

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

РЕПАРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ ОРИГИНАЛЬНОЙ СУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ АЛЬГИНОВОЙ КИСЛОТЫ

Р. Н. Зеленцов¹, И. А. Крылов¹, Д. В. Незговоров¹,
Н. А. Мартынова¹, Ю. И. Шамшур²

Изучено влияние оригинальной субстанции на основе энзиматически деструктурированной альгиновой кислоты на репаративную активность на экспериментальной модели плоскостной асептической раны. Проведена оценка токсичности тестируемого соединения, определена эффективная доза. В качестве препарата сравнения использовали куриозин. Выявлено, что изучаемое соединение не токсично. Показано, что примененный референтный препарат (куриозин) уступает по фармакологической активности тестируемому образцу в среднем на 3,5 %, ($p = 0,021$) оригинальной фармацевтической субстанции на основе деструктурированной альгиновой кислоты.

Ключевые слова: альгиновая кислота; энзиматическая деструкция; репаративная активность.

ВВЕДЕНИЕ

Для Российской Федерации (РФ), испытывающей существенный дефицит в отечественных лекарственных препаратах (ЛП), крайне важны поиск и разработка оригинальных, эффективных ЛП на основе местных природных источников, в частности, обладающих репаративной активностью. Сложившаяся ситуация открывает перспективу углубленного исследования фармацевтической субстанции на основе регионально-биоресурса — морской бурой водоросли ламинарии (*Laminaria saccharina*) и изучения ее репаративного (ранозаживляющего) потенциала.

В РФ ежегодно в лечебных учреждениях регистрируется более 13 млн новых случаев травм [4]. Ведущее место среди всех повреждений занимают поверхностные травмы, которые составляют более 35 % [4], а вместе с ранами и травмами кровеносных сосудов, на которые приходится более 18 % [4], составляют больше половины всей травматической патологии. По данным Министерства здравоохранения РФ существует тенденция к увеличению количества травм и повреждений [4], что может быть связано с комплексом социально-экономических причин.

Высокая распространенность травматических повреждений в структуре общей заболеваемости с отчетливой тенденцией к росту данной патологии делает актуальным вопрос фармакологического поиска и разработки оригинальных фармацевтических субстанций,

оказывающих терапевтическое действие на раневой процесс.

На Европейском Севере России особый интерес с точки зрения природного ресурсоведения и фармакоэкономики представляют гидробионты Белого и Баренцева морей, в частности, ламинария (*Laminaria saccharina*) — источник альгиновой кислоты, нейтральных полисахаридов (ламинарин), сульфатированных полисахаридов (фукоидан), многоатомных спиртов (маннит) и др., обладающих значимой фармакологической активностью. Так, по данным Министерства природных ресурсов РФ, запасы ламинариевых водорослей в Белом море существенны и используются не в полном объеме [8].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С применением метода энзиматической деструкции достигнуто уменьшение молекулярной массы действующего вещества, снижение степени полимеризации, придание молекуле линейного вида, что доказано методами ЯМР-спектроскопии и эксклюзионной ВЭЖХ (рис. 1). Это позволило улучшить физико-химические, фармакокинетические и фармакодинамические свойства модифицированного полисахарