служащих тест-системой для патофизиологических и нейрофармакологических исследований, связанных с синуклеинопатиями. При этом до индукции Cre-зависимой рекомбинации данная линия является репрезентативной моделью для исследования биологической роли мутантного *Snca*. В то же время, после Cre-зависимая активация нокаута позволяет имитировать фармакологическое ингибирование α -синуклеина, что представляет особый интерес для прикладных исследований в нейрофармакологии.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование проведено при финансовой поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации (Приложение № 9 к Соглашению о субсидии № 075-15-2021-1346 от 04.10.2021).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Е.А. Патраханов – выделение ДНК, ПЦР-анализ, рестрикционный анализ, написание статьи;
В.М. Покровский – написание статьи, культивирование клеток и нуклеофекция; А.Ю. Карагодина – формализация списка литературы, подготовка графического материала; А.М. Краюшкина – формализация списка литературы, подготовка графического материала; Н.С. Жунусов – ПЦР-анализ, написание статьи;
А.В. Дейкин – консультация по вопросам методологии исследования; М.В. Корокин – консультация по вопросам методологии исследования, дизайн эксперимента; М.В. Покровский – консультация по вопросам методологии исследования, дизайн эксперимента; Алтухова О.Б. – дизайн эксперимента, написание статьи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Checkoway H., Lundin J.I., Kelada S.N. Neurodegenerative diseases // IARC Sci. Publ. – 2011. – P. 407–419.
2. Bougea A. Synuclein in neurodegeneration // Adv. Clin. Chem. – 2021. – Vol. 103. – P. 97–134. DOI: 10.1016/bs.acc.2020.08.007
3. Ozansoy M., Başak A.N. The central theme of Parkinson's disease: α -synuclein // Mol Neurobiol. – 2013. – Vol. 47, No. 2. – P. 460–465. DOI: 10.1007/s12035-012-8369-3
4. George J.M. The synucleins // Genome Biol. – 2002. – Vol. 3, No. 1. – Art. ID: 3002. DOI: 10.1186/gb-2001-3-1-reviews3002
5. Breydo L., Wu J.W., Uversky V.N. A-synuclein misfolding and Parkinson's disease // Biochim. Biophys. Acta. – 2012. – Vol. 1822, No. 2. – P. 261–285. DOI: 10.1016/j.bbdis.2011.10.002
6. Iwai A., Masliah E., Yoshimoto M., Ge N., Flanagan L., de Silva H.A., Kittel A., Saitoh T. The precursor protein of non-A beta component of Alzheimer's disease amyloid is a presynaptic protein of the central nervous system // Neuron. – 1995. – Vol. 14, No. 2. – P. 467–475. DOI: 10.1016/0896-6273(95)90302-x
7. Lee S.J., Jeon H., Kandror K.V. Alpha-synuclein is localized in a subpopulation of rat brain synaptic vesicles // Acta Neurobiol. Exp. (Wars). – 2008. – Vol. 68, No. 4. – P. 509–515.
8. Lashuel H.A., Overk C.R., Oueslati A., Masliah E. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target // Nat. Rev. Neurosci. – 2013. – Vol. 14, No. 1. – P. 38–48. DOI: 10.1038/nrn3406
9. Dalfó E., Ferrer I. Alpha-synuclein binding to rab3a in multiple system atrophy // Neurosci. Lett. – 2005. – Vol. 380, No. 1–2. – P. 170–175. DOI: 10.1016/j.neulet.2005.01.034
10. Burré J., Sharma M., Tssetsenis T., Buchman V., Etherton M.R., Südhof T.C. Alpha-synuclein promotes SNARE-complex assembly *in vivo* and *in vitro* // Science. – 2010. – Vol. 329, No. 5999. – P. 1663–1667. DOI: 10.1126/science.1195227
11. Ninkina N., Connor-Robson N., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Shelkovnikova T.A., Buchman V.L. A novel resource for studying function and dysfunction of α -synuclein: mouse lines for modulation of endogenous Snca gene expression // Sci. Rep. – 2015. – Vol. 5. – Art. ID: 16615. DOI: 10.1038/srep16615
12. Roman A.Y., Limorenko G., Ustyugov A.A., Tarasova T.V., Lysikova E.A., Buchman V.L., Ninkina N. Generation of mouse lines with conditionally or constitutively inactivated Snca gene and Rosa26-stop-lacZ reporter located in cis on the mouse chromosome 6 // Transgenic Res. – 2017. – Vol. 26, No. 2. – P. 301–307. DOI: 10.1007/s11248-016-9995-8
13. Chaprov K.D., Lysikova E.A., Teterina E.V., Buchman V.L. Kinetics of alpha-synuclein depletion in three brain regions following conditional pan-neuronal inactivation of the encoding gene (Snca) by tamoxifen-induced Cre-recombination in adult mice // Transgenic Res. – 2021. – Vol. 30, No. 6. – P. 867–873. DOI: 10.1007/s11248-021-00286-3
14. Krüger R., Kuhn W., Müller T., Voitalla D., Graeber M., Kösel S., Przuntek H., Epplen J.T., Schöls L., Riess O. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease // Nat. Genet. – 1998. – Vol. 18, No. 2. – P. 106–108. DOI: 10.1038/ng0298-106
15. Polymeropoulos M.H., Lavedan C., Leroy E., Ide S.E., Dehejia A., Dutra A., Pike B., Root H., Rubenstein J., Boyer R., Stenroos E.S., Chandrasekharappa S., Athanassiadou A., Papapetropoulos T., Johnson W.G., Lazzarini A.M., Duvoisin R.C., Di Iorio G., Golbe L.I., Nussbaum R.L. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease // Science. – 1997. – Vol. 276, No. 5321. – P. 2045–2047. DOI: 10.1126/science.276.5321.2045
16. Angelova P.R., Choi M.L., Berezhnov A.V., Horrocks M.H., Hughes C.D., De S., Rodrigues M., Yapom R., Little D., Dolt K.S., Kunath T., Devine M.J., Gissen P., Shchepinov M.S., Sylantyev S., Pavlov E.V., Klenerman D., Abramov A.Y., Gandhi S. Alpha synuclein aggregation drives ferroptosis: an interplay of iron, calcium and lipid peroxidation // Cell Death Differ. – 2020. – Vol. 27, No. 10. – P. 2781–2796. DOI: 10.1038/s41418-020-0542-z
17. Angelova P.R., Horrocks M.H., Klenerman D., Gandhi S., Abramov A.Y., Shchepinov M.S. Lipid peroxidation is essential for α -synuclein-induced cell death // J. Neurochem. – 2015. – Vol. 133, No. 4. – P. 582–589. DOI: 10.1111/jnc.13024
18. Choi M.L., Chappard A., Singh B.P., MacLachlan C., Rodrigues M., Fedotova E.I., Berezhnov A.V., De S., Peddie C.J., Athauda D., Viridi G.S., Zhang W., Evans J.R., Wernick A.I., Zanjani Z.S., Angelova P.R., Esteras N., Vinokurov A.Y., Morris K., Jeacock K., Tosatto L., Little D., Gissen P., Clarke D.J., Kunath T., Collinson L., Klenerman D., Abramov A.Y., Horrocks M.H., Gandhi S. Pathological structural conversion of α -synuclein at the mitochondria induces neuronal toxicity // Nat. Neurosci. – 2022. – Vol. 25, No. 9. – P. 1134–1148. DOI: 10.1038/s41593-022-01140-3. Erratum in: Nat. Neurosci. – 2022. – Vol. 25, No. 11. – Art. ID: 1582.
19. Choi M.L., Gandhi S. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases // FEBS J. – 2018. – Vol. 285, No. 19. – P. 3631–3644. DOI: 10.1111/febs.14587
20. Srinivasan E., Chandrasekhar G., Chandrasekar P., Anbarasu K., Vickram A.S., Karunakaran R., Rajasekaran R., Srikumar P.S. Alpha-Synuclein Aggregation in Parkinson's Disease // Front. Med. (Lausanne). – 2021. – Vol. 8. – Art. ID: 736978. DOI: 10.3389/fmed.2021.736978

21. Chaprov K.D., Goloborshcheva V.V., Tarasova T.V., Teterina E.V., Korokin M.V., Soldatov V.O., Pokrovskiy M.V., Kucheryanu V.G., Morozov S.G., Ovchinnikov R.K. Increased Expression of the Multimerin-1 Gene in α -Synuclein Knockout Mice // *Dokl. Biol. Sci.* – 2020. – Vol. 494, No. 1. – P. 260–263. DOI: 10.1134/S0012496620050014
22. Soldatov V.O., Kubekina M.V., Silaeva Yu.Yu., Bruter A.V., Deykin A.V. On the way from SARS-CoV-sensitive mice to murine COVID-19 model // *Research Results in Pharmacology*. – 2022. – Vol. 6, No. 2. – P. 1–7. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.53633
23. Bruter A.V., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Sergiev P.V., Kalinina A.A., Ilchuk L.A., Silaeva Y.Y., Korshunov E.N., Soldatov V.O., Deykin A.V. Novel transgenic mice with Cre-dependent co-expression of GFP and human ACE2: a safe tool for study of COVID-19 pathogenesis. *Transgenic Res.* 2021 Apr 14;30(3):289–301. DOI: 10.1007/s11248-021-00249-8. Epub ahead of print.
24. Кузубова Е.В., Радченко А.И., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Новикова А.А., Степенко Ю.В., Дейкин А.В. Патологические состояния, ассоциированные с белком тау: механизмы развития и возможные биологические мишени для фармакологической коррекции тау-протеинопатии (обзор) // *Научные результаты биомедицинских исследований*. – 2022. – Т. 8, № 4. – С. 474–797. DOI: 10.18413/2658-6533-2022-8-4-0-6
25. Dolyskiy A.A., Gudymo A.S., Taranov O.S., Grishchenko I.V., Shitik E.M., Prokopov D.Y., Soldatov V.O., Sobolevskaya E.V., Bodnev S.A., Danilchenko N.V., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Y., Bulanovich Y.A., Onhonova G.S., Ivleva E.K., Kubekina M.V., Belykh A.E., Tregubchak T.V., Ryzhikov A.B., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Deykin A.V., Yudkin D.V. The Tissue Distribution of SARS-CoV-2 in Transgenic Mice With Inducible Ubiquitous Expression of hACE2 // *Front. Mol. Biosci.* – 2022. – Vol. 8. – Art. ID: 821506. DOI: 10.3389/fmolb.2021.821506

АВТОРЫ

Патраханов Евгений Александрович – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-8415-4562. E-mail: pateval7@mail.ru

Покровский Владимир Михайлович – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-3138-2075. E-mail: vmpokrovsky08@gmail.com

Карагодина Анастасия Юрьевна – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-9440-5866. E-mail: karagodina75@gmail.com

Краюшкина Анастасия Михайловна – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-6830-3820. E-mail: annkrayushkina98@gmail.com

Жунусов Никита Сергеевич – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0002-1969-3615. E-mail: nzhunu@mail.ru

Дейкин Алексей Васильевич – кандидат биологических наук, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-9960-0863. E-mail: deyin@bsu.edu.ru

Корокин Михаил Викторович – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0001-5402-0697. E-mail: mkorokin@mail.ru

Покровский Михаил Владимирович – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-4478-1091. E-mail: mpokrovsky@yandex.ru

Алтухова Оксана Борисовна – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой акушерства и гинекологии медицинского института ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID ID: 0000-0003-4674-8797. E-mail: altuhova_o@bsu.edu.ru

УДК 615.252.349.7:616.379-008.64-092.4



ГИПОГЛИКЕМИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ КОМБИНАЦИИ СИТАГЛИПТИНА С АМИНОГУАНИДИНОМ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, Ю.В. Горбунова, А.В. Стрыгин,
Т.М. Андриашвили, А.А. Соколова, Н.С. Болохов, В.Э. Пустынников, Е.А. Фомичев

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

E-mail: strannik986@mail.ru

Получена 16.09.2022

После рецензирования 15.11.2022

Принята к печати 11.12.2022

Цель. Определить эффективность противодиабетического действия комбинации ситаглиптина с аминугуанидином у крыс с экспериментальным сахарным диабетом.

Материалы и методы. Исследование проведено на крысах-самцах линии Wistar и мышах линии C57BL/KsJ-db/db. Согласно используемым моделям, оно было разделено на 4 серии, в которых формировали аллоксановый, стероид-индуцированный (дексаметазоновый) и стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный сахарный диабет (СД) у крыс. В 4 серии использовали склонных к ожирению мышей линии C57BL/KsJ-db/db. В 1 и 2 сериях лечение начинали профилактически – через 3 ч после введения аллоксана и одновременно с введением дексаметазона; в 3 и 4 сериях лечение проводили после сформировавшейся патологии – через 7 сут после введения стрептозотоцина с никотинамидом и у мышей с ожирением сразу после их распределения по группам. В качестве лечения вводили ситаглиптин (10 мг/кг), аминугуанидин (25 мг/кг) или их комбинацию. Лечение проводили до конца эксперимента, который завершали пероральным тестом на толерантность к глюкозе (ПТТГ) после 4 ч голодания. Полученные данные подвергались статистической обработке.

Результаты. В ходе проведенных экспериментов было установлено, что профилактическое введение комбинации ситаглиптина с аминугуанидином, в отличие от каждого из компонентов, предотвращало развитие аллоксанового СД, а также более эффективно, чем введение только ситаглиптина снижало выраженность стероид-индуцированного СД, что выражалось в значительно более низком уровне гликемии натощак (через 4 ч голодания) и постпрандиальной гликемии (в ходе проведения ПТТГ). В условиях стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД исследуемая комбинация замедляла прогрессирование патологии, а у мышей с ожирением терапевтическое курсовое введение ситаглиптина и его комбинации снижало тяжесть нарушения углеводного обмена (уровень гликемии натощак) и увеличивало скорость утилизации глюкозы.

Заключение. Аминугуанидин как блокатор iNOS усиливал противодиабетическое действие ситаглиптина, предотвращая развитие аллоксанового диабета и уменьшая выраженность стероид-индуцированного СД при профилактическом введении, а при лечебном курсовом введении снижал тяжесть течения стрептозотоцин-никотинамид-индуцированного СД у крыс и СД 2 типа у мышей с предрасположенностью к ожирению.

Ключевые слова: ингибиторы ДПП-4; ситаглиптин; доклинические исследования; сахарный диабет; аллоксан; стрептозотоцин

Список сокращений: eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота; nNOS – нейрональная синтаза оксида азота; NO – оксид азота (II); ГПП-1 – глюкагоноподобный пептид-1; иДПП-4 – ингибиторы дипептидилпептидазы-4; ПТТГ – пероральный тест на толерантность к глюкозе; СД – сахарный диабет; ССД – стероид-индуцированный сахарный диабет.

Для цитирования: Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, Ю.В. Горбунова, А.В. Стрыгин, Т.М. Андриашвили, А.А. Соколова, Н.С. Болохов, В.Э. Пустынников, Е.А. Фомичев. Гипогликемическое действие комбинации ситаглиптина с аминугуанидином при экспериментальном сахарном диабете. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):536-548. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-536-548

© Д.В. Куркин, Д.А. Бакулин, Е.И. Морковин, Ю.В. Горбунова, А.В. Стрыгин, Т.М. Андриашвили, А.А. Соколова, Н.С. Болохов, В.Э. Пустынников, Е.А. Фомичев, 2022

For citation: D.V. Kurkin, D.A. Bakulin, E.I. Morkovin, Yu.V. Gorbunova, A.V. Strygin, T.M. Andriashvili, A.A. Sokolova, N.S. Bolokhov, V.E. Pustynnikov, E.A. Fomichev. Hypoglycemic effect of sitagliptin and aminoguanidine combination in experimental diabetes mellitus. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6):536-548. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-536-548

HYPOGLYCEMIC EFFECT OF SITAGLIPTIN AND AMINO GUANIDINE COMBINATION IN EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

D.V. Kurkin, D.A. Bakulin, E.I. Morkovin, Yu.V. Gorbunova, A.V. Strygin,
T.M. Andriashvili, A.A. Sokolova, N.S. Bolokhov, V.E. Pustynnikov, E.A. Fomichev

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

E-mail: strannik986@mail.ru

Received 16 Sep 2022

After peer review 15 Nov 2022

Accepted 11 Dec 2022

The aim of the work was to determine the antidiabetic effect of a sitagliptin and aminoguanidine combination in rats with experimental diabetes mellitus.

Materials and methods. The study was carried out on male Wistar rats and C57BL/KsJ-db/db mice. According to the models used, it was divided into 4 series, in which alloxan, steroid-induced (dexamethasone) and streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes mellitus (DM) were formed, respectively, in rats, and in the 4 series, obese C57BL/KsJ-db/db mice were used. In the 1 and 2 series, the treatment was started prophylactically – 3 h after the alloxan administration and simultaneously with the dexamethasone administration, in the 3rd and 4th series, the treatment was carried out after the pathology had developed – 7 days after the streptozotocin with nicotinamide administration, and in the obese mice – immediately after their distribution according to the groups. The treatment was carried out with sitagliptin (10 mg/kg), aminoguanidine (25 mg/kg), or a combination thereof. The treatment was continued till the end of the experiment, which was completed with an oral glucose tolerance test (OGTT) after 4 h of fasting. The obtained data were subjected to statistical processing.

Results. In the course of the experiments, it was found out that the prophylactic administration of a sitagliptin and aminoguanidine combination, unlike each of the components, prevented the development of alloxan DM. More effectively than the administration of sitagliptin alone, it reduced the severity of steroid-induced DM, which was expressed in a significantly lower level of fasting glycemia (after 4 h of fasting) and postprandial glycemia (during OGTT). Under the conditions of streptozotocin-nicotinamide-induced DM, the studied combination slowed down the progression of the pathology, and in the obese mice, the course therapeutic administration of sitagliptin and its combination reduced the severity of carbohydrate metabolism disorders (fasting glycemia) and increased the rate of glucose utilization.

Conclusion. As an iNOS blocker, aminoguanidine enhances the antidiabetic effect of sitagliptin, preventing the development of alloxan diabetes and reducing the severity of steroid-induced DM when administered prophylactically. When administered therapeutically, it reduces the severity of streptozotocin-nicotinamide-induced DM in rats and type 2 DM in mice with a predisposition to obesity.

Keywords: DPP-4 inhibitors; sitagliptin; preclinical studies; diabetes; alloxan; streptozotocin

Abbreviations: eNOS – endothelial nitric oxide synthase; iNOS – inducible nitric oxide synthase; nNOS – neuronal nitric oxide synthase; NO – nitric oxide (II); GLP-1 – glucagon-like peptide-1; DPP-4 inhibitors – inhibitors of dipeptidyl peptidase-4; OGTT – oral glucose tolerance test; DM – diabetes mellitus; SDM – steroid-induced diabetes mellitus.

ВВЕДЕНИЕ

Количество зарегистрированных в России пациентов с сахарным диабетом (СД) на начало 2021 г. составляло почти 4,8 млн человек [1]. При этом в мире по оценкам Международной диабетической федерации (IDF) эта цифра превысила 536 млн человек в 2021 г. (диагностированные и недиагностированные случаи) и по ее прогнозам к 2045 г. это число увеличится на 46%, достигнув 783,2 млн человек [2]. Низкая доступность современных гипогликемических лекарственных средств существенно ограничивает эффективность эндокринологической службы и медико-социальных мер, направленных на сдерживание СД и родственных ему заболеваний. Современные рекомендации по терапии СД указывают на целесообразность раннего начала лечения с использованием рациональных комбинаций препаратов, а также отмечают важность профилактики сосудистых осложнений СД [3, 4].

Стероид-индуцированный сахарный диабет (ССД) также распространенная и потенциально опасная проблема в клинической практике, затрагивающая почти все медицинские специальности, однако обнаружить её в клинических условиях очень трудно. Глюкокортикоиды широко используются как сильнодействующие противовоспалительные и иммунодепрессивные препараты для лечения широкого спектра заболеваний. Однако они также связаны с рядом побочных эффектов, включая впервые возникшую гипергликемию у пациентов без СД в анамнезе или тяжелую неконтролируемую гипергликемию у пациентов с диагностированным СД [5]. Механизм развития ССД включает снижение чувствительности к инсулину (соответственно утилизации глюкозы) в тканях-мишенях с последующим усилением катаболических процессов (протеолиза и липолиза) и повышением продукции глюкозы печенью (вследствие

стимуляции глюконеогенеза и гликогенолиза), а также подавление синтеза инсулина, в том числе из-за прямого повреждающего эффекта стероидов на β -клетки поджелудочной железы [5].

В настоящее время научно обоснованные и надежно апробированные методы предупреждения и профилактики ССД малочисленны. Как и в случае других видов СД, применяются принципы раннего выявления и модификации факторов риска. Скрининг на ССД следует проводить у всех пациентов, получающих средние и высокие дозы глюкокортикоидов. Проблемы в лечении ССД связаны с большими колебаниями постпрандиальной гипергликемии и отсутствием четких протоколов лечения. Наряду с изменением образа жизни показаны гипогликемические препараты с инсулин-сенситизирующим действием [6, 7]. Тем не менее, инсулинотерапия часто неизбежна, поэтому инсулин можно считать препаратом выбора. При лечении ССД следует учитывать степень и характер гипергликемии, а также тип, дозу и режим приема глюкокортикоидов. Кроме того, важно проинструктировать пациента и/или его семью о том, как выполнять необходимые регулировки. Для ответа на оставшиеся вопросы, касающиеся ССД, необходимы проспективные исследования. Считается, что гипергликемия, возникшая на фоне применения глюкокортикоидов, проходит после их отмены, но это не всегда подтверждается на практике. Обратная ситуация возникает чаще, особенно у лиц с наличием факторов риска в виде ожирения или преддиабета, что подтверждается данными пациентов, перенесших COVID-19 [8].

Ингибиторы дипептидилпептидазы-4 (ИДПП-4) обладают умеренной гипогликемической активностью и часто используются для создания рациональных комбинаций гипогликемических препаратов. Препараты этой фармакотерапевтической группы разрабатываются уже на протяжении более, чем 30 лет в том числе ведущими фармацевтическими компаниями по всему миру [9]. Отличительной особенностью препаратов с инкретиновой активностью, к которым относятся ИДПП-4, является ряд плеiotропных эффектов, связанных со снижением риска развития сердечно-сосудистых осложнений СД [10]. В России ИДПП-4 активно используются при комбинированной терапии СД. Характеристики отечественного рынка ИДПП-4 обобщены на рисунке 1.

Аминогуанидин является ингибитором синтеза оксида азота с высокой (в 50 раз) специфичностью в отношении её индуцибельной изоформы (iNOS), а также ингибитором образования конечных продуктов гликирования [11]. В экспериментальных условиях введение аминогуанидина задерживало формирование аутоиммунного СД, скорость образования бляшек в условиях диеты с избытком холестерина и улучшало течение аллоксанового

СД [12–14]. Результаты ряда исследований свидетельствуют в пользу существенной роли оксида азота в развитии аутоиммунного диабета, также указывает на целесообразность использования селективных ингибиторов iNOS для ослабления болезненных состояний, связанных с его экспрессией и повышенной продукцией оксида азота [13–15]. Оксид азота может рассматриваться в качестве одной из мишеней для терапии СД и его осложнений, поскольку доказана его роль в модуляции секреции инсулина и его сигнальных путей [16]. Внимание многих исследователей сосредоточено на изучении роли iNOS в патогенезе многих заболеваний, в том числе на формировании инсулинорезистентности и гибели β -клеток при СД. Известно, что этот фермент может быть индуцирован многими воспалительными цитокинами, повышенная экспрессия которых сопровождает СД и ожирение [14, 15, 18].

В рамках поиска средств профилактики сосудистых осложнений СД аминогуанидин ранее исследовался в качестве антигликирующего агента и препарата для лечения диабетической нефропатии [19]. Однако клинические испытания аминогуанидина были прекращены на III фазе из-за соображений безопасности и недостаточной эффективности. Тем не менее, терапевтический потенциал аминогуанидина представляет интерес в рамках разработки новых патогенетических подходов для лечения СД и его осложнений путем создания рациональных комбинаций. Для этого целесообразно изучить потенциал комбинации средств с инкретиновой активностью, улучшающего функцию β -клеток и ингибитора iNOS аминогуанидина, который способен снизить аутоагрессию иммунной системы в отношении β -клеток при СД, а также обладающий свойствами антигликирующего агента.

ЦЕЛЬ. Изучить гипогликемическое действие комбинации ситаглиптина с аминогуанидином в условиях различных моделей экспериментального сахарного диабета.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Модельные объекты

Все эксперименты были выполнены в соответствии с законодательством Российской Федерации и техническими стандартами Евразийского экономического союза по надлежащей лабораторной практике (ГОСТ Р 53434-2009, ГОСТ Р 51000.4-2011). Дизайн исследования одобрен Региональным независимым этическим комитетом, регистрационный номер: ИРБ 00005839 IORG 0004900 (ONHR), о чем свидетельствует выписка из протокола № 132 от 20 мая 2019 г. заседания комиссии по экспертизе исследования этического комитета при ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Работу выполняли на 150 самцах крыс линии Wistar (возраст 6 мес, масса тела 300–350 г, ПЛЖ

«Рапполово»), и 40 самцах мышей линии C57BL/KsJ-db/db (возраст 4–5 мес, масса тела 50–60 г), для которых характерно выраженное ожирение и спонтанно развивающийся тяжёлый СД, вызывающий по мере прогрессирования некроз β -клеток, нефро-, нейро-, ретинопатию и другие осложнения. Мыши данной линии несут аутомно-рецессивную мутацию в гене рецептора лептина (8-я группа сцепления, 4-я хромосома), в гомозиготном состоянии вызывающую гиперлептемию, гиперинсулинемию, дислипидемию, гипергликемию, ожирение и диабет, который при этом сложно корректировать препаратами из группы иДПП-4 в монотерапии [20]. В качестве контрольных использовали 10 мышей линии C57BL/KsJ-db+/+m (ген *m* – *misty*, рецессивный, осветляющий окраску маркер оппозитивной хромосомы, не несущий гена *db*), без ожирения и без диабета (возраст 4–5 мес, масса тела 20–25 г) [21, 22]. Всех мышей получали из питомника лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. После поступления из питомника животных помещали на карантин длительностью 14 сут в виварий ВолгГМУ, в помещении которого они содержались на протяжении всего эксперимента при $20 \pm 2^\circ\text{C}$ в условиях 40–60% влажности в условиях сменяющегося цикла день/ночь (12/12 ч) с неограниченным доступом к корму и воде.

Моделирование патологии

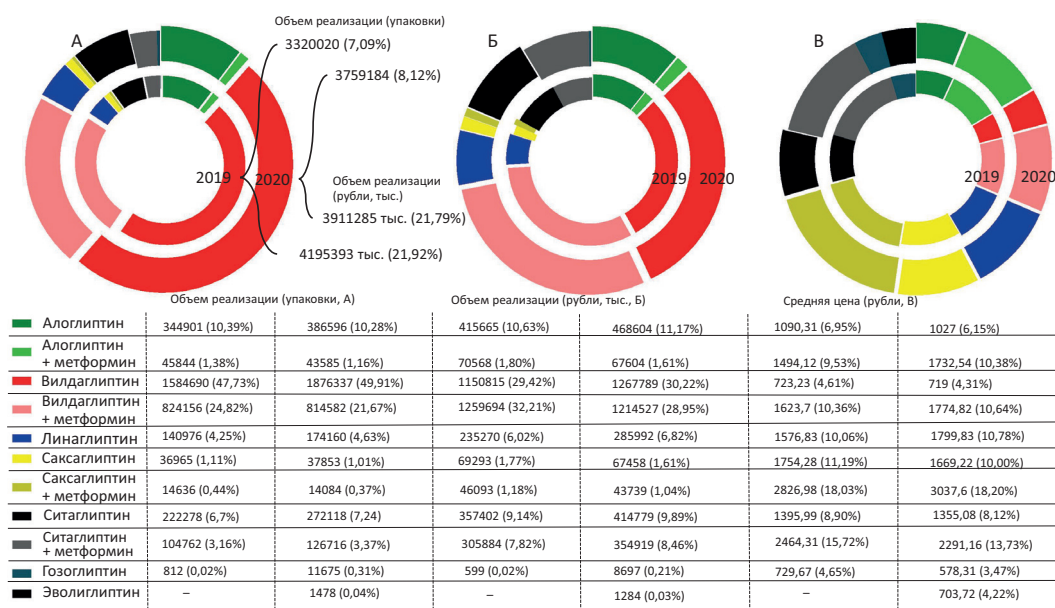
У крыс нарушение углеводного обмена вызывали многократным внутрибрюшинным введением дексаметазона (раствор для инъекций 4 мг/мл; КРКА, Словения) в дозе 20 мг/кг/сут (в течение 7 дней) или однократным внутрибрюшинным введением аллоксана (130 мг/кг; Sigma-Aldrich, США) [23] или стрептозотоцина (65 мг/кг; через 15 мин после 230 мг/кг никотинамида; Sigma-Aldrich, США) [24]. Аллоксан и стрептозотцин вводили животным после 36 ч голодания, которое обеспечивает лучшую воспроизводимость данных моделей из-за снижения уровня гликемии к нижней границе референсного диапазона и уменьшения вариабельности её уровня между животными [24]. Механизм диабетогенного действия этих веществ схематично отображен на рисунке 2. Аллоксан и стрептозотцин благодаря способности избирательно взаимодействовать с переносчиком глюкозы GLUT2 накапливаются в β -клетках поджелудочной железы и оказывают селективное для них, но разное по механизму, цитотоксическое действие. Введение аллоксана приводит к развитию оксидативного стресса и последующей гибели бета-клеток, и вызывает состояние выраженной гипергликемии, которое может соответствовать СД 1 типа. При этом возможно поражение клеток печени и почек из-за незначительной экспрессии GLUT2. Цитостатический эффект стрептозотоцина развивается в

результате алкилирования нуклеиновых кислот и повышения генерации активных форм кислорода. Алкилирование ДНК приводит к ошибкам в репарации, которые, накапливаясь, влекут за собой гибель клетки через активацию механизмов апоптоза. При этом совместное со стрептозотоцином введение никотинамида позволяет снизить активность PARP-1, что, в свою очередь, снижает активность SOS-репарации и несколько уменьшает интенсивность процессов апоптоза. Введение стрептозотоцина и никотинамида в определенных дозах (и в определенных соотношениях) позволяет добиться частичного снижения β -клеточной массы с развитием состояния умеренной гипергликемии которое может соответствовать одной из форм СД 2 типа, характеризующейся нарушением секреции инсулина без инсулинорезистентности [25].

Дизайн исследования

Общий дизайн исследования представлен ниже на рисунке 3. Исследование выполняли в 4 серии: в первой лечение начинали через 3 ч после введения аллоксана, во второй – одновременно с первой инъекцией дексаметазона, в третьей – через 7 сут после введения стрептозотоцина, а в четвертой – после прохождения карантина и распределения на группы. В качестве лечения вводили ситаглиптин (Янвувия, 10 мг/кг/сут, *per os*) или аминугуанидин (Sigma, 25 мг/кг/сут, в/б) или их комбинацию (доза, режим и путь введения для каждого препарата сохранялся). В 1 и 2 сериях, в которых лечение начинали до развития патологии, животных распределяли на группы случайным образом перед введением исследуемых препаратов. В 3 серии (стрептозотцин-никотинамид индуцированный СД) и в 4 серии (мыши с ожирением) у животных со сформированной патологией предварительно измеряли уровень гликемии. Рандомизации в экспериментальные группы подлежали крысы и мыши с уровнем гликемии натощак более 11 ммоль/л. Лечение начинали сразу после разделения по группам. Эффективность терапии оценивали путем измерения концентрации глюкозы (глюкометр Контур ТС, Bayer, Германия) в крови после 4 ч голодания и/или при проведении перорального теста на толерантность к глюкозе (ПТТГ). Для этого теста регистрировали уровень гликемии до, а также через 60 и 120 мин после перорального введения водного 40% раствора глюкозы в дозе 4 г/кг с последующим расчётом площади под кривой зависимости «уровень гликемии – время» (AUC_{0-120}).

В каждой серии исследования животных разделяли на равные ($n=10$) группы: интактная, диабет + плацебо (0,9% раствор NaCl) – «Плацебо», диабет + ситаглиптин – «Сит», диабет + аминугуанидин – «Амг», диабет + ситаглиптин + аминугуанидин – «Сит + Амг». Дозы веществ подбирали с учетом литературных данных [19, 26].

Рисунок 1 – Некоторые показатели отечественного рынка ИДПП-4 (по данным DSM Group)¹

Примечание: данные представлены в российских рублях, на 1 августа 2022 г. 1 доллар США (USD) соответствовал 61,3 российским рублям (RUB).

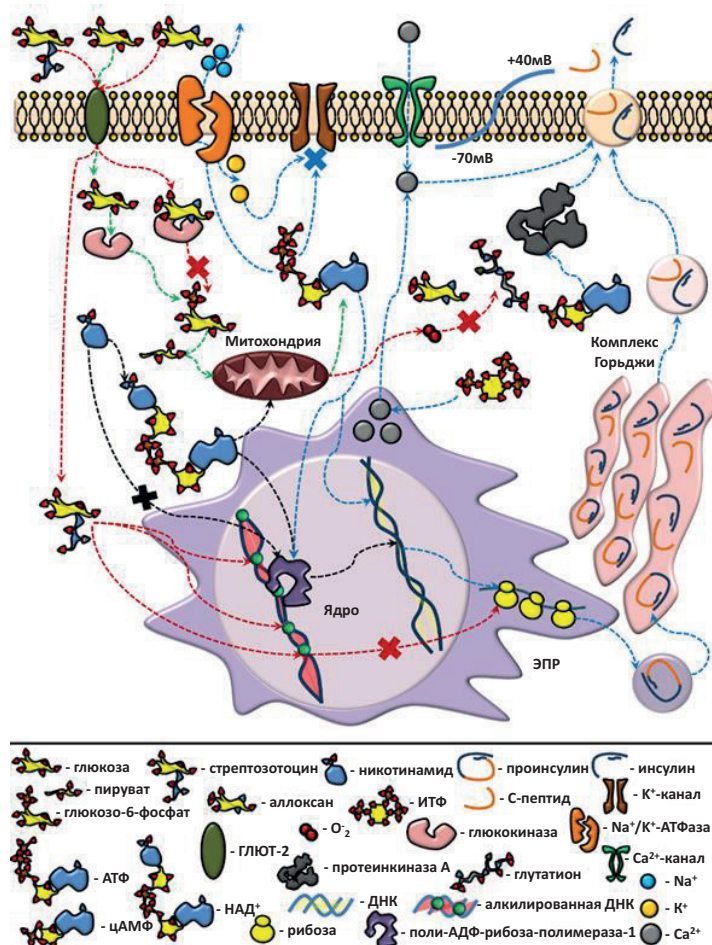
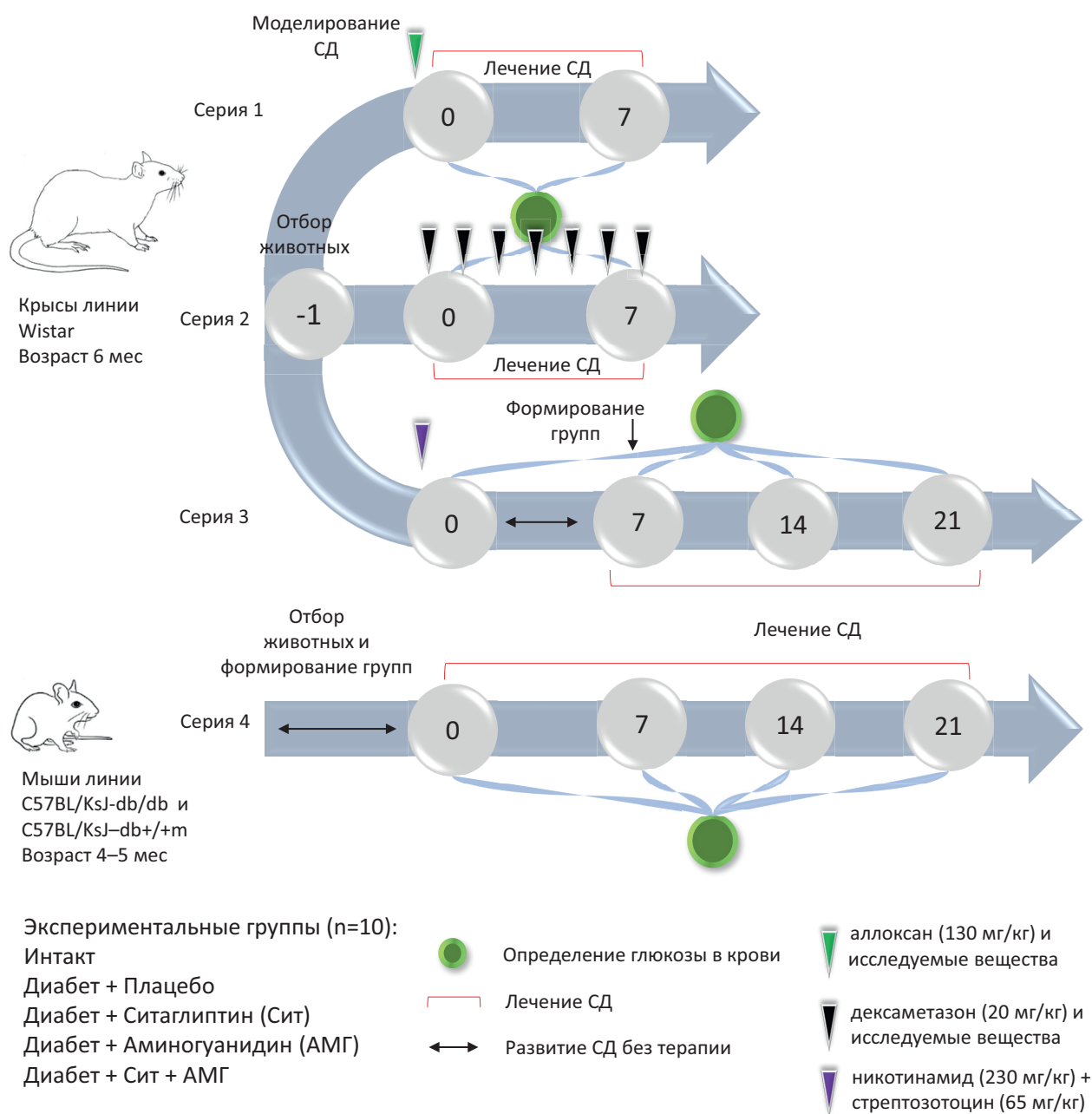


Рисунок 2 – Механизм диабетогенного действия стрептозотозина и аллоксана, адаптировано из [25]

Примечание: АДФ – аденозиндифосфат; АТФ – аденозинтрифосфат; ГЛЮТ-2 – глюкозный транспортер тип 2; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ИТФ – инозитол 1,4,5-трифосфат; мВ – милливольт; НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид (окисленный); цАМФ – циклический аденозинмонофосфат; ЭПР – эндоплазматический ретикулум.

¹ Данные были официально приобретены у компании DSM Group, на их основе произведены расчёты и представлены диаграммы.

**Рисунок 3 – Дизайн исследования**

Примечание: АМГ – аминогуанидин; СД – сахарный диабет; Сит – ситаглиптин.

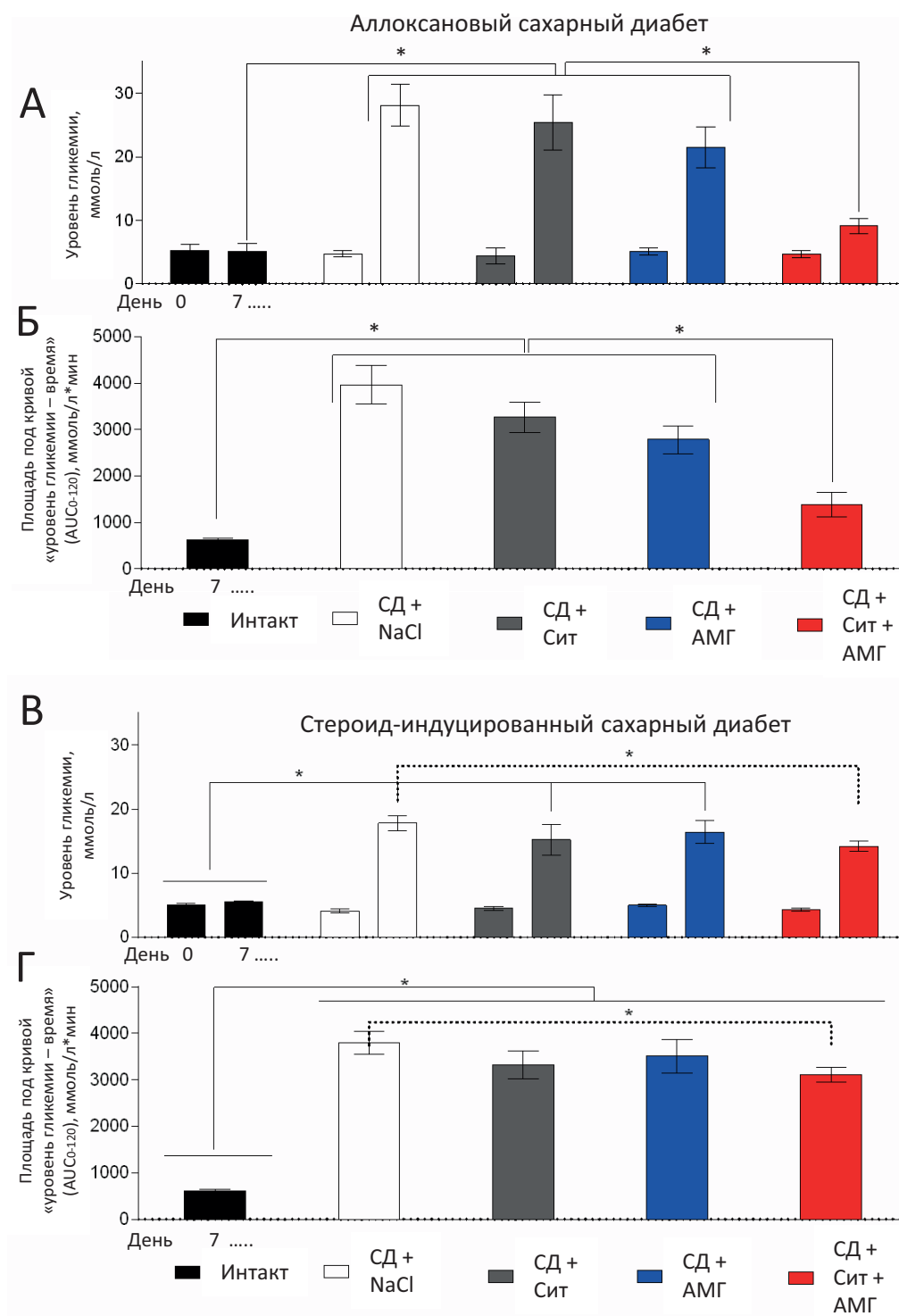


Рисунок 4 – Влияние ситаглиптина, амингуанидина и их комбинации при профилактическом введении крысам с аллоксановым (А, Б) и стероид-индуцированным (В, Г) СД на уровень глюкозы в крови натощак (ммоль/л; А, В) и её утилизацию при пероральном тесте на толерантность к глюкозе (AUC_{0-120} , ммоль/л*мин; Б, Г)

Примечание: А – первый столбик – значения до моделирования СД (аллоксан, день 0), второй – после лечения (день 7); Б – площадь под кривой «уровень гликемии – время» (AUC_{0-120}) через 7 дней после лечения СД, вызванного введением аллоксана; В – первый столбик – значения до моделирования СД (дексаметазон, день 0), второй – после лечения (день 7); Г – AUC_{0-120} через 7 дней после лечения СД, вызванного введением дексаметазона; * – $p < 0,05$ однофакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Ньюмена-Кейлса; сравниваемые выборки обозначены линиями.

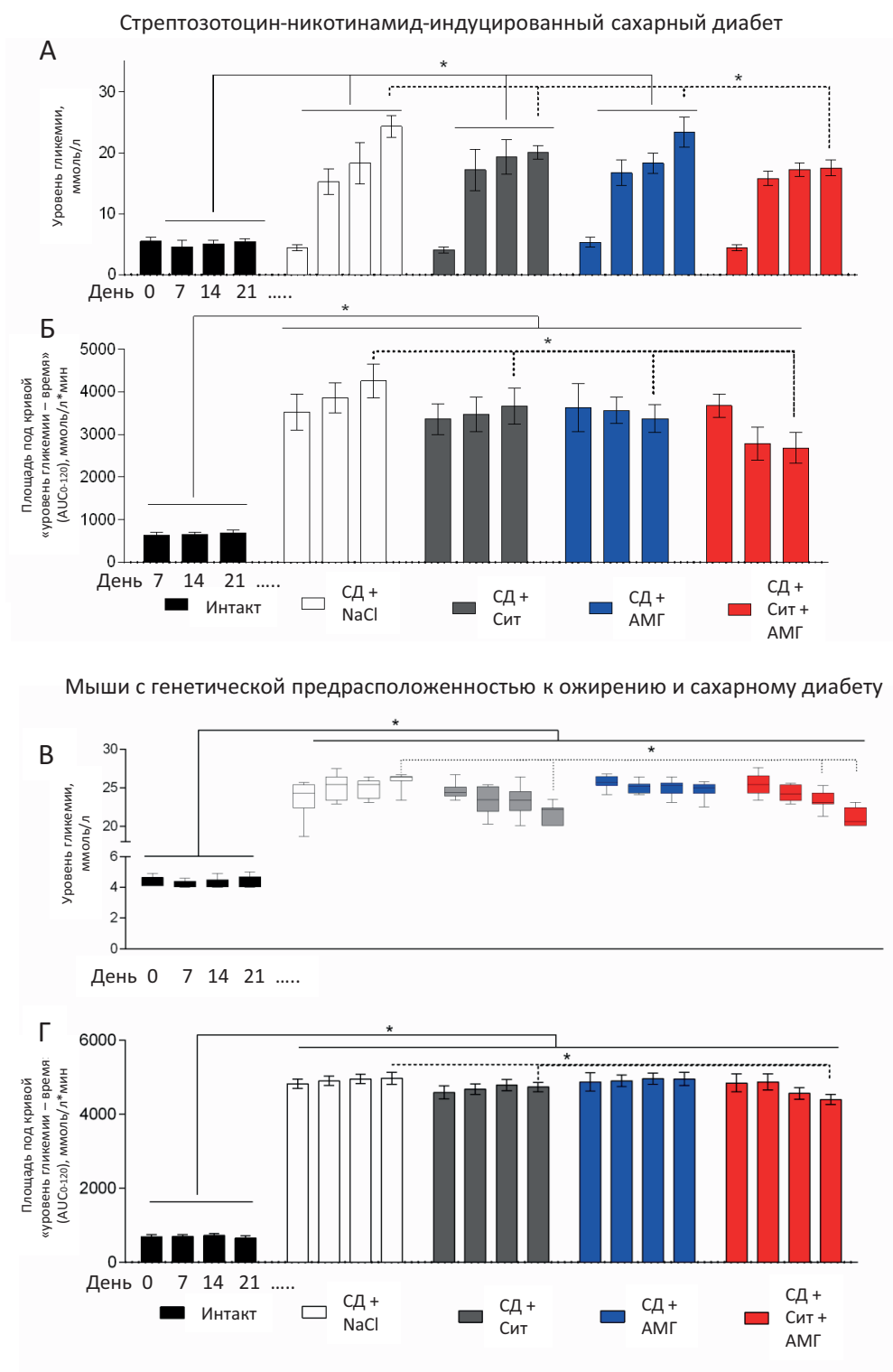


Рисунок 5 – Влияние ситаглиптина, амингуанидина и их комбинации при лечебном введении крысам со стрептозотоцин-никотинамид-индуцированным СД (А, Б) и у мышей линии C57BL/KsJ-db/db с генетической предрасположенностью к СД (В, Г) на уровень глюкозы в крови натощак (ммоль/л; А, В) и её утилизацию при пероральном тесте на толерантность к глюкозе (AUC₀₋₁₂₀, ммоль/л*мин; Б, Г) до и после лечения

Примечание: А – первый столбик – значения до моделирования СД (стрептозотоцин, день 0), второй – до лечения (день 7), третий и четвертый соответственно после лечения; Б – первый столбик – до лечения (день 7), второй, третий столбик – AUC₀₋₁₂₀ соответственно после лечения; В – первый столбик – значения до лечения (день 0), второй, третий и четвертый – соответственно через 7, 14 и 21 день после лечения; Г – первый столбик – значения до лечения (день 0), второй, третий и четвертый – соответственно через 7, 14 и 21 день после лечения; * – $p < 0,05$ однофакторный дисперсионный анализ с пост-тестом Ньюмена-Кейлса; сравниваемые выборки обозначены линиями.

Статистическая обработка

Статистическую обработку полученных результатов проводили методами описательной и аналитической статистики с применением программного обеспечения Prism 6 (GraphPad Software Inc., США). Распределение количественных показателей оценивали с использованием критерия Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия оценивали при помощи однофакторного дисперсионного анализа с пост-тестом Ньюмена-Кейлса. Различия признавались значимыми при $p < 0,05$. Цифровые значения представляли в виде гистограмм с использованием среднего арифметического и стандартной ошибки среднего арифметического ($M \pm SD$), а также в виде диаграмм размаха с указанием медианы, 25-го и 75-го процентиля.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Введение аллоксана вызывает выраженное токсическое действие в отношении β -клеток поджелудочной железы: через 7 дней после введения у животных, которым одновременно с аллоксаном вводили физиологический раствор (плацебо), концентрация глюкозы в крови была максимальной и составила $28,1 \pm 3,3$ ммоль/л (скорость утилизации глюкозы при проведении ПТТГ в данной группе была минимальной; Рис. 4А и Б). Это свидетельствует о выраженном нарушении углеводного обмена вследствие деструкции β -клеток поджелудочной железы.

Одновременное с аллоксаном введение ситаглиптина или аминуганидина существенно не влияло на тяжесть возникающих нарушений метаболизма глюкозы, уровень гипергликемии у животных составлял $25,4 \pm 4,3$ ммоль/л или $21,5 \pm 3,2$ ммоль/л соответственно. Совместное введение ситаглиптина и аминуганидина оказывало выраженное протективное действие, поскольку у животных этой группы концентрация глюкозы составляла $9,1 \pm 1,2$ ммоль/л (скорость утилизации глюкозы при ПТТГ также была значительно выше, чем у животных других групп, $p < 0,05$; Рис. 4А и Б). Таким образом, профилактическое введение комбинации ситаглиптина (идПП-4) с аминуганидином (ингибитора iNOS) предотвратило развитие аллоксанового СД. Это может быть следствием сочетания протективного действия инкретинов и ингибирующего действия аминуганидина в отношении iNOS: фермента, который, вызывая секрецию большого количества NO, значительно усиливает апоптоз и соответственно потенцирует цитотоксическое действие аллоксана, а соответственно его блокада препятствует возникновению оксидативного стресса и снижает повреждение β -клеток поджелудочной железы.

В отличие от механизма развития СД после применения аллоксана курсовое введение глюкокортикостероидов вызывает усиление

катаболических процессов в тканях-мишенях инсулина, а также снижение функции и гибель β -клеток. В зависимости от длительности введения, исходного состояния углеводного обмена и других индивидуальных особенностей глюкокортикостероиды могут вызвать незначительные обратимые изменения, так и стойкие и прогрессирующие нарушения углеводного обмена [5]. В проведенном исследовании курсовое введение дексаметазона приводило к развитию выраженной гипергликемии (Рис. 4В и Г). У животных, которым одновременно с дексаметазоном вводили ситаглиптин ($15,2 \pm 2,4$ ммоль/л), аминуганидин (в меньшей степени, $16,4 \pm 1,8$ ммоль/л) или их комбинацию (в большей степени, $14,2 \pm 0,8$ ммоль/л, $p < 0,05$) концентрация глюкозы в крови была значительно ниже, чем у тех, которым вводили дексаметазон и плацебо ($17,8 \pm 1,2$ ммоль/л).

Подобно аллоксану, введение стрептозотоцина с никотинамидом вызывало меньшие, но в то же время выраженные нарушения метаболизма глюкозы вследствие неполного поражения β -клеточной массы, что предпочтительнее при проведении исследований продолжительностью более 14 сут ввиду меньшего общесоматического истощения животных. В данной серии экспериментов исследуемые вещества животным вводили, начиная с 7 сут после стрептозотоцина. У животных, которым вводили физиологический раствор (плацебо), концентрация глюкозы увеличилась с $15,2 \pm 2,1$ (7 сут) до $24,3 \pm 1,8$ ммоль/л (21 сут), что свидетельствует о прогрессирующей деструкции β -клеток поджелудочной железы (Рис. 5А и 5Б). У животных, которым после стрептозотоцина в течение 14 дней вводили ситаглиптин или аминуганидин концентрация глюкозы увеличивалась с $17,2 \pm 3,4$ и $16,7 \pm 2,1$ ммоль/л до $20,1 \pm 1,1$ и $23,4 \pm 2,5$ ммоль/л, соответственно. Минимальная прогрессия гипергликемии отмечена у животных, которым в течение 14 сут вводили комбинацию ситаглиптина и аминуганидина (с $15,8 \pm 1,2$ до $17,5 \pm 1,3$ ммоль/л, $p < 0,05$), что также может быть следствием блокирования iNOS и снижения количества факторов, способствующих апоптозу.

Мыши, на которых проводили последнюю серию исследований при содержании на стандартной диете, характеризовались крайне высокими значениями гипергликемии (Рис. 5В и 5Г), что, вероятно, является особенностью данной модели СД. Введение животным ситаглиптина, аминуганидина или их комбинации оказывало умеренное гипогликемическое действие: уровни гликемии у мышей, которым в течение 3 недель вводили перечисленные лекарственные средства составлял $21,6 \pm 1,2$ ммоль/л, $24,7 \pm 0,9$ ммоль/л, $21,1 \pm 1,2$ ммоль/л соответственно, в то время как у животных, получавших плацебо, концентрация глюкозы в крови составляла $26 \pm 0,96$ ммоль/л.

ОБСУЖДЕНИЕ

Островок Лангенгарса состоит из приблизительно 1000 β -клеток, которые содержат от 10 до 13 тыс. гранул с 10^6 молекулами инсулина в каждой. В клетках поджелудочной железы экспрессируются все изоформы NOS. Продукция оксида азота индуцибельной синтазой (iNOS) значительно превышает таковую у остальных изоформ. Более того, экспрессия iNOS увеличивается при высоких концентрациях (≥ 10 mM) глюкозы в цитоплазме. Оксид азота участвует в ранней фазе секреции инсулина, увеличивает уровень циклического гуанозинмонофосфата и внутриклеточного Ca^{2+} , способствует синтезу инсулина, стимулирует активность промотора гена инсулина и его экспрессию, усиливает кровоток в поджелудочной железе и препятствует апоптозу посредством S-нитрозилирования, модулирует динамическую ассоциацию глюкокиназы с секреторными гранулами, что, в совокупности, способствует секреции инсулина. Помимо протективного действия, NO в высоких концентрациях, создаваемых в основном iNOS, оказывает выраженное негативное действие в отношении многих систем организма, в том числе и в отношении инсулярного аппарата. Физиологические (создаваемые nNOS или eNOS) концентрации NO вызывают позитивные эффекты, которые прекращают функционировать при активации iNOS и слишком высокой продукции NO, что способствует дисфункции островков. В ответ на воспалительные стимулы клетки поджелудочной железы увеличивают экспрессию iNOS, что сопровождается повышением концентрации NO до цитотоксических уровней, вызывающих повреждение, дисфункцию и гибель β -клеток, что имеет важное значение в возникновении и прогрессировании СД. Подавление iNOS оказывает протективное действие в отношении клеток поджелудочной железы, которые считаются особо чувствительными к повреждению свободными радикалами различного происхождения из-за низкого уровня ферментов антиоксидантной системы – супероксиддисмутазы, каталазы и глутатионпероксидазы [16–18].

Регуляция активности индуцибельной NOS осуществляется на всех этапах экспрессии, включая стабильность белка, и в значительной степени зависит от функционального состояния клетки. С учетом токсичности избытка NO блокада iNOS в условиях воспаления является перспективным экспериментальным подходом для управления целым рядом патологических процессов. Для различных заболеваний предпринималось множество попыток к нормализации активности NOS: блокирование продукции АФК в восходящем направлении, введение BH4, введение фолиевой кислоты для рециркуляции BH2 в BH4, ингибиторов аргиназы, ресвератрола, кальция добезилата, кавноксина, усилителей транскрипции NOS (AVE3085 и AVE9488), L-аргинина, блокаторов и активаторов различных NOS [11].

Метаболическая защита β -клеток поджелудочной железы является перспективным обоснованным подходом к терапии СД и снижения его осложнений. Комбинирование нескольких лекарственных средств, обладающих разнонаправленными эффектами и, соответственно, воздействующими на различные патогенетические механизмы представляет собой перспективный подход к разработке современных лекарственных средств. С этой позиции аминоксидин (ингибитор iNOS и ингибитор образования конечных продуктов гликирования [19]) и ситаглиптин (повышающий уровень эндогенных инкретинов, оказывающих защитное действие на β -клетки [27]) являются обоснованными кандидатами для создания комбинированного противодиабетического препарата, способного защитить β -клетки и замедлить прогрессирование СД различной этиологии.

В данном исследовании была предпринята попытка оценить противодиабетическое действие комбинации распространенного препарата ситаглиптин и средства, проявляющего выраженное ингибирующее iNOS действие. Используемые в работе модели характеризуются различным механизмом индукции углеводных нарушений: полная или частичная гибель β -клеток из-за специфического токсина, формирование стероид-индуцированного СД и генетическая модель СД2. Также относительно момента формирования патологии различалось время начала терапии: профилактическое введение (аллоксановый СД с индукцией полной гибели β -клеток и стероид-индуцированный СД с комплексным нарушением углеводного обмена) и лечебное введение (стрептозотоцин-никотинамид-индуцированный СД и генетическая модель СД2, которые характеризуются гибелью большей части β -клеток и ожирением с первичной инсулинорезистентностью).

В ходе выполнения работы было обнаружено, что протективное действие комбинации значительно превосходит эффекты отдельных веществ, что указывает на синергизм компонентов, что, в свою очередь, может быть объяснено и разноплановостью их действия. Особенно выраженным терапевтический эффект был при профилактическом введении на модели аллоксанового СД, который характеризуется полной гибелью β -клеток, чего очевидно не случилось на фоне введения комбинации ингибитора iNOS и инкретиномиметика (идПП-4). Ранее в литературе отмечалось протективное действие аминоксидина на модели аллоксанового диабета при монотерапии и профилактическом введении, но для развития выраженного эффекта потребовалось его введение в течение 6 недель, при этом плавное развивающийся протективный эффект авторы связывают с восстановлением системы антиоксидантной защиты, ингибированием образования конечных продуктов гликирования, снижением воспаления и восстановлением островков [14]. В текущем исследовании, только в группе, получавшей

комбинацию (ситаглиптин + аминугуанидин, но не отдельные компоненты) уровень гликемии по сравнению с группой негативного контроля был значительно (в несколько раз) ниже уже через 1 неделю после введения аллоксана, что указывает на защитное действие комбинации в отношении клеточного токсина, который реализует свое действие через оксидативный стресс с последующей гибелью β -клеток. Учитывая характер экспериментального диабета, вызываемого введением схожих по механизму действия цитотоксических веществ (аллоксана и стрептозотоцина), а именно ключевую роль апоптоза в повреждении β -клеток и участие в этом процессе iNOS. Можно предположить, что гипогликемическое и протективное действие в отношении β -клеток у ситаглиптина (реализующего свое действие преимущественно через инкретины) дополняется антиапоптотическим (антиоксидантным и противовоспалительным вследствие ингибирования iNOS) влиянием аминугуанидина, что приводит к снижению интенсификации апоптоза и, соответственно, меньшей потере β -клеток. Для выяснения точного механизма влияния комбинации на процесс гибели β -клеток требуется дополнительное исследование с выявлением экспрессии факторов, влияющих на апоптоз (например: транскрипционных факторов, цитокинов, эффекторов и регуляторов апоптоза, и др.).

Во второй серии исследования было обнаружено, что комбинация ситаглиптина и аминугуанидина при одновременном (профилактическом) введении с дексаметазоном значительно ограничивает гипергликемическое действие последнего (прогрессирование нарушений углеводного обмена). Выявленный эффект был менее выраженный по сравнению с первой серией, что возможно связано с комплексным влиянием глюкокортикостероидов на углеводный обмен, при ограниченном числе точек приложения исследуемой комбинации, прежде всего защита β -клеток. Однако для коррекции сохранившихся нарушений углеводного обмена после отмены глюкокортикостероидов, данный подход может представлять интерес.

В третьей серии экспериментов лечебное

введение комбинации ситаглиптина и аминугуанидина удалось значительно замедлить прогрессирование стрептозотонин-никотинамидного СД, что также можно связать со снижением интенсивности апоптоза и улучшением функционального состояния оставшихся β -клеток вследствие сочетания гипогликемического и защитного действия инкретинов (идПП-4) и противовоспалительного эффекта аминугуанидина.

У животных с ожирением и СД также было отмечено определенное гипогликемическое действие ситаглиптина и его комбинации с аминугуанидином. Известно, что ожирение и инсулинорезистентность вызывают каскад реакций общим звеном которых является системное воспаление с повышением секреции провоспалительных цитокинов, что ускоряет повреждение β -клеток и трансформацию диабета 2 типа в 1. Применение аминугуанидина в сочетании с ситаглиптином может значительно влиять на различные патогенетические звенья, инициируемые гипергликемией, в частности, снижать уровень системного воспаления за счёт ингибирования активности iNOS и ее роли в деструкции β -клеток. При дальнейшей работе с данной моделью ввиду тяжести патологии целесообразно применение более эффективных инкретиномиметиков – агонистов рецептора глюкагоноподобного пептида-1.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинированное применение ситаглиптина и аминугуанидина повышает противодиабетическое действие отдельных компонентов, препятствуя развитию сахарного диабета после введения аллоксана при профилактическом введении, снижая выраженность углеводных нарушений после курсового введения дексаметазона, замедляя прогрессирование стрептозотонин-никотинамидного СД и снижая уровень гликемии у животных с генетической предрасположенностью к сахарному диабету и ожирению при лечебном введении. Комбинация ситаглиптина с аминугуанидином может стать основой разработки нового перспективного подхода к лечению сахарного диабета и его осложнений.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке РФ (проект № 20-75-10013)

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Д.В. Куркин, А.В. Стрыгин – идея и планирование исследования, оформление графического материала, утверждение финальной версии рукописи; Т.М. Андриашвили, А.А. Соколова, Н.С. Болохов, В.Э. Пустынников, Е.А. Фомичев – моделирование патологии, проведение экспериментальной работы; Е.И. Морковин – статистическая обработка данных, оформление графического материала, редактирование текста; Д.А. Бакулин, Ю.В. Горбунова – сбор и анализ литературных данных, написание рукописи.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Дедов И.И., Шестакова М.В., Майоров А.Ю., Мокрышева Н.Г., Викулова О.К., Галстян Г.Р., Кураева Т.Л., Петеркова В.А., Смирнова О.М., Старостина Е.Г., Суркова Е.В., Сухарева О.Ю., Токмакова А.Ю., Шамхалова М.Ш., Ярек-Мартынова И.Я., Артемова Е.В., Бешлиева Д.Д., Бондаренко О.Н., Волеводз Н.Н., Гомова И.С., Григорян О.Р., Джемилова З.Н., Есян Р.М., Ибрагимова Л.И., Калашников В.Ю., Кононенко И.В., Лаптев Д.Н., Липатов Д.В., Мельникова О.Г., Михина М.С., Мичурова М.С., Мотовилин О.Г., Никонова Т.В., Роживанов Р.В., Скляник И.А., Шестакова Е.А. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом». Под редакцией И.И. Дедова, М.В. Шестаковой, А.Ю. Майорова. 10-й выпуск // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 1S. – С. 1–148. DOI: 10.14341/DM12802
- Sun H., Saeedi P., Karuranga S., Pinkepank M., Ogurtsova K., Duncan B.B., Stein C., Basit A., Chan J.C.N., Mbanya J.C., Pavkov M.E., Ramachandaran A., Wild S.H., James S., Herman W.H., Zhang P., Bommer C., Kuo S., Boyko E.J., Magliano D.J. IDF Diabetes Atlas: Global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045 // Diabetes Res. Clin. Pract. – 2022. – Vol. 183. – Art. ID: 109119. DOI: 10.1016/j.diabres.2021.109119
- Дедов И.И., Шестакова М.В., Викулова О.К., Железнякова А.В., Исаков М.А. Эпидемиологические характеристики сахарного диабета в Российской Федерации: клинко-статистический анализ по данным регистра сахарного диабета на 01.01.2021 // Сахарный диабет. – 2021. – Т. 24, № 3. – С. 204–221. DOI: 10.14341/DM12759
- Blonde L., Umpierrez G.E., Reddy S.S., McGill J.B., Berga S.L., Bush M., Chandrasekaran S., DeFronzo R.A., Einhorn D., Galindo R.J., Gardner T.W., Garg R., Garvey W.T., Hirsch I.B., Hurley D.L., Izuora K., Kosiborod M., Olson D., Patel S.B., Pop-Busui R., Sadhu A.R., Samson S.L., Stec C., Tamborlane W.V. Jr., Tuttle K.R., Twining C., Vella A., Vellanki P., Weber S.L. American Association of Clinical Endocrinology Clinical Practice Guideline: Developing a Diabetes Mellitus Comprehensive Care Plan-2022 Update // Endocr. Pract. – 2022. – Vol. 28, No. 10. – P. 923–1049. DOI: 10.1016/j.eprac.2022.08.002
- Триголосова И.В. Стероид-индуцированный сахарный диабет // ПМЖ. – 2016. – Т. 24, № 1. – С. 54–56.
- Wallace M.D., Metzger N.L. Optimizing the Treatment of Steroid-Induced Hyperglycemia // Ann. Pharmacother. – 2018. – Vol. 52, No. 1. – P. 86–90. DOI:10.1177/1060028017728297
- Shah P., Kalra S., Yadav Y., Deka N., Lathia T., Jacob J.J., Kota S.K., Bhattacharya S., Gadve S.S., Subramaniam K.A.V., George J., Iyer V., Chandratreya S., Aggrawal P.K., Singh S.K., Joshi A., Selvan C., Priya G., Dhingra A., Das S. Management of Glucocorticoid-Induced Hyperglycemia // Diabetes Metab. Syndr. Obes. – 2022. – Vol. 15. – P. 1577–1588. DOI:10.2147/DMSO.S330253
- Стронгин Л.Г., Некрасова Т.А., Беликина Д.В., Корнева К.Г., Петров А.В. Дисгликемия при COVID-19 и сахарном диабете 2 типа: особенности гликемического профиля у госпитализированных пациентов и роль стероид-индуцированных нарушений // Проблемы эндокринологии. – 2022. – Т. 68, № 2. – С. 56–65. DOI:10.14341/probl12840
- Сидоров А.В. Клиническая фармакология ингибиторов дипептидилпептидазы 4: сравнительный обзор // Эффективная фармакотерапия. – 2020. – Т. 16, № 25. – С. 24–49. DOI:10.33978/2307-3586-2020-16-25-24-48
- Тюренок И.Н., Бакулин Д.А., Куркин Д.В., Волотова Е.В. Нейропротективные свойства инкретиномиметиков при ишемии головного мозга и нейродегенеративных заболеваниях // Проблемы эндокринологии. – 2017. – Т. 63, № 1. – С. 58–67. DOI:10.14341/probl201763149-58
- Куркин Д.В., Абросимова Е.Е., Бакулин Д.А., Ковалев Н.С., Дубровина М.А., Борисов А.В., Стрыгин А.В., Морковин Е.И., Тюренок И.Н. Модуляция активности различных синтаз оксида азота в качестве подхода к терапии эндотелиальной дисфункции // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 10, № 2. – С. 130–153. DOI:10.19163/2307-9266-2022-10-2-130-153
- Corbett J.A., McDaniel M.L. The use of aminoguanidine, a selective iNOS inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide in the development of autoimmune diabetes // Methods. – 1996. – Vol. 10, No. 1. – P. 21–30. DOI:10.1006/meth.1996.0074
- Panagiotopoulos S., O'Brien R.C., Bucala R., Cooper M.E., Jerums G. Aminoguanidine has an anti-atherogenic effect in the cholesterol-fed rabbit // Atherosclerosis. – 1998. – Vol. 136, No. 1. – P. 125–131. DOI:10.1016/s0021-9150(97)00192-5
- Arif B., Arif Z., Ahmad J., Perveen K., Bukhari N.A., Ashraf J.M., Moinuddin, Alam K. Attenuation of hyperglycemia and amadori products by aminoguanidine in alloxan-diabetic rabbits occurs via enhancement in antioxidant defenses and control of stress // PLoS One. – 2022. – Vol. 17, No. 1. – Art. ID: e0262233. DOI:10.1371/journal.pone.0262233
- Oleson B.J., Corbett J.A. Dual Role of Nitric Oxide in Regulating the Response of β Cells to DNA Damage // Antioxid. Redox. Signal. – 2018. – Vol. 29, No. 14. – P. 1432–1445. DOI:10.1089/ars.2017.7351
- Gheibi S., Ghasemi A. Insulin secretion: The nitric oxide controversy // EXCLI J. – 2020. – Vol. 19. – P. 1227–1245. DOI:10.17179/excli2020-2711
- Anavi S., Tirosh O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions // Free Radic. Biol. Med. – 2020. – Vol. 146. – P. 16–35. DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2019.10.411
- Soskić S.S., Dobutović B.D., Sudar E.M., Obradović M.M., Nikolić D.M., Djordjević J.D., Radak D.J., Mikhailidis D.P., Isenović E.R. Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) and its Potential Role in Insulin Resistance, Diabetes and Heart Failure // Open Cardiovasc. Med. J. – 2011. – Vol. 5. – P. 153–163. DOI:10.2174/1874192401105010153
- Thornalley P.J. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – Vol. 419, No. 1. – P. 31–40. DOI:10.1016/j.abb.2003.08.013
- Kawashima S., Matsuoka T.A., Kaneto H., Tochino Y., Kato K., Yamamoto K., Yamamoto T., Matsuhisa M., Shimomura I. Effect of alogliptin, pioglitazone and glargine on pancreatic β -cells in diabetic db/db mice // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 2011. – Vol. 404, No. 1. – P. 534–540. DOI:10.1016/j.bbrc.2010.12.021

21. Ковалева М.А., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Генетически модифицированные линии лабораторных животных, используемые в качестве модели метаболического синдрома и сахарного диабета // Лабораторные животные для научных исследований. – 2018. – № 1. – С. 22–31. DOI:10.29296/2618723X-2018-01-03
22. Katsuda Y., Ohta T., Shinohara M., Bin T., Yamada T. Diabetic mouse models // Open J. Anim. Sci. – 2013. – Vol. 3, No. 4. – P. 334–342. DOI:10.4236/ojas.2013.34050
23. Tyurenkov I.N., Kurkin D.V., Bakulin D.A., Volotova E.V., Morkovin E.I., Chafeev M.A., Karapetian R.N. Chemistry and Hypoglycemic Activity of GPR119 Agonist ZB-16 // Front Endocrinol. (Lausanne). – 2018. – Vol. 9. – Art. ID: 543. DOI:10.3389/fendo.2018.00543
24. Sheriff O.L., Olayemi O., Taofeeq A.O., Riskat, K.E., Ojochebo D.E., Ibukunoluwa A.O. A new model for alloxan-induced diabetes mellitus in rats // J. Bangladesh Society of Physiologist. – 2020. – Vol. 14, No. 2. – P. 56–62. DOI:10.3329/jbsp.v14i2.44785
25. Rais N., Ved A., Ahmad R., Parveen K., Gautam G.K., Bari D.G., Shukla K.S., Gaur R., Singh A.P. Model of Streptozotocin-nicotinamide Induced Type 2 Diabetes: a Comparative Review // Curr. Diabetes. Rev. – 2022. – Vol. 18, No. 8. – Art. ID: e171121198001. DOI:10.2174/157339981866621117123358
26. Okamoto T., Shimada T., Matsumura C., Minoshima H., Ban T., Itotani M., Shinohara T., Fujita S., Matsuda S., Sato S., Kanemoto N. New Approach to Drug Discovery of a Safe Mitochondrial Uncoupler: OPC-163493 // ACS Omega. – 2021. – Vol. 6, No. 26. – P. 16980–16988. DOI:10.1021/acsomega.1c01993
27. Scott L.J. Sitagliptin: a review in type 2 diabetes // Drugs. – 2017. – Vol. 77, No. 2. – P. 209–224. DOI:10.1007/s40265-016-0686-9

АВТОРЫ

Куркин Денис Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, профессор кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: strannik986@mail.ru

Бакулин Дмитрий Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории фармакологии сердечно-сосудистых средств НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-4694-3066. E-mail: mbfdoc@gmail.com

Морковин Евгений Игоревич – кандидат медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией нейрорепсихофармакологии НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-7119-3546. E-mail: e.i.morkovin@gmail.com

Горбунова Юлия Васильевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-1116-3425. E-mail: yvgorbunova@yandex.ru

Стрыгин Андрей Валерьевич – кандидат медицинских наук, доцент, заместитель директора НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-6997-1601. E-mail: drumsav@mail.ru

Анриашвили Тамара Мамукаевна – студент-исследователь, кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0983-666X. E-mail: tamuna.andriashvili@yandex.ru

Соколова Алина Андреевна – студент-исследователь, кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-5116-8458. E-mail: chudi.lis.14@gmail.com

Болохов Никита Сергеевич – студент-исследователь, кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-2458-5731. E-mail: neekit.main@gmail.com

Пустынников Владислав Эдуардович – студент-исследователь, кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-9561-5320. E-mail: pustynnikov200122@gmail.com

Фомичев Евгений Андреевич – студент-исследователь, кафедра клинической фармакологии и интенсивной терапии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1837-4337. E-mail: fomichevVSMU@gmail.com

УДК 615.015:616.379



СОЕДИНЕНИЕ ДФ-5 ЗАМЕДЛЯЕТ РАЗВИТИЕ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ НЕФРОПАТИИ У КРЫС

А.А. Спасов^{1,2}, О.Н. Жуковская³, А.И. Ращенко¹, А.А. Бригадирова^{1,2}, Р.А. Литвинов^{1,2},
Н.А. Гурова¹, А.В. Смирнов^{1,2}, Н.Г. Паньшин¹, Х.С.А. Аббас³, А.С. Морковник³

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

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

² Государственное бюджетное учреждение «Волгоградский медицинский научный центр»,
400131, Россия, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1

³ Научно-исследовательский институт физической и органической химии федерального государственного
автономного образовательного учреждения высшего профессионального образования
«Южный федеральный университет»,
344090, Россия, г. Ростов-на-Дону, пр-т Стачки, д. 194/2

E-mail: litvinov.volggmu@mail.ru

Получена 08.09.2022

После рецензирования 18.11.2022

Принята к печати 10.12.2022

Конечные продукты гликирования играют важную роль в развитии осложнений сахарного диабета. По этой причине замедление образования поперечных сшивок гликированных белков, как предполагается, является потенциальным терапевтическим подходом к лечению и профилактике осложнений заболевания, связанных с поражением сосудов.

Цель. Оценка способности нового антисшивающего соединения ДФ-5 влиять на количество конечных продуктов гликирования и коллагена в почках, на массу тела, уровни глюкозы и гликированного гемоглобина, а также на развитие ранних проявлений поражения почек у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом.

Материалы и методы. Работа проведена на 40 самцах крыс Sprague-Dawley. Через 2 месяца после индукции диабета исследуемое вещество вводили внутривенно (12,5 мг/кг) 1 р/сут в течение 28 дней с помощью зонда. Определяли уровень глюкозы и гликированного гемоглобина в крови, оценивали функцию почек, а также проводили гистологическое и иммуногистохимическое исследования тканей почек.

Результаты. Регулярное внутривенное введение ДФ-5 в течение 30 сут статистически значимо снижало уровень HbA1c в крови, но не влияло на уровень глюкозы в крови натощак. Соединение ДФ-5 существенно уменьшало протеинурию и предотвращало повреждение почек у экспериментальных животных за счет ограничения повреждений клубочков и канальцев. Было установлено, что соединение ДФ-5 замедляет повреждение почек на ранней стадии диабетической нефропатии, что сопровождается снижением количества конечных продуктов гликирования в ткани почек, улучшением их морфологической картины и функции.

Заключение. Полученные результаты открывают возможность для разработки дополнительного терапевтического подхода к лечению диабетической нефропатии и, возможно, других осложнений сахарного диабета.

Ключевые слова: конечные продукты гликирования; поперечные сшивки; ALT-711 (алагебриум); сахарный диабет; диабетическая болезнь почек (нефропатия); стрептозотоцин-индуцированный диабет

Список сокращений: БСА – бычий сывороточный альбумин; ВКМ – внеклеточный матрикс; ГБМ – гломерулярная базальная мембрана; ДМСО – диметилсульфоксид; ИК – инфракрасная спектроскопия; ИФА – иммуноферментный анализ; КПА – конечные продукты гликирования; T_{пл} – температура плавления; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; IDF – Международная диабетическая федерация; HbA1c – гликированный гемоглобин.

Для цитирования: А.А. Спасов, О.Н. Жуковская, А.И. Ращенко, А.А. Бригадирова, Р.А. Литвинов, Н.А. Гурова, А.В. Смирнов, Н.Г. Паньшин, Х.С.А. Аббас, А.С. Морковник. Соединение ДФ-5 замедляет развитие диабетической нефропатии у крыс. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):549-561. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-549-561

© А.А. Спасов, О.Н. Жуковская, А.И. Ращенко, А.А. Бригадирова, Р.А. Литвинов,
Н.А. Гурова, А.В. Смирнов, Н.Г. Паньшин, Х.С.А. Аббас, А.С. Морковник, 2022

For citation: A.A. Spasov, O.N. Zhukovskaya, A.I. Rashchenko, A.A. Brigadirova, R.A. Litvinov, N.A. Gurova, A.V. Smirnov, N.G. Pan'shin, H.S.A. Abbas, A.S. Morkovnik. DF-5 compound delays development of diabetic nephropathy in rats. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6):549-561. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-549-561

DF-5 COMPOUND DELAYS DEVELOPMENT OF DIABETIC NEPHROPATHY IN RATS

A.A. Spasov^{1,2}, O.N. Zhukovskaya³, A.I. Rashchenko¹, A.A. Brigadirova^{1,2}, R.A. Litvinov^{1,2}, N.A. Gurova¹, A.V. Smirnov^{1,2}, N.G. Pan'shin¹, H.S.A. Abbas³, A.S. Morkovnik³

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

² Volgograd Medical Research Center,
1, Pavshikh Bortsov Sq., Volgograd, Russia, 400131

³ Institute of Physical and Organic Chemistry, Southern Federal University,
Bldg 2, 194, Stachki Ave., Rostov-on-Don, Russia, 344090

E-mail: litvinov.volggu@mail.ru

Received 08 Sep 2022

After peer review 18 Nov 2022

Accepted 10 Dec 2022

Advanced glycation end-products play an important role in the development of diabetic complications, so slowing down of glycated proteins' cross-links formation have been suggested as a potential therapeutic option for the treatment of vascular diabetic complications and preventing their progression.

The aim of the work was to assess the influence of novel anticrosslinking agent DF-5 on the renal advanced glycation end-products and collagen contents, body weight, blood glucose and glycated hemoglobin levels and the development of early renal disease in streptozotocin-induced diabetic rats.

Materials and methods. 40 male Sprague-Dawley rats were used in the study. Two months after inducing diabetes, the study substance was administered intragastrically once a day for 28 days (12.5 mg/kg). Measurements included the assessment of blood glucose and HbA1c levels, the evaluation of the renal function, and the results of histology and immunohistochemical staining of kidneys.

Results. A repeated intragastric administration of DF-5 for 30 days significantly reduced the level of HbA1c in the blood, but did not affect the level of fasting blood glucose. DF-5 compound significantly reduced proteinuria and prevented kidney damage in experimental animals by limiting damage of the glomeruli and tubules. It was found that DF-5 inhibits the progression of an early renal dysfunction in rats with streptozotocin-induced diabetic nephropathy. This was associated with a decreased accumulation of advanced glycation end-products in the kidney, accompanied by the improvement of both renal morphology and function.

Conclusion. The results obtained provide investigators with additional therapeutic options for the treatment of diabetic nephropathy and possibly other complications of diabetes.

Keywords: advanced glycation endproducts; cross-links; ALT-711 (alagebrium); diabetes mellitus; diabetic kidney disease (nephropathy); streptozotocin-induced diabetes.

Abbreviations: BSA – bovine serum albumin; ECM – extracellular matrix; GBM – glomerular basement membrane; DMSO – dimethyl sulfoxide; IR – infrared spectroscopy; ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay; AGEs – advanced glycation end products; m.p. – melting point; NMR – nuclear magnetic resonance; IDF – International Diabetes Federation; HbA1c – glycated hemoglobin.

ВВЕДЕНИЕ

Диабет является серьезным хроническим заболеванием, значимость которого определена его распространенностью в мире, затратами на лечение и последствиями для здоровья [1]. По оценкам Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)¹, в 2014 г. в мире в общей сложности 422 млн взрослых людей были больны диабетом, а уже в 2019 г. оценочная смертность, связанная непосредственно с данным заболеванием, достигла 1,5 млн случаев. По данным Международной диабетической федерации (International Diabetes Federation – IDF), в 2021 году во всем мире насчитывалось около 537 млн человек с диабетом, что подтверждает высокую скорость распространения заболевания.

¹ World Health Organization (WHO). Diabetes. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>

Диабет и его осложнения стремительно приобретают характер самой значимой причины заболеваемости и смертности в мире. В условиях хронической гипергликемии глюкоза и другие восстанавливающие сахара реагируют с белками в каскаде неферментативных реакций, образующих класс гетерогенных соединений, именуемых – конечные продукты гликирования (КПГ) [2, 3]. Некоторые КПГ представляют собой стабильные поперечные сшивки, образующиеся на многих крупных белках, таких как коллаген и эластин, на протяжении всего периода их существования, ковалентно модифицируя их структуру и нарушая функцию. По данным многих исследований, образование КПГ в долгоживущих компонентах соединительной ткани и внеклеточного матрикса является причинным фактором развития поздних

осложнений диабета и возрастных заболеваний [4–10]. КПГ играют важную роль в патогенезе таких осложнений диабета, как нефропатия, нейропатия, ретинопатия, катаракта, кардиомиопатия. КПГ принимают участие в формировании иммунопатологий, неопластических заболеваний и атеросклероза [2, 11, 12].

При диабетической болезни почек КПГ могут накапливаться в гломерулярной базальной мембране (ГБМ), мезангиальных клетках, эндотелиальных клетках и подоцитах. Следовательно, КПГ играют важную роль в развитии и прогрессировании нефропатии, что в свою очередь приводит к формированию гломерулосклероза и тубулоинтерстициального фиброза [7]. Кроме этого, сильно гликированные белки устойчивы к разрушению протеасомными и лизосомальными протеолитическими системами [13]. Способность анти-КПГ агентов снижать уровень КПГ в тканях считается потенциально эффективным терапевтическим подходом к восстановлению эластичности внеклеточного матрикса (ВКМ) сосудов, а также к лечению сосудистых диабетических осложнений и предотвращению их прогрессирования.

В настоящем исследовании мы приводим усовершенствованную методику синтеза нового представителя антисшивающих агентов, 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-а]бензимидазола (соединение ДФ-5, I), представляем результаты оценки его активности *in vivo*, а именно: влияние на уровни гликированного гемоглобина (HbA1c), массу тела, уровень глюкозы в крови и развитие ранних проявлений поражения почек у крыс с диабетом, вызванным стрептозотоцином. Активность этого нового антисшивающего агента *in vivo* была сопоставлена с активностью хорошо известного разрушителя КПГ-сшивок – соединения ALT-711 (алагебриум) [14].

ЦЕЛЬ. Оценка способности нового антисшивающего соединения ДФ-5 влиять на количество конечных продуктов гликирования и коллагена в почках, на массу тела, уровни глюкозы и гликированного гемоглобина, а также на развитие ранних проявлений поражения почек у крыс со стрептозотоциновым сахарным диабетом.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Все химические вещества, использованные в настоящем исследовании, имели аналитическую чистоту и доступны для приобретения. Стрептозотоксин и 3,3',5,5'-тетраметилбензидин были приобретены от Sigma-Aldrich (США); глюкоза приобретена от «Агат-Мед» (Россия); бычий сывороточный альбумин (БСА), фракция V – Biowest (Франция); диметилсульфоксид (ДМСО)

был приобретен от Fisher Scientific (США); кроличьи поликлональные антитела к БСА и козы вторичные антитела к кроличьим IgG были приобретены от Cloud-Clone (США); 10% нейтральный забуференный формалин, набор реактивов для окраски по Массону и гематоксилин были приобретены от «Модитех» (Россия); гомогенизированные парафиновые среды – от фирмы «Био Витрум» (Россия); кроличьи поликлональные антитела к КПГ были приобретены от Abcam (США); соединение ALT-711 было приобретено от Kailu Xingli Pharmaceutical Co., Ltd. (Китай).

Синтез 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-а]бензимидазола (соединение ДФ-5)

Синтез соединения ДФ-5 (I·HCl) был проведен в Институте физической и органической химии Южного федерального университета (Ростов-на-Дону, Россия) из 2-амино-1-бензилбензимидазола (II).

ИК-спектры ($\nu/\text{см}^{-1}$) новых соединений регистрировали с применением спектрофотометра Varian Excalibur 3100 FT-IR (Varian, USA) для порошкообразных образцов, с применением метода ослабленного полного отражения; спектры ^1H ЯМР зарегистрированы с применением спектрометра Bruker Avance 600 (Германия). Химические сдвиги для ^1H даны в виде значений δ в миллионных долях (ppm) относительно сигналов остаточных протонов дейтерированного растворителя DMCO-d_6 и CDCl_3 (δ 2,49 и 7,24 соответственно), а константы связи выражены в герцах (Гц). Температуры плавления определяли с применением Fisher-Johns Melting Point Apparatus (Fisher Scientific, США). Элементный анализ проводили классическим методом [15]. Ход реакции и чистоту полученных соединений контролировали методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) (пластины с Al_2O_3 III степени активности, элюент CHCl_3 , визуализация парами йода во влажной камере).

2-Имино-3-[(2-бифенил-4-ил)-2-оксоэтил]-1-бензилбензимидазолина гидробромид (III). К горячему раствору 2,23 г 2-аминобензимидазола II (10 ммоль) в 65 мл MeCN добавляли 4-(бромацетил) бифенил (2,75 г, 10 ммоль). Смесь перемешивали до растворения кватернизирующего реагента, затем нагревали до завершения образования осадка и выдерживали 6–8 ч при комнатной температуре. После этого осадок соли III отфильтровывали и тщательно промывали ацетоном. Выход 94%, $T_{\text{пл}}$ 254–256°C. ИК, $\nu/\text{см}^{-1}$: 3207, 3240 (NH_2), 1687 (C=O). Установлено: C 67,47; H, 4,85; Br, 16,03; N, 8,43%. Элементный анализ для $\text{C}_{28}\text{H}_{24}\text{BrN}_3\text{O}$: C 67,45; H, 4,88; Br, 16,00; N, 8,39%. ^1H ЯМР (600 МГц, DMCO-d_6), δ : 5,57 (s, 2H, CH_2CO); 6,07 (s, 2H, $\text{N}_{\text{Bzm}}\text{CH}_2$); 7,30–7,36 (m, 5H, 5,6- H_{Bzm} + 3 H_{Ph}); 7,40–7,48 (m, 3H, 2 H_{Ph} + 1 H_{Biph}); 7,51–7,55 (m, 3H, 7- H_{Bzm} + 2 H_{Biph}); 7,67–7,68 (m, 1H, 4- H_{Bzm}); 7,81 (d, 2H, 2 H_{Biph} , J 7,2 Гц); 7,97 (d, 2H, H_{Biph} , J 8,4 Гц); 8,19 (d, 2H, H_{Biph} , J 8,4 Гц); 9,06 (s, 2H, N+ H_2).

9-Бензил-2-(бифенил-4-ил)-9H-имидазо[1,2-а]бензимидазол (I). Смесь 2 г (4,0 ммоль) бромида II, 0,89 г тонкоизмельченного Na_2CO_3 , 40 мл EtOH и 9 мл воды кипятили до завершения реакции (20–25 ч). Затем из реакционной смеси отгоняли спирт, добавляли воду (25–30 мл), продукт отфильтровывали и сушили на воздухе. Полученное основание очищали колоночной хроматографией на Al_2O_3 , CHCl_3 использовали в качестве элюента, собирали фракцию с $R_f=0,9$. После выпаривания растворителя остаток перекристаллизовывали из ДМФА. Получали 1,3 г (81%) соединения I.

Смесь 2,0 г (4 ммоль) амина III и 0,33 г (4 ммоль) свежерасплавленного ацетата натрия кипятили в ледяной уксусной кислоте (5 ч), контролируя полноту реакции тонкослойной хроматографией. Затем реакционную массу охлаждали до комнатной температуры, отфильтровывали осадок имидазо[1,2-а]бензимидазола (I), промывали водой и сушили при 85°C. Выход 1,5 г (92%), $T_{\text{пл.}}$ 228–229°C. ИК, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1513, 1617 (C=C), 1664 (C=N). Установлено: C 84,21; H 5,38; N 10,46%. Элементный анализ для $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{N}_3$: C 84,10; H 5,30; N 10,52%. ^1H ЯМР (600 МГц), δ : 5,76 (s, 2H, CH_2); 7,29–7,53 (m, 10H, 5H_{Bzm} , 6,7-H $_{\text{Bzm}}$ + 3H $_{\text{Biph}}$), 7,76 (d, 2H, H_{Biph} , $J = 7,9$ Гц), 7,84 (d, 2H, 5,8-H $_{\text{Bzm}}$, $J = 8,3$ Гц), 7,97 (d, 1H, H_{Ar} , $J = 7,8$ Гц), 8,03 (d, 2H, H_{Ar} , $J = 8,3$ Гц); 8,64 (s, 1H, 3-H).

Гидрохлорид 9-бензил-2-(бифенил-4-ил)-9H-имидазо[1,2-а]бензимидазола (ДФ-5). Соединение получали обработкой имидазо[1,2-а]бензимидазола I конц. HCl. Выход 93%, $T_{\text{пл.}}$ 237–238°C. ИК, $\nu/\text{см}^{-1}$: 1512, 1614 (C=C), 1663 (C=N). Установлено: C, 77,11; H, 5,13; Cl, 8,08; N, 9,58%. Элементный анализ для $\text{C}_{28}\text{H}_{21}\text{N}_3 \cdot \text{HCl}$: C, 77,14; H, 5,09; Cl 8,13; N, 9,64%.

Расщепление в условиях *in vitro* комплексов «КПГ-БСА-коллаген»

Способность ДФ-5 расщеплять предварительно сформированный комплекс КПГ-БСА-коллаген проверяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) [16], с незначительными модификациями. Детально методика описана в RU 2627769 C1, Россия (2017) [17].

Коллаген экстрагировали из крысиных хвостов 0,1% (вес/объем) раствором уксусной кислоты в течение 7 сут, затем центрифугировали (8000 g, 10 мин) для осаждения нерастворившихся фрагментов. Полученный гель использовали для покрытия лунок планшета. Для получения гликированного БСА (БСА-КПГ) раствор БСА (50 мг/мл) инкубировали с глюкозой (0,5 М) в фосфатном буферном растворе в течение 3-х мес. В лунки планшета добавляли БСА-КПГ и проводили инкубацию при 37°C в течение 4 ч для образования поперечных связей (комплексы КПГ-БСА-коллаген). Растворы ДФ-5 или ALT-711 добавляли в лунки планшета после инкубации, затем планшет инкубировали вновь при 37°C в течение 16 ч. После промывки в лунки планшета добавляли

80 мкл/лунка кроличьих антител к БСА (1:500) и планшет инкубировали в течение 50 мин при 37°C. После следующей промывки добавляли 80 мкл/лунка меченных пероксидазой хрена козьих антикроличьих вторичных антител IgG (1:1000) и инкубировали в течение 50 мин при 37°C, затем добавляли по 100 мкл/лунка субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. После 20 мин инкубации в темноте при комнатной температуре реакцию останавливали с применением раствора кислоты серной 2М. Оптическую плотность проб определяли при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера Infinite M200 Pro (Tecan, Австрия).

При оценке активности каждого соединения были сформированы 4 группы данных: 1) гликированный БСА + коллаген, 2) гликированный БСА + коллаген + исследуемое соединение, 3) негликированный БСА + коллаген, 4) негликированный БСА + коллаген + исследуемое соединение. Для минимизации интерференции из-за неспецифической адгезии БСА на коллагеновую матрицу из результатов проб, содержащих гликированный БСА, были вычтены результаты проб соответствующего состава, содержащих негликированный БСА.

Животные

Эксперименты на животных проводились в соответствии со стандартами, установленными законодательством Российской Федерации (ГОСТ Р 33044-2014 и ГОСТ Р 33647-2015) и техническими стандартами надлежащей лабораторной практики EASC. Исследование было одобрено локальным комитетом по этике научных исследований (Волгоград, Россия) [регистрационный номер: IRB 00005839 IORG 0004900 (ONHR)] от 5 июня 2015 г. (протокол № 2016-2015).

Самцы крыс Sprague-Dawley (возраст 5–6 недель, масса тела 200–230 г) были приобретены в ООО «НИЦ БМТ», (Москва, Россия). Животные находились в виварии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. Адаптацию животных к условиям содержания проводили в помещении с 12/12-часовым циклом свет/темнота при температуре окружающей среды 25°C в течение 2 недель после доставки. До начала исследования животные имели свободный доступ к пище и воде.

Моделирование сахарного диабета крыс

Диабет у крыс моделировали путем однократной внутрибрюшинной инъекции стрептозотоцина (65 мг/кг в цитратном буфере, pH 4,5) после ночного голодания. Процедуру моделирования выполнили на 40 животных. Животным из группы недиабетического контроля вводили цитратный буфер ($n = 10$). Через 3 сут после инъекции стрептозотоцина только крысы с тощачковым уровнем глюкозы в крови, превышающим 15 ммоль/л, были классифицированы

как диабетические и включались в исследование ($n=30$). Животные, не достигшие этого критерия, были исключены из текущего эксперимента ($n=10$). Пять крыс с развившимся диабетом погибли в течение следующих 2-х мес после введения стрептозотоцина (до начала разделения на группы и лечения).

Выбор эффективной дозы (12,5 мг/кг) для ALT-711 и ДФ-5 был основан на результатах экспериментальных исследований ALT-711 на различных животных моделях осложнений сахарного диабета [18-20]. Через два месяца после развития диабета животные с экспериментальной патологией ($n=24$) были случайным образом разделены на три группы: контрольная группа с диабетом без лечения (получала дистиллированную воду, 5 мл/кг внутривенно) и две опытные группы, получавшие либо ДФ-5, либо ALT-711 (12,5 мг/кг соответствующего соединения, растворенного в дистиллированной воде, 5 мл/кг внутривенно). Для достижения равных объемов групп (8 животных в группе) до начала лечения из исследования были исключены 3 объекта (2 крысы без диабета и 1 крыса с диабетом). В течение 4-недельного периода лечения введение соединений осуществляли через внутривенный зонд 1 р/сут утром (спустя 1 ч после включения света). Группа здоровых животных, не получавших лечения, находилась в таких же условиях, включая манипуляции с введением (дистиллированная вода, 5 мл/кг). У всех животных периодически определяли уровень глюкозы в крови и масса тела. Общее время, отведенное на исследование, составляло более 12 недель.

Биохимические исследования

Уровень глюкозы в крови измеряли с помощью глюкометра (Glucocard, Arkray, Япония) после забора образцов крови из хвостовой вены. Концентрацию HbA_{1c} определяли в конце исследования с помощью набора Diabet-Test Assay Kit (HbA_{1c}) (ООО «Фосфосорб», Россия) согласно инструкции производителя.

Определение функции почек

Функцию почек оценивали в конце исследования путем измерения суточного диуреза, общей концентрации белка в моче и его экскреции. В ходе забора материала крыс помещали в метаболические камеры («Открытая наука», Россия) для сбора суточной мочи. Общий белок мочи определяли с помощью соответствующего набора для анализа – Общий белок-ПК-Витал (Кат. № Б 06.03, ОАО «Витал Девелопмент Корпорэйшн», Россия) согласно инструкции производителя.

Гистологические и иммуногистохимические исследования почек

По окончании эксперимента животных декапировали (предварительно наркотизировав

хлоралгидратом, 400 мг/кг внутривенно). Почки удаляли, образцы коркового и мозгового вещества почек фиксировали в течение 24 ч в 10% (масса/объем) нейтральном забуференном формалине и заливали в парафин. Срезы толщиной 3–5 мкм окрашивали трихромом по Массону для оценки гломерулосклеротических изменений и отложений соединительной ткани. Другие фиксированные формалином срезы почек помещали на предметные стекла и окрашивали с применением кроличьих поликлональных антител к КПГ в соответствии с инструкциями производителя. После протекания иммунологической реакции ткани окрашивали гематоксилином. Визуализация выполнялась с помощью микроскопа Axiostar Plus (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия) и цифровой камеры Axiocam 105 Color (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Изображения анализировали с помощью программного обеспечения Zeiss Zen Pro 2012 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия). Результаты выражали как процент площади с положительным окрашиванием.

Статистический анализ

Статистический анализ проводили с помощью программы GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., США). Данные анализировали с применением ANOVA с пост-тестом Тьюки (множественное сравнение с контрольной группой), предварительную проверку нормальности распределения данных проводили с применением критерия Шапиро-Уилка. Уровень $p \leq 0,05$ считался пороговым при определении статистической значимости. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего ($M \pm SD$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Химический синтез

Соединение I синтезировано из 2-амино-1-бензилбензимидазола (III) в ходе последовательных реакций, изображенных на рисунке 1, как описано ранее [21], но с дополнительной модификацией стадии 2. На первой стадии амин III кватернизовали с применением эквивалентного количества 4-(бромацетил)бифенила (MeCN, комнатная температура, 6–8 ч) с получением выхода соли III. Затем на завершающей стадии эту соль подвергли циклизации в среде MeCOOH (кипение, 5 ч) в присутствии ацетата натрия. Выход соединения I составил 92%, что значительно больше, чем при циклизации соли III в водн./EtOH среде [21], а время реакции в этом случае значительно меньше. Отметим, что при кипячении ДМФА циклизация протекает еще быстрее (15–20 мин), но с низким выходом.

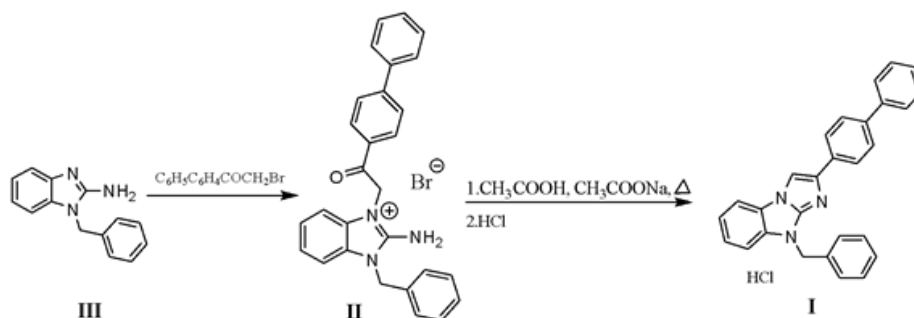


Рисунок 1 – Схема синтеза гидрохлорида 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-а]бензимидазола (соединение ДФ-5)

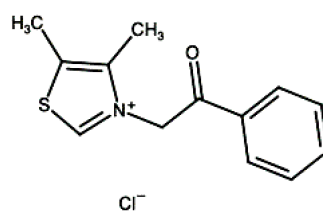


Рисунок 2 – Химическая структура соединения ALT-711 (алагебриум)

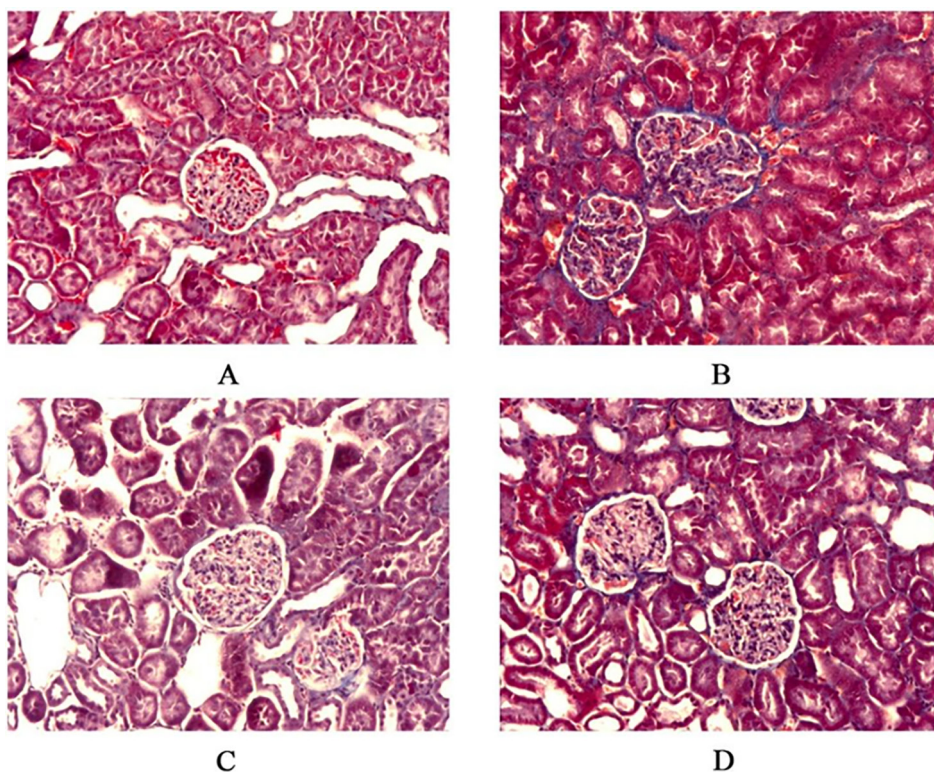


Рисунок 3 – Гистологическая картина клубочков. Изменения в тканях почек, вызванные сахарным диабетом, а также эффект от лечения соединениями ДФ-5 или ALT-711

Примечание: окраска трихромом по Массону: (A) здоровый контроль, (B) животные с сахарным диабетом без лечения, (C) диабет + соединение ALT-711 и (D) диабет + соединение ДФ-5. Увеличение $\times 100$

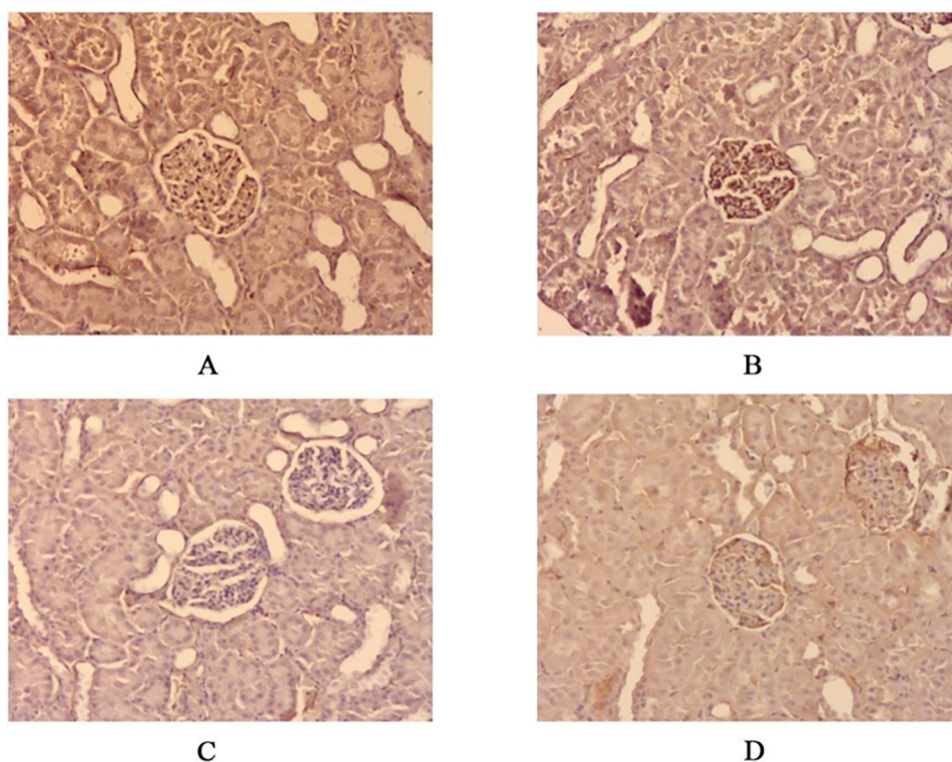


Рисунок 4 – Влияние соединений ДФ-5 и ALT-711 на накопление КПГ в почках, вызванное сахарным диабетом

Примечание: Иммуногистохимическое окрашивание КПГ в почках: (А) контроль без диабета, (В) животные с диабетом без лечения, (С) диабет + соединение ALT-711 и (D) диабет + соединение ДФ-5. Увеличение $\times 100$

Таблица 1 – Масса тела, уровень глюкозы в крови, уровень HbA_{1c} и смертность, наблюдаемые в конечной точке исследования в группах крыс без диабета (ND), крыс с диабетом (D), а также крыс с диабетом, получавших или не получавших соединения ДФ-5 или ALT-711

Опытная группа	Масса тела (g)	Глюкоза крови (ммоль/л)	HbA _{1c} (%)	Смертность
ND + растворитель	455,25 $\pm$ 17,82	5,37 $\pm$ 0,18	6,42 $\pm$ 0,49	0/8
D + растворитель	323,80 $\pm$ 18,75 ^a	26,83 $\pm$ 1,14 ^a	19,77 $\pm$ 0,08 ^a	3/8
D + ДФ-5 (12,5 мг/кг)	358,00 $\pm$ 32,35	27,93 $\pm$ 0,95 ^a	11,46 $\pm$ 1,39 ^{ab}	2/8
D + ALT-711 (12,5 мг/кг)	335,83 $\pm$ 20,80	25,78 $\pm$ 0,43 ^a	12,30 $\pm$ 1,88 ^{ab}	2/8

Примечание: ^a – $p \leq 0,05$ при сравнении со здоровыми крысами (ND); ^b – $p \leq 0,05$ при сравнении с диабетическими крысами, не получавшими лечения (D).

Таблица 2 – Показатели функции почек и экскреции белка, наблюдаемые в конечной точке исследования в группах крыс без диабета (ND), крыс с диабетом (D), а также крыс с диабетом, получавших или не получавших соединения ДФ-5 или ALT-711

Опытная группа	Объем отделяемой мочи (мл/сут)	Концентрация общего белка в моче (г/л)	Экскреция общего белка с мочой (мг/сут)
ND + растворитель	15,00 $\pm$ 1,54	0,017 $\pm$ 0,004	0,26 $\pm$ 0,08
D + растворитель	23,20 $\pm$ 1,62 ^a	0,058 $\pm$ 0,005 ^a	1,32 $\pm$ 0,08 ^a
D + ДФ-5 (12,5 мг/кг)	21,83 $\pm$ 1,58 ^a	0,025 $\pm$ 0,007 ^{ab}	0,59 $\pm$ 0,21 ^{ab}
D + ALT-711 (12,5 мг/кг)	22,83 $\pm$ 4,15 ^a	0,033 $\pm$ 0,005 ^{ab}	0,72 $\pm$ 0,13 ^{ab}

Примечание: ^a – $p \leq 0,05$ при сравнении со здоровыми крысами (ND); ^b – $p \leq 0,05$ при сравнении с диабетическими крысами, не получавшими лечения (D).

Таблица 3 – Морфометрический анализ повреждений клубочков в срезах почек, окрашенных трихромом по Массону, проведенный у крыс без диабета (ND) и с диабетом (D), а также крыс с диабетом, получавших или не получавших соединения ДФ-5 или ALT-711

Опытная группа	Общая клубочковая площадь (мкм ²)	Площадь клубочковой соединительной ткани (мкм ²)	Относительная площадь клубочковой соединительной ткани (%)
ND + растворитель	14885,17±1932,23	695,92±195,25	4,6
D + растворитель	12572,63±1015,25	3356,46±1871,64 ^a	26,7 ^a
D + ДФ-5 (12.5 мг/кг)	14753,21±975,23	2397,29±832,43	16,2 ^b
D + ALT-711 (12.5 мг/кг)	13968,94±856,26	1640,38±543,19	11,7 ^b

Примечание: ^a – $p \leq 0,05$ при сравнении со здоровыми крысами (ND); ^b – $p \leq 0,05$ при сравнении с диабетическими крысами, не получавшими лечения (D).

Таблица 4 – Иммуногистохимическое окрашивание КПГ в почках, проведенное в конечной точке исследования у крыс без диабета (ND) и с диабетом (D), а также крыс с диабетом, получавших или не получавших соединения ДФ-5 или ALT-711

Опытная группа	Общая клубочковая площадь (мкм ²)	Площадь клубочкового КПГ-позитивного материала (мкм ²)	Относительная площадь клубочкового КПГ-позитивного материала (%)
ND + растворитель	15287,35 ± 1759,13	1634,04 ± 759,17	10,68
D + растворитель	12121,19 ± 1234,57	3746,13 ± 1098,73	30,90 ^a
D + ДФ-5 (12.5 мг/кг)	12982,17 ± 971,56	2471,09 ± 658,81	17,48 ^b
D + ALT-711 (12.5 мг/кг)	13106,82 ± 1346,49	2117,85 ± 732,43	19,03 ^b

Примечание: ^a – $p \leq 0,05$ при сравнении со здоровыми крысами (ND); ^b – $p \leq 0,05$ при сравнении с диабетическими крысами, не получавшими лечения (D).

Разрушение комплексов КПГ-БСА-коллаген, предварительно сформированных *in vitro*

Было установлено, что соединение ДФ-5 проявляет выраженную антисшивающую активность в отношении предварительно сформированных поперечных сшивок, стабилизирующих комплекс КПГ-БСА-коллаген ($IC_{50}=0,31$ мМ), что в 6 раз превосходит соответствующую активность соединения ALT-711 (Рис. 2) ($IC_{50}=1,89$ мМ). Способность соединения ALT-711 разрушать поперечные сшивки была многократно описана, хотя механизм действия до настоящего времени не установлен. Более подробное описание активности соединения ДФ-5 дано в патенте RU 2627769 С1, Россия (2017) [17]. Мы отмечаем, что на основании описанного эксперимента нельзя предположить точный механизм воздействия соединения на преформированные комплексы, поэтому мы называем соединение ДФ-5 «антисшивающим агентом», а не «разрушителем поперечных сшивок».

В дизайне эксперимента учтена поправка на интерференцию, связанную с неспецифической адгезией БСА к поверхности коллагеновой матрицы и к пластику планшета. По этой причине мы полагаем, что установленная активность соединений ДФ-5 и ALT-711 связана именно с действием на определенный комплекс, образующийся в результате взаимодействия продуктов гликирования

на альбумине с аминокислотными остатками негликированного коллагена. Именно этот комплекс, мы полагаем, и позволяет закрепить альбумин на коллагеновой матрице и является мишенью для действия соединений.

Циклические катионы бета-кетоиминия хорошо подходят на роль продуктов, реагирующих на стороне альбумина и быстро образующих поперечную связь с аминокислотными остатками коллагена. Такие ионы являются результатом циклизации глюкозона или пентозона Ледерера. Реагируя со свободной гуанидиновой группой аргинина, они способны в несколько стадий образовывать глюкозепан или пентозидин. Возможно, что упомянутые глюкозон и пентозон Ледерера, а также предшествующие им продукты Амадори также важны для образования комплексов, фиксирующих БСА на коллагеновом матриксе, но их вклад еще предстоит установить.

Оценка массы тела животного

В конечной точке исследования средняя масса тела у животных с диабетом была значительно ниже ($p \leq 0,05$), чем у крыс без диабета (табл. 1). Крысы с диабетом, получавшие соединения ДФ-5 и ALT-711, показали небольшой прирост массы тела по сравнению с больными животными без лечения, но разница была статистически значимой только в случае крыс с диабетом, получавших ДФ-5.

Уровень глюкозы крови

По сравнению с недиабетическими крысами, животные с сахарным диабетом имели значительно более высокий уровень глюкозы в крови, равно как и уровень HbA1c (табл. 1; $p \leq 0,05$). Повышенное содержание HbA1c, наблюдаемое у животных с диабетом, было почти на 40% устранено в группах, получавших лечение как соединением ДФ-5, так и ALT-711 (табл. 1; $p \leq 0,05$). В то же время введение указанных соединений приводило лишь к незначительному снижению концентрации глюкозы в крови, не имевшему статистической значимости.

Оценка функции почек и их гистологическое исследование

В результате исследования установлено, что у животных с диабетом наблюдалось увеличение объема мочи и повышение количества отделяемого общего белка ($p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой животных без диабета; табл. 2). В то же время соединения ДФ-5 и ALT-711 статистически значимо предотвращали повышение концентрации общего белка в моче по сравнению с животными без лечения ($\approx 50\%$, $p \leq 0,05$), при этом не влияли на объем отделяемой мочи (табл. 2).

Гистологическое исследование животных с сахарным диабетом позволило выявить повреждения тканей почек. Характерным для диабета является прогрессирующее поражение клубочков и канальцев нефронов. В почках диабетических крыс, в сравнении со здоровым контролем, были выявлены значительные морфологические изменения (Рис. 3). В клубочках нефронов наблюдали утолщение ГБМ и экспансию мезангиального матрикса. Утолщение ГБМ было распространенным, степень выраженности экспансии мезангиального матрикса градировалась от легкой до умеренной и провоцировала сужение просветов капилляров. По сравнению с контрольными животными, не страдающими диабетом, средняя площадь клубочков была немного уменьшена, но различия не носили характер статистически значимых. В то же время средняя и относительная площади клубочковой соединительной ткани в группе животных с сахарным диабетом были значительно увеличены, в 4,8 и в 5,8 раз соответственно (табл. 3; $p \leq 0,05$). Лечение диабетических животных соединением ДФ-5 или ALT-711 значительно уменьшало степень повреждения клубочков (Рис. 3). Средние относительные площади гломерулярной соединительной ткани, наблюдаемые у крыс со стрептозотоциновым диабетом, получавших либо соединение ДФ-5, либо ALT-711, были статистически значимо ниже ($p \leq 0,05$), в 1,6 и 2,3 раза соответственно, в сравнении с диабетическими животными, не получавшими лечения (табл. 3).

Уровень КПГ в тканях почек

Иммуногистохимическое окрашивание КПГ показало, что в клубочках нефронов крыс с диабетом наблюдается более выраженное распространение антиген-позитивного материала по сравнению с материалом контрольных крыс без диабета. Интенсивность окрашивания была менее выражена в тканевом материале животных с сахарным диабетом, получавших лечение соединениями ДФ-5 или ALT-711 (Рис. 4). Средние относительные площади антиген-позитивного материала в клубочках диабетических животных, получавших либо соединение ДФ-5, либо ALT-711, были статистически значимо ниже, чем в группе животных без лечения ($p \leq 0,05$), в 1,6 и 1,8 раз соответственно (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Гликирование белков и образование КПГ играют важную роль в патогенезе поздних осложнений сахарного диабета, таких как ретинопатия, нефропатия, нейропатия, кардиомиопатия, а также ревматоидного артрита, остеопороза и старения [2]. Гликирование и поперечное сшивание белков не только приводит к снижению эластичности сосудов, но и влияет на структурную целостность и физиологические функции внутренних органов.

Гликирование представляет собой стадийный процесс, включающий образование гемиаминалей, оснований Шиффа, енаминолов, продуктов Амадори, ендиолов, глюкозонов (или пентозона) Ледерера, которые затем подвергаются внутримолекулярной конденсации между аминокислотной и концевой альдегидной группой, что дает положительно заряженные кольцевые продукты – циклические бета-кетоиминиевые ионы (6- или 7-членные) [2, 22]. Последние, реагируя с гуанидиновой группой аргинина, образуют сложные и стабильные поперечные сшивки, такие как глюкозепан или пентозидин. Помимо этого, ранние продукты гликирования способны распадаться на карбонильные соединения (метилглиоксаль, глиоксаль и др.), которые образуют другие виды сшивающих КПГ, такие как MOLD и GOLD [22]. Для всех КПГ характерна высокая стабильность.

Диабетическую нефропатию определяют как прогрессирующее на фоне диабета снижение скорости клубочковой фильтрации, сопровождающееся протеинурией и другими осложнениями со стороны почек [2]. В отношении почек отмечаются гликирование и активация каскада комплемента через распознавание гликированных белков маннан-связывающим лектином и/или дисфункция регуляторных белков комплемента [23], активация сигнальных каскадов рецепторов к КПГ и т.д. [24]. Ключевые события в ГБМ, мезангиальном и тубулоинтерстициальном матриксе, напрямую или опосредованно связаны с гликированием:

увеличение количеств коллагена типов IV и VI, усиление гликирования коллагена IV, интенсификация поперечного сшивания в коллагене IV, увеличение количеств ламинина и фибронектина, увеличение количества коллагена типа I и т. д. [25]. Наблюдаются экспансия мезангиального матрикса и утолщение ГБМ, повреждение подоцитов, гломерулосклероз и почечный фиброз [26–28].

Считается, что разрушение образовавшихся в почках КПГ посредством применения разрушителя поперечных сшивок, такого как соединение ALT-711, может обеспечить нефропротекцию в условиях диабета. Forbes J.M. и соавт. (2001) представляли соединение ALT-711 как потенциально способное стать новой основой для терапии диабетической нефропатии. Применение ALT-711 с 16-й по 32-ю неделю исследования способно улучшить как состояние функциональных параметров почек (альбуминурия), так и маркеров структурного повреждения, в том числе гломерулосклероза, тубулоинтерстициального повреждения и окислительного стресса [29].

Механизм действия при разрыве поперечных сшивок окончательно не выяснен. Согласно первоначальным предположениям, выдвинутым для аналога соединения ALT-711 – фенилтиазолия бромид [16], механизм его действия включает разрыв C–C связи между двумя соседними карбонильными группами. Однако КПГ, содержащие подобный 1,2-дикарбонильный фрагмент, в условиях эксперимента установлены не были, хотя разрыв поперечных сшивок был доказан экспериментально, иммунологически, с применением антител к тому или иному из двух сшитых белков [30–33]. Следует отметить, что такая C–C связь, расположенная между двумя соседними карбонильными группами, присутствует в некоторых ранних продуктах гликирования [22]. Кроме того, имеются убедительные данные из экспериментов *in vivo*, демонстрирующие положительный эффект соединения ALT-711 в условиях диабетической нефропатии [34, 35]. Несмотря на убедительные доказательства активности разрушителей поперечных КПГ-сшивок в условиях диабетической нефропатии, концепция непосредственного разрушения в целостном организме является спорной [36]. Механизм антисшивания теоретически может быть реализован за счет гидролиза, путем расщепления незрелых поперечных сшивок, образующихся на ранних стадиях процесса сшивания (антисшивающая активность), а также посредством инактивации ранних продуктов гликирования.

Можно предположить, что в условиях целостного организма механизм действия связан с инактивацией промежуточных предварительно сшитых электрофильных продуктов гликирования и дериватов глюкозы, существующих как в виде аддуктов, так и свободных соединений. Их

структура аналогична структуре теоретической дикарбонильной сшивки, которая так и не была обнаружена [14, 16]. К таким продуктам могут относиться основания Шиффа, карбонильные соединения, аддукты α -оксоальдегидов, расположенные на белках и др. Для α -оксоальдегидов доказано их участие в образовании поперечных сшивок, а именно: 2-аммоний-6-([2-[(4-аммоний-5-оксидо-5-оксопентил)амино]-4,5-дигидро-1H-имидазол-5-илиден)амино)гексаноат (GODIC), 2-аммоний-6-([2-[(4-аммоний-5-оксидо-5-оксопентил)амино]-4-метил-4,5-дигидро-1H-имидазол-5-илиден)амино)гексаноат (MODIC), глюкозепан [37, 38] и многих других. Следующий важный продукт – циклический b-кетоиминиевый ион, обладающий электрофильными свойствами [22] и образующий при взаимодействии с гуанидиновой группой в одну стадию пентозинан, в две стадии пентозидин (если кольцо b-кетоиминиевого иона было 6-членным) или глюкозепан (если это кольцо было 7-членным).

Возможность разрушения ранних аддуктов α -оксоальдегида разрывателями поперечных сшивок уже описана [39] с использованием модели гликирования апополипротеина A-I метилглиоксалем в присутствии соединения ALT-711. Данный механизм обсуждался как возможный для разрушителей поперечных сшивок в работе Kim T. и соавт. [40], а возможность прямого связывания метилглиоксала (представителя α -оксоальдегидов) соединением ALT-711 рассмотрена там же [40].

Таким образом, предлагаемая гипотеза о механизме действия разрушителей поперечных сшивок предполагает их способность производить нуклеофильные атаки на электрофильные интермедиаты гликирования и ранние продукты сшивания (антисшивающая активность). Детальный молекулярный механизм требует уточнения, но, учитывая нуклеофильность ДФ-5 и ALT-711, это является возможным.

Исследование *in vivo* было проведено для проверки способности соединения ДФ-5 предотвращать развитие ранней стадии диабетической болезни почек у крыс в условиях диабета, индуцированного стрептозотоцином. Объект исследования, как и эталон ALT-711, экспериментальным животным вводили внутривенно в течение 30 сут. На протяжении всего исследования уровень глюкозы в крови крыс с диабетом составлял не менее 15 ммоль/л, что способствовало развитию диабетических сосудистых осложнений. В конце исследования мы оценили и сопоставили результаты оценки массы тела животных, уровни глюкозы и HbA1c в крови, а также функцию почек и гистологическую картину их тканей в группах здоровых крыс, крыс с диабетом, а также крыс с диабетом, получавших соединения ДФ-5 или ALT-711. Регулярное внутривенное введение ДФ-5 статистически значимо снижало уровень HbA1c

в крови, но не влияло на уровень глюкозы натошак. Этот факт, вероятно, указывает на способность ДФ-5 действовать так, как предполагалось выше – разрушать продукты, образующиеся на ранних стадиях гликирования, в том числе так называемые продукты Амадори (HbA1c имеет структуру продуктов такого типа) [41]. Согласно ранее упомянутой гипотезе о механизме действия разрушителей поперечных КПГ-сшивок, такие агенты могут быть способны отщеплять глюкозу из ее обратимых аддуктов с белками (основания Шиффа и/или продукты Амадори) [42].

Настоящее исследование продемонстрировало возможность соединения ДФ-5 предотвратить диабетическую нефропатию у крыс с диабетом, вызванным стрептозотоцином. Как и ожидалось, диабет с течением времени индуцировал увеличение протеинурии. Соединение ДФ-5 существенно уменьшало протеинурию и предотвращало повреждение почек у экспериментальных животных за счет ограничения повреждений клубочков и канальцев. Подобный эффект был также описан для ALT-711 [43]. Замедленный прирост количества соединительной ткани и пониженный уровень КПГ в почках по сравнению с контрольной группой животных, вероятно, являются характерными свойствами антисшивающих агентов.

Накопление КПГ при диабете связано с усиленным образованием в почках компонентов внеклеточного матрикса, и раннее вмешательство в этот процесс может улучшить долгосрочные функциональные и структурные особенности диабетической нефропатии. В этом исследовании накопление КПГ в почках увеличивалось при диабете и уменьшалось при лечении соединением ДФ-5.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, мы представили данные о новом антисшивающем агенте, соединении ДФ-5. Однако для выяснения точного механизма действия соединения требуются дальнейшие исследования. ДФ-5 (12,5 мг/кг) ингибирует прогрессирование почечной дисфункции у крыс с диабетом, индуцированным стрептозотоцином, на раннем этапе патологии. В условиях экспериментальной диабетической нефропатии это соединение улучшает состояние как функциональных, так и морфологических параметров. Наблюдаемые улучшения были ассоциированы со сниженным накоплением КПГ в почках. Эти результаты предоставляют исследователям дополнительные возможности для лечения диабетической нефропатии и, возможно, других осложнений диабета.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Химическая часть исследования выполнена в Институте органической и физической химии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет» при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках государственного задания, грант ФЕНВ-2020-0031 (0852-2020-0031). Биологическая часть исследования проведена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-25-00139).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

А.А. Спасов – руководство и концептуализация исследования; О.Н. Жуковская, Х.С.А. Аббас, А.С. Морковник – синтез и подтверждение структуры соединения ДФ-5; А.И. Ращенко, А.А. Бригадирова, Р.А. Литвинов, Н.А. Гурова – разработка методологии, проведение исследования, программная обработка, написание рукописи; А.В. Смирнов, Н.Г. Паньшин – проведение исследования, визуализация данных; А.И. Ращенко, А.А. Бригадирова, Н.А. Гурова – обработка полученных результатов; Р.А. Литвинов – разработка гипотезы о механизме действия соединений, не связанном с непосредственным разрушением зрелых поперечных сшивок.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Silva J.A.D., Souza E.C.F., Echazú Böschemeier A.G., Costa C.C.M.D., Bezerra H.S., Feitosa E.E.L.C. Diagnosis of diabetes mellitus and living with a chronic condition: participatory study // BMC Public Health. – 2018. – Vol. 18, No. 1. – Art. ID: 699. DOI:10.1186/s12889-018-5637-9
2. Singh V.P., Bali A., Singh N., Jaggi A.S. Advanced Glycation End Products and Diabetic Complications // Korean J. Physiol. Pharmacol. – 2014. – Vol. 18, No. 1. – P. 1–14. DOI:10.4196/kjpp.2014.18.1.1
3. Rhee S.Y., Kim Y.S. The Role of Advanced Glycation End Products in Diabetic Vascular Complications // Diabetes Metab. J. – 2018. – Vol. 42, No. 3. – P. 188–195. DOI:10.4093/dmj.2017.0105
4. Chaudhuri J., Bains Y., Guha S., Kahn A., Hall D., Bose N., et al. 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
5. Bodiga V.L., Eda S.R., Bodiga S. Advanced glycation end products: role in pathology of diabetic cardiomyopathy // Heart Fail Rev. – 2014. – Vol. 19, No. 1. – P. 49–63. DOI:10.1007/s10741-013-9374-y
6. Bhat S., Mary S., Giri A.P., Kulkarni M.J. Advanced

- Glycation End Products (AGEs) in Diabetic Complications / Mechanisms of Vascular Defects in Diabetes Mellitus. *Advances in Biochemistry in Health and Disease* // Edited by Kartha C.C., Ramachandran S., Pillai R.M. Cham: Springer International Publishing, 2017. – P. 423–449. DOI:10.1007/978-3-319-60324-7_19
7. Rabbani N., Thornalley P.J. Advanced glycation end products in the pathogenesis of chronic kidney disease // *Kidney Int.* – 2018. – Vol. 93, No. 4 – P. 803–813. DOI:10.1016/j.kint.2017.11.034
 8. Nabi R., Alvi S.S., Saeed M., Ahmad S., Khan M.S. Glycation and HMG-CoA Reductase Inhibitors: Implication in Diabetes and Associated Complications // *Curr. Diabetes Rev.* – 2019. – Vol. 15, No. 3. – P. 213–223. DOI:10.2174/1573399814666180924113442
 9. Nabi R., Alvi S.S., Khan R.H., Ahmad S., Ahmad S., Khan M.S. Antiglycation study of HMG-R inhibitors and tocotrienol against glycated BSA and LDL: A comparative study // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2018. – Vol. 116. – P. 983–992. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.115
 10. Rahbar S., Figarola J.L. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 419, No. 1. – P. 63–79. DOI:10.1016/j.abb.2003.08.009
 11. Akhter F., Khan M.S., Ahmad S. Acquired immunogenicity of calf thymus DNA and LDL modified by D-ribose: a comparative study // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2015. – Vol. 72. – P. 1222–1227. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2014.10.034
 12. Jabir R., Ahmad S., Tabrez S. An insight on the association of glycation with hepatocellular carcinoma // *Semin. Cancer Biol.* – 2018. – Vol. 49. – P. 56–63. DOI:10.1016/j.semcancer.2017.06.005
 13. Brings S., Fleming T., Freichel M., Muckenthaler M.U., Herzig S., Nawroth P.P. Dicarbonyls and Advanced Glycation End-Products in the Development of Diabetic Complications and Targets for Intervention // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, No. 5. – Art. ID: 984. DOI:10.3390/ijms18050984
 14. Vasan S., Foiles P., Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product–protein crosslinks // *Arch. Biochem. Biophys.* – 2003. – Vol. 419, No. 1. – P. 89–96. DOI:10.1016/j.abb.2003.08.016
 15. Zuehlke C.W. Methods of Organic Elemental Microanalysis // *J. Am. Chem. Soc.* – 1963. – Vol. 85, No. 16. – Art. ID: 2536. DOI:10.1021/ja00899a055
 16. Vasan S., Zhang X., Zhang X., Kapurniotu A., Bernhagen J., Teichberg S., Basgen J., Wagde D., Shih D., Terlecky I., Bucala R., Cerami A., Egan J., Ulrich P. An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo // *Nature.* – 1996. – Vol. 382, No. 6588. – P. 275–278. DOI:10.1038/382275a0
 17. Жуковская О.Н., Анисимова В.А., Морковник А.С., Петров В.И., Спасов А.А., Ращенко А.И., Бригадирова А.А., Аббас Х.С.А. 9-бензил-2-бифенилимидазо[1,2-а]бензимидазол и его фармацевтически приемлемые соли, проявляющие свойства разрушителей поперечных сшивок гликированных белков. RU 2627769 C1, 2017.
 18. Zhang B., He K., Chen W., Cheng X., Cui H., Zhong W., Li S., Wang L. Alagebrium (ALT-711) improves the anti-hypertensive efficacy of nifedipine in diabetic-hypertensive rats // *Hypertens. Res.* – 2014. – Vol. 37, No. 10. – P. 901–907. DOI:10.1038/hr.2014.98
 19. Cheng G., Wang L.L., Qu W.S., Long L., Cui H., Liu H.Y., Cao Y.L., Li S. C16, a novel advanced glycation endproduct breaker, restores cardiovascular dysfunction in experimental diabetic rats // *Acta Pharmacol.* Sin. – 2005. – Vol. 26, No. 12. – P. 1460–1466. DOI:10.1111/j.1745-7254.2005.00240.x
 20. Cheng G., Wang L.L., Long L., Liu H.Y., Cui H., Qu W.S., Li S. Beneficial effects of C36, a novel breaker of advanced glycation endproducts cross-links, on the cardiovascular system of diabetic rats // *Br. J. Pharmacol.* – 2007. – Vol. 152, No. 8. – P. 1196–1206. DOI:10.1038/sj.bjp.0707533
 21. Spasov A.A., Zhukovskaya O.N., Brigadirova A.A., Abbas H.S.A., Anisimova V.A., Sysoeva V.A., Rashchenko A.I., Litvinov R.A., Mayka O.Yu., Babkov D.A., Morkovnik A.S. Synthesis and pharmacological activity of 2-(biphenyl-4-yl)imidazo[1,2-a]benzimidazoles // *Russ. Chem. Bull.* – 2017. – Vol. 66. – P. 1905–1912. DOI:10.1007/s11172-017-1965-7
 22. Cho S.J., Roman G., Yeboah F., Konishi Y. The Road to Advanced Glycation End Products: A Mechanistic Perspective // *Curr. Med. Chem.* – 2007. – Vol. 14, No. 15. – P. 1653–1671. DOI:10.2174/092986707780830989
 23. Tang S.C.W., Yiu W.H. Innate immunity in diabetic kidney disease // *Nat. Rev. Nephrol.* 2020- Vol. 16. – P. 206–222. DOI:10.1038/s41581-019-0234-4
 24. Yao D., Wang S., Wang M., Lu W. Renoprotection of dapagliflozin in human renal proximal tubular cells via the inhibition of the high mobility group box 1receptor for advanced glycation end productsnuclear factorκB signaling pathway // *Mol. Med. Rep.* – 2018. – Vol. 18, No. 4. – P. 3625–3630. DOI:10.3892/mmr.2018.9393.
 25. Kolset S.O., Reinholt F.P., Jenssen T. Diabetic Nephropathy and Extracellular Matrix // *J. Histochem. Cytochem.* – 2012. – Vol. 60, No. 12. – P. 976–986. DOI: 10.1369/0022155412465073
 26. Dalla Vestra M., Saller A., Mauer M., Fioretto P. Role of mesangial expansion in the pathogenesis of diabetic nephropathy // *J. Nephrol.* – 2001. – Vol. 14, Suppl 4. – P. 51–57.
 27. Amorim R.G., Guedes G. da S., Vasconcelos S.M. de L., Santos J.C. de F. Kidney Disease in Diabetes Mellitus: Cross-Linking between Hyperglycemia, Redox Imbalance and Inflammation // *Arq. Bras. Cardiol.* – 2019. – Vol. 112, No. 5. – P. 577–587. DOI: 10.5935/abc.20190077. Erratum in: *Arq. Bras. Cardiol.* – 2019. – Vol. 113, No. 1. – Art. ID: 182.
 28. Vasan S., Foiles P.G., Founds H.W. Therapeutic potential of AGE inhibitors and breakers of AGE protein cross-links // *Expert Opin. Investig. Drugs.* – 2001. – Vol. 10, No. 11. – P. 1977–1987. DOI:10.1517/13543784.10.11.1977
 29. Forbes J.M., Thallas V., Thomas M.C., Founds H.W., Burns W.C., Jerums G., Cooper ME. The breakdown of preexisting advanced glycation end products is associated with reduced renal fibrosis in experimental diabetes // *FASEB J.* – 2003. – Vol. 17, No. 12. – P. 1762–1764. DOI:10.1096/fj.02-1102fje
 30. Kim Y.S., Kim J., Kim C.S., Sohn E.J., Lee Y.M., Jeong I.H., Kim H., Jang D.S., Kim J.S. KIOM-79, an Inhibitor of AGEs–Protein Cross-linking, Prevents Progression of Nephropathy in Zucker Diabetic Fatty Rats // *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–10. DOI:10.1093/ecam/nep078
 31. Jung E., Park S.B., Jung W.K., Kim H.R., Kim J. Antiglycation Activity of Aucubin In Vitro and in Exogenous Methylglyoxal Injected Rats // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, No. 20. – Art. ID: 3653. DOI:10.3390/molecules24203653
 32. Kim J., Kim C.S., Kim Y.S., Lee I.S., Kim J.S. Jakyakgamcho-tang and Its Major Component, Paeonia Lactiflora, Exhibit Potent Anti-glycation Properties // *J. Exerc. Nutrition Biochem.* – 2016. – Vol. 20, No. 4. – P. 60–64. DOI:10.20463/jenb.2016.0049

33. Kim C.S., Jo K., Pyo M.K., Kim J.S., Kim J. Pectin lyase-modified red ginseng extract exhibits potent anti-glycation effects *in vitro* and *in vivo* // J. Exerc. Nutrition Biochem. – 2017. – Vol. 21, No. 2. – P. 56–62. DOI:10.20463/jenb.2017.0011
34. Coughlan M.T., Forbes J.M., Cooper M.E. Role of the AGE crosslink breaker, alagebrium, as a renoprotective agent in diabetes // Kidney International. – 2007. – Vol. 72, Suppl. 106. – P. 54–60. DOI:10.1038/sj.ki.5002387
35. Thallas-Bonke V., Lindschau C., Rizkalla B., Bach L.A., Boner G., Meier M., Haller H., Cooper M.E., Forbes J.M. Attenuation of Extracellular Matrix Accumulation in Diabetic Nephropathy by the Advanced Glycation End Product Cross-Link Breaker ALT-711 via a Protein Kinase C-Dependent Pathway // Diabetes. – 2004. – Vol. 53. – P. 2921–2930. DOI:10.2337/diabetes.53.11.2921
36. Yang S., Litchfield J.E., Baynes J.W. AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats // Arch. Biochem. Biophys. – 2003. – Vol. 412, No. 1. – P. 42–46. DOI:10.1016/S0003-9861(03)00015-8
37. Nasiri R., Field M.J., Zahedi M., Moosavi-Movahedi A.A. Cross-Linking Mechanisms of Arginine and Lysine with α,β -Dicarbonyl Compounds in Aqueous Solution // J. Phys. Chem. A. – 2011. – Vol. 115, No. 46. – P. 13542–13555. DOI:10.1021/jp205558d
38. Nasiri R., Field M.J., Zahedi M., Moosavi-Movahedi A.A. Comparative DFT Study To Determine if α -Oxoaldehydes are Precursors for Pentosidine Formation // J. Phys. Chem. A. – 2012. – Vol. 116, No. 11. – P. 2986–2996. DOI:10.1021/jp2104165
39. Nobécourt E., Zeng J., Davies M.J., Brown B.E., Yadav S., Barter P.J., Rye K.A. Effects of cross-link breakers, glycation inhibitors and insulin sensitizers on HDL function and the non-enzymatic glycation of apolipoprotein A-I // Diabetologia. – 2008. – Vol. 51, No. 6. – P. 1008–1017. DOI:10.1007/s00125-008-0986-z
40. Kim T., Spiegel D.A. The Unique Reactivity of N-Phenacyl-Derived Thiazolium Salts Toward α -Dicarbonyl Compounds // Rejuvenation Res. – 2013. – Vol. 16, No. 1. – P. 43–50. DOI:10.1089/rej.2012.1370
41. Sherwani S.I., Khan H.A., Ekhzaimy A., Masood A., Sakharkar M.K. Significance of HbA1c Test in Diagnosis and Prognosis of Diabetic Patients // Biomark Insights. – 2016. – Vol. 11. – P. 95–104. DOI:10.4137/BMI.S38440
42. Nagai R., Murray D.B., Metz T.O., Baynes J.W. Chelation: A Fundamental Mechanism of Action of AGE Inhibitors, AGE Breakers, and Other Inhibitors of Diabetes Complications // Diabetes. 2012. – Vol. 61, No. 3. – P. 549–559. DOI:10.2337/db11-1120
43. Toprak C., Yigitaslan S. Alagebrium and Complications of Diabetes Mellitus // Eurasian J. Med. – 2019. – Vol. 51, No. 3. – P. 285–292. DOI:10.5152/eurasianjmed.2019.18434

АВТОРЫ

Спасов Александр Алексеевич – доктор медицинских наук, академик РАН, заведующий кафедрой фармакологии и биоинформатики, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; заведующий лабораторией экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0002-7185-4826. E-mail: aspasov@mail.ru

Жуковская Ольга Николаевна – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ФГАОУ ВПО ЮФУ. ORCID ID: 0000-0003-2485-2139. E-mail: zhukowskaia.ol@yandex.ru

Ращенко Андрей Игоревич – кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболитных лекарственных средств НЦИЛС, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0162-0653. E-mail: a.rashenko@yandex.ru

Бригадирова Анастасия Андреевна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0003-0957-7087. E-mail: a.brigadirova@gmail.com

Литвинов Роман Александрович – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории метаболитных лекарственных средств

НЦИЛС, ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России; научный сотрудник лаборатории экспериментальной фармакологии ГБУ ВМНЦ. ORCID ID: 0000-0002-0162-0653. E-mail: litvinov.volgsmu@mail.ru

Гурова Наталия Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и биоинформатики ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-0670-1444. E-mail: gurova.vlgmed@mail.ru

Смирнов Алексей Владимирович – доктор медицинских наук, заведующий кафедрой патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-5351-6105. E-mail: alexey-smirnov@rambler.ru

Паншин Николай Геннадьевич – кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической анатомии ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-4035-4108. E-mail: panshin.nickolay@gmail.com

Аббас Хайдер Сабри Аббас – магистрант лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ФГАОУ ВПО ЮФУ. E-mail: vip.haider89@gmail.ru

Морковник Анатолий Савельевич – доктор химических наук, главный научный сотрудник лаборатории органического синтеза НИИ ФОХ ФГАОУ ВПО ЮФУ. ORCID ID: 0000-0002-9182-6101. E-mail: asmork@mail.ru

УДК 615.03:615.72



ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЭКВИВАЛЕНТНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕННОГО ПРЕПАРАТА МОЛНУПИРАВИРА У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ

В.Б. Васильюк^{1,2}, А.Ю. Бородулева³, П.Д. Соболев³, А.Г. Никифорова³, В.Г. Мозговая⁴,
О.В. Филон⁴, А.В. Зинковская⁴, В.Г. Игнатьев⁴, М.Ю. Самсонов⁴, И.С. Козлова⁴, Е.К. Ханонина⁴

¹ Общество с ограниченной ответственностью «Научно-исследовательский центр Эко-безопасность»
(ООО «НИЦ Эко-безопасность»),

196143, Россия, г. Санкт-Петербург, пр-т Юрия Гагарина, д. 65

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Северо-Западный государственный медицинский университет имени И.И. Мечникова»

Министерства здравоохранения Российской Федерации,

191015, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Кирочная, д. 41

³ Общество с ограниченной ответственностью «Экзактэ Лабс»,

117246, Россия, Москва, Научный проезд, д. 20, стр. 2

⁴ Акционерное общество «Р-Фарм»,

123154, Россия, г. Москва, ул. Берзарина, д. 19, корп. 1

E-mail: khanonina@rpharm.ru

Получена 21.08.2022

После рецензирования 12.10.2022

Принята к печати 20.11.2022

Молнупиравир – один из препаратов этиотропной терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19, который подтвердил свою клиническую эффективность в терапии пациентов с лёгким и среднетяжёлым течением, в том числе с факторами риска развития тяжёлого течения.

Цель. Оценка биоэквивалентности воспроизведенного препарата молнупиравира АЛАРИО-ТЛ и оригинального препарата Лагеврио при однократном пероральном применении у здоровых добровольцев.

Материалы и методы. Данное исследование биоэквивалентности представляло собой открытое рандомизированное двухпериодное перекрестное исследование. В каждом из двух периодов добровольцы принимали однократно исследуемый или референтный препарат молнупиравира в виде капсул в дозе 200 мг. Отмывочный период между приемами препаратов составил 3 сут. Для определения фармакокинетических параметров и биоэквивалентности оценивали концентрацию основного метаболита молнупиравира N-гидроксицитидина (NHC) в плазме крови добровольцев. Отбор образцов плазмы крови производили в интервале от точки 0 до 16 ч в каждом из периодов исследования. Биоэквивалентность оценивали, сравнивая 90% доверительные интервалы (ДИ) для отношения средних геометрических значений $AUC_{(0-16)}$ и C_{max} исследуемого и референтного препаратов с установленными пределами эквивалентности, равными 80,00–125,00%.

Результаты. Всего в исследование было включено 28 здоровых добровольцев мужского пола. По результатам проведенного статистического анализа, 90% ДИ для отношения средних геометрических показателей $AUC_{(0-16)}$ и C_{max} после приема исследуемого и референтного препаратов составили 96,31% – 113,64% и 91,37% – 114,8%, соответственно. Данные интервалы укладываются в установленные пределы 80,00–125,00%, что подтверждает биоэквивалентность препаратов. При сравнении частоты регистрации отдельных нежелательных явлений не было выявлено достоверных различий после приема исследуемого и референтного препаратов.

Заключение. По результатам данного исследования можно заключить, что исследуемый и референтный препараты молнупиравира биоэквивалентны. Кроме того, полученные данные указывают на то, что препараты обладают сходными профилями безопасности.

Ключевые слова: COVID-19; молнупиравир; биоэквивалентность; фармакокинетика; N-гидроксицитидин

Список сокращений: COVID-19 – новая коронавирусная инфекция, вызванная вирусом SARS-CoV-2; NHC –

Для цитирования: В.Б. Васильюк, А.Ю. Бородулева, П.Д. Соболев, А.Г. Никифорова, В.Г. Мозговая, О.В. Филон, А.В. Зинковская, В.Г. Игнатьев, М.Ю. Самсонов, И.С. Козлова, Е.К. Ханонина. Исследование биоэквивалентности воспроизведенного препарата молнупиравира у здоровых добровольцев. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):562-572. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-562-572

© В.Б. Васильюк, А.Ю. Бородулева, П.Д. Соболев, А.Г. Никифорова, В.Г. Мозговая, О.В. Филон, А.В. Зинковская, В.Г. Игнатьев, М.Ю. Самсонов, И.С. Козлова, Е.К. Ханонина, 2022

For citation: V.B. Vasilyuk, A.Yu. Boroduleva, P.D. Sobolev, A.G. Nikiforova, V.G. Mozgovaya, O.V. Filon, A.V. Zinkovskaya, V.G. Ignatiev, M.Yu. Samsonov, I.S. Kozlova, E.K. Khanonina. Bioequivalence study of generic molnupiravir in healthy volunteers. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6):562-572. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-562-572

N-гидроксцитидин; ДИ – доверительный интервал; AUC – площадь под кривой «концентрация–время»; AUC_{0-t}/AUC_{0-16} – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» от нуля до последнего отбора крови при котором концентрация препарата равна или выше нижнего предела количественного определения; $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время», начиная с нулевого значения времени, экстраполированная до бесконечности; C_{max} – максимальная концентрация препарата в плазме крови; ННС-ТР – N-гидроксцитидин трифосфат; T_{max} – время достижения максимальной концентрации; ВЭЖХ-МС/МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией; GLP – надлежащая лабораторная практика; НЯ/СНЯ – нежелательное/серьезное нежелательное явление; ТСРП – тест сравнительной кинетики растворения; ИМТ – индекс массы тела.

BIOEQUIVALENCE STUDY OF GENERIC MOLNUPIRAVIR IN HEALTHY VOLUNTEERS

V.B. Vasilyuk^{1,2}, A.Yu. Boroduleva³, P.D. Sobolev³, A.G. Nikiforova³, V.G. Mozgovaya⁴,
O.V. Filon⁴, A.V. Zinkovskaya⁴, V.G. Ignatiev⁴, M.Yu. Samsonov⁴, I.S. Kozlova⁴, E.K. Khanonina⁴

¹ Limited Liability Company “Eco-Safety Scientific Research Center”,
65, Yuri Gagarin Ave., St. Petersburg, Russia, 196143

² North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov,
41, Kirochnaya Str., St. Petersburg, Russia, 191015

³ Limited Liability Company “Exacte Labs”,
Bldg 2, 20, Nauchny driveway, Moscow, Russia, 117246

⁴ Joint-Stock Company “R-Pharm”,
Bldg 1, 19, Berzarin Str., Moscow, Russia, 123154

E-mail: khanonina@rpharm.ru

Received 21 July 2022

After peer review 12 Oct 2022

Accepted 20 Nov 2022

Molnupiravir is one of the drugs for the etiotropic therapy of a new coronavirus infection COVID-19. It has confirmed its clinical efficacy in the treatment of patients with mild and moderate COVID-19, including those who are at high risk of progressing to severe disease.

The aim of the study was to evaluate bioequivalence of the generic drug molnupiravir ALARIO-TL and the original drug Lagevrio with a single oral administration in healthy volunteers.

Materials and methods. This bioequivalence study was an open, randomized, two-period crossover study. In each of the two periods, volunteers received a single dose of the test drug, or reference drug molnupiravir, in the form of capsules at the dose of 200 mg. The washout period between the doses was 3 days. To determine pharmacokinetic (PK) parameters and bioequivalence, the concentration of N-hydroxycytidine (NHC), the main molnupiravir metabolite in the blood plasma of volunteers was evaluated. The blood plasma sampling was carried out in the range from 0 to 16 hours in each of the study periods. Bioequivalence was assessed by comparing 90% confidence intervals (CIs) for the ratio of geometric means of $AUC_{(0-16)}$ and C_{max} of the test drug and reference drugs with the established equivalence limits of 80.00 – 125.00%.

Results. A total of 28 healthy male volunteers were included in the study. According to the results of the statistical analysis, after the administration of the test and reference drugs, the 90% CIs for the ratio of the geometric means of $AUC_{(0-16)}$ and C_{max} were 96.31% – 113.64% and 91.37% – 114.8%, respectively. These intervals fit within the established limits of 80.00–125.00%, which confirms the bioequivalence of the drugs. When comparing the frequency of the individual adverse events registration, no significant differences were found out after the administration of the test and reference drugs.

Conclusion. Based on the results of this study, it can be concluded that the test and reference drugs of molnupiravir are bioequivalent. In addition, the data obtained indicate that the drugs have similar safety profiles.

Keywords: COVID-19; molnupiravir; bioequivalence; pharmacokinetics; N-hydroxycytidine

Abbreviations. COVID-19 – a novel coronavirus infection caused by the SARS-CoV-2 virus; NHC, N-hydroxycytidine; CI – confidence interval; AUC – area under the concentration-time curve; AUC_{0-t}/AUC_{0-16} – area under the concentration-time pharmacokinetic curve from zero to the last blood withdrawal at which the drug concentration is equal to or higher than the lower limit of quantitation; $AUC_{0-\infty}$ – area under the concentration-time pharmacokinetic curve, starting from zero time, extrapolated to infinity; C_{max} – the maximum concentration of the drug in blood plasma; ННС-ТР – N-hydroxycytidine triphosphate; T_{max} – time to reach the maximum concentration; HPLC-MS/MS – high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; GLP – Good Laboratory Practice; AE/SAE – undesirable/serious adverse event; CDKT – comparative dissolution kinetics test; BMI – body mass index.

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия новой коронавирусной инфекции (COVID-19) существенно увеличила нагрузку на системы здравоохранения по всему миру и потребовала решительных мер, в частности, активного поиска эффективных методов лечения [1–4]. В настоящий момент для лечения COVID-19 существует 3 основных направления терапии: этиотропная (противовирусная), патогенетическая и симптоматическая.

Молнупиравир относится к противовирусным препаратам, эффективным в отношении SARS-CoV-2. Он представляет собой пролекарство, которое по химической структуре является 5'-изобутиратным эфиром аналога рибонуклеозида N-гидроксицитидина (ННС). Попадая в кровоток, молнупиравир гидролизруется до ННС, который при проникновении в клетку превращается в фармакологически активный N-гидроксицитидин трифосфат (ННС-ТР). ННС-ТР, в свою очередь, встраивается в вирусную РНК с помощью РНК-полимераз вируса и генерирует ошибки в его генетическом коде. Ошибки генома, вызванные ННС-ТР, накапливаются, нарушая репликацию вируса. Таким образом, реализуется противовирусное действие молнупиравира [5–7].

В клинических исследованиях молнупиравир продемонстрировал эффективность в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19 и благоприятный профиль безопасности [8–12]. Рекомендованным режимом дозирования молнупиравира при COVID-19 является прием 800 мг 2 р/сут независимо от приема пищи в течение 5 дней.

В конце 2021 года молнупиравир был одобрен для применения у взрослых пациентов с COVID-19 лёгкого и среднетяжёлого течения с факторами риска развития тяжёлого течения в различных странах, в т.ч. в США, странах Европы и Великобритании. Помимо этого, он внесен во Временные методические рекомендации Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», начиная с версии 14 от 27.12.2021 г.

Оригинальным препаратом молнупиравира является Лагеврио, который был зарегистрирован в России в 2022 г. ООО «МСД Фармасьютикалс» и представлен в форме капсул с дозировкой 200 мг. ООО «Технология лекарств» был разработан воспроизведенный препарат молнупиравира – АЛАРИО-ТЛ. Для подтверждения биоэквивалентности разработанного воспроизведенного и оригинального препаратов было проведено настоящее исследование биоэквивалентности.

ЦЕЛЬ. Оценка биоэквивалентности воспроизведенного препарата молнупиравира АЛАРИО-ТЛ и оригинального препарата Лагеврио при однократном пероральном применении у здоровых добровольцев.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Дизайн исследования

Оценка биоэквивалентности препаратов производилась в рамках 1-го этапа клинического исследования с комбинированным двухэтапным дизайном (№ CJ051025138). Первый этап данного исследования, то есть исследование биоэквивалентности, представлял собой рандомизированное двухпериодное перекрестное исследование с однократным пероральным приемом исследуемого и референтного препаратов натощак в дозе 200 мг здоровыми добровольцами.

Дизайн исследования был разработан с учетом как российских рекомендаций по проведению исследований биоэквивалентности¹, так и международных руководств². Также при планировании дизайна были учтены рекомендации ВОЗ³ по проведению исследований биоэквивалентности препаратов на основе молнупиравира.

До начала исследования протокол № CJ051025138 был одобрен Минздравом России и Советом по этике при нем (разрешение № 294 от 20.04.2022 г.), а также локальным этическим комитетам исследовательского центра (протокол № 236 от 28.04.2022 г.). Исследование проводилось в полном соответствии с требованиями надлежащей клинической практики Международного совета по гармонизации (ICH GCP) E6 (R2), правилами надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза, этическими принципами Хельсинкской декларации последнего пересмотра и другими применимыми законодательными актами Российской Федерации и Евразийского экономического союза.

Клинический этап исследования биоэквивалентности был проведен на базе центра ООО «НИЦ Эко-безопасность» в период с 28 апреля по 18 мая 2022 г.

Перед началом исследования был проведен тест сравнительной кинетики растворения (ТСКР) и сравнительное количественное определение с использованием тех же серий, которые в дальнейшем использовались в исследовании биоэквивалентности. ТСКР проводили с использованием прибора

¹ Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 03.11.2016 № 85 «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза».

² Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on the investigation of bioequivalence. Doc. Ref.: CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev. 1/ Corr **, 2010. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-bioequivalence-rev1_en.pdf

³ Рекомендациям ВОЗ по изучению препаратов, содержащих в качестве действующего вещества молнупиравир. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://extranet.who.int/pqweb/sites/default/files/documents/BE_molnupiravir_Nov2021.pdf

типа «Лопастная мешалка» и приспособления для погружения в условиях вращения мешалки 75 об/мин, температуре $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ и объеме среды – 900 мл. Для испытания использовали три среды растворения: буферный раствор pH 1,2; ацетатный буферный раствор pH 4,5; фосфатный буферный раствор pH 6,8. Анализ проб в точках 10, 15, 20, 30, 45, 60 мин выполняли методом УФ-спектрофотометрии. В результате как для исследуемого, так и референтного препарата, во всех средах наблюдалось высвобождение более 85% действующего вещества в течение 15 мин, что позволило считать кинетику растворения эквивалентной без математической оценки. Количественное определение показало, что содержание действующего вещества в препаратах отличается не более, чем на 5%, а профили высвобождения молнупиравира при ТСКР эквивалентны, что подтверждало корректность выбора серий исследуемого и референтного препаратов.

Исследуемая популяция

В общей сложности в данном исследовании был скринирован 31 здоровый доброволец, скрининг успешно прошли и рандомизированы 28 добровольцев (по 14 добровольцев в каждой группе). Рандомизация проводилась методом конвертов. К основным критериям включения относились: мужской пол; возраст 18–45 лет; индекс массы тела $18,5\text{--}30\text{ кг/м}^2$, верифицированный диагноз «здоров» по данным стандартных клинических, лабораторных и инструментальных методов обследования. К участию в исследовании не допускались добровольцы с положительным тестом на SARS-CoV-2, отягощенным аллергологическим анамнезом, гиперчувствительностью к компонентам исследуемых препаратов, а также хроническими заболеваниями различных систем органов. К критериям досрочного исключения добровольцев из исследования относились: отзыв информированного согласия, возникновение нежелательных явлений (НЯ) или серьезных нежелательных явлений (СНЯ) у добровольцев, при которых дальнейшее участие в исследовании было нежелательным, смерть, прием запрещенной терапии, а также существенные нарушения требований протокола. Замена выбывших добровольцев не была предусмотрена.

Прием исследуемых препаратов

Исследуемым объектом (Т) в настоящем исследовании был воспроизведенный препарат молнупиравира – АЛАРИО-ТЛ (АО «Р-Фарм», Россия), в лекарственной форме капсулы, 200 мг. В качестве референтного препарата (R) использовался оригинальный препарат Лагеврио, капсулы, 200 мг (Patheon Pharma Services, Thermo Fisher Scientific Inc, США). Добровольцев рандомизировали в одну из групп с разной последовательностью

приема препаратов (TR или RT). Прием препаратов осуществлялся двукратно с интервалом 3 сут в дозе 200 мг (по 1 капсуле). Соответственно, в группе № 1 (TR) добровольцы в 1 периоде однократно принимали исследуемый препарат, а в периоде 2 – препарат сравнения; в группе № 2 (RT) – наоборот. Длительность отмывочного периода была выбрана с целью исключить возможное влияние приема молнупиравира в 1-м периоде исследования на фармакокинетические (ФК) параметры препарата во 2 периоде. Средний период полувыведения основного метаболита молнупиравира ННС составляет около 3,3 ч. Таким образом, для гарантированного снижения концентрации молнупиравира ниже порога количественного определения у добровольцев в начале 2-го периода исследования промежуток между приемами препаратов должен составлять, по крайней мере, 5 периодов полувыведения, то есть не менее 16,5 ч.

Препараты принимали утром натощак после воздержания от приема пищи не менее 10 ч, запивая 200 мл негазированной питьевой воды комнатной температуры. Добровольцы должны были находиться в положении «сидя» в течение 4 ч после приема препарата (было допустимо вставать и ходить, не допускалось положение «лежа»). В случае, если в течение первых 4 ч после приема препарата в любом из периодов исследования у добровольца возникала рвота или диарея, он выбывал из исследования.

Отбор проб и пробоподготовка

Временные точки отбора биообразцов для оценки концентрации ННС в плазме были выбраны таким образом, чтобы получить наиболее полные данные для каждого фрагмента фармакокинетической кривой. С этой целью был предусмотрен частый отбор образцов вблизи T_{max} (~1 ч при приеме молнупиравира в дозе 200 мг), а также не менее 3–4 точек в течение терминальной фазы. Таким образом, отбор биообразцов производился в следующих точках: перед приемом исследуемого/референтного препарата и далее через 15, 30, 45, 60 мин, 1 ч 15 мин, 1 ч 30 мин, 1 ч 45 мин, 2 ч, 2 ч 15 мин, 2 ч 30 мин, 2 ч 45 мин., 3 ч., 3 ч 30 мин., 4 ч, 5 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч и 16 ч после приема препарата в каждом из 2-х периодов исследования (всего 21 точка отбора в периоде). Перенос сроков забора образцов крови для определения концентрации молнупиравира не допускался в первые 2 ч; допускался не более, чем на 5 мин в период с 3 до 16 ч.

Венозную кровь в объеме не менее 6 мл отбирали в специальные пробирки-вакутейнеры, содержащие антикоагулянт $\text{K}_2\text{ЭДТА}$. Плазму крови отделяли центрифугированием с ускорением 2000 g в течение 10 мин. Далее пробирки замораживали и хранили при температуре не выше -65°C . Промежуток времени между отбором крови, ее центрифугированием и замораживанием не превышал 30 мин.

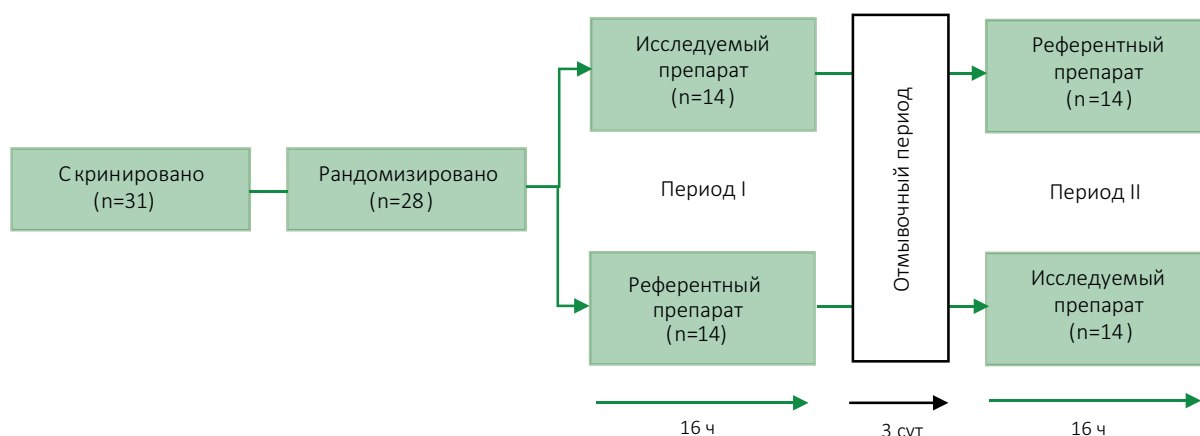


Рисунок 1 – Дизайн исследования биоэквивалентности

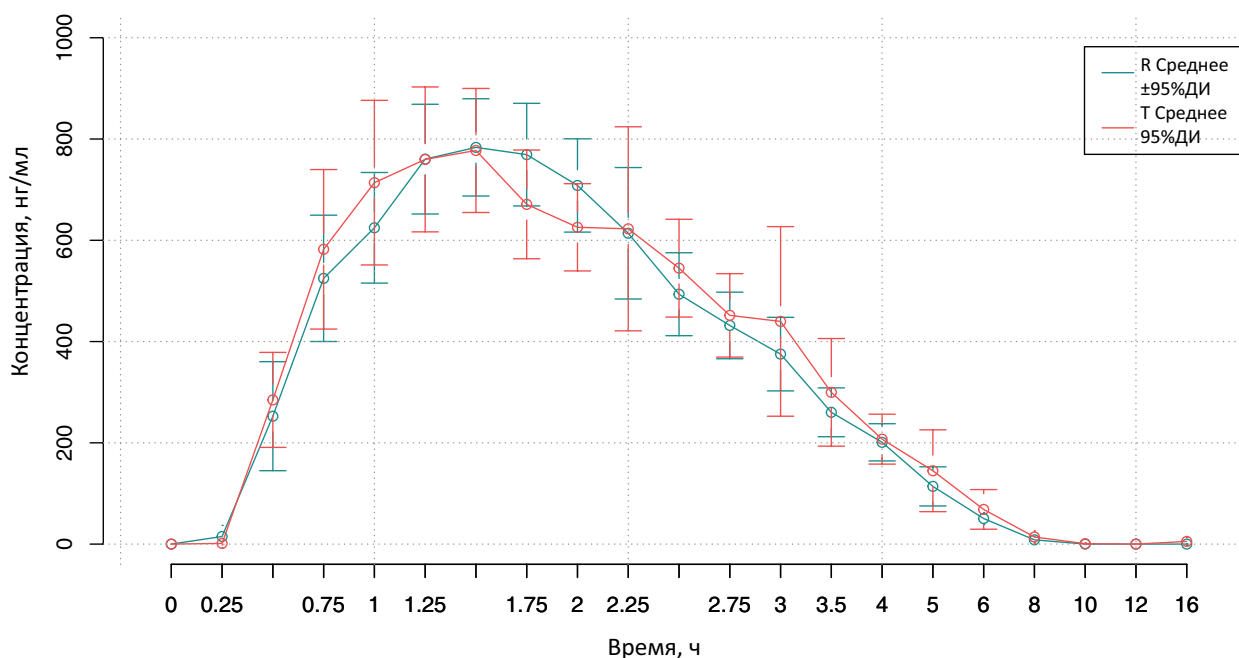


Рисунок 2 – Динамика концентраций метаболита ННС (среднее и 95% ДИ) после приема исследуемого и референтного препаратов (n = 28)

Примечание: R – референтный препарат, T – исследуемый препарат.

Таблица 1 – Полученные значения фармакокинетических параметров после приема исследуемого и референтного препаратов (n = 28)

ФК показатели	Исследуемый препарат (n = 28)	Референтный препарат (n = 28)
$AUC_{(0-16)'} (нг/мл)*ч$	2229,66 ($\pm 963,99$)	2083,21 ($\pm 656,45$)
C_{max}' нг/мл	1028,12 ($\pm 503,31$)	972,68 ($\pm 317,16$)
$AUC_{(0-\infty)'} (нг/мл)*ч$	2327,01 ($\pm 984,49$)	2154,71 ($\pm 673,22$)
T_{max}' ч	1,3 (0,8–2,5)	1,5 (0,8–2,3)
$T_{1/2}'$ ч	1,7 ($\pm 0,42$)	1,58 ($\pm 0,26$)

Примечание: n – число наблюдений; C_{max} – максимальная концентрация лекарственного вещества в крови добровольцев; T_{max} – время достижения C_{max} ; $T_{1/2}$ – период полувыведения; $AUC_{(0-16)'}$ – суммарная площадь под кривой «концентрация – время» в интервале времени от 0 до 16 часов; $AUC_{(0-\infty)'}$ – площадь под кривой «концентрация-время» в интервале времени от 0 до бесконечности.

Таблица 2 – Значения рассчитанных 90% ДИ для отношений средних геометрических значений фармакокинетических показателей ННС после приема исследуемого и референтного препаратов

Показатель	Соотношение средних геометрических T/R	Рассчитанные значения 90% ДИ	CV _{intra} ¹
AUC ₍₀₋₁₆₎	104,6%	96,31% – 113,64%	18,30%
C _{max}	102,4%	91,37% – 114,80%	25,44%

Примечание: ¹ – CV_{intra} – интраиндивидуальный коэффициент вариальности; ДИ – доверительные интервалы; Т – исследуемый препарат, R – референтный препарат.

Таблица 3 – Сводная таблица частоты НЯ после приема каждого из препаратов

Нежелательное явление	Исследуемый препарат (N = 28)	Референтный препарат (N = 28)	Значение p ¹
Нарушения со стороны сердечно-сосудистой системы			
Повышение диастолического артериального давления	1 (3,6%)	0 (0,0%)	1,000
Лабораторные и инструментальные данные			
Повышение числа лейкоцитов	0 (0,0%)	1 (3,6%)	1,000
Снижение числа лимфоцитов	1 (3,6%)	0 (0,0%)	1,000
Увеличение числа лимфоцитов	1 (3,6%)	0 (0,0%)	1,000
Повышение уровня креатинфосфокиназы	1 (3,6%)	0 (0,0%)	1,000

Примечание: ¹ – критерий Мак-Немара с поправкой Эдвардса. Все НЯ, приведенные в таблице, относятся к 1 степени тяжести.

Аналитический метод

В качестве аналита в данном исследовании был выбран основной метаболит молнупиравира – ННС, поскольку молнупиравир подвергается гидролизу до ННС раньше, чем достигает системного кровотока, вследствие чего неизмененный молнупиравир практически не определяется в крови.

Вся пробоподготовка проводилась в условиях охлаждения на ледяной бане, поскольку при комнатной температуре гидролиз молнупиравира ферментами плазмы продолжался после отбора проб. Извлечение ННС из плазмы крови осуществляли путем осаждения белков плазмы крови охлажденным метанолом, содержащим 0,1% муравьиной кислоты.

Определение концентрации ННС в плазме крови было проведено с использованием валидированной методики высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Методика определения была разработана и валидирована в соответствии со стандартами надлежащей лабораторной практики (GLP) и рекомендациям Приложения № 6 к «Правилам проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов» в рамках Евразийского экономического союза. Валидация была проведена по основным характеристикам методики: степень извлечения соединений из плазмы и матричный эффект; нижний предел количественного определения (НПКО); калибровочный диапазон; точность и прецизионность; селективность (специфичность); перенос пробы; стабильность соединений.

Анализ полученных образцов проводили на

высокоэффективном жидкостном хроматографе Infinity 1290 (Agilent) с масс-спектрометрическим детектором Triple Quad 5500+ (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур) с тройным квадруполом и ионизацией электроспреем. Хроматографическое разделение осуществляли на хроматографической колонке Phenomenex Kinetex EVO C18 (100A 50×2,1 мм, 2,6 мкм) в градиентном режиме элюирования при скорости потока 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы составил 2 мкл. В качестве подвижной фазы использовали смесь растворов ацетата аммония и метанола. В этих условиях время удерживания для N-гидроксицитидина составило 0,5 мин, внутреннего стандарта толбутамида – 1,8 мин. Общее время анализа составило 4 мин.

Для селективного и чувствительного детектирования исследуемых соединений были выбраны оптимальные условия ионизации в электроспрее и регистрации отрицательно заряженных ионов (MRM переходы для ННС составили 258,2/126,1, для толбутамида – 269,1/170,2).

Количественную обработку данных проводили в программе Analyst 1.7.2, (AB Sciex Pte. Ltd., Сингапур) методом внутреннего стандарта (раствор толбутамида в концентрации 1 мг/мл).

Концентрация аналита рассчитывалась из калибровочной зависимости отношения площади хроматографического пика аналита к площади пика внутреннего стандарта от номинальной концентрации аналита. Калибровочные кривые представляли собой линейные функции, линейный диапазон концентраций для ННС составил 20–5000 нг/мл.

Оценка безопасности

С целью анализа безопасности проводилась периодическая оценка физиологических (артериальное давление, частота пульса, температура тела), гематологических (эритроциты, гемоглобин, тромбоциты, лейкоцитарная формула, скорость оседания эритроцитов) и биохимических (аланинаминотрансфераза, аспартатаминотрансфераза, лактатдегидрогеназа, креатинфосфокиназа, мочевиная кислота, глюкоза, билирубин общий, креатинин) показателей, анализа мочи, а также регистрация НЯ и СНЯ. Соответствующие лабораторные и инструментальные обследования производились на скрининге, а также на очных визитах в 1, 4 и 6 сут от начала исследования. Дополнительной точкой для мониторинга безопасности был выбран телефонный визит на 10 ± 1 сут. В качестве конечных точек для оценки безопасности были выбраны: частота и тяжесть всех случаев НЯ и СНЯ, частота случаев НЯ 3–5 степени по NCI CTCAE 5.0, а также частота случаев досрочного прекращения участия в исследовании, связанных с НЯ/СНЯ.

Статистический анализ

Статистический анализ был проведен при помощи программного пакета для статистического анализа R, версия 4.2.0. (R Foundation, Австрия).

Расчет размера выборки производился с учетом выбранного уровня статистической значимости α , равного 0,05, мощности – 0,8 (80%), а также интраиндивидуального коэффициента вариации для $C_{\max}$ и AUC 22% молнупиравира – 0,22 (22%).

Анализ фармакокинетики и биоэквивалентности проводили в популяции всех добровольцев, у которых было пропущено не более 2 отборов образцов крови в каждом из периодов, и не более 2-х отборов подряд. Анализ безопасности проводили в популяции всех участников, получивших хотя бы одну дозу исследуемого или референтного препаратов.

На основании полученных значений концентраций ННС в плазме крови добровольцев, в предусмотренные настоящим протоколом временные интервалы были рассчитаны основные фармакокинетические показатели: $C_{\max}$ – максимальная концентрация лекарственного вещества в крови добровольцев; $T_{\max}$ – время достижения $C_{\max}$; $AUC_{(0-t)}$ – суммарная площадь под кривой «концентрация-время» в интервале времени от 0 до 16 часов; $T_{1/2}$ – период полувыведения; $AUC_{(0-\infty)}$ – площадь под кривой «концентрация-время» в интервале времени от 0 до бесконечности.

Все вышеперечисленные параметры были представлены с помощью среднего арифметического + стандартное отклонение ($M \pm SD$), за исключением $T_{\max}$, для которого использовали медиану, минимум и максимум.

Оценка биоэквивалентности препаратов

производилась путем сравнения границ доверительных интервалов (ДИ) для отношения геометрических средних показателей $AUC_{(0-16)}$ и $C_{\max}$ после приема исследуемого и референтного препаратов с установленными границами эквивалентности, равными 80,00–125,00%. Для установления биоэквивалентности использовался дисперсионный анализ (ANOVA) логарифмически преобразованных показателей ННС, необходимых для оценки биоэквивалентности (AUC и $C_{\max}$). На основе остаточной вариации дисперсионных моделей были рассчитаны коэффициенты вариации исследуемых показателей и построены соответствующие ДИ (в логарифмической шкале) для поиска различия между сравниваемыми лекарственными препаратами. Полученные ДИ подвергались обратному преобразованию, чтобы построить желаемые ДИ для отношения средних в исходных (не преобразованных) единицах измерения.

Статистический анализ принимал во внимание источники варибельности, способные повлиять на изучаемую переменную. В моделях дисперсионного анализа использовались фиксированные факторы: последовательность применения препаратов, субъект исследования, вложенный в последовательность, период и лекарственный препарат. Дисперсионный анализ применялся для проверки гипотез о статистической значимости вклада каждого из указанных факторов в наблюдаемую варибельность. Полученная с помощью дисперсионного анализа оценка остаточной вариации использовалась при расчете 90%-ного доверительного интервала для отношения средних значений соответствующего фармакокинетического показателя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Популяция

Всего в исследование было включено 28 добровольцев мужского пола. Все рандомизированные добровольцы были представителями европеоидной расы. Рост и масса тела участников исследования находились в пределах нормальных значений по индексу массы тела (ИМТ). Средний возраст составил $26,46 (\pm 4,74)$ лет, масса тела – $77,55 (\pm 9,20)$ кг, а ИМТ – $23,71 (\pm 2,07)$ кг/м². Все добровольцы завершили исследование согласно протоколу, в связи с чем были включены в популяцию для оценки фармакокинетики и биоэквивалентности.

Оценка фармакокинетики и биоэквивалентности

По результатам анализа концентрации ННС в плазме крови добровольцев были рассчитаны основные параметры фармакокинетики молнупиравира, представленные в таблице 1.

Значения показателей представлены в виде среднего арифметического (стандартное

отклонение), кроме $T_{\max}$, который представлен в виде медианы (минимум – максимум).

Фармакокинетические параметры молнупиравира после приема исследуемого и референтного препаратов были схожи между собой. Так максимальная концентрация $C_{\max}$ NHC после приема исследуемого препарата составила $1028,12 \pm 503,31$ нг/мл, в то время как после приема референтного препарата этот показатель был равен в среднем $972,68 \pm 317,16$ нг/мл. Площадь под кривой, оцененная за период до 16 ч после приема лекарственного препарата $AUC_{(0-16)}$ была равна $2229,66 \pm 963,99$ нг*ч/мл после приема исследуемого препарата и $2083,21 \pm 656,45$ нг*ч/мл после приема референтного препарата.

На рисунке 2 представлен график изменения концентраций NHC после приема исследуемого и референтного препаратов.

После расчета ФК показателей была проведена статистическая оценка биоэквивалентности. Поскольку результаты расчетов показали, что $AUC_{(0-16)}$ составляла более 80% от значения $AUC_{(0-\infty)}$, для установления биоэквивалентности использовались значения $AUC_{(0-16)}$.

По результатам проведенного статистического анализа, 90% ДИ для отношения средних геометрических $AUC_{(0-16)}$ исследуемого и референтного препаратов составили 96,31% – 113,64% по NHC. Для соотношения средних геометрических $C_{\max}$ исследуемых препаратов 90% ДИ составил 91,37% – 114,8%. Полученные интервалы соответствуют установленному пределу эквивалентности для $AUC_{(0-16)}$ и $C_{\max}$ – 80,00–125,00%, что свидетельствует о биоэквивалентности исследуемых препаратов (табл. 2). Результаты ANOVA показали, что такие источники вариации, как различия между лекарственными препаратами, между субъектами (межиндивидуальные различия), а также последовательность приема и периоды исследования не оказывали значимого влияния на оцениваемые переменные.

Безопасность

На протяжении всего исследования как исследуемый, так и референтный препараты хорошо переносились добровольцами. Показатели гематологического и биохимического анализа крови, а также анализа мочи и физиологических показателей у большинства добровольцев оставались в норме в течение всего исследования. Любые отклонения от нормы лабораторных и инструментальных показателей регистрировали в качестве НЯ. Всего в исследовании было зарегистрировано 5 НЯ: повышение диастолического артериального давления, повышение числа лейкоцитов, снижение или увеличение числа лимфоцитов, повышение уровня креатинфосфокиназы. Зарегистрированные отклонения имели случайный разнонаправленный

характер. Все НЯ имели 1 степень тяжести по СТСАЕ 5.0. Перечень НЯ представлен в таблице 3.

По заключению исследователей все зарегистрированные НЯ были не связаны с исследуемыми препаратами, т.е. степень связи расценена как «сомнительная».

При сравнении частоты регистрации отдельных НЯ не было выявлено достоверных различий ($p > 0,05$) после приема исследуемого препарата и референтного препаратов, на основании чего можно сделать вывод о схожей переносимости препаратов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Молнупиравир по своей структуре является низкомолекулярным рибонуклеозидным пролекарством, которое гидролизует в крови до N-гидроксицитидина. Молнупиравир обладает противовирусной активностью в отношении различных вариантов SARS-CoV-2 [13–15] и других РНК-содержащих вирусов, таких как вирус гриппа, вирус Эбола и респираторно-синцитиальный вирус [16–20]. В ходе доклинической разработки в испытаниях *in vitro* и *in vivo* молнупиравир показал высокую эффективность против SARS-CoV-2, а также низкую токсичность в отношении животных [21, 22]. В клинических исследованиях, проведенных для оригинального препарата, молнупиравир продемонстрировал эффективность в терапии новой коронавирусной инфекции COVID-19 легкого и среднетяжелого течения [11, 12, 23, 24]. В наиболее масштабном исследовании 3-й фазы MOVE-OUT (NCT04575597), в которое было включено 1433 пациента, было установлено, что молнупиравир в дозе 800 мг 2 р/сут в течение 5 дней достоверно снижал риск госпитализации или смерти по сравнению с плацебо [12]. В популяции mITT, представленной рандомизированными пациентами, которые приняли по крайней мере одну дозу молнупиравира или плацебо и не были госпитализированы до начала терапии, частота госпитализации или смерти составила 6,8% (48 из 709 пациентов) в группе молнупиравира и 9,7% (68 из 699 пациентов) в группе плацебо. Разница между группами составила 3% [95% ДИ –5,9; –0,1]. Кроме того, препарат продемонстрировал благоприятный профиль безопасности. Доля пациентов, у которых было зарегистрировано хотя бы одно НЯ, была сходной в обеих группах (30,4% в группе молнупиравира и 33,0% в группе плацебо). Учитывая широкое распространение новой коронавирусной инфекции COVID-19, выход на рынок биоэквивалентного воспроизведенного препарата молнупиравира позволит повысить доступность эффективного и безопасного лечения данного заболевания.

В результате проведенного исследования биоэквивалентности было установлено, что

ФК параметры воспроизведенного препарата молнупирифа сопоставимы с параметрами референтного (оригинального) препарата. Кроме того, ФК параметры исследуемого препарата оказались сопоставимы с данными, полученными в результате исследования 1-х фазы оригинального препарата Лагеврио. Так среднее геометрическое $C_{\max}$ полученное в исследовании EIDD-2801-1001-UK [25] оригинального препарата при однократном приеме 200 мг составило 926 нг/мл, при этом среднее геометрическое этого показателя для исследуемого препарата в данном исследовании биоэквивалентности составило 950 нг/мл. Аналогичные тенденции прослеживаются и по показателю $AUC_{0-\infty}$: значение среднего геометрического показателя в исследовании оригинального препарата составило 1830 нг*ч/мл, а исследуемого препарата в данном исследовании биоэквивалентности – 2189 нг*ч/мл.

После расчета ФК показателей исследуемого и референтного препаратов в данном исследовании было проведено статистическое определение биоэквивалентности, по результатам которого было установлено, что полученные 90% ДИ полностью укладываются в требуемый диапазон 80,00–125,00% для $AUC_{(0-16)}$ и $C_{\max}$, который был установлен в соответствии с протоколом и «Правилами проведения исследования биоэквивалентности лекарственных препаратов» в рамках Евразийского Экономического Союза, утвержденными Решением Совета Евразийской Экономической Комиссии № 85 от 03.11.2016 г., а также международным

руководством по биоэквивалентности Европейского агентства лекарственных средств (ЕМА).

Спектр зарегистрированных НЯ соответствовал профилю безопасности оригинального препарата молнупирифа. Частота регистрации НЯ не имела различий после приема исследуемого и референтного препаратов. Таким образом, можно заключить, что в рамках проведенного клинического исследования исследуемый и референтный препараты продемонстрировали аналогичные характеристики безопасности.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведения данного исследования биоэквивалентности были получены результаты, полностью соответствующие всем критериям для лекарственных препаратов, установленным в общепризнанных международных руководствах. Таким образом, можно заключить, что исследуемый и референтный препараты молнупирифа являются биоэквивалентными. Также по результатам исследования можно сделать вывод о том, что препараты обладают сходными профилями безопасности.

На основании результатов проведенного исследования биоэквивалентности и безопасности в июле 2022 г. лекарственный препарат АЛАРИО-ТЛ был зарегистрирован в Российской Федерации по процедуре регистрации препаратов, предназначенных для применения в условиях угрозы возникновения, возникновения и ликвидации чрезвычайных ситуаций⁴.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование выполнено при финансировании группы компаний АО «Р-Фарм».

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Клиническое исследование было организовано спонсором АО «Р-Фарм».

Авторы статьи: В.Г. Мозговая, О.В. Филон, А.В. Зинковская, В.Г. Игнатьев, М.Ю. Самсонов, И.С. Козлова, Е.К. Ханонина являются сотрудниками компании АО «Р-Фарм».

ВКЛАД АВТОРОВ

В.Б. Василюк – проведение исследования; А.Ю. Бородулаева, П.В. Соболев, А.Г. Никифорова – разработка, валидация аналитической части, анализ биобразцов; В.Г. Мозговая, О.В. Филон – разработка дизайна исследования, написание и редактирование текста; И.С. Козлова, Е.К. Ханонина – анализ результатов, написание и редактирование текста публикации; А.В. Петкова – статистическая обработка результатов исследования; В.Г. Игнатьев, М.Ю. Самсонов – постановка цели, разработка дизайна исследования.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study // The Lancet. – 2020. – Vol. 395, No. 10229. – P. 1054–1062. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30566-3. Erratum in: Lancet. – 2020. – Vol. 395, No. 10229. – Art. ID: 1038. Erratum in: Lancet. – 2020. – Vol. 395, No. 10229. – Art. ID: 1038.
 2. Walsh K.A., Spillane S., Comber L., Cardwell K., Harrington P., Connell J., Teljeur C., Broderick N., de Gascun C.F., Smith S.M., Ryan M., O'Neill M. The duration of infectiousness of individuals infected with SARS-CoV-2 // J. Infect. – 2020. – Vol. 81, No. 6. – P. 847–856. DOI:10.1016/j.jinf.2020.10.009
- ⁴ Государственный реестр лекарственных средств. АЛАРИО-ТЛ. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=ad6c6196-0400-4d82-a656-56178a7c6e85

3. Ng T.I., Correia I., Seagal J., DeGoey D.A., Schrimpf M.R., Hardee D.J., Noey E.L., Kati W.M. Antiviral Drug Discovery for the Treatment of COVID-19 Infections. // *Viruses*. – 2022. – Vol. 14, No. 5. – Art. ID: 961. DOI:10.3390/v14050961
4. Rahmah L., Abarikwu S.O., Arero A.G., Essouma M., Jibril A.T., Fal A., Flisiak R., Makuku R., Marquez L., Mohamed K., Ndow L., Zarębska-Michaluk D., Rezaei N., Rzymiski P. Oral antiviral treatments for COVID-19: opportunities and challenges. *Pharmacol Rep*. 2022 Dec;74(6):1255–1278. DOI:10.1007/s43440-022-00388-7
5. Singh A.K., Singh A., Singh R., Misra A. Molnupiravir in COVID-19: A systematic review of literature // *Diabetes Metab. Syndr.* – 2021. – Vol. 15, No. 6. – Art. ID: 102329. DOI:10.1016/j.dsx.2021.102329
6. Kabinger F., Stiller C., Schmitzová J., Dienemann C., Kovic G., Hillen H.S., Höbartner C., Cramer P. Mechanism of molnupiravir-induced SARS-CoV-2 mutagenesis // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2021. – Vol. 28, No. 9. – P. 740–746. DOI:10.1038/s41594-021-00651-0
7. Tian L., Pang Z., Li M., Lou F., An X., Zhu S., Song L., Tong Y., Fan H., Fan J. Molnupiravir and Its Antiviral Activity Against COVID-19 // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – Art. ID: 855496. DOI:10.3389/fimmu.2022.855496
8. Johnson M.G., Puenpatom A., Moncada P.A., Burgess L., Duke E.R., Ohmagari N., Wolf T., Bassetti M., Bhagani S., Ghosn J., Zhang Y., Wan H., Williams-Diaz A., Brown M.L., Paschke A., De Anda C. Effect of Molnupiravir on Biomarkers, Respiratory Interventions, and Medical Services in COVID-19 : A Randomized, Placebo-Controlled Trial // *Ann. Intern. Med.* – 2022. – Vol. 175, No. 8. – P. 1126–1134. DOI:10.7326/M22-0729
9. Amani B., Zareei S., Amani B. Rapid review and meta-analysis of adverse events associated with molnupiravir in patients with COVID-19 // *Br. J. Clin. Pharmacol.* – 2022. – Vol. 88, No. 10. – P. 4403–4411. DOI: 10.1111/bcp.15449
10. Fischer W.A. (2nd), Eron J.J. Jr., Holman W., Cohen M.S., Fang L., Szcwczuk L.J., Sheahan T.P., Baric R., Mollan K.R., Wolfe C.R., Duke E.R., Azizad M.M., Borroto-Esoda K., Wohl D.A., Coombs R.W., James Loftis A., Alabanza P., Lipansky F., Painter W.P. A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus // *Sci. Transl. Med.* – 2022. – Vol. 14, No. 628. – Art. ID: eabl7430. DOI:10.1126/scitranslmed.abl7430
11. Caraco Y., Crofoot G.E., Moncada P.A., Galustyan A.N., Musungaie D.B., Payne B., Kovalchuk E., Gonzalez A., Brown M.L., Williams-Diaz A., Gao W., Strizki J.M., Grobler J., Du J., Assaid C.A., Paschke A., Butterson J.R., Johnson M.G., de Anda C. Phase 2/3 trial of molnupiravir for treatment of Covid-19 in non-hospitalized adults // *NEJM Evidence*. – 2022. – Vol. 1, No. 2. DOI:10.1056/EVIDo21100043
12. Jayk Bernal A., Gomes da Silva M.M., Musungaie D.B., Kovalchuk E., Gonzalez A., Delos Reyes V., Martín-Quiros A., Caraco Y., Williams-Diaz A., Brown M.L., Du J., Pedley A., Assaid C., Strizki J., Grobler J.A., Shamsuddin H.H., Tipping R., Wan H., Paschke A., Butterson J.R., Johnson M.G., De Anda C. – Vol. MOVE-OUT Study Group. Molnupiravir for Oral Treatment of Covid-19 in Nonhospitalized Patients // *N. Engl. J. Med.* – 2022. – Vol. 386, No. 6. – P. 509–520. DOI:10.1056/NEJMoa2116044
13. Abdelnabi R., Foo C.S., De Jonghe S., Maes P., Weynand B., Neyts J. Molnupiravir Inhibits Replication of the Emerging SARS-CoV-2 Variants of Concern in a Hamster Infection Model // *J. Infect. Dis.* – 2021. – Vol. 224, No. 5. – P. 749–753. DOI:10.1093/infdis/jiab361
14. Sheahan T.P., Sims A.C., Zhou S., Graham R.L., Pruijssers A.J., Agostini M.L., Leist S.R., Schäfer A., Dinnon K.H. (3rd), Stevens L.J., Chappell J.D., Lu X., Hughes T.M., George A.S., Hill C.S., Montgomery S.A., Brown A.J., Bluemling G.R., Natchus M.G., Saindane M., Kolykhalov A.A., Painter G., Harcourt J., Tamin A., Thornburg N.J., Swanstrom R., Denison M.R., Baric R.S. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice // *Sci. Transl. Med.* – 2020. – Vol. 12, No. 541. – Art. ID: eabb5883. DOI:10.1126/scitranslmed.abb5883
15. Cox R.M., Wolf J.D., Plemper R.K. Therapeutically administered ribonucleoside analogue MK-4482/EIDD-2801 blocks SARS-CoV-2 transmission in ferrets // *Nat. Microbiol.* – 2021. – Vol. 6, No. 1. – P. 11–18. DOI:10.1038/s41564-020-00835-2
16. Wang Y., Li P., Solanki K., Li Y., Ma Z., Peppelenbosch M.P., Baig M.S., Pan Q. Viral polymerase binding and broad-spectrum antiviral activity of molnupiravir against human seasonal coronaviruses // *Virology*. – 2021. – Vol. 564. – P. 33–38. DOI:10.1016/j.virol.2021.09.009
17. Agostini M.L., Pruijssers A.J., Chappell J.D., Gribble J., Lu X., Andres E.L., Bluemling G.R., Lockwood M.A., Sheahan T.P., Sims A.C., Natchus M.G., Saindane M., Kolykhalov A.A., Painter G.R., Baric R.S., Denison M.R. Small-Molecule Antiviral β -d-N⁴-Hydroxycytidine Inhibits a Proofreading-Intact Coronavirus with a High Genetic Barrier to Resistance // *J. Virol.* – 2019. – Vol. 93, No. 24. – Art. ID: e01348–19. DOI: 10.1128/JVI.01348-19
18. Pagliano P., Sellitto C., Ascione T., Scarpati G., Folliero V., Piazza O., Franci G., Filippelli A., Conti V. The preclinical discovery and development of molnupiravir for the treatment of SARS-CoV-2 (COVID-19) // *Expert Opin. Drug Discov.* – 2022. – Vol. 17, No. 12. – P. 1299–1311. DOI:10.1080/17460441.2022.2153828
19. Yoon J.J., Toots M., Lee S., Lee M.E., Ludeke B., Luczo J.M., Ganti K., Cox R.M., Sticher Z.M., Edpuganti V., Mitchell D.G., Lockwood M.A., Kolykhalov A.A., Greninger A.L., Moore M.L., Painter G.R., Lowen A.C., Tompkins S.M., Fearn R., Natchus M.G., Plemper R.K. Orally Efficacious Broad-Spectrum Ribonucleoside Analog Inhibitor of Influenza and Respiratory Syncytial Viruses // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2018. – Vol. 62, No. 8. – Art. ID: e00766–18. DOI:10.1128/AAC.00766-18
20. Toots M., Yoon J.J., Hart M., Natchus M.G., Painter G.R., Plemper R.K. Quantitative efficacy paradigms of the influenza clinical drug candidate EIDD-2801 in the ferret model // *Transl. Res.* 2020. – Vol. 218. – P. 16–28. DOI:10.1016/j.trsl.2019.12.002
21. Wahl A., Gralinski L.E., Johnson C.E., Yao W., Kovarova M., Dinnon K.H. (3rd), Liu H., Madden V.J., Krzystek H.M., De C., White K.K., Gully K., Schäfer A., Zaman T., Leist S.R., Grant P.O., Bluemling G.R., Kolykhalov A.A., Natchus M.G., Askin F.B., Painter G., Browne E.P., Jones C.D., Pickles R.J., Baric R.S., Garcia J.V. SARS-CoV-2 infection is effectively treated and prevented by EIDD-2801 // *Nature*. – 2021. – Vol. 591, No. 7850. – P. 451–457. DOI:10.1038/s41586-021-03312-w

22. Mali K.R., Eerike M., Raj G.M., Bisoi D., Priyadarshini R., Ravi G., Chaliserry L.F., Janti S.S. Efficacy and safety of Molnupiravir in COVID-19 patients: a systematic review // *Ir. J. Med. Sci.* – 2022. – P. 1–14. DOI:10.1007/s11845-022-03139-y
23. Wen W., Chen C., Tang J., Wang C., Zhou M., Cheng Y., Zhou X., Wu Q., Zhang X., Feng Z., Wang M., Mao Q. Efficacy and safety of three new oral antiviral treatment (molnupiravir, fluvoxamine and Paxlovid) for COVID-19: a meta-analysis // *Ann Med.* – 2022. – Vol. 54, No. 1. – P. 516–523. DOI:10.1080/07853890.2022.2034936
24. Wong C.K.H., Au I.C.H., Lau K.T.K., Lau E.H.Y., Cowling B.J., Leung G.M. Real-world effectiveness of molnupiravir and nirmatrelvir plus ritonavir against mortality, hospitalisation, and in-hospital outcomes among community-dwelling, ambulatory patients with confirmed SARS-CoV-2 infection during the omicron wave in Hong Kong: an observational study // *Lancet.* – 2022. – Vol. 400, No. 10359. – P. 1213–1222. DOI:10.1016/S0140-6736, No. 22)01586-0
25. Painter W.P., Holman W., Bush J.A., Almazedi F., Malik H., Eraut N.C.J.E., Morin M.J., Szewczyk L.J., Painter G.R. Human Safety, Tolerability, and Pharmacokinetics of Molnupiravir, a Novel Broad-Spectrum Oral Antiviral Agent with Activity Against SARS-CoV-2 // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2021. – Vol. 65, No. 5. – Art. ID: e02428–20. DOI:10.1128/AAC.02428-20

АВТОРЫ

Василук Василий Богданович – доктор медицинских наук, управляющий ООО «НИЦ Экобезопасность»; профессор кафедры токсикологии, экстремальной и водолазной медицины ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И.И. Мечникова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-2503-4402. E-mail: vasilyuk_vb@ecosafety.ru

Бородулева Анна Юрьевна – старший химик-аналитик ООО «Экзактэ Лабс». ORCID ID: 0000-0003-1074-5551. E-mail: anna.boroduleva@exactelabs.com

Соболев Павел Дмитриевич – заведующий лабораторией биоаналитики ООО «Экзактэ Лабс». ORCID ID: 0000-0003-3634-596X. E-mail: pavel.sobolev@exactelabs.com

Никифорова Айыына Григорьевна – руководитель отдела биоаналитики ООО «Экзактэ Лабс». ORCID ID: 0000-0002-5719-0787. E-mail: aiyyuna.nikiforova@exactelabs.com

Мозговая Валентина Геннадьевна – научный советник АО «Р-Фарм». ORCID ID: 0000-0002-8934-8884. E-mail: mozgovay@rpharm.ru

Филон Ольга Владимировна – директор департамента АО «Р-Фарм». ORCID ID: 0000-0002-8735-7429. E-mail: ov.filon@rpharm.ru

Зинковская Анна Васильевна – руководитель группы биостатистики департамента доклинической и клинической разработки АО «Р-Фарм». ORCID ID: 0000-0002-7028-0496. E-mail: zinkovskaya@rpharm.ru

Игнатьев Василий Геннадьевич – кандидат медицинских наук, генеральный директор АО «Р-Фарм». ORCID ID: 0000-0003-2818-6583. E-mail: info@rpharm.ru

Самсонов Михаил Юрьевич – кандидат медицинских наук, доцент, медицинский директор АО «Р-Фарм». ORCID ID: 0000-0003-2685-1623. E-mail: samsonov@rpharm.ru

Козлова Ирина Сергеевна – медицинский писатель АО «Р-Фарм». ORCID ID: 0000-0002-2536-296X. E-mail: is.kozlova@rpharm.ru

Ханонина Елизавета Константиновна – младший специалист АО «Р-Фарм». ORCID ID: 0000-0001-5848-0869. E-mail: khanonina@rpharm.ru

УДК 615.275.4



ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ОРИГИНАЛЬНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ СУКЦИНАТА ГЕКСАПЕПТИДА В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ COVID-19 У ВЗРОСЛЫХ ГОСПИТАЛИЗИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Л.А. Балыкова¹, О.А. Радаева¹, К.Я. Заславская¹, П.А. Белый², В.Ф. Павелкина¹,
Н.А. Пятаев¹, А.Ю. Иванова^{3,4}, Г.В. Родоман⁵, Н.Э. Костина⁶, В.Б. Филимонов⁴,
Е.Н. Симакина⁷, Д.А. Быстрицкий⁸, А.С. Агафьина⁹, К.Н. Корянова¹⁰, Д.Ю. Пушкар^{2,11}

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», 430005, Россия, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевикская, д. 68

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

³ Государственное бюджетное учреждение Рязанской области «Областная клиническая больница», 390039, Россия, г. Рязань, ул. Интернациональная, д. 3-а

⁴ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 390026, Россия, г. Рязань, ул. Высоковольная, д. 9

⁵ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы», 127015, Россия, г. Москва, ул. Писцовая, д. 10

⁶ Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Воронежская областная клиническая больница № 1», 394066, Россия, г. Воронеж, Московский пр-т, д. 151

⁷ Областное государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Клиническая больница № 1», 214006, Россия, г. Смоленск, ул. Фрунзе, д. 40

⁸ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы», 125367, Россия, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 63

⁹ Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного района», 197706, Россия, г. Санкт-Петербург, г. Сестрорецк, ул. Борисова, д. 9, лит. Б

¹⁰ Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации 357532, Россия, г. Пятигорск, пр-т Калинина, д. 11

¹¹ Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница имени С.И. Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы», 127206, Россия, г. Москва, ул. Вучетича, д. 21

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Получена 01.12.2022

После рецензирования 20.12.2022

Принята к печати 30.12.2022

Для цитирования: Л.А. Балыкова, О.А. Радаева, К.Я. Заславская, П.А. Белый, В.Ф. Павелкина, Н.А. Пятаев, А.Ю. Иванова, Г.В. Родоман, Н.Э. Костина, В.Б. Филимонов, Е.Н. Симакина, Д.А. Быстрицкий, А.С. Агафьина, К.Н. Корянова, Д.Ю. Пушкар. Эффективность и безопасность оригинального препарата на основе сукцината гексапептида в комплексной терапии COVID-19 у взрослых госпитализированных пациентов. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):573-588. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-573-588

© Л.А. Балыкова, О.А. Радаева, К.Я. Заславская, П.А. Белый, В.Ф. Павелкина, Н.А. Пятаев, А.Ю. Иванова, Г.В. Родоман, Н.Э. Костина, В.Б. Филимонов, Е.Н. Симакина, Д.А. Быстрицкий, А.С. Агафьина, К.Н. Корянова, Д.Ю. Пушкар, 2022

For citation: L.A. Balykova, O.A. Radaeva, K.Ya. Zaslavskaya, P.A. Bely, V.F. Pavelkina, N.A. Pyataev, A.Yu. Ivanova, G.V. Rodoman, N.E. Kostina, V.B. Filimonov, E.N. Simakina, D.A. Bystritsky, A.S. Agafina, K.N. Koryanova, D.Yu. Pushkar. Efficacy and safety of original drug based on hexapeptide succinate in complex COVID-19 therapy in adults hospitalized patients. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6):573-588. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-573-588

На сегодняшний день имеются данные, позволяющие говорить о высокой клинической эффективности применения янтарнокислой соли тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина (гексапептида сукцинат) для лечения COVID-19. Настоящая статья посвящена результатам клинических исследований оригинального российского лекарственного препарата на его основе.

Цель. Оценить клиническую эффективность, безопасность и переносимость внутримышечного и ингаляционного применения препарата гексапептида сукцината в комплексной терапии в сравнении со стандартной терапией у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19.

Материалы и методы. Исследование проводилось с 28 февраля 2022 г. по 22 ноября 2022 г. на базе 10 исследовательских центров на территории РФ. В исследование были включены госпитализированные пациенты (n=312) старше 18 лет со среднетяжелым течением COVID-19, которые прошли процедуру скрининга и были рандомизированы на 3 группы: группа 1 получала стандартную терапию в соответствии с Временными методическими рекомендациями, действующими на момент проведения исследования в течение 10 сут; группа 2 получала препарат гексапептида сукцинат (Амбервин® Пульмо) внутримышечно по 1 мг 1 раз/сут в течение 10 дней; группа 3 получала препарат гексапептида сукцинат (Амбервин® Пульмо) ингаляционно по 10 мг 1 раз/сут в течение 10 дней.

Результаты. По результатам исследования терапия лекарственным препаратом гексапептида сукцинат как при внутримышечном, так и при ингаляционном введении обеспечивала ускорение выздоровления вплоть до полного отсутствия признаков заболевания более, чем у 80% госпитализированных пациентов с COVID-19. К окончанию курса терапии препаратом более 60% пациентов соответствовали критериям выписки из стационара и могли продолжить лечение в амбулаторных условиях. Около 70% пациентов в группе ингаляционного введения и 80% в группе внутримышечного введения гексапептида сукцинат имели сопутствующие заболевания (гипертензию – 28%, ожирение – 14%), что говорит об эффективности применения указанного лекарственного препарата у коморбидных пациентов. Применение препарата способствовало восстановлению поврежденных тканей легких, нормализации оксигенации, исчезновению одышки и уменьшению продолжительности симптомов заболевания по сравнению со стандартной терапией. В результате сравнительного анализа нежелательных явлений по их наличию, степени тяжести, причинно-следственной связи с терапией и исходу не было выявлено статистически значимых различий между группами терапии.

Заключение. Таким образом, результаты проведенного клинического исследования эффективности и безопасности гексапептида сукцинат показали целесообразность применения препарата в схемах патогенетической терапии COVID-19.

Ключевые слова: амбервин; гексапептида сукцинат; острый респираторный дистресс-синдром; цитокиновый шторм; COVID-19; тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина сукцинат

Список сокращений: НЯ – нежелательные явления; СНЯ – серьезные нежелательные явления; ВМР – Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции»; АЛТ – аланинаминотрансферазы; АСТ – аспартатаминотрансфераза; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; СРБ – С-реактивный белок; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; ИЛП – информационный листок пациента; ВПО – высокопоточная оксигенотерапия; НИВЛ – неинвазивная вентиляция легких; ИВЛ – искусственная вентиляция легких; ЭКМО – экстракорпоральная мембранная оксигенация; ОРДС – острый респираторный дистресс-синдром; SARS-CoV-2 – коронавирус, возбудитель COVID-19; КИ – клинические исследования; СО – стандартное отклонение; ПОЛ – перекисное окисление липидов.

EFFICACY AND SAFETY OF ORIGINAL DRUG BASED ON HEXAPEPTIDE SUCCINATE IN COMPLEX COVID-19 THERAPY IN ADULTS HOSPITALIZED PATIENTS

L.A. Balykova¹, O.A. Radaeva¹, K.Ya. Zaslavskaya¹, P.A. Bely², V.F. Pavelkina¹,
N.A. Pyataev¹, A.Yu. Ivanova^{3,4}, G.V. Rodoman⁵, N.E. Kostina⁶, V.B. Filimonov⁴,
E.N. Simakina⁷, D.A. Bystritsky⁸, A.S. Agafina⁹, K.N. Koryanova¹⁰, D.Yu. Pushkar^{2,11}

¹ National Research Ogarev Mordovia State University,
68, Bol'shevistskaya Str., Saransk, Republic of Mordovia, Russia, 430005

² Moscow State Medical and Dental University named after A.I. Evdokimov,
Bld. 1, 20, Delegatskaya Str., Moscow, Russia, 127473

³ Regional Clinical Hospital,

Bld. A, 3, Internatsionalnaya Str., Ryazan, Russia, 390039

⁴ Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov,

9, Vysokovoltynaya Str., Ryazan, Russia, 390026

⁵ Municipal clinical hospital No. 24, Moscow City Health Department,

10, Pistsovaya Str., Moscow, Russia, 127015

⁶ Voronezh Regional Clinical Hospital No. 1,

151, Moskovsky Ave., Voronezh, Russia, 394066

⁷ Smolensk Clinical Hospital No. 1,

40, Frunze Str., Smolensk, Russia, 214006

⁸ Infectious Clinical Hospital No. 1, Moscow City Health Department,

63, Volokolamsk Hwy, Moscow, Russia, 125367

⁹ City Hospital No. 40, Kurortny District,

9B, Borisov Str., Sestroretsk, St. Petersburg, Russia, 197706

¹⁰ Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute – branch of Volgograd State Medical University,

11, Kalinin Ave., Pyatigorsk, Russia, 357532

¹¹ City Clinical Hospital named after S.I. Spasokukotsky, Moscow City Health Department,

21, Vuchetich Str., Moscow, Russia, 127206

E-mail: kiryonok@yandex.ru

Received 01 Dec 2022

After peer review 20 Dec 2022

Accepted 30 Dec 2022

Currently, there are data that make it possible to speak about a high clinical efficacy of the use of succinic salt of tyrosyl-D-alanyl-glycyl-phenylalanyl-leucyl-arginine (hexapeptide succinate) for the COVID-19 treatment. This article is devoted to the results of clinical trials of the original Russian drug based on it.

The aim of the study was to evaluate a clinical efficacy, safety and tolerability of intramuscular and inhalation use of hexapeptide succinate in complex therapy in comparison with standard therapy in patients with moderate COVID-19.

Materials and methods. The research was conducted from February 28, 2022 to November 22, 2022 based on 10 research centers in the Russian Federation. The study included hospitalized patients (n=312) over 18 years of age with moderate COVID-19 who had undergone a screening procedure and were randomized into 3 groups: group 1 received standard therapy in accordance with the Interim Guidelines in force at the time of the study, within 10 days; group 2 received hexapeptide succinate (Ambervin® Pulmo) intramuscularly at the dose of 1 mg once a day for 10 days; group 3 received hexapeptide succinate (Ambervin® Pulmo) 10 mg once a day by inhalation for 10 days.

Results. According to the results of the study, therapy with the drug hexapeptide succinate, both intramuscular and inhaled, provided an acceleration of recovery up to the complete absence of the disease signs in more than 80% of hospitalized COVID-19 patients. By the end of the therapy course with the drug, more than 60% of patients had met the criteria for discharge from hospital and could continue the treatment on an outpatient basis. About 70% of patients in the inhalation group and 80% in the intramuscular hexapeptide succinate injection group had concomitant diseases (hypertension – 28%, obesity – 14%), which indicates the effectiveness of this drug use in comorbid patients. The use of the drug contributed to the restoration of damaged lung tissues, normalization of oxygenation, the disappearance of shortness of breath and a decrease in the duration of the disease symptoms compared with standard therapy. As a result of a comparative analysis of adverse events in terms of their presence, severity, causal relationship with the therapy and outcome, there were no statistically significant differences between the treatment groups.

Conclusion. Thus, the results of the clinical study of the succinate hexapeptide efficacy and safety showed the feasibility of using the drug in pathogenetic therapy COVID-19 regimens.

Keywords: ambervine; hexapeptide succinate; acute respiratory distress syndrome; cytokine storm; COVID-19; tyrosyl-D-alanyl-glycyl-phenylalanyl-leucyl-arginine succinate

Abbreviations: AE – adverse events; SAE – serious adverse events; IG – Interim guidelines “Prevention, diagnosis and treatment of a new coronavirus infection”; ALT – alanine aminotransferase; AST – aspartate aminotransferase; LDH – lactate dehydrogenase; CRP – C-reactive protein; GFR – glomerular filtration rate; PIS – patient information sheet; HFO – high-flow oxygen; NIVL – non-invasive lung ventilation; ALV – artificial lung ventilation; ECMO – extracorporeal membrane oxygenation; ARDS – acute respiratory distress syndrome; SARS-CoV-2 – coronavirus, the causative agent of COVID-19; CTs – clinical trials, SD – standard deviation; LPO – lipid peroxidation; RR – respiratory rate.

ВВЕДЕНИЕ

С середины 1970-х годов началась эра исследования эндогенных веществ, активирующих те же рецепторы, что и опиаты. Впоследствии данные исследования привели к открытию первого эндогенного опиоидного пептида. В 1975 г. были открыты два класса эндогенных пептидов – метионин-энкефалин (мет-энкефалин) и лейцин-энкефалин (лей-энкефалин). С тех пор открыто более 20 опиоидных пептидов. Каждый из этих пептидов с разным сродством связывается с тремя типами опиоидных рецепторов (μ , δ или κ) [1–5]. В настоящее время эндогенные опиоидные пептиды делятся на четыре семейства: энкефалины, динарфины, эндорфины и ноцицептин/орфанин FQ [6, 7].

Тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин – первый в мире синтетический опиоидный пептид, созданный на основе эндогенного лейцин-энкефалина путем стандартной замены Gly2 на D-Ala2 и присоединения к C-терминальной части молекулы сильно заряженного остатка аргинина с целью получения периферического эффекта и стабильности пептида. Данная модификация молекулы лейцин-энкефалина способствовала нивелированию некоторых побочных эффектов, характерных для других опиатов: не вызывал привыкания и физической зависимости [8]. Тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин ранее применялся в лечении больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, резистентных к терапии и с недостаточным эффектом от лечения другими средствами, а затем препарат начали применять для лечения острых и хронических панкреатитов [8]. Дальнейшие исследования выявили кардиопротекторные свойства тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина у пациентов, оперированных в условиях искусственного кровообращения [9]. В дальнейшем исследования продемонстрировали защитное действие препарата на легкие [10].

Клетки иммунной системы являются одними из основных мишеней опиоидных пептидов за счет детекции соответствующих рецепторов на поверхности иммуноцитов лимфатических узлов, костного мозга, селезенки. Эндорфины, динарфины и энкефалины включены в развитие и патогенез целого ряда аутоиммунных расстройств и поэтому могут изменять противовирусный и противомикробный ответ [11–14]. Принимая во внимание широкий диапазон терапевтического действия опиоидных пептидов, их высокий профиль безопасности и хорошую переносимость ввиду того, что они в основном состоят из природных аминокислот и обладают высокой селективностью действия, интерес к ним не угасал, продолжается поиск их возможного применения

при различных заболеваниях, в т.ч. при COVID-19 [15, 16].

Энкефалины работают как агонисты дельта-рецепторов, подавляя избыточный синтез провоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО- α) и, таким образом, уменьшая последствия системной гипериммунной реакции (цитокинового шторма) [17–20]. Цитокиновый шторм является основной причиной развития острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), в частности при COVID-19, который требует перевода пациента на ИВЛ из-за резкой гипоксии [21–23].

Агонисты дельта-рецепторов, к которым относится тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин, стимулируют процессы регенерации и заживления, нормализуют микроциркуляцию в зоне повреждения, способствуют поддержанию структурного гомеостаза [13–15]. Гексапептид оказывает иммуномодулирующее действие, регулирует активность клеток врожденного и адаптивного иммунитета, усиливает активность фагоцитарного звена иммунитета (макрофагов и нейтрофилов). Тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин повышает активность натуральных киллеров – НК-клеток (natural killer cells – NK), доступность которых падает при тяжелых инфекциях РНК-вирусами (грипп, вирус Эбола, COVID-19, SARS, MERS). Гексапептид стимулирует выработку эндогенных интерферонов, повышает устойчивость организма к вирусным инфекциям [24, 25]. В ходе проведенных доклинических исследований было показано, что тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин и его соли оказывают положительное влияние на течение острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), достоверно уменьшая смертность животных, снижая воспаление и отек легочной ткани, а также подавляя цитокиновый шторм [25].

В исследовании Украинской Л.А. и соавт. (2002) показано, что применение тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина сукцината при экспериментальной стресс-индуцированной альтерации легких уменьшало гиперактивацию перекисного окисления липидов (ПОЛ), распад сурфактанта, выраженность отека и лейкоцитарной инфильтрации альвеол и увеличивало площадь газообмена. Ограничение альтерационных эффектов стресса путем введения гексапептида оказывает эффективное пульмонопротекторное действие [26]. К настоящему времени в ряде экспериментальных исследований показано иммуномодулирующее действие гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина [24, 27].

В 2022 г. разработан и зарегистрирован лекарственный препарат Амбервин® Пульмо (РУ № ЛП-008604 от 07 октября 2022, Патент № ЕА038010), содержащий тирозил-D-аланил-

глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина сукцинат (гексапептида сукцинат) в дозировках 1,16 мг и 5,8 мг. Амбервин® Пульмо оказывает противовоспалительное действие, подавляя синтез в легких и тормозя поступление в системный кровоток одного из основных провоспалительных медиаторов цитокинового шторма – IL-6, а также других провоспалительных цитокинов (в частности, IL-1, ФНО- α , HMGB1) и повышая образование IL-10 и VEGF, оказывающих противовоспалительное действие и повышающих защитные силы организма. Являясь аналогом лей-энкефалина, лекарственный препарат¹ оказывает вазопротективное действие, снижая проницаемость сосудистой стенки и предотвращая разрушение эндотелия, повышает толерантность к гипоксии, предотвращает и снижает выраженность острого повреждения легких, уменьшает риск снижения оксигенации и развития вторичных бактериальных осложнений².

Рассматриваемый лекарственный препарат за счет включенного в структуру гексапептида, фрагмента янтарной кислоты, проявляет антиоксидантные, антигипоксические свойства, в том числе в альвеолярных клетках легочной ткани, в эпителиальных клетках средних и верхних отделов дыхательной системы. Ингибирует ПОЛ, улучшает структуру и функции мембран клеток, снижает степень угнетения окислительных процессов в цикле Кребса в условиях гипоксии, повышает резистентность организма к различным повреждающим факторам³.

Гексапептида сукцинат стимулирует процессы регенерации и заживления, способствует восстановлению поврежденных тканей, в том числе эпителиальных клеток альвеол, снижению выраженности интерстициального отека в нижних отделах дыхательных путей (альвеолы, бронхи, бронхиолы), нормализует микроциркуляцию в зоне повреждения, способствует поддержанию структурного гомеостаза, обладает противовоспалительным, дезинтоксикационным, антиоксидантным, репаративным и иммуномодулирующим действиями, повышая эффективность проводимой противовирусной и антибактериальной терапии.

Настоящая статья посвящена результатам клинического исследования применения данного лекарственного препарата в терапии пациентов с COVID-19.

ЦЕЛЬ. Оценить клиническую эффективность, безопасность и переносимость внутримышечного и ингаляционного применения препарата

тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина сукцината в комплексной терапии в сравнении со стандартной терапией у пациентов со среднетяжелым течением COVID-19.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эффективность, безопасность и переносимость препарата тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина сукцинат или гексапептида сукцината в сравнении со стандартной терапией у пациентов, госпитализированных с COVID-19, изучалась в рамках открытого рандомизированного многоцентрового сравнительного клинического исследования III фазы (РКИ МЗ № 100 от 14.02.2022).

Исследования проводилось с 28 февраля 2022 г. по 22 ноября 2022 г. на базе 10 исследовательских центров на территории РФ:

1. ФГБОУ ВО «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»;
2. ГБУ Рязанской области «Областная клиническая больница»;
3. ГБУЗ города Москва «Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы»;
4. ГБУЗ Воронежской области «Воронежская областная клиническая больница № 1»;
5. ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России;
6. ГБУЗ города Москвы «Городская клиническая больница имени С.И. Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы»;
7. ГБУЗ «Клиническая больница № 1» (г. Смоленск);
8. ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница №1 Департамента здравоохранения города Москвы»;
9. СПб ГБУЗ «Городская Больница №40 Курортного района»;
10. Бюджетное учреждение Чувашской Республики «Больница скорой медицинской помощи» Министерства здравоохранения Чувашской Республики.

Дизайн исследования

Госпитализированные пациенты мужского и женского пола (n=313) в возрасте от 18 до 80 лет включительно, со среднетяжелым течением COVID-19 прошли процедуру скрининга и были рандомизированы на 3 группы в соотношении 1:1:1. Выбор препарата для пациентов осуществлялся в соответствии с рандомизационным номером, который присваивался пациентам на момент рандомизации.

¹ Инструкция по медицинскому применению лекарственного препарата Амбервин® Пульмо https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=1f912539-dd59-4a95-adeb-31621b26fb0b

² Там же.

³ Там же.

Рандомизация субъектов исследования по группам

Пациенты мужского и женского пола (не менее 312 человек) в возрасте от 18 до 80 лет включительно, госпитализированные с COVID-19, соответствующие критериям включения и не соответствующие критериям невключения, рандомизировались в 3 группы в соотношении 1:1:1 (Рис. 1).

Рандомизация пациентов осуществлялась посредством интерактивной online системы рандомизации (Interactive Web Randomization System – IWRS), встроенной в электронную индивидуальную регистрационную карту (э-ИРК). Перед началом исследования каждому врачу-исследователю, которому делегирована обязанность переноса данных в э-ИРК, был передан код доступа (комбинация имени пользователя и пароля) к э-ИРК, а также подробные письменные инструкции по работе с э-ИРК, включая подробные инструкции по процедуре рандомизации.

Рандомизация проводилась по следующему алгоритму: каждому пациенту, соответствующему всем критериям включения и не соответствующему ни одному из критериев невключения, посредством системы IWRS присваивался трехзначный рандомизационный номер. Рандомизационный номер пациента и другие соответствующие данные вносились врачом-исследователем в Журнал скрининга/рандомизации субъектов исследования. Если пациент преждевременно прекращал участие в исследовании, его рандомизационный номер повторно не использовался.

Данное исследование являлось открытым, поэтому и пациент, и врач-исследователь знали какую терапию получал пациент.

1 группа (n=104) получала стандартную терапию в соответствии с ВМР⁴, действующими на момент проведения исследования в течение 10 сут;

2 группа (n=104) получала препарат гексапептида сукцинат (Амбервин® Пульмо, ООО «ПРОМОМЕД РУС») внутримышечно по 1,16 мг 1 раз/сут в течение 10 дней;

3 группа (n=104) получала препарат гексапептида сукцинат (Амбервин® Пульмо, ООО «ПРОМОМЕД РУС») ингаляционно с помощью небулайзера по 11,6 мг 1 раз/сут в течение 10 дней.

В качестве сопутствующей терапии пациенты 2 и 3 группы получали стандартную терапию, представленную в ВМР, действующих на момент проведения исследования. Внутримышечное и ингаляционное применение исследуемого

препарата осуществлялось в условиях стационара. Дизайн исследования представлен на рисунке 2. Общая длительность участия пациента в исследовании составила не более 30 дней.

Отбор субъектов для анализа

Первичный и вторичный показатели эффективности анализировались с использованием набора данных участников исследования, отбираемых по принципу соответствия протоколу, т.е. все пациенты, завершившие исследование в соответствии с Протоколом исследования. Участник исключался из набора данных в случае соответствия критерию исключения. В набор данных оценки безопасности вошли все рандомизированные пациенты, которые подверглись воздействию изучаемого препарата, независимо от степени следования Протоколу в ходе исследования.

Критерии включения

Наличие подписанной и датированной пациентом Формы информированного согласия ИЛП, мужчины и женщины в возрасте от 18 до 80 лет включительно на момент подписания Формы информированного согласия ИЛП; подтвержденный случай COVID-19 на момент скрининга на основании результатов анализа на определение РНК SARS-CoV-2 методом амплификации нуклеиновых кислот (МАНК); госпитализация, обусловленная заболеванием COVID-19; среднетяжелое течение инфекции, вызванной SARS-CoV-2 (наличие как минимум 2 из следующих критериев: температура тела $>38^{\circ}\text{C}$; частота дыхательных движений (ЧДД) $>22/\text{мин}$; одышка при физических нагрузках; изменения при компьютерной томографии (КТ), типичные для вирусного поражения; $\text{SpO}_2 < 95\%$; С-реактивный белок (СРБ) сыворотки крови $>10 \text{ мг/л}$); объем поражения легких минимальный или средний (КТ 1–2); согласие пациента использовать надежные методы контрацепции на протяжении всего исследования и в течение 3 недель после его окончания. Надежными средствами контрацепции являются: половой покой, использование презерватива в сочетании со спермицидом. В исследовании также могли принять участие женщины, неспособные к деторождению (в анамнезе: гистерэктомия, перевязка маточных труб, бесплодие, менопауза более 2 лет), а также мужчины с бесплодием или перенесенной вазэктомией в анамнезе.

Критерии невключения

Гиперчувствительность к компонентам исследуемого препарата; препятствия или невозможность выполнения внутримышечных инъекций и/или ингаляций; невозможность проведения процедуры КТ (например, гипсовая

⁴ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Версия 16 (18.08.2022). – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://static-0.minzdrav.gov.ru/system/attachments/attaches/000/060/193/original/%D0%92%D0%9C%D0%A0_COVID-19_V16.pdf

повязка или металлические конструкции в области исследования); артериальная гипотензия (снижением артериального давления (АД) ниже 100/60 мм рт. ст.) на момент скрининга и/или наличие гипотонических кризов в анамнезе; потребность в применении препаратов из списка запрещенной терапии; наличие критериев тяжелого и крайне тяжелого течения заболевания на момент скрининга; наличие в течение 6 мес до скрининга вероятного или подтвержденного случая COVID-19 среднетяжелого течения; наличие вероятного или подтвержденного случая COVID-19 тяжелого и крайне тяжелого течения в анамнезе; вакцинация в течение менее 4 недель до скрининга; необходимость в проведении лечения в отделении реанимации и интенсивной терапии на момент скрининга; нарушение функции печени (АСТ и/или АЛТ ≥ 3 ВГН и/или общий билирубин $\geq 1,5$ ВГН) на момент скрининга; нарушение функции почек (СКФ < 60 мл/мин) на момент скрининга; положительный анализ на ВИЧ, сифилис, гепатиты В и/или С на момент скрининга; хроническая сердечная недостаточность III–IV ФК по функциональной классификации Нью-Йоркской ассоциации кардиологов (NYHA); наличие в анамнезе злокачественных новообразований, за исключением пациентов, у которых заболевание не наблюдалось в течение последних 5 лет, пациентов с полностью излеченным базальноклеточным раком кожи или полностью излеченной карциномой *in situ*; алкогольная, фармакологическая и/или наркотическая зависимость в анамнезе и/или на момент скрининга; эпилепсия в анамнезе; шизофрения, шизоаффективное расстройство, биполярное расстройство или другая психическая патология в анамнезе или подозрение на их наличие на момент скрининга; тяжелые, декомпенсированные или нестабильные соматические заболевания (любые заболевания или состояния, которые угрожают жизни пациента или ухудшают прогноз пациента, а также делают невозможным его участие в клиническом исследовании); любые данные анамнеза, которые, по мнению врача-исследователя, могут привести к осложнению интерпретации результатов исследования или создать дополнительный риск для пациента в результате его участия в исследовании; нежелание или неспособность пациента соблюдать процедуры Протокола (по мнению врача-исследователя); беременные или кормящие женщины, или женщины, планирующие беременность; участие в другом клиническом исследовании в течение 3 месяцев до включения в исследование; прочие условия, которые, по мнению врача-исследователя, препятствуют включению пациента в исследование.

Критерии исключения

Решение об исключении субъекта из исследования принимал врач-исследователь.

Пациент выводился из исследования сразу при возникновении любой из следующих ситуаций:

1. Отрицательный результат анализа на наличие РНК SARS-CoV-2 методом МАНК, отобранного на этапе скрининга (для пациентов с вероятным случаем COVID-19 на момент скрининга).
2. Появление в ходе исследования любых заболеваний или состояний, которые ухудшают прогноз пациента, а также делают невозможным дальнейшее участие пациента в клиническом исследовании.

При необходимости перевода пациента на ВПО, НИВЛ применение терапии, предусмотренной Протоколом, продолжался, пациент не исключался из исследования. Ингаляционное применение препарата гексапептида сукцинат осуществлялось через контур аппарата при сохранении заданных параметров оксигенации.

При необходимости перевода пациента на ИВЛ, ЭКМО пациент исключался из исследования, ему назначалась терапия в соответствии с клинической практикой исследовательского центра.

3. Прием препаратов запрещенной терапии или необходимость их назначения.
4. Беременность пациентки.
5. Ошибочное включение пациента, несоответствующего критериям включения и/или соответствующего критериям невключения.
6. Другие нарушения Протокола, которые, по мнению врача-исследователя, являются значительными.
7. Отказ пациента от участия в исследовании.
8. Другие административные причины.

Критерии оценки эффективности

Первичный критерий эффективности:

- Частота достижения 0–1 категории по категориальной порядковой шкале клинического улучшения к Визиту 4 (табл. 1).

Вторичные критерии эффективности:

- Частота пациентов с клиническим статусом менее 4 баллов по категориальной порядковой шкале клинического улучшения к Визитам 3 и 4;
- Частота улучшения клинического статуса по категориальной порядковой шкале клинического улучшения на 2 и более категории к Визитам 3 и 4;
- Время (в днях) до улучшения клинического статуса по категориальной порядковой шкале клинического улучшения на ≥ 1 балл;
- Частота пациентов, соответствующих критериям выписки для продолжения лечения

в амбулаторных условиях в соответствии с ВМР к Визитам 2 и 3.

Критерии выписки (соответствие всем критериям, однако, пациент мог продолжить нахождение в стационаре после достижения критериев выписки, если врач-исследователь считал это необходимым или это требовалось по социальным причинам):

- стойкое улучшение клинической картины;
- уровень насыщения крови кислородом на воздухе $\geq 95\%$;
- температура тела $< 37,5^\circ\text{C}$;
- уровень СРБ < 10 мг/л;
- уровень лимфоцитов крови $> 1,2 \times 10^9$ /л.
- Частота пациентов с ЧДД < 22 /мин к Визитам 2 и 3. Оценка проводилась только для пациентов, у которых на Визите 1 отмечалось ЧДД > 22 /мин;
- Частота пациентов с уровнем СРБ < 10 мг/л к Визитам 2 и 3;
- Оценка проводилась только для пациентов, у которых на Визите 0 отмечался уровень СРБ > 10 мг/л;
- Частота пациентов с уровнем лимфоцитов крови $> 1,2 \times 10^9$ /л к Визитам 2 и 3;

Оценка проводилась только для пациентов, у которых на Визите 0 отмечался уровень лимфоцитов крови $< 1,2 \times 10^9$ /л;

- Оценка степени поражения легких по данным КТ к Визиту 4;
- Частота пациентов с $\text{SpO}_2 \geq 95\%$ на протяжении 2 дней подряд к Визитам 2, 3 и 4. Оценка проводилась только для пациентов, у которых на Визите 1 $\text{SpO}_2 < 95\%$;
- Частота случаев перевода пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии;
- Частота случаев применения ВПО, НИВЛ, ИВЛ, ЭКМО;
- Частота случаев развития ОРДС;
- Частота пациентов со смертельным исходом.

Дополнительные исследуемые параметры

- Частота пациентов, достигших референсных значений к Визитам 2, 3 по каждому из следующих показателей: ИЛ 6, D димер, ферритин, фибриноген, СРБ, лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты, триглицериды, ЛДГ;
- Изменение (%) к Визитам 2, 3 по каждому из следующих показателей: ИЛ-6, D-димер, ферритин, фибриноген, СРБ, лимфоциты, лейкоциты, тромбоциты, триглицериды, ЛДГ.

Критерии оценки безопасности

- Общее количество НЯ, стратифицированных по тяжести и частоте;

- Частота нежелательных реакций;
- Частота СНЯ, в том числе связанных с применением исследуемого препарата/стандартной терапии;
- Доля пациентов, у которых зарегистрировано как минимум одно НЯ;
- Доля пациентов, прервавших лечение из-за возникновения НЯ/СНЯ.

Статистический анализ

Для статистического анализа использовалось программное обеспечение с валидированными алгоритмами для выполнения статистических анализов и надлежащего документального оформления (StatSoft Statistica 10.0., IBM SPSS Statistics 22 (актуальная версия, лицензия GPL-2/GPL-3).

Непрерывные (количественные) данные представлены с помощью количества наблюдений, среднего арифметического, 95% доверительного интервала (ДИ) для среднего, стандартного (среднеквадратического) отклонения, медианы, межквартильного размаха (25-го и 75-го центили), минимума и максимума.

Качественные данные (порядковые, номинальные) представлены с помощью абсолютных частот (количества наблюдений), относительных частот (процентов) и 95% ДИ.

Проверка на нормальность распределения проводилась одним из общепринятых методов (критерий Шапиро-Уилка, критерий Колмогорова-Смирнова). В случае не Гауссовского распределения для сравнения показателей эффективности и безопасности использовались непараметрические методы оценки.

Уровни значимости и доверительные интервалы рассчитывались как двусторонние, и статистическая значимость различий была по умолчанию двусторонней и относилась к уровню значимости 0,05 (если не указано дополнительно).

Для анализа первичного критерия эффективности предполагается использование межгруппового сравнения долей при помощи одностороннего варианта точного теста Фишера или критерия χ^2 («хи-квадрат»), в случае если все ожидаемые значения в ячейках таблицы сопряженности для данного анализа составляли 5 и более. Доля пациентов, достигших 0–1 категории по категориальной порядковой шкале клинического улучшения к Визиту 4, представлена с двусторонним 95% ДИ по группам лечения. Представлена разница в долях между группами лечения и двусторонним 95% ДИ для разницы в долях, рассчитанным по методу Ньюкомба-Вилсона. Вторичные критерии эффективности и дополнительные исследуемые параметры представлены описательно для каждой группы.

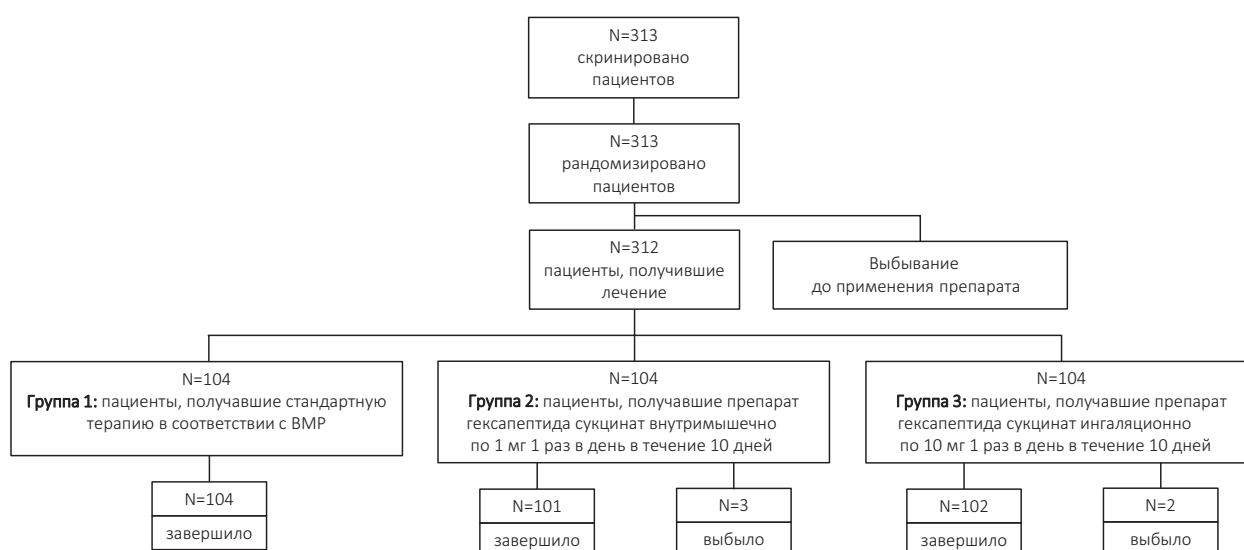


Рисунок 1 – Распределение субъектов по группам

Примечание: ВМР – Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)» Версия 16 от 18.08.2022 (здесь и рис. 2).

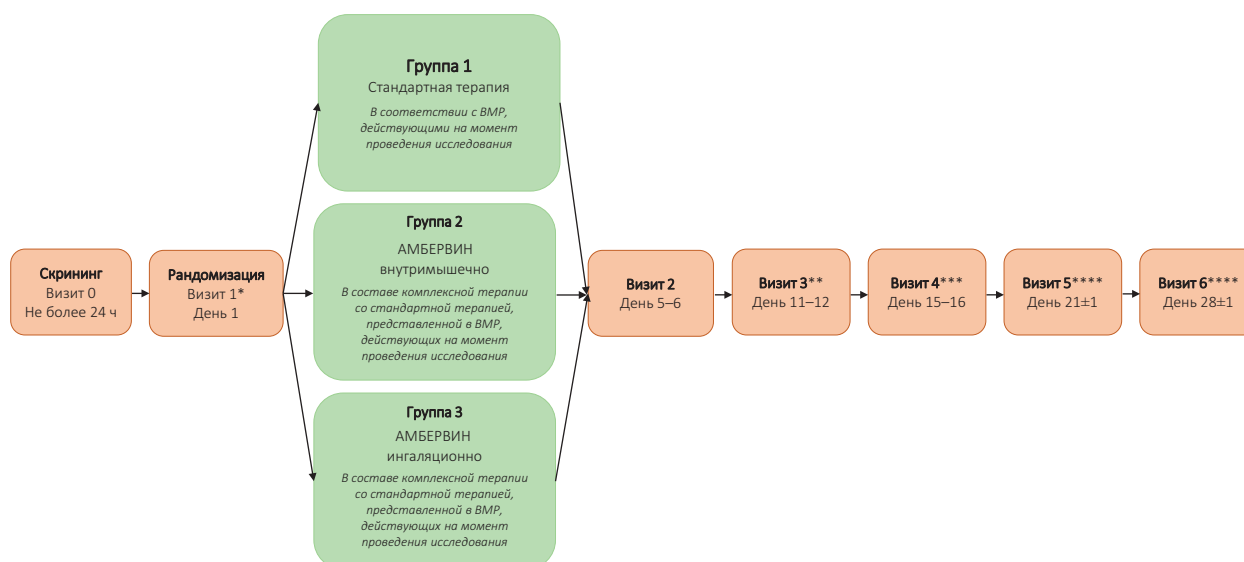


Рисунок 2 – Дизайн исследования

Примечание: * – Визит 1 мог совпадать с Визитом 0. Если Визит 1 и Визит 0 совпадали, то физикальное обследование, оценка жизненно важных показателей, регистрация сопутствующей терапии, пульсоксиметрия с измерением SpO₂ повторно не проводились, оценка критериев включения и невключения проводилась непосредственно перед рандомизацией, а критерии исключения оценивались после применения препарата. ** – Для пациентов группы 1: если выписка из стационара осуществлялась ранее, на момент выписки пациенту проводились процедуры Визита 3, КТ легких и оценка изменений в легких при помощи «эмпирической» визуальной шкалы (по данным КТ легких). Если выписка из стационара осуществлялась ранее 7 дня, то КТ легких и оценка изменений в легких при помощи «эмпирической» визуальной шкалы (по данным КТ легких) проводилась на усмотрение врача-исследователя. *** – Если выписка из стационара осуществлялась на 13 или 14 день от начала терапии, на момент выписки проводился визит, соответствующий по объему процедур, предусмотренных для очного визита. Всем пациентам, которые выписывались ранее 15 дня, на 15–16 день проводился визит, соответствующий по объему процедур, предусмотренных для визита, проводимого посредством телефонного звонка. **** – Если выписка из стационара осуществлялась ранее, то вместо очного визита проводился визит посредством телефонного звонка.

Таблица 1 – Категориальная порядковая шкала клинического улучшения течения COVID-19

Статус пациента	Описание	Категория
Амбулаторный	Отсутствуют клинические и вирусологические признаки инфекции	0
	Отсутствуют ограничения деятельности	1
	Ограничения деятельности	2
Госпитализирован:	Госпитализирован, кислородная терапия отсутствует	3
– легкое течение заболевания	Оксигенация с помощью маски или назальной канюли	4
– тяжелое течение заболевания	Неинвазивная вентиляция или высокопоточная оксигенация	5
	Интубация или механическая вентиляция	6
	Вентиляция + дополнительная поддержка органов – вазопрессоры, заместительная почечная терапия, экстракорпоральная мембранная оксигенация (ЭКМО)	7
Умерший	Смерть	8

Таблица 2 – Исходные демографические, антропометрические и клинические характеристики пациентов

Характеристика	Стандартная терапия, n=104	Гексапептида сукцинат в/м, n=104	Гексапептида сукцинат ингаляционно, n=104
Возраст, лет (M ±SD)	57,64±16,44	57,54±16,02	59,46±16,46
Мужской пол, n (%)	50 (48,08)	53 (50,96)	43 (41,35)
ИМТ, кг/м ² (M ±SD)	27,87±5,72	26,91±5,90	27,86±5,30
Сопутствующие заболевания/состояния*			
Гипертензия, n (% от всех СЗ)	60 (29,56)	49 (25,13)	64 (29,22)
Ожирение, n (% от всех СЗ)	34 (16,75)	21 (10,77)	33 (15,07)

Примечание: *кроме указанных в таблице, были выявлены следующие сопутствующие заболевания/состояния с частотой 5 и менее %: фибрилляция предсердий, хроническая сердечная недостаточность, ишемия миокарда, стенокардия, остеохондроз, сахарный диабет 2 типа, менопауза.

Таблица 3 – Обобщенные данные сравнительной оценки эффективности гексапептида сукцинат

Контрольная точка	Группы		
	Стандартная терапия	Гексапептида сукцинат (в/м)	Гексапептида сукцинат (ингаляционно)
Первичный критерий			
Достижение 0–1 категории			
Визит 4 (День 15)	66,35% (69/104)	85,15% (86/101)	83,33% (85/102)
Вторичные критерии эффективности			
Клинический статус менее 4 баллов			
Визит 3 (День 11)	69,23% (72/104)	87,13% (88/101)	83,33% (85/102)
Визит 4 (День 15)	94,23% (98/104)	99,01% (100/101)	99,02% (101/102)
Улучшение клинического статуса на 2 и более категории			
Визит 3 (День 11)	52,88% (55/104)	58,42% (59/101)	59,80% (61/102)
Визит 4 (День 15)	90,38% (94/104)	98,02% (99/101)	96,08% (98/102)
Время до улучшения клинического статуса на ≥ 1 балл			
Медиана времени, дни	7	6	6
Соответствие критериям выписки для продолжения лечения в амбулаторных условиях в соответствии с ВМР			
Визит 2 (День 5)	13,46% (14/104)	16,83% (17/101)	17,65% (18/102)
Визит 3 (День 11)	52,88% (55/104)	67,33% (68/101)	67,65% (69/102)
ЧДД<22/мин			
Визит 2 (День 5)	60,98% (25/41)	71,43% (25/35)	85,71% (36/42)
Визит 3 (День 11)	92,68% (38/41)	100,00% (35/35)	100,00% (42/42)
СРБ<10 мг/л			
Визит 2 (День 5)	52,78% (38/72)	59,46% (44/74)	55,88% (38/68)
Визит 3 (День 11)	79,17% (57/72)	83,78% (62/74)	92,65% (63/68)
Лимфоциты крови > 1,2×10 ⁹ /л к Визитам 2 и 3			
Визит 2 (День 5)	55,26% (21/38)	67,86% (19/28)	69,23% (27/39)
Визит 3 (День 11)	71,05% (27/38)	75,00% (21/28)	76,92% (30/39)
Степень поражения легких по данным КТ			
Визит 4 КТ-0 (День 15)	30,77% (28/91)	33,33% (33/99)	33,33% (34/102)
КТ-2	9,89% (9/91)	6,06% (6/99)	5,88% (6/102)
SpO ₂ ≥95% на протяжении 2 дней подряд			
Визит 2 (День 5)	64,29% (36/56)	72,41% (42/58)	74,14% (43/58)
Визит 3 (День 11)	87,50% (49/56)	96,55% (56/58)	96,55% (56/58)
Визит 4 (День 15)	91,07% (51/56)	100,00% (58/58)	98,28% (57/58)

**Таблица 4 – Описание общего числа НЯ,
зарегистрированных у пациентов в исследуемых группах**

НЯ (РТ по MeDRA)*	Количество НЯ, абс. (% от общего числа НЯ)			
	Группа гексапептида сукцинат (в/м), n=104	Группа гексапептида сукцинат (ингаляционно), n=104	Группа «стандартная терапия», n=104	Всего, n=312
Аритмия	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,33%)	1 (3,33%)
Гипергликемия	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,33%)	1 (3,33%)
Головная боль	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	1 (3,33%)
Диарея	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,33%)	1 (3,33%)
Дыхательная недостаточность	1 (10%)	2 (25%)	0 (0%)	3 (30%)
Инфекция мочевыводящих путей	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,33%)
Конкремент в мочевыводящих путях	0 (0%)	1 (12,5%)	0 (0%)	1 (3,33%)
Повышение уровня АЛТ	3 (30%)	1 (12,5%)	2 (16,67%)	6 (20%)
Повышение уровня АСТ	1 (10%)	2 (25%)	2 (16,67%)	5 (16,67%)
Повышение уровня глюкозы в крови	2 (20%)	1 (12,5%)	1 (8,33%)	4 (13,33%)
Повышение уровня креатинина в крови	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,33%)
Тошнота	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,33%)	1 (3,33%)
Удлинение активированного частичного тромбопластинового времени	0 (0%)	0 (0%)	1 (8,33%)	1 (3,33%)
Удлинение протромбинового времени	0 (0%)	0 (0%)	2 (16,67%)	2 (6,67%)
Сердечно-сосудистая недостаточность	1 (10%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,33%)
Итого:	10 (100%)	8 (100%)	12 (100%)	30 (10%)

Примечание: *РТ (preferterm) – уровень международного словаря медицинских и терапевтических терминов MeDRA; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза.

Популяция безопасности: пациенты, которые получили хотя бы одну дозу препарата исследования, и для которых есть оценка состояния и/или НЯ хотя бы для одной временной точки после применения. Если исследуемый препарат не был принят добровольцем/пациентом, его данные не включались в статистический анализ, однако представлялись в итоговом отчете исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исходные характеристики пациентов

Процедуру скрининга и рандомизации прошли 313 пациентов, 312 – были включены в исследование, один пациент исключен из исследования до приема препарата по причине соответствия критерию исключения «Отказ пациента от участия в исследовании»: 104 пациента получили стандартную терапию в соответствии с текущими ВМР, 104 пациента – гексапептида сукцинат внутримышечно (в/м) и 104 пациента – гексапептида сукцинат ингаляционно. Группы были сопоставимы по демографическим,

антропометрическим и клиническим характеристикам (табл. 2).

Средний возраст всех пациентов, включенных в исследование, составил 58,21 лет (от 18 до 80 лет), женщин было немного больше 53,21% (n=166), чем мужчин – 46,79% (n=146). Средний показатель индекса массы тела (ИМТ) составил 27,55 кг/м² (от 15,30 до 51,42 кг/м²), что соответствует избыточной массе тела по классификации ВОЗ. У 242 пациентов (77,56%) были выявлены сопутствующие заболевания. Самые частые сопутствующие заболеваниями (СЗ): гипертензия – 28% (n=173) и ожирение – 14% (n=88). Другие сопутствующие заболевания/состояния, которые встречались с частотой от 2 до 5%: фибрилляция предсердий (3,2%), хроническая сердечная недостаточность (2,4%), ишемия миокарда (2,6%), стенокардия (2,6%), остеохондроз (2,1%), сахарный диабет 2 типа (4,8%), менопауза (2,4%). У 163 (52,24%) пациентов были выявлены отклонения показателей ЭКГ. Группы были сопоставимы по полу, возрасту и коморбидному статусу пациентов.

Результаты оценки эффективности

Обобщенные данные сравнительного анализа по критериям эффективности представлены в таблице 3.

Первичный критерий эффективности

В группе гексапептида сукцината внутримышечное введение доля пациентов, достигших 0–1 категории по категориальной порядковой шкале клинического улучшения к Визиту 4, составила 85,15% (86/101), в группе гексапептида сукцината ингаляционное введение 83,33% (85/102), в группе стандартной терапии – 66,35% (69/104). 95% ДИ для доли пациентов, достигших 0–1 категории по категориальной порядковой шкале клинического улучшения к Визиту 4, в группе препарата гексапептида сукцинат внутримышечное введение составил 95% ДИ [0,7637; 0,9118], гексапептида сукцинат ингаляционное введение составил 95% ДИ [0,7437; 0,8972], в группе стандартной терапии – 95% ДИ [0,5634; 0,7514]. Разница в долях между группой препарата гексапептида сукцината внутримышечное введение и группой стандартной терапии составила 0,188 (18,80%), 95% ДИ для разницы в долях между группами составил – 95% ДИ [0,0638; 0,3049]. Разница в долях между группой препарата гексапептида сукцината ингаляционное введение и группой стандартной терапии составила 0,1699 (16,99%), 95% ДИ для разницы в долях между группами составил – 95% ДИ [0,0443; 0,2886].

В результате проведенного анализа были выявлены статистически значимые различия по частоте достижения 0–1 категории по категориальной порядковой шкале клинического улучшения к Визиту 4 как между группой препарата гексапептида сукцината, внутримышечное введение и группой стандартной терапии ($p=0,0017$), так и между группой гексапептида сукцината, ингаляционное введение и группой стандартной терапии ($p=0,0050$).

Таким образом, было показано, что в отличие от стандартной терапии гексапептида сукцинат, как при внутримышечном, так и при ингаляционном способе применения, обеспечил ускорение выздоровления вплоть до полного отсутствия признаков заболевания более, чем у 80% госпитализированных пациентов с COVID-19.

Более того, так как среди участников исследования были пациенты с сопутствующими заболеваниями, можно сделать вывод о высокой эффективности терапии гексапептида сукцинатом, как у пациентов без сопутствующих заболеваний, так и у пациентов с коморбидной патологией, имеющих факторы риска прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения, в отношении ускорения выздоровления и выписки из стационара, а также снижения риска отягощенного течения COVID-19 и перевода в ОПИТ,

что подтверждает клиническую эффективность и фармакоэкономическую обоснованность применения изученных схем терапии.

Курс терапии лекарственным препаратом гексапептида сукцинатом способствовал ускорению выздоровления и выписки из стационара, предотвращению прогрессирования COVID-19 до более тяжелого течения, что свидетельствует о высокой эффективности и обосновывает внедрение в клиническую практику схем терапии на основе исследуемого препарата.

Вторичные критерии эффективности

В результате сравнительного анализа по частоте пациентов с клиническим статусом менее 4 баллов по категориальной порядковой шкале клинического улучшения были выявлены статистически значимые различия к Визиту 3 между группой препарата гексапептида сукцината (в/м) и группой стандартной терапии ($p=0,0020$), а также между группой препарата гексапептида сукцината (ингаляционно) и группой стандартной терапии ($p=0,0175$). Полученные данные свидетельствуют о более эффективном, по сравнению со стандартной терапией, действием гексапептида сукцината на динамику симптомов пациентов с COVID-19, приводящем к выраженному улучшению клинического состояния пациентов. Лечение гексапептида сукцинатом, как при внутримышечном, так и при ингаляционном применении, уже к окончанию терапии, через 10 дней от ее начала, обеспечило отсутствие ограничений повседневной активности более, чем у 80% пациентов с коронавирусной инфекцией. Эти данные подтверждают эффективность терапии в отношении течения заболевания, улучшения качества жизни пациентов.

В результате сравнительного анализа по частоте пациентов с улучшением клинического статуса по категориальной порядковой шкале клинического улучшения на 2 и более категории были выявлены статистически значимые различия между группой препарата гексапептида сукцината (в/м) и группой стандартной терапии к Визиту 4 ($p=0,0334$). Таким образом, показано, что по сравнению со стандартной терапией, применение лекарственного препарата гексапептида сукцината приводит к более выраженному, быстрому и существенному улучшению состояния пациентов с COVID-19.

В результате сравнительного анализа по частоте пациентов, соответствующих критериям выписки для продолжения лечения в амбулаторных условиях в соответствии с ВМР, были выявлены статистически значимые различия между группой препарата гексапептида сукцината (ингаляционно) и группой стандартной терапии к Визиту 3 ($p=0,0305$), а также между группой препарата гексапептида сукцината (в/м) и группой стандартной терапии

($p=0,0348$). Таким образом, было показано, что в отличие от стандартной терапии в основной группе к окончанию терапии препаратом гексапептида сукцинатом, как при внутримышечном, так и при ингаляционном применении, более чем 60% пациентов соответствовали критериям выписки и могли продолжать лечение в амбулаторных условиях, что снижает нагрузку на систему здравоохранения и говорит о целесообразности применения исследуемой терапии.

В результате сравнительного анализа по частоте пациентов с ЧДД <22 /мин к окончанию терапии были выявлены статистически значимые различия ($p=0,01$) между группой пациентов, получавших препарат гексапептида сукцинат (ингаляционное введение) и стандартной терапией: 85,7% (36/42) и 60,9% (25/41), соответственно, что говорит об улучшении состояния пациентов, исчезновении одышки и дыхательной недостаточности, что способствует уменьшению рисков развития осложнений COVID-19.

В результате сравнительного анализа по частоте пациентов с уровнем с СРБ <10 мг/л к Визитам 2 и 3 не было выявлено статистически значимых различий между исследуемыми группами. Стоит отметить, что в отличие от пациентов, получавших стандартную терапию, более чем у 50% пациентов, получавших препарат гексапептида сукцинат, уже к 5 дню терапии наблюдалось снижение показателя СРБ <10 мг/л. Следует подчеркнуть, что более чем у 90% пациентов, получавших препарат в ингаляционной форме к окончанию терапии было достигнуто снижение СРБ до нормальных значений, что свидетельствует о противовоспалительном действии препарата, уменьшении последствий системной гипериммунной реакции, снижении выраженности острого повреждения тканей, об уменьшении рисков развития осложнений COVID-19 и улучшении прогноза заболевания.

Среднее значение ($\text{Mean} \pm \text{SD}$) степени поражения легких по данным КТ на Визите 4 в группе препарата гексапептида сукцината (в/м) составило $0,73 \pm 0,57$; в группе препарата гексапептида сукцината (ингаляционно) – $0,73 \pm 0,57$; в группе стандартной терапии – $0,79 \pm 0,61$.

Оценка степени поражения легких по данным КТ показала, что терапия препаратом гексапептида сукцинат приводит к значимому улучшению состояния легких по данным КТ, вплоть до полного исчезновения симптомов заболевания. Следует отметить, что по результатам внутрigrуппового анализа степени поражения легких, в отличие от группы стандартной терапии, в обеих группах препарата гексапептида сукцината было установлено статистически значимое различие между моментом скрининга пациентов в исследовании и 15–16 днем терапии ($p<0,0001$), что свидетельствует о наличии положительной динамики течения заболевания –

уменьшение степени поражения легких в группе исследуемого препарата, как при внутримышечном, так и при ингаляционном введении. Следовательно, применение исследуемого препарата способствует восстановлению поврежденных тканей легких, в том числе, эпителиальных клеток альвеол.

В результате сравнительного анализа по частоте пациентов с $\text{SpO}_2 \geq 95\%$ на протяжении 2 дней подряд к Визиту 4 были выявлены статистически значимые различия между группой препарата гексапептида сукцината (в/м) и группой стандартной терапии ($p=0,0260$). Следует отметить, что к моменту окончания терапии, более 90% в группе исследуемого препарата достигли нормализации показателя оксигенации, что свидетельствует об уменьшении рисков развития осложнений COVID-19 и улучшении прогноза. Таким образом, применение гексапептида сукцината снижает выраженность диффузного альвеолярного повреждения ткани легких, что способствует предупреждению развития фиброза легких и нормализует вентиляционную функцию легких.

Дополнительные исследуемые параметры

В результате сравнения показателей биохимического анализа крови были выявлены статистически значимые различия между группами 1 и 3 на Визите 2 по показателю «ЛДГ» ($p=0,016$). В группе исследуемого гексапептида сукцината, ингаляционное введение на Визите 2 наблюдались снижение показателя ЛДГ, причем значения этого фермента были ниже по сравнению с группой стандартной терапии, что может свидетельствовать о более выраженном уменьшении степени повреждения и восстановлении поврежденных тканей, в том числе, эпителиальных клеток альвеол, улучшении энергетического обмена в клетках и улучшении функции мембран клеток. Кроме того, в группах, получавших терапию исследуемым соединением, наблюдалось снижение таких показателей, как СОЭ, СРБ, ИЛ-6, Д-димер, лактат, триглицериды, что также подтверждает его противовоспалительное действие.

Оценка безопасности

Частота пациентов с зарегистрированными случаями НЯ/СНЯ составила 7,69% (24/312). Всего у 24 пациентов отмечалось 30 НЯ (табл. 4). При этом, развитие НЯ, в т.ч. 3 СНЯ, в большинстве случаев было обусловлено анамнезом пациента (ожирение, бронхиальная астма, сердечная недостаточность) и не было связано с приемом исследуемого препарата.

В результате сравнительного анализа НЯ по их наличию, степени тяжести, причинно-следственной связи с терапией и исходу не было выявлено статистически значимых различий между группами терапии. В группах исследуемого препарата

большинство НЯ носили транзиторный характер, случаев отмены терапии или изменения дозы в связи с развитием НЯ в группах исследуемого препарата зарегистрировано не было. По оценке врачей-исследователей, у пациентов отмечалась хорошая переносимость исследуемого препарата.

При анализе данных частоты случаев перевода пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии, применения ВПО, НИВЛ, ИВЛ, ЭКМО, развития ОРДС, статистически значимые различия между исследуемыми группами выявлены не были.

Таким образом, оценка безопасности проводимой терапии говорит о положительном профиле «польза/риск» в отношении лекарственного препарата Амбервин® Пульмо.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты проведенного клинического исследования «Открытое рандомизированное многоцентровое сравнительное исследование по оценке эффективности, безопасности и переносимости применения препарата Амбервин® Пульмо, лиофилизат для приготовления раствора для внутримышечного введения и раствора для ингаляций у пациентов, госпитализированных с COVID-19» показали, что терапия исследуемым препаратом, как при внутримышечном, так и при ингаляционном введении, обеспечивала ускорение выздоровления

вплоть до полного отсутствия признаков заболевания более, чем у 80% госпитализированных пациентов с COVID-19. К окончанию курса терапии препаратом гексапептида сукцинатом, более 60% пациентов соответствовали критериям выписки из стационара и могли продолжить лечение в амбулаторных условиях, что снижает нагрузку на систему здравоохранения и подтверждает целесообразность применения исследуемой терапии. Важно отметить, что 70% пациентов в группе ингаляционного введения и 80% в группе внутримышечного введения исследуемого препарата имели сопутствующие заболевания (в основном гипертензию и ожирение), которые являются факторами риска прогрессирования COVID-19 до тяжелого течения. Применение препарата способствовало восстановлению поврежденных тканей легких, в том числе, эпителиальных клеток альвеол, нормализация оксигенации, исчезновение одышки и уменьшение продолжительности симптомов заболевания по сравнению со стандартной терапией. В результате сравнительного анализа нежелательных явлений по их наличию, степени тяжести, причинно-следственной связи с терапией и исходу не было выявлено статистически значимых различий между группами терапии. По оценке врачей-исследователей, исследуемый препарат характеризуется высоким профилем безопасности и хорошей переносимостью.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Клиническое исследование проводилось при поддержке компании ООО «ПРОМОМЕД РУС». Спонсор не оказывал влияния на выбор материала для публикации, анализ и интерпретацию данных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Л.А. Балыкова – разработка и реализация дизайна исследования, написание и редактирование текста;
О.А. Радаева – разработка дизайна исследования, анализ результатов, редактирование текста;
К.Я. Заславская – разработка дизайна исследования, редактирование текста, анализ литературных источников; П.А. Белый – разработка дизайна исследования, анализ результатов, редактирование текста;
В.Ф. Павелкина – сбор источников, обработка данных, написание статьи; Н.А. Пятаев – сбор источников, обработка данных, написание статьи; А.Ю. Иванова – реализация дизайна исследования, обработка данных;
Г.В. Родоман – реализация дизайна исследования, обработка данных; Н.Э. Костина – реализация дизайна исследования, обработка данных; В.Б. Филимонов – реализация дизайна исследования, обработка данных;
Е.Н. Симакина – реализация дизайна исследования, обработка данных; Д.А. Быстрицкий – реализация дизайна исследования, обработка данных; А.С. Агафьина – реализация дизайна исследования, обработка данных; К.Н. Корянова – сбор источников, обработка данных, написание статьи;
Д.Ю. Пушкарь – разработка и реализация дизайна исследования, обработка данных.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Булгаков С.А. Агонисты опиатных рецепторов в гастроэнтерологической практике // Доказательная гастроэнтерология. – 2015. – Т. 4, № 1. – С. 14–18. DOI:10.17116/dokgastro201541-214-18
2. Hughes J., Smith T.W., Kosterlitz H.W., Fothergill L.A., Morgan B.A., Morris H.R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity // Nature. – 1975. – Vol. 258, No. 5536. – P. 577–580. DOI:10.1038/258577a0

3. Goldstein A., Lowney L.I., Pal B.K. Stereospecific and nonspecific interactions of the morphine congener levorphanol in subcellular fractions of mouse brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1971. – Vol. 68, No. 8. – P. 1742–1747. DOI:10.1073/pnas.68.8.1742
4. Petrocelli G., Pampanella L., Abruzzo P.M., Ventura C., Canaider S., Facchin F. Endogenous Opioids and Their Role in Stem Cell Biology and Tissue Rescue // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23, No. 7. – Art. ID: 3819. DOI:10.3390/ijms23073819
5. Fricker L.D., Margolis E.B., Gomes I., Devi L.A. Five Decades of Research on Opioid Peptides: Current Knowledge and Unanswered Questions // *Mol. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 98, No. 2. – P. 96–108. DOI:10.1124/mol.120.119388
6. Kibaly C., Xu C., Cahill C.M., Evans C.J., Law P.Y. Non-nociceptive roles of opioids in the CNS: opioids' effects on neurogenesis, learning, memory and affect // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2019. – Vol. 20, No. 1. – P. 5–18. DOI:10.1038/s41583-018-0092-2
7. Eisenstein T.K. The Role of Opioid Receptors in Immune System Function // *Front. Immunol.* – 2019. – Vol. 10. – Art. ID:2904. DOI:10.3389/fimmu.2019.02904
8. Булгаков С.А. Гексапептид даларгин в клинической гастроэнтерологии: 30-летний опыт использования препарата // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2016. – Т. 26, № 3. – С. 103–112. DOI:10.22416/1382-4376-2016-26-3-103-112
9. Шлозников Б.М., Лихванцев В.В., Кузнецов А.Ю., Перетрухин А.И., Тверской А.Л., Мачулин А.В., Гринько А.Н. Даларгин – основное средство интраоперационной защиты больного при коррекции дефекта межпредсердной перегородки в условиях искусственного кровообращения: новый метод анестезии // *Анестезиология и реаниматология*. – 1989. – № 4. – С. 21–25.
10. Лихванцев В.В., Смирнова В.И., Кузнецов А.Ю., Перетрухин А.И., Какурин Ф.Ф., Гринько А.Н. Сравнительные аспекты применения Даларгина в комплексе анестезиологической защиты при хирургической коррекции врожденных пороков сердца // *Анестезиология и реаниматология*. – 1992. – № 4. – С. 23–28.
11. Sharp B.M. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling // *Brain Behav. Immun.* – 2006. – Vol. 20, No. 1. – P. 9–14. DOI:10.1016/j.bbi.2005.02.002
12. Гейн С.В. Опиоидергическая регуляция иммунных реакций. Молекулярная медицина. – 2010. – Т. 4. – С. 17–21.
13. Franchi S., Moretti S., Castelli M., Lattuada D., Scavullo C., Panerai A.E., Sacerdote P. Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages // *Brain Behav. Immun.* – 2012. – Vol. 26, No. 3. – P. 480–488. DOI:10.1016/j.bbi.2011.12.010
14. Brejchova J., Holan V., Svoboda P. Expression of Opioid Receptors in Cells of the Immune System // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – Vol. 22, No. 1. – P. 315. DOI:10.3390/ijms22010315
15. Забродин О.Н. К норадренергическому компоненту механизмов стресс-лимитирующего и заживляющего эффектов Даларгина // *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. – 2016. – Т. 14, № 4. – С. 61–66. DOI:10.17816/RCF14461-66
16. Ясенявская А.Л., Самотруева М.А., Башкина О.А., Андреева Л.А., Мясоєдов Н.Ф., Тюренков И.Н., Караулов А.В. Нейропептидная регуляция иммунитета // *Иммунология*. – 2018. – Т. 39, № 5–6. – С. 326–336. DOI: 10.18821/0206-4952-2018-39-5-6-326-336
17. Fara A., Mitrev Z., Rosalia R.A., Assas B.M. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines // *Open Biol.* – 2020. – Vol. 10, No. 9. – P. 200160. DOI:10.1098/rsob.200160
18. Ye Q., Wang B., Mao J. The pathogenesis and treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19 // *J. Infect.* – 2020. – Vol. 80, No. 6. – P. 607–613. DOI:10.1016/j.jinf.2020.03.037
19. Chen R., Lan Z., Ye J., Pang L., Liu Y., Wu W., Qin X., Guo Y., Zhang P. Cytokine Storm: The Primary Determinant for the Pathophysiological Evolution of COVID-19 Deterioration // *Front. Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – Art. ID: 589095. DOI:10.3389/fimmu.2021.589095
20. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J.; HLH Across Speciality Collaboration, UK. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression // *Lancet.* – 2020. – Vol. 395, No. 10229. – P. 1033–1034. DOI:10.1016/S0140-6736(20)30628-0
21. Thompson B.T., Chambers R.C., Liu K.D. Acute Respiratory Distress Syndrome // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – Vol. 377, No. 19. – P. 1904–1905. DOI:10.1056/NEJMc1711824
22. Петров В.И., Амосов А.А., Герасименко А.С., Шаталова О.В., Пономарева А.В., Акинчиц А.Н., Кулакова И.С., Горбатенко В.С. Механизмы развития цитокинового шторма при covid-19 и новые потенциальные мишени фармакотерапии // *Фармация и фармакология*. – 2020. – Т. 8, № 6. – С. 380–391. DOI:10.19163/2307-9266-2020-8-6-380-391
23. Земсков Д.Н., Балыкова Л.А., Радаева О.А., Заславская К.Я., Белый П.А., Семенова Е.В., Ширманкина М.В., Корянова К.Н. Актуальные аспекты этиотропной терапии COVID-19 // *Фармация и фармакология*. – 2022. – Т. 10, № 5. – С. 432–445. DOI:10.19163/2307-9266-2022-10-5-432-445
24. Парахонский А.П. Регуляция иммунного ответа опиоидными пептидами // *Успехи современного естествознания*. – 2008. – № 10 – С. 77–78.
25. Патент № 2728939 С1 Российская Федерация, МПК А61К 38/08, А61Р 31/14. Применение даларгина для производства средств лечения коронавирусной инфекции COVID-19: № 2020113639: заявл. 16.04.2020: опубл. 03.08.2020 / В.А. Виноградов, В.И. Скворцова, В.Н. Каркищенко [и др.]; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России).
26. Украинская Л.А., Васильева Л.С. Ограничение стресс-индуцированной альтерации легких путем активации стресс-лимитирующих систем // *Сибирский медицинский журнал (Иркутск)*. – 2002. – Т. 31, № 2. – С. 28–29.
27. Балачевский Б.В., Курзанов А.Н., Славинский А.А. Даларгин-индуцируемая модуляция функционально-метаболической активности нейтрофильных лейкоцитов // *Успехи современного естествознания*. – 2008. – № 5. – С. 75–77.

АВТОРЫ

Балыкова Лариса Александровна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой педиатрии, директор Медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-2290-0013. E-mail: larisabalykova@yandex.ru

Радаева Ольга Александровна – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой иммунологии, микробиологии и вирусологии с курсом клинической иммунологии и аллергологии Медицинский институт ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0003-1383-2474. E-mail: radaevamed@mail.ru

Заславская Кира Яковлевна – ассистент кафедры биологической и фармацевтической химии с курсом организации и управления фармацией Медицинский институт ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-7348-9412. E-mail: kiryonok@yandex.ru

Белый Петр Александрович – кандидат медицинских наук, старший лаборант кафедры пропедевтики внутренних болезней и гастроэнтерологии ФГБОУ ВО МГМУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0001-5998-4874. E-mail: pbely@ncpharm.ru

Павелкина Вера Федоровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой инфекционных болезней с курсами эпидемиологии, фтизиатрии, кожных и венерических болезней ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0001-9582-9986. E-mail: pavelkina@rambler.ru

Пятаев Николай Анатольевич – доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой анестезиологии и реаниматологии ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева». ORCID ID: 0000-0002-9688-7640. E-mail: pyataevna@mail.ru

Иванова Анастасия Юрьевна – врач-кардиолог, ФГБОУ ВО РязГМУ им. академика И.П. Павлова Минздрава России; врач-анестезиолог ГБУ «Областная клиническая больница», г. Рязань. ORCID ID: 0000-0002-4112-5382. E-mail: Nastya_doctor@list.ru

Родоман Григорий Владимирович – доктор медицинских наук, главный врач ГБУЗ «Городская клиническая больница № 24 Департамента здравоохранения города Москвы», г. Москва. ORCID ID: 0000-0001-6692-1425 E-mail: generalsurgery24@mail.ru

Костина Наталья Эдуардовна – заведующая отделением пульмонологии, БУЗ ВО «Воронежская областная клиническая больница № 1», г. Воронеж. ORCID ID: 0000-0002-5128-5005. E-mail: nata166k@yahoo.com

Филимонов Виктор Борисович – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой урологии с курсом хирургических болезней ФГБОУ ВО РязГМУ им. академика И.П. Павлова Минздрава России. ORCID ID: 0000-0002-2199-0715. E-mail: filimonov1974@mail.ru

Симакина Елена Николаевна – врач-инфекционист, заведующая инфекционным отделением ОБУЗ «Клиническая больница № 1», г. Смоленск, Россия. ORCID ID: 0000-0002-5709-8913. E-mail: e.simakina@mail.ru

Быстрицкий Дмитрий Алексеевич – специалист организационно-методического отдела Департамента здравоохранения г. Москвы по инфекционным болезням, врач-инфекционист, врач-методист, заведующий отделением по оказанию платных медицинских услуг ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы». ORCID ID: 0000-0001-9253-9684. E-mail: bistritskiyda@ikb1.ru

Агафьина Алина Сергеевна – кандидат медицинских наук, заведующая отделением клинических исследований, Санкт-Петербургское государственное бюджетное учреждение здравоохранения «Городская больница № 40 Курортного района», г. Санкт-Петербург. ORCID ID: 0000-0003-2598-4440. E-mail: a.agafina@mail.ru

Корянова Ксения Николаевна – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармакологии с курсом клинической фармакологии ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России. ORCID ID: 0000-0003-1571-9301. E-mail: kskor-16@mail.ru

Пушкарь Дмитрий Юрьевич – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой урологии ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России; врач-уролог ГКБ им. С.И. Спасокукоцкого Департамента здравоохранения города Москвы; академик РАН. ORCID ID: 0000-0002-6096-5723. E-mail: pushkardm@mail.ru

УДК 577.352.38



УЧАСТИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В МЕХАНИЗМАХ ТОКСИЧНОСТИ АЦЕТАТА СВИНЦА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

С.Г. Дзугкоев, Ф.С. Дзугкоева, О.И. Маргиева, А.Е. Хубулова, И.В. Можаяева

Институт биомедицинских исследований – филиал федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального научного центра «Владикавказский научный центр Российской академии наук», 362025, Россия, г. Владикавказ, ул. Пушкинская, д. 47

E-mail: patbiochem@mail.ru

Получена 12.10.2022

После рецензирования 15.12.2022

Принята к печати 20.12.2022

Цель. Изучение фармакологических веществ, играющих роль регуляторов экспрессии eNOS, в модификации эффектов свинцовой интоксикации в эксперименте.

Материал и методы. В эксперименте были использованы линейные крысы-самцы одного возраста: интактные и со свинцовой интоксикацией (120 голов). Дизайн исследования: группа 1 – контроль; группа 2 – интоксикация раствором ацетата свинца; группа 3 – интактные + L-нитроаргинин метиловый эфир; группа 4 – ацетат свинца + L-нитроаргинин метиловый эфир; группа 5 – интактные + L-аргинин; группа 6 – ацетат свинца + L-аргинин. В исследовании проводилось изучение состояния окислительно-восстановительных реакций, содержания стабильных метаболитов оксида азота (NO_x), липидного профиля, уровня экспрессии NO-синтазы (eNOS) в эндотелии сосудов, основных процессов мочеобразования и активности Na^+/K^+ -АТФ-азы слоёв почечной ткани, а также в печени. Результаты подвергались статистической обработке.

Результаты. Сатурнизм вызвал развитие окислительного стресса, снижение содержания NO_x в плазме крови, нарушение биодоступности L-аргинина для eNOS и дисфункцию эндотелия. Показателями нарушения функции почек были снижение скорости клубочковой фильтрации (СКФ), канальцевой реабсорбции воды, натрия и активности Na^+/K^+ -АТФ-азы. О повреждении гепатоцитов свидетельствовало изменение активности органоспецифических ферментов в крови и Na^+/K^+ -АТФ-азы. L-аргинин проявлял антиоксидантные свойства, повышал содержание NO_x и уровень экспрессии eNOS. Ингибитор eNOS – L-нитроаргинин метиловый эфир показал противоположные L-аргинуину эффекты.

Заключение. Биохимическими маркерами повреждения клеток почек и печени при сатурнизме являются показатели окислительного стресса, дефицит NO_x и нарушение гемодинамики в них. В этих механизмах участвовали фармакологические вещества: ингибитор eNOS – L-нитроаргинин метиловый эфир, вызывавший снижение уровня экспрессии энзима, и индуктор eNOS – L-аргинин, повышавший степень выраженности этого показателя. В механизмах токсичности свинца участвовало нарушение обмена холестерина, способствующее сниженной доступности L-аргинина для eNOS и продукции NO_x . Следовательно, применение L-аргинина можно рекомендовать как регулятора окислительного стресса и NO-продуцирующей функции эндотелия при других патологиях.

Ключевые слова: ацетат свинца; перекисное окисление липидов; антиокислительная система; суммарные метаболиты оксида азота; дисфункция эндотелия; L-аргинин; L-NAME; функция почек; холестерин; гепатоциты

Список сокращений: ПДК – предельно допустимая концентрация; ПОЛ – перекисное окисление липидов; АОС – антиокислительная система; NO – оксид азота; NO_x – суммарные метаболиты оксида азота; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; iNOS – индуцибельная NO-синтаза; Рн – неорганический фосфор; Na^+/K^+ -АТФ-аза – натрий-калиевая аденозинтрифосфатаза; L-NAME – L-нитроаргинин метиловый эфир; TNF- α – фактор некроза опухоли- α ; iL-1 β – интерлейкин 1 β ; iL-10 – интерлейкин 10; МДА – малоновый диальдегид; СОД – супероксиддисмутаза; ЦП – церулоплазмин; ОХС – общий холестерин; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; СКФ – скорость клубочковой фильтрации; АДМА – асимметричный диметиларгинин; АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза; ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза; АРК – активные радикалы кислорода; АМК – активные метаболиты кислорода; СРО – свободно-радикальное окисление.

Для цитирования: С.Г. Дзугкоев, Ф.С. Дзугкоева, О.И. Маргиева, А.Е. Хубулова, И.В. Можаяева. Участие фармакологических веществ в механизмах токсичности ацетата свинца в эксперименте. *Фармация и фармакология*. 2022;10(6):589-600. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-589-600

© С.Г. Дзугкоев, Ф.С. Дзугкоева, О.И. Маргиева, А.Е. Хубулова, И.В. Можаяева, 2022

For citation: S.G. Dzugkoev, F.S. Dzugkoeva, O.I. Margieva, A.E. Khubulova, I.V. Mozhaeva. Experimental participation of pharmacological substances in mechanisms of lead acetate toxicity. *Pharmacy & Pharmacology*. 2022;10(6):589-600. DOI: 10.19163/2307-9266-2022-10-6-589-600

EXPERIMENTAL PARTICIPATION OF PHARMACOLOGICAL SUBSTANCES IN MECHANISMS OF LEAD ACETATE TOXICITY

S.G. Dzugkoev, F.S. Dzugkoeva, O.I. Margieva, A.E. Khubulova, I.V. Mozhaeva

Institute of Biomedical Research – branch of Vladikavkaz Scientific
Center of the Russian Academy of Sciences,
47, Pushkinskaya Str., Vladikavkaz, Russia, 362025

E-mail: patbiochem@mail.ru

Received 12 Oct 2022

After peer review 15 Dec 2022

Accepted 20 Dec 2022

The aim of the work is to study pharmacological substances that play a role of eNOS expression regulators in the modification of lead intoxication effects in the experiment.

Materials and methods. In the experiment, linear male rats of the same age were used: intact and with lead intoxication (120 heads). The study design was the following: group 1 – control; group 2 – intoxication with a lead acetate solution; group 3 – intact + L-nitroarginine methyl ester; group 4 – lead acetate + L-nitroarginine methyl ester; group 5 – intact + L-arginine; group 6 – lead acetate + L-arginine. The research carried out the study state of the redox reactions, the content of nitric oxide (NO_x) stable metabolites, a lipid profile, the level of NO-synthase (eNOS) expression in the vascular endothelium, the main processes of urination and the activity of Na⁺/K⁺-ATPase in the renal tissue layers, as well as in the liver. The results were subjected to statistical processing.

Results. Saturnism caused the oxidative stress development, a decrease in the NO_x content in blood plasma, a violation of the L-arginine for eNOS bioavailability, and an endothelial dysfunction. Indicators of the impaired renal function were a decrease in the glomerular filtration rate (GFR), the tubular reabsorption of water, sodium, and the Na⁺/K⁺-ATPase activity. The damage to hepatocytes was evidenced by changes in the activity of organ-specific enzymes in the blood and Na⁺/K⁺-ATPase. L-arginine exhibited antioxidant properties, increased the NO_x content and the level of eNOS expression. The eNOS L-nitroarginine methyl ester inhibitor showed the effects opposite to L-arginine.

Conclusion. Biochemical markers of damage to kidney and liver cells during saturnism are indicators of the oxidative stress, NO_x deficiency and hemodynamic disturbances in them. These mechanisms involved the following pharmacological substances: an eNOS inhibitor, L-nitroarginine methyl ester, which caused a decrease in the expression level of the enzyme, and an eNOS inducer, L-arginine, which increased this indicator severity. The lead toxicity mechanisms have been implicated in the impaired cholesterol metabolism, contributing to the L-arginine reduced availability for eNOS and the NO_x production. Therefore, the use of L-arginine can be recommended as a regulator of the oxidative stress and an NO-producing endothelial function in other pathologies.

Keywords: lead acetate; lipid peroxidation; antioxidant system; total nitric oxide metabolites; endothelial dysfunction; L-arginine; L-NAME; kidney function; cholesterol; hepatocytes

Abbreviations: MPC – maximum permissible concentration; LPO – lipid peroxidation; AOS – antioxidant system; NO – nitric oxide; NO_x – total nitric oxide metabolites; eNOS – endothelial NO synthase; iNOS – inducible NO synthase; IP – inorganic phosphorus; Na⁺/K⁺-ATPase – sodium-potassium adenosine triphosphatase; L-NAME – L-nitroarginine methyl ester; TNF-α – tumor necrosis factor-α; IL-1β – interleukin 1β; IL-10 – interleukin 10; MDA – malonic dialdehyde; SOD – superoxide dismutase; CP – ceruloplasmin; TC – total cholesterol; LDL – low density lipoproteins; HDL – high density lipoproteins; GFR – glomerular filtration rate; ADMA – asymmetric dimethylarginine; ALT – alanine aminotransferase; AST – aspartate aminotransferase; GGTP – gamma-glutamyl transpeptidase; AORs – active oxygen radicals; AOMs – active oxygen metabolites; FRO – free radical oxidation.

ВВЕДЕНИЕ

Проведенные за последние годы экспериментальные и клинические исследования показали негативную роль экпатогенных факторов и их участие в развитии сосудистых осложнений, нарушении функции эндотелия и патологии внутренних органов – почек и печени. В этом аспекте свое негативное участие вносят тяжёлые металлы, превышающие в окружающей среде довольно часто предельно допустимую концентрацию (ПДК). Интерес учёных привлекает и влияние свинца на метаболизм, и функцию внутренних органов. Оценивая токсичность свинца для организма, следует

учитывать его стойкость, кумулятивную способность для биологических сред человека и животных [1–3]. Ионы свинца при низких уровнях их содержания, которые ранее считались безопасными, вызывают токсические эффекты [4–6]. Будучи политропным ядом, свинец способен нарушать структуру и функцию клеток внутренних органов. Свинцовая нефропатия и гепатопатия являются интегральной частью токсического влияния, повреждаются почти все элементы нефрона и гепатоцита [7, 8].

Свинец, изменяя структуру гема гемоглобина крови, является причиной развития анемии, гипоксии клеток органов и активации процесса

перекисного окисления липидов (ПОЛ) в эритроцитах и тканях [9–14]. Будучи необходимой составляющей систем организма в физиологических условиях, свободно-радикальное окисление (СРО) может быть фактором развития патологического процесса. Однако следует отметить, что весьма недостаточно представлены данные литературы, которые свидетельствуют о способности свинца активировать процесс ПОЛ в крови и клетках внутренних органов. Более того, повышенная активность свободно-радикальных реакций (СРР) может быть причиной не только негативных явлений, но и играть роль патогенетического звена ряда патологических процессов при различных нозологиях. Этот процесс возможно интерпретировать как многофункциональную стресс-реакцию организма на токсические воздействия. Развивающийся окислительный стресс ингибирует продукцию оксида азота (NO), который выполняет роль внутриклеточного мессенджера и участвует в реализации ответных реакций со стороны клеток органов и тканей [15]. NO образуется при ферментативном окислении L-аргинина NO-синтазой (eNOS). Реакции ПОЛ вызывают изменение липопротеинов в биологических мембранах, повышая при этом их гидрофильность, проницаемость и нарушения липид-белковых взаимодействий, включая участие энзимов.

Единичные сведения литературы посвящены анализу активности Na^+/K^+ -АТФ-азы эритроцитов при свинцовой интоксикации у работающих на металлургическом производстве [16]. Экспериментальные исследования на крысах показали, что систематическая экспозиция ацетатом свинца сопровождается его накоплением в структурах нефрона и нарушением функционального состояния почек. Длительность контакта со свинцом и количество кумулированного вещества может привести к хронической нефропатии, характеризующейся развитием процесса воспаления и апоптоза клеток почек [17].

В механизмах развития нефропатии участвуют провоспалительные цитокины: фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин 1β (IL- 1β) и др., при недостаточном уровне противовоспалительных цитокинов – IL-10 в нефроне. Вместе с тем следует отметить, что комплексные исследования об изменениях окислительно-восстановительных реакций и их роли в нарушении метаболизма NO, активности и экспрессии NO-синтазы, функции почек и печени при систематическом отравлении организма ацетатом свинца недостаточно представлены в доступной литературе. Отсутствуют литературные данные о фармакологических препаратах, играющих роль регуляторов экспрессии eNOS, при свинцовой интоксикации; участие в этих процессах L-аргинина и его модифицированного производного L-NAME (L-нитроаргинин метиловый эфир). Это и послужило основанием для проведения данного экспериментального исследования.

ЦЕЛЬ. Изучение фармакологических веществ, играющих роль регуляторов экспрессии eNOS, в модификации эффектов свинцовой интоксикации в эксперименте.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на линейных крысах-самцах одной возрастной группы (10–14 мес), массой 200–280 грамм: интактных – контрольные (n=20) и с хронической свинцовой интоксикацией, вызванной ежедневным введением раствора ацетата свинца в дозе 5 мг/кг веса животного подкожно в течение 30 дней (n=60). На фоне свинцовой интоксикации и интактным животным (n=40) вводили фармакологические вещества: L-аргинин (10 мг/кг) и L-NAME (25 мг/кг). Во время экспериментов животные, полученные из вивария ИБМИ ВНЦ РАН, находились на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к воде и естественном световом режиме.

Экспериментальные животные были разделены на следующие серии: 1-я контрольная группа (n=20) – исследования на интактных крысах; 2-я опытная группа (n=20) при систематической интоксикации, вызываемой подкожной инъекцией раствора ацетата свинца (5 мг/кг массы тела животного) длительностью 30 дней; 3-я группа (n=20) – интактные крысы + модифицированный L-аргинин (L-NAME); 4-я группа (n=20) – крысы с интоксикацией ацетатом свинца + L-NAME; 5-ая группа (n=20) – интактные крысы с введением L-аргинина; 6-я группа (n=20) – крысы с интоксикацией ацетатом свинца + L-аргинин. Все серии опытов длились 30 дней. Опыты проводили согласно требованиям, предъявляемым к работе с использованием животных в эксперименте. Соблюдение международных требований работы с экспериментальными животными, включая гуманное обращение с ними, что подтверждается решением Комитета по этике ИБМИ (26.12.2018, протокол №6). Применяли регуляторы экспрессии eNOS – L-аргинин (ООО «Диаэм», Ajinomoto, Япония) и L-NAME (ООО «Эталон», катал. № 5757 Sigma-Aldrich, США).

По окончании экспериментов у интактных и опытных крыс под рауш-наркозом вскрывали грудную клетку, забирали кровь с помощью антикоагулянта цитрата натрия из левого желудочка сердца через катетер, центрифугировали на лабораторной центрифуге ЦЛМН-Р10-01-ЭЛЕКОН (ЭЛЕКОН-М, Россия), в течение 10 мин при 1500 об/мин, отбирали плазму крови. Эритроцитарную массу дважды промывали физиологическим раствором, затем определенный объем лизировали. Одновременно извлекали образцы тканей почек и печени, гомогенизировали при температуре +4°C и получали гомогенаты. Эффективность моделирования оценивали по содержанию свинца в крови и развитию интоксикационного синдрома по интенсивности системы ПОЛ – АОС. Определяли степень перекисного окисления по данным изменения концентрации конечного

продукта ПОЛ – малонового диальдегида (МДА) в гемолизате эритроцитов, в гомогенатах почечной и печеночной тканей колориметрическим методом с тиобарбитуровой кислотой по методу Asacawa T. [18]. Состояние антиоксидантной системы (АОС) организма оценивали по активности ее ферментов – каталазы в плазме крови спектрофотометрически по методу М.А. Королюка (1988) [19] и супероксиддисмутазы (СОД) – методом окисления адреналина в гемолизате эритроцитов (Сирота Т.В., 1999) [20], концентрации церулоплазмينا (ЦП) – методом Равина [21]. Обмен холестерина (ХС) определяли по данным общего ХС (ОХС), ХС ЛПНП, ХС ЛПВП и ТАГ в плазме крови наборами (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия).

Одновременно общепринятыми методами исследовали активность ферментов: аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтрансептидазы (ГГТП) и фосфатазы щелочной в плазме крови, используя наборы фирмы «Витал». Для анализа и определения стабильных метаболитов оксида азота (NO_x) в плазме крови применяли метод, разработанный Метельской В.А. [22].

Исследование уровня экспрессии эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) проводили методом Вестерн-блоттинга в эндотелии аорты у подопытных животных, включающий обработку образцов в жидком азоте. Полученное содержимое помещали в центрифужную пробирку, промывали фосфатным буфером 3 раза и осадок центрифугировали (10 мин при 1000 g). Полученный осадок подвергали действию лизирующего буфера в объеме 100 мкл. Для определения действия применяемых фармакологических препаратов использовали сопоставительный анализ уровня экспрессии eNOS по сравнению с контрольными белками-метками. Данные выражали в условных единицах, рассчитывая отношение исследуемой полосы X по отношению к данным контроля на каждой пленке. Определение этого показателя проводили совместно с биохимической лабораторией ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр терапии и профилактической медицины» Минздрава России. Токсичность ацетата свинца у подопытных животных определяли по данным содержания тяжелого металла в крови у животных. Экстракцию металла производили концентрированной азотной кислотой, после чего содержание свинца определяли спектрофотометрически на масс-спектрофотометре ICH-VSNP 4500 Hewlett-Packard (США).

Для исследования функционального состояния нефрона использовали условия спонтанного диуреза, оценивали основные процессы мочеобразования: скорость клубочковой фильтрации (СКФ) и канальцевую реабсорбцию натрия ($R_{\text{Na}}\%$) и воды ($R_{\text{H}_2\text{O}}\%$), фильтрационные заряды калия и натрия. Величину клубочковой ультрафильтрации определяли клиренсовым методом по отношению креатинина мочи к его содержанию в плазме крови

с учетом часового диуреза. Все показатели функции почек рассчитывали по формулам, разработанным академиком Наточиным Ю.В. [23]. Активность Na^+/K^+ -АТФ-азы в гомогенатах коркового и мозгового слоев почек, а также печени определяли по методу Scow J.C. (1957). Удельную активность рассчитывали на мг белка в час (мкмольРн/мгбелка/ч). Белок в пробах определяли по методу Lowry O.H. (1951) [24].

С помощью программы Microsoft Excel 2006 и пакета Statistica 6.0 проводили статистическую обработку результатов. Полученные данные характеризовались нормальным распределением в соответствии с критерием Шапиро-Уилка и при их обработке применяли параметрический метод статистики. Данные были представлены в виде среднего значения (М) и ошибки среднего ($\pm m$). Достоверность различий определяли по t-критерию Стьюдента, проверяли статистическую достоверность различий между группами и считали $p < 0,05$ уровнем статистической значимости. Коэффициенты корреляции определяли по Пирсону.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Попадая в организм животных и человека, свинец ингибирует синтез гемоглобина и вызывает развитие анемии с последующей гипоксией тканей. Нарушение кислородтранспортной функции крови способствует образованию активных форм кислорода (АФК) и активации процесса ПОЛ. Будучи обязательно присутствующим в мембранах клеток, СРО является важным фактором нормальной жизнедеятельности клеток, обеспечивая обновление фосфолипидов клеточных мембран и регуляцию метаболизма. Однако повышенная активность СРО может быть причиной негативных проявлений и патологических процессов. Тем не менее, следует отметить, что в литературе недостаточно представлены сведения о способности свинца активировать СРО в крови и внутренних органах как патогенетического звена сосудистых осложнений, его взаимосвязи с другими метаболическими процессами, в частности с регуляцией содержания NO, активности NO-синтазы, взаимодействия с ферментными системами и участие в этих процессах регуляторов экспрессии eNOS – L-аргинина и L-NAME. Систематизируя и анализируя наши результаты о характере изменений окислительно-восстановительных реакций при свинцовой интоксикации, следует отметить, что имеет место активация липопероксидации по данным достоверного увеличения концентрации МДА в эритроцитах, в клетках почечной и печеночной тканей (табл. 1). Возрастает концентрация МДА в гемолизате эритроцитов в среднем на 33,3% ($p < 0,02$), в корковом и мозговом веществе почек при парентеральном введении тяжелого металла соответственно на 74,2% ($p < 0,001$) и 25,4% ($p < 0,001$), а также в гепатоците на 94,1% ($p < 0,001$).

Во взаимосвязи с процессами СРО находится АОС организма, ограничивающая ПОЛ практически

во всех его звеньях. О состоянии АОС судили по активности супероксиддисмутазы (СОД), каталазы и концентрации церулоплазмينا (ЦП). Данные показали дисбаланс в АОС – снижение активности СОД и повышение уровня каталазы и ЦП (табл. 1).

Анализ данных активности АОС показал ингибирование СОД в эритроцитах на 62,2%, тогда как активность каталазы и содержание ЦП в сыворотке крови возросли, соответственно, на 69,5% и 27,6%. Для понимания отсутствия односторонности в изменении активности ферментов АОС учитывается различие их молекулярной структуры; при этом фермент каталаза является наиболее защищенной, чем СОД из-за наличия четырех молекул гема и 4 НАДФН (никотинамидадениндинуклеотидфосфат).

Развитие интоксикационного синдрома при парентеральном введении ацетата свинца характеризуется наличием достоверного повышения содержания свинца в плазме крови, моче, в тканях почек и печени. Выявлена сильная корреляционная связь между дозой вводимого ацетата свинца и его концентрацией в сыворотке крови ($r=+0,95$; $p<0,001$). Эти результаты согласуются с данными литературы [12]. Любой ксенобиотик, как правило, окисляется в микросомальной фракции гепатоцита, оказывает свое повреждающее действие и экскретируется почками. В соответствии с полученными нами данными было отмечено, что активные радикалы кислорода (АРК) при свинцовой интоксикации индуцируют развитие системного окислительного стресса, который сопровождается снижением концентрации в плазме крови NO_x (табл. 1).

Анализ взаимосвязи между повышением концентрации МДА в крови и снижением уровня NO_x показал наличие отрицательной сильной связи между этими показателями ($r=-0,69$; $p<0,001$). Следует отметить, что нарушение сигнального пути L-аргинин–NO-синтаза–NO играет определяющую роль в регуляции вазодилаторного действия NO. Продукты ПОЛ могут нарушать взаимодействие между оксигеназным и редуктазным доменами NO-синтазы, вследствие чего фермент начинает вырабатывать АФК и, соответственно, меньше образуется NO. В обсуждении этих результатов, следует отметить причинно-следственную связь сниженного уровня NO_x , интенсивности липопероксидации, наличия субстрата L-аргинина, его модифицированных производных, активности и уровня экспрессии eNOS. В этом аспекте нужно полагать, что в развитии дефицита L-аргинина как индуктора экспрессии eNOS, может играть роль и его использование в орнитинном цикле.

Данные литературы свидетельствуют о повышенном содержании мочевины в сыворотке крови на фоне свинцовой интоксикации вследствие её продукции [25, 26]. Поэтому многие исследователи используют ингибиторы фермента аргиназы цикла синтеза мочевины для увеличения концентрации субстрата L-аргинина [27]. Причиной недостаточности

L-аргинина может быть его превращение в асимметричный диметиларгинин (ADMA) и L-NAME, то есть модифицированные производные, играющие конкурентную роль с L-аргиномом и снижающие его биодоступность для eNOS. В связи с этим мы изучали влияние этих аминокислот на содержание продуктов ПОЛ, NO_x и экспрессию eNOS. В нашем исследовании показано участие повышенной активности ПОЛ, концентрации МДА в эритроцитах, клетках коркового и мозгового слоев почек и гепатоцитов в нарушении продукции NO_x . Их взаимосвязь подтверждается наличием отрицательной корреляционной связи между этими показателями. Для установления факта нарушения NO-продуцирующей функции эндотелия и недостаточного образования NO_x , нами исследовано участие уровня экспрессии и функциональной активности eNOS. Другой причиной дефицита L-аргинина является повышение уровня модифицированного производного L-аргинина – ADMA и его аналога – L-NAME. Наши данные показали, что ингибитор экспрессии eNOS вызывал активацию процесса ПОЛ и одновременно еще более выраженное снижение уровня NO_x (табл. 1). В противоположность этому результату L-аргинин показал способность повышать концентрацию NO при сатурнизме и одновременно обеспечивать снижение активности ПОЛ по данным содержания МДА (табл. 2). Адаптивная система в условиях снижения активности СРО под влиянием L-аргинина показала повышение активности СОД и положительную динамику в отношении каталазы и ЦП (табл. 2).

В регуляции уровня экспрессии и активности eNOS важную роль играют коферменты, которые теряют свое восстановленное состояние при окислительном стрессе, а также присутствие ингибитора экспрессии – eNOS, аналога ADMA – L-NAME. Для подтверждения этого предположения мы предприняли исследование экспрессии eNOS на фоне L-NAME при интоксикации ацетатом свинца. Данные показали, что при сатурнизме L-NAME ингибировал экспрессию eNOS на 23,9%, тогда как L-аргинин стимулировал этот показатель на 29,05%. Нормализуя окислительно-восстановительные реакции, L-аргинин одновременно увеличивал продукцию и содержание NO_x , способствуя при этом вазодилатации. Полученные нами данные свидетельствуют об участии L-NAME и L-аргинина в регуляции уровня экспрессии эндотелиальной NO-синтазы. Результаты нашего исследования подтверждают, что активация iNOS в условиях окислительного стресса сопровождается снижением уровня экспрессии eNOS, ответственной за базисный уровень продукции NO_x как основного вазодилатора. Сам факт повышения уровня экспрессии eNOS под влиянием индуктора eNOS L-аргинина и снижение этого показателя на фоне модифицированного производного аминокислоты – L-NAME придает результатам приоритетный характер.

Таблица 1 – Влияние ингибитора экспрессии eNOS – L-NAME на характер изменений показателей окислительного стресса и липидного обмена при сатурнизме в эксперименте

Показатели	Единицы измерения	Контроль	Ацетат свинца	Интактные + L-NAME	Ацетат свинца + L-NAME
МДА, эритроциты	нмоль/мл	4,74±0,16	6,32±0,015 ^а	4,82±0,043 ^б	6,59±0,03 ^{б,в}
МДА, корковое вещество	нмоль/мг белка	3,18±0,22	5,54±0,02 ^а	3,24±0,01 ^б	5,67±0,02 ^{б,в}
МДА, мозговое вещество	нмоль /мг белка	4,25±0,059	5,33±0,009 ^а	4,55±0,042 ^б	5,48±0,015 ^{б,в}
МДА, гепатоцит	нмоль /мг белка	1,73±0,05	3,36±0,007 ^а	1,77±0,07 ^б	3,52±0,013 ^{б,в}
СОД	усл. ед.	88,05±0,07	54,94±0,081 ^а	82,1±1,67 ^б	51,97±0,318 ^{б,в}
Каталаза	мкат/л	225,56±29,09	382,36±0,313 ^а	285,6±4,63 ^б	395,41±3,01 ^{б,в}
ЦП	мг/л	339,14±6,59	432,29±1,14 ^а	360,2±1,15 ^б	448,6±3,18 ^{б,в}
NO	мкмоль	50,95±0,65	29,38±0,029 ^а	48,13±0,57 ^б	28,33±0,32 ^{б,в}
ОХС	ммоль/л	1,88±0,03	4,67±0,009 ^а	2,08±0,01 ^б	5,02±0,014 ^{б,в}
ХС ЛПНП	ммоль/л	1,09±0,01	4,15±0,02 ^а	1,11±0,01 ^б	4,54±0,005 ^{б,в}
ХС ЛПВП	ммоль/л	0,673±0,01	0,27±0,006 ^а	0,65±0,03 ^б	0,205±0,009 ^{б,в}
ТАГ	ммоль/л	0,246±0,011	0,55±0,009 ^а	0,25±0,01 ^б	0,61±0,007 ^{б,в}

Примечание: МДА – малоновый диальдегид; СОД – супероксиддисмутаза; ЦП – церулоплазмин; NO – оксид азота; ОХС – общий холестерин; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ТАГ – триацилглицериды; L-NAME – L-нитроаргинин метиловый эфир; а – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца относительно контроля; б – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-NAME относительно интактных + L-NAME; в – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-NAME относительно контроля; вв – $p < 0,01$ – достоверность ацетата свинца + L-NAME относительно ацетата свинца.

Таблица 2 – Влияние индуктора экспрессии eNOS – L-аргинина на характер изменений показателей окислительного стресса и липидного обмена при сатурнизме в эксперименте

Показатели	Единицы измерения	Контроль	Ацетат свинца	Интактные + L-аргинин	Ацетат свинца + L-аргинин
МДА, эритроциты	нмоль/мл	4,74±0,16	6,32±0,015 ^а	4,18±0,10 ^б	6,05±0,1 ^{б,вв}
МДА, корковое вещество	нмоль /мг белка	3,18±0,22	5,54±0,02 ^а	2,8±0,05 ^б	5,26±0,005 ^{б,в}
МДА, мозговое вещество	нмоль /мг белка	4,25±0,059	5,33±0,009 ^а	3,9±0,06 ^б	5,19±0,009 ^{б,в}
МДА, гепатоцит	нмоль /мг белка	1,73±0,05	3,36±0,007 ^а	1,67±0,03 ^б	3,22±0,013 ^{б,в}
СОД	усл.ед.	88,05±0,07	54,94±0,081 ^а	88,8±1,37 ^б	57,18±0,38 ^{б,в}
Каталаза	мкат/л	225,56±29,09	382,36±0,313 ^а	221,72±2,97 ^б	370,17±3,12 ^{б,в}
ЦП	мг/л	339,14±6,59	432,29±1,14 ^а	336,4±6,39 ^б	416,3±3,71 ^{б,в}
NO	мкмоль	50,95±0,65	29,38±0,029 ^а	53,25±0,08 ^б	32,07±0,29 ^{б,в}
ОХС	ммоль/л	1,88±0,03	4,67±0,009 ^а	1,84±0,02 ^б	4,32±0,009 ^{б,в}
ХС ЛПНП	ммоль/л	1,09±0,01	4,15±0,02 ^а	1,03±0,03 ^б	3,77±0,015 ^{б,в}
ХС ЛПВП	ммоль/л	0,673±0,01	0,27±0,006 ^а	0,69±0,03 ^б	0,39±0,011 ^{б,в}
ТАГ	ммоль/л	0,246±0,011	0,55±0,009 ^а	0,23±0,03 ^б	0,49±0,007 ^{б,в}

Примечание: МДА – малоновый диальдегид; СОД – супероксиддисмутаза; ЦП – церулоплазмин; NO – оксид азота; ОХС – общий холестерин; ЛПНП – липопротеины низкой плотности; ЛПВП – липопротеины высокой плотности; ТАГ – триацилглицериды; L-NAME – L-нитроаргинин метиловый эфир; а – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца относительно контроля; б – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-аргинин относительно интактных + L-аргинин; в – $p < 0,001$ – достоверность ацетата свинца + L-аргинин относительно контроля; вв – $p < 0,01$ – достоверность ацетата свинца + L-аргинин относительно ацетата свинца.

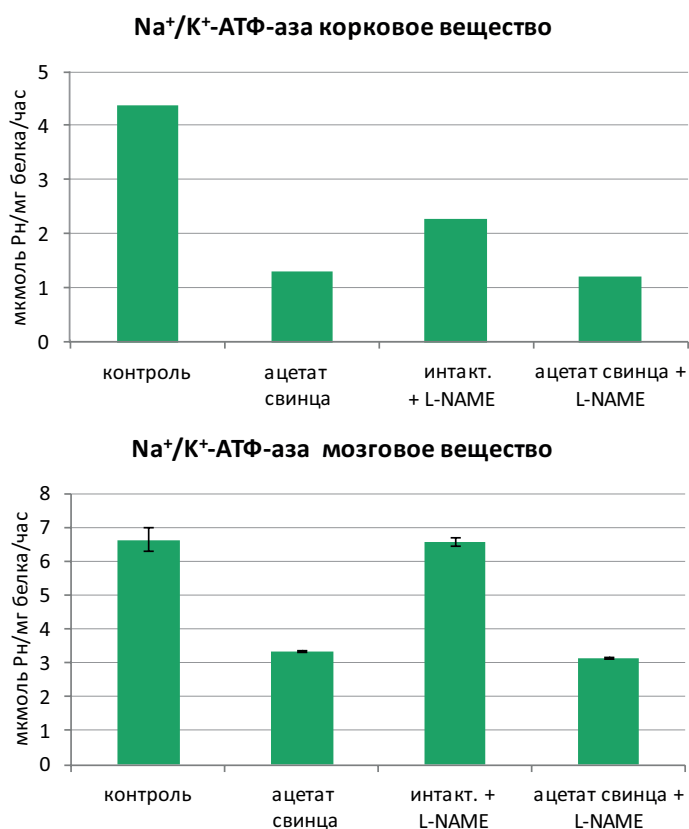


Рисунок 1 – Динамика изменений активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы при сатурнизме и влияние ингибитора экспрессии eNOS – L-NAME

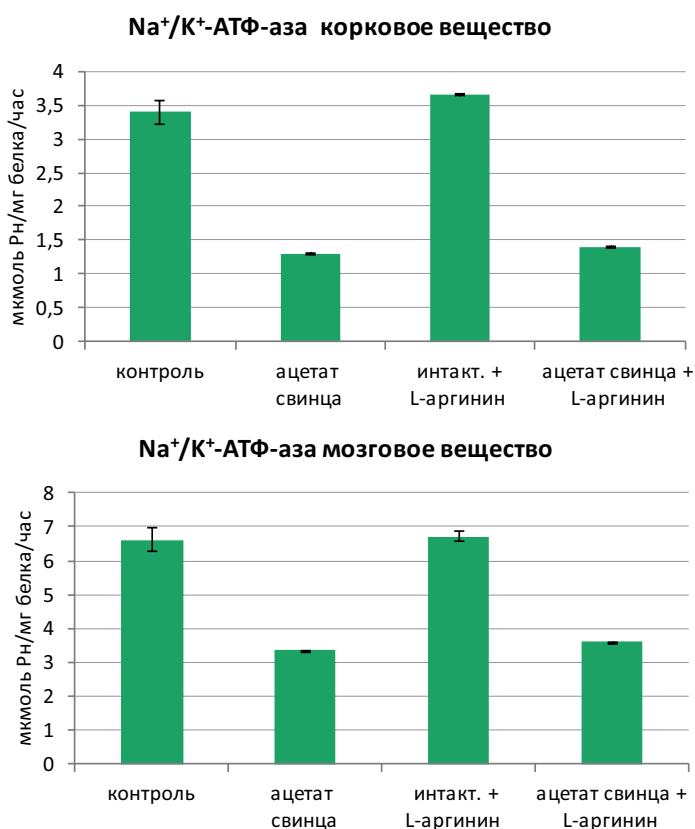


Рисунок 2 – Динамика изменений активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы при сатурнизме и влияние индуктора экспрессии eNOS – L-аргинина

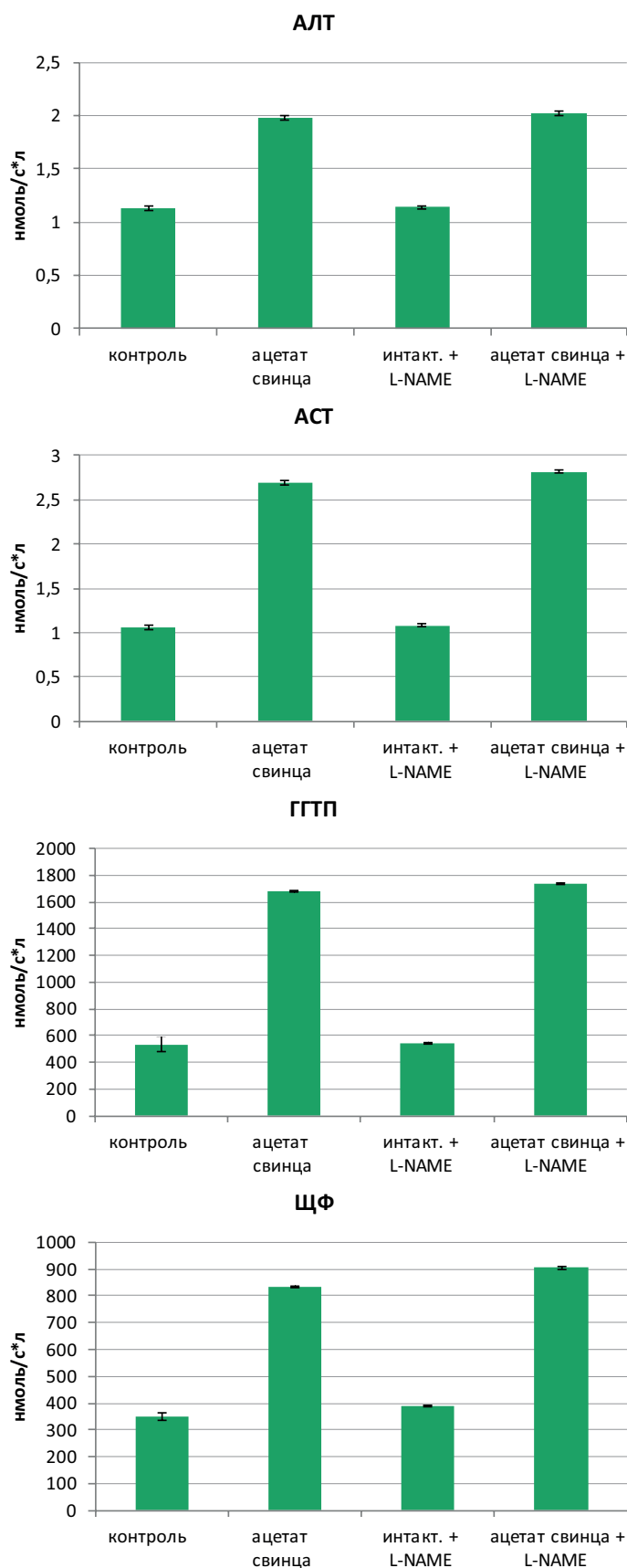


Рисунок 3 – Данные изменений активности органо-специфических ферментов под влиянием ингибитора экспрессии eNOS – L-NAME

Примечание: АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспартатаминотрансфераза; ГГТ – гамма-глутамилтранспептидаза; ЩФ – щелочная фосфатаза.

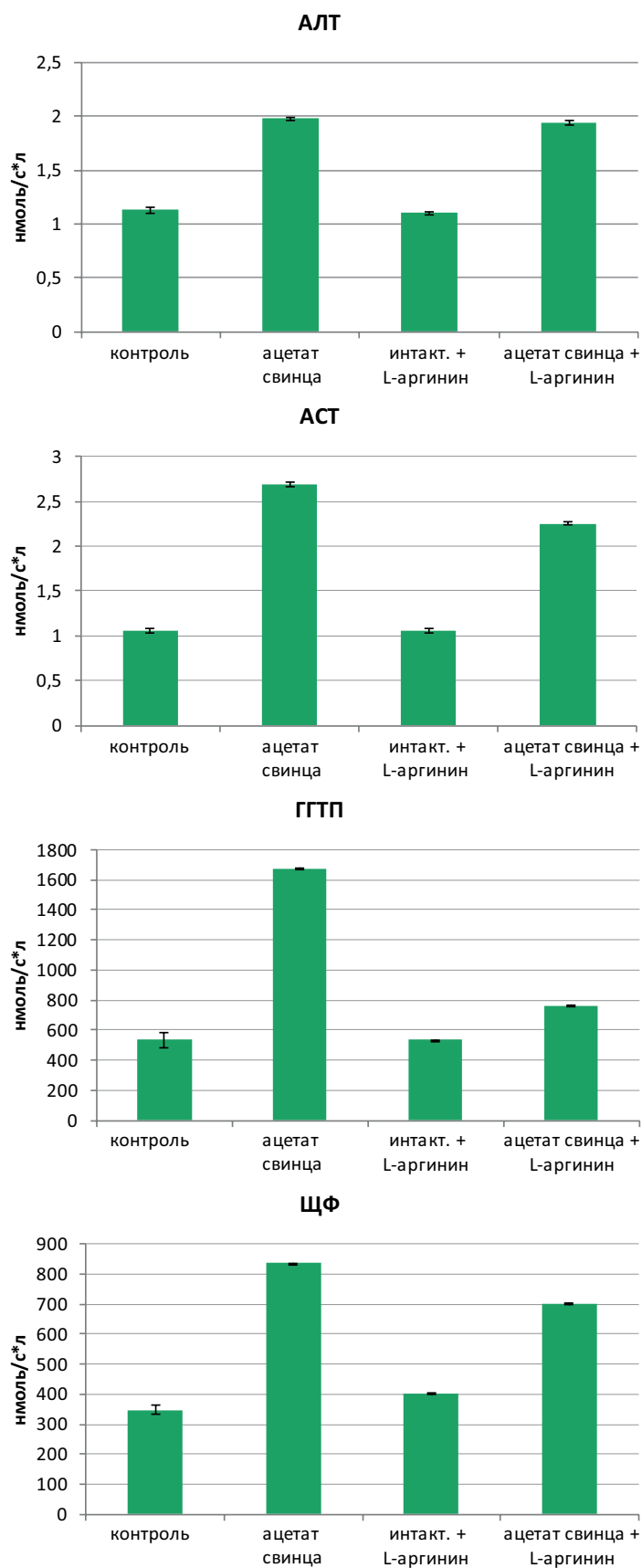


Рисунок 4 – Данные изменений активности органо-специфических ферментов под влиянием индуктора экспрессии eNOS – L-аргинина

Примечание: АЛТ – аланинаминотрансфераза; АСТ – аспаратаминотрансфераза; ГГТП – гамма-глутамилтранспептидаза; ЩФ – щелочная фосфатаза.

Сопутствующую роль может играть нарушение биодоступности L-аргинина к NO-синтазе вследствие неадекватности транспортного механизма для аминокислоты. В этом плане свое участие в нарушении доступности субстрата L-аргинина может вносить изменение обмена холестерина – гиперхолестеринемия и гипер- β -липопротеинемия. Наши данные при свинцовой интоксикации показали увеличение содержания в сыворотке крови ОХС, ХС ЛПНП и снижение ХС ЛПВП (табл. 1, 2). Более того, результаты показали, что в условиях окислительного стресса происходит окислительная модификация ЛПНП, причем не только с липидным компонентом, но и с белком β -аполипопротеином – apo B₁₀₀. Нарушается афинность β -глобулина к рецепторам ЛПНП, снижение их поглощения клетками тканей и повышение содержание ХС в плазме крови. Такие изменения в метаболизме ХС приводят к взаимодействию липопротеидов с рецепторами «мусорщиками» фагоцитов и их поглощению. Липиды в эндотелии сосудов накапливаются, образуются «пенистые» клетки – факторы риска атерогенеза. В этих условиях изменяется структура эндотелия сосудистой стенки, что приводит к нарушению доступности L-аргинина для NO-синтазы и снижению продукции NO_x как основного вазодилатора. Дефицит NO_x сопровождается гемодинамическими изменениями, в частности в нефроне. Нарушение адекватного взаимодействия между сосудистым тонусом приносящей и выносящей артериол клубочка почек вызывает изменение их функционального состояния.

Анализ полученных данных выявил снижение СКФ на 17,09% при свинцовой интоксикации. Вместе с тем имело место увеличение диуреза, вследствие достоверного снижения канальцевой реабсорбции воды и натрия. Расчеты этих показателей выявили, что уровни канальцевой реабсорбции воды и натрия значительно уменьшаются сравнительно с контролем, соответственно, на 0,26% и 3,01%.

Для определения причинно-следственной связи нарушения обмена натрия в нефроне и снижения уровня канальцевой реабсорбции иона определяли активность фермента АТФ-азы, активируемой натрием и калием в гомогенатах коркового и мозгового вещества почечной ткани. Данные показали угнетение активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы в обоих слоях почек при свинцовой интоксикации, а также еще более значительное изменение данных фермента при ее комбинации с L-NAME (Рис. 1). Конформационные изменения молекулы фермента в результате процесса ПОЛ, изменяющего молекулярную структуру фосфолипидов клеток почечных канальцев, сопровождались снижением активности АТФ-азы (Рис. 1). Нарушение фосфолипидной структуры клеточных мембран подтверждается и данными литературы [16, 28].

Показателями повреждения гепатоцитов при свинцовой интоксикации на фоне L-NAME были данные, свидетельствующие о повышении в них содержания МДА, снижении функции Na⁺/K⁺-АТФ-азы, а также достоверные изменения уровня активности ферментов плазмы крови: АЛТ, АСТ, ГГТП и щелочной фосфатазы (Рис. 1, 3). В противоположность этим данным введение L-аргинина экспериментальным животным вызвало угнетение СРО в клетках почечной и печеночной тканей, восстановление фосфолипидной структуры клеточных мембран органов и повышение в них активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы (Рис. 2). В плазме крови под влиянием L-аргинина данные показали снижение уровня активности органоспецифических ферментов: АЛТ, АСТ, ГГТП и щелочной фосфатазы (Рис. 4).

Следовательно, биохимическими маркерами гидрофильности мембраны гепатоцитов и повышенной проницаемости является уровень активности органоспецифических ферментов плазмы крови, модуляция активности Na⁺/K⁺-АТФ-азы в клетках печени.

Обсуждая эти результаты при свинцовой интоксикации, было отмечено, что липопероксидация способствует дефициту NO_x из-за более низкого уровня экспрессии eNOS. Эти биохимические изменения приводят к нарушению функции эндотелия и микроциркуляции, а также нефропатии и гепатопатии. Сопоставляя эти биохимические данные с литературными сведениями, отмечена активация митоген-активируемой протеинкиназы, запускающей определенную последовательность реакций образования провоспалительных белков, повышение тонуса сосудов и кровяного давления [29].

Вспомогательную роль в нарушении биодоступности L-аргинина для eNOS вносят изменения обмена холестерина. Изменения в обмене холестерина сопровождались развитием предатерогенных изменений в эндотелии сосудов и являлись препятствием для доступности L-аргинина к eNOS, что подтверждается и данными литературы [30].

Микроциркуляторные гемодинамические нарушения в нефроне привели к функциональным изменениям в почках, а также в печени. Действительно, на фоне метаболических изменений развивались функциональные нарушения, как в нефронах, так и в гепатоцитах, включающие показатели основных процессов мочеобразования, снижение активности мембранного фермента Na⁺/K⁺-АТФ-азы, нарушение обмена холестерина в печени и повышение активности органоспецифических ферментов в крови. Регуляторную роль в этих механизмах выполняли фармакологические вещества: аминокислота L-аргинин и его модифицированное производное – L-NAME. Таким образом, полученные в исследовании

данные при свинцовой интоксикации об изменениях в системе ПОЛ – АОС, NO-продуцирующей функции эндотелия, включая уровень экспрессии eNOS, а также нарушения функции почек и печени в одном исследовании, являются приоритетными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена прямая корреляционная связь между дозой вводимого ацетата свинца, содержанием металла в плазме крови и активностью липопероксидации в гемолизате эритроцитов. Отмечается активация ПОЛ и в гомогенатах коркового и мозгового слоев почечной ткани, а также в печени, о чем свидетельствует повышение концентрации вторичного продукта липопероксидации – МДА. Ответственным за развитие окислительного стресса является снижение активности АОС – СОД. Между показателями, характеризующими дозу ацетата свинца, его содержанием в крови, органах и интенсивностью ПОЛ существует прямая положительная корреляционная связь. Окислительный стресс сопровождается снижением содержания NO_x в плазме крови. Поскольку основным продуцентом NO является eNOS, мы исследовали влияние регуляторов уровня экспрессии NO-синтазы: ингибитора L-NAME и индуктора L-аргинина. Данные подтвердили участие ингибитора NO-синтазы – L-NAME, на фоне которого усиливается ПОЛ, снижается содержание NO_x и уровень экспрессии

eNOS. В противоположность этому L-аргинин способствовал повышению содержания NO_x , ингибированию интенсивности СРО и повышению уровня экспрессии eNOS. В механизме сниженного уровня NO_x играет роль и нарушение доступности L-аргинина для NO-синтазы вследствие изменения обмена холестерина – гиперхолестеринемии и гипер- β -липопротеинемии. Развиваются предатерогенные структурные изменения в эндотелии сосудов, которые участвуют в понижении доступности L-аргинина для eNOS. Окислительный стресс вызывает снижение уровня NO_x и изменение функционального состояния почек: полиурию, натрийурез, снижение уровня канальцевой реабсорбции воды, натрия и активности Na^+/K^+ -АТФ-азы. Одновременно происходит активация ПОЛ в гепатоцитах, повышение проницаемости клеточной мембраны, уровня активности органоспецифических ферментов в сыворотке крови. L-аргинин вызывал повышение уровня NO_x , увеличение микроциркуляторной гемодинамики и активности Na^+/K^+ -АТФ-азы в тканях почек и печени. Важно отметить однонаправленность изменений процесса ПОЛ в эритроцитах, в клетках почечной, печеночной тканей, что является основанием для рекомендаций к использованию в клинических условиях определения активности СРО в эритроцитах для оценки нарушений функции внутренних органов при свинцовом отравлении.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Данное исследование не имело финансовой поддержки от сторонних организаций.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

С.Г. Дзугкоев – идея, планирование и руководство исследованием, написание статьи;
Ф.С. Дзугкоева, О.И. Маргиева – участие в разработке дизайна исследования, поиск и анализ информации, анализ и интерпретация полученных данных, оформление финального варианта статьи;
И.В. Можеева, О.И. Маргиева, А.Е. Хубулова – моделирование патологии, проведение биохимических исследований, проведение расчетов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Boskabady M., Marefati N., Farkhondeh T., Farzaneh Sh., Farshbaf A., Boskabady M.H. The effect of environmental lead exposure on human health and the contribution of inflammatory mechanisms, a review // *Environment. International* – 2018. – Vol. 120. – P. 404–420. DOI:10.1016/j.envint.2018.08.013
2. Levin S.M., Goldberg M. Clinical evaluation and management of lead-exposed construction workers // *Am. J. Ind. Med.* – 2000. – Vol. 37. – P. 23–43. DOI:10.1002/(sici)1097-0274(200001)37:1<23::aid-ajim4>3.0.co;2-u
3. de Souza I.D., de Andrade A.S., Dalmolin R.J.S. Lead-interacting proteins and their implication in lead poisoning // *Crit. Rev. Toxicol.* – 2018. – Vol. 48, No. 5. – P. 375–386. DOI:10.1080/10408444.2018.1429387
4. Ericson B., Gabelaia L., Keith J., Kashibadze T., Beraia N., Sturua L., Kazzi Z. Elevated Levels of Lead (Pb) Identified in Georgian Spices // *Ann. Glob. Health.* – 2020. – Vol. 86, No. 1. – Art. ID: 124. DOI:10.5334/aogh.3044
5. Mani M.S., Kabekkodu S.P., Joshi M.B., Dsouza H.S. Ecogenetics of lead toxicity and its influence on risk assessment // *Hum. Exp. Toxicol.* – 2019. – Vol. 38, No. 9. – P. 1031–1059. DOI:10.1177/0960327119851253
6. Obeng-Gyasi E. Sources of lead exposure in various countries // *Rev. Environ. Health.* – 2019. – Vol. 34, No. 1. – P. 25–34. DOI: 10.1515/reveh-2018-0037
7. Wronska-Nofer T., Pisarska A., Trzcinka-Ochocka M., Halatek T., Stetkiewicz J., Braziewicz J., Nofer J.R., Wasowicz W. Scintigraphic assessment of renal function in steel plant workers occupationally exposed to lead // *J. Occup. Health.* – 2015. – Vol. 57, No. 2. – P. 91–99. DOI:10.1539/joh.14-0115-OA
8. Alwaleedi S.A. Haemato-biochemical changes induced by lead intoxication in male and female albino mice // *Int. J. Recent Sci. Res.* – 2015. – Vol. 6, Issue 5. – P. 3999–4004.

9. López-Vanegas N.C., Hernández G., Maldonado-Vega M., Calderón-Salinas J.V. Leukocyte apoptosis, TNF- α concentration and oxidative damage in lead-exposed workers // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 391. – Art. ID: 114901. DOI:10.1016/j.taap.2020.114901
10. Omobowale T.O., Oyagbemi A.A., Akinrinde A.S., Saba A.B., Daramola O.T., Ogunpolu B.S., Olopade J.O. Failure of recovery from lead induced hepatotoxicity and disruption of erythrocyte antioxidant defence system in Wistar rats // *Environ. Toxicol. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 37, No. 3. – P. 1202–1211. DOI:10.1016/j.etap.2014.03.002
11. Nakhaee S., Amirabadizadeh A., Brent J., Mehrpour O. Impact of chronic lead exposure on liver and kidney function and haematologic parameters // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2019. – Vol. 124, No. 5. – P. 621–628. DOI:10.1111/bcpt.13179
12. Wang H., Huang P., Zhang R., Feng X., Tang Q., Liu S., Wen F., Zeng L., Liu Y., Wang T., Ma L. Effect of lead exposure from electronic waste on haemoglobin synthesis in children // *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* – 2021. – Vol. 94, No. 5. – P. 911–918. DOI:10.1007/s00420-020-01619-1
13. Соседова Л.М., Вокина В.А., Капустина Е.А. Фетальное программирование в формировании когнитивных нарушений при моделировании свинцовой интоксикации белых крыс // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* – 2018. – Т. 166, № 11. – С. 559–564.
14. Obeng-Gyasi E., Armijos R.X., Weigel M.M., Filippelli G.M., Sayegh M.A. Cardiovascular-related outcomes in U.S. adults exposed to lead // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2018. – Vol. 15, No. 4. – Art. ID: 759. DOI: 10.3390/ijerph15040759
15. Tejero J., Shiva S., Gladwin M.T. Sources of Vascular Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species and Their Regulation // *Physiol Rev.* – 2019. – Vol. 99, No. 1. – P. 311–379. DOI: 10.1152/physrev.00036.2017
16. Yücebilgiç G., Bilgin R., Tamer L., Tükel S. Effects of lead on Na(+)-K(+) ATPase and Ca(2+) ATPase activities and lipid peroxidation in blood of workers // *Int. J. Toxicol.* – 2003. – Vol. 22, No. 2. – P. 95–97. DOI:10.1080/10915810305096
17. Satarug S., C. Gobe G., A. Vesey D., Phelps K.R. Cadmium and Lead Exposure, Nephrotoxicity, and Mortality // *Toxics.* – 2020. – Vol. 8, No. 4. – Art. ID: 86. DOI: 10.3390/toxics8040086
18. Asakawa T., Matsushita S. Coloring conditions of thiobarbituric acid test, for detecting lipid hydroperoxides // *Lipids.* – 2006. – Vol. 15. – P. 137–140. DOI:10.1007/BF02540959
19. Королук М.А., Иванова Л.И., Майорова И.Г. Метод определения активности каталазы // *Лабораторное дело.* – 1988. – № 1. – С. 16–19.
20. Сирота Т.В. Новый подход в исследовании аутоокисления адреналина и использование его для измерения активности супероксиддисмутазы // *Вопросы медицинской химии.* – 1999. – № 3. – С. 263–272.
21. Афашагова М.М., Маржохова М.Ю., Ахохова А.В. Содержание церулоплазмينا в крови больных рожистым воспалением // *Фундаментальные исследования.* – 2005. – № 5. – С. 103–104.
22. Метельская В.А., Гуманова Н.Г. Скрининг-метод определения уровня метаболитов оксида азота в сыворотке крови человека // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2005. – № 6. – С. 15–18.
23. Наточин Ю.В., Кутина А.В. Новый подход к интегративной функциональной характеристике почек при разных типах диуреза // *Нефрология.* – 2009. – Т. 13, № 3. – С. 19–23. DOI:10.24884/1561-6274-2009-13-3-19-23
24. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – Vol. 193, No. 1. – P. 265–275.
25. Zhang G., Han S., Wang L., Yao Y., Chen K., Chen S. A Ternary Synergistic eNOS Gene Delivery System Based on Calcium Ion and L-Arginine for Accelerating Angiogenesis by Maximizing NO Production // *Int J Nanomedicine.* – 2022. – Vol. 2, No.17. – P. 1987–2000. DOI:10.2147/IJN.S363168
26. Fan M., Gao X., Li L., Ren Z., Lui L.M.W., McIntyre R.S., Teopiz K.M., Deng P., Cao B. The Association Between Concentrations of Arginine, Ornithine, Citrulline and Major Depressive Disorder: A Meta-Analysis // *Front Psychiatry.* – 2021. – Vol. 12. – Art. ID: 686973. DOI:10.3389/fpsy.2021.686973
27. Koo B.H., Lee J., Jin Y., Lim H.K., Ryoo S. Arginase inhibition by rhaponticin increases L-arginine concentration that contributes to Ca²⁺-dependent eNOS activation // *BMB Rep.* – 2021. – Vol. 54, No. 10. – P. 516–521. DOI:10.5483/BMBRep.2021.54.10.053
28. Дзугкоев С.Г., Дзугкоева Ф.С., Можеева И.В., Маргиева О.И. Анализ изменений окислительно-восстановительных реакций при интоксикации хлоридом никеля и ингибитором NO-синтазы // *Медицинский вестник Северного Кавказа.* – 2021. – № 4. – С. 422–424. DOI:10.14300/mnnc.2021.16102
29. Тарасова О.С., Гайнуллина Д.К. Rho-киназа как ключевой участник регуляции тонуса сосудов в норме и при сосудистых расстройствах // *Артериальная гипертензия.* – 2017. – Т. 23, № 5. – С. 383–394. DOI:10.18705/1607-419X-2017-23-5-383-394
30. Jamwal S., Sharma S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders // *Inflamm. Res.* – 2018. – Vol. 67, No. 5. – P. 391–405. DOI:10.1007/s00011-018-1129-8

АВТОРЫ

Дзугкоев Сергей Гаврилович – доктор медицинских наук, заведующий отделом физиологических и биохимических механизмов патологии ИБМИ ВНЦ РАН. ORCID ID: 0000-0002-0597-6104. E-mail: patbiochem@mail.ru

Дзугкоева Фира Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории патофизиологии ИБМИ ВНЦ РАН. ORCID ID: 0000-0002-4208-8157. E-mail: firadzugkoeva@mail.ru

Маргиева Ольга Ивановна – младший научный

сотрудник лаборатории патофизиологии ИБМИ ВНЦ РАН. ORCID ID: 0000-0002-3557-0586. E-mail: margievaolga@mail.ru

Хубулова Анна Елизбаровна – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патофизиологии ИБМИ ВНЦ РАН. ORCID ID: 0000-0001-7955-779X. E-mail: kvizia@mail.ru

Можеева Ирина Викторовна – младший научный сотрудник лаборатории патофизиологии ИБМИ ВНЦ РАН. ORCID ID: 0000-0003-3507-9356. E-mail: ledmin@mail.ru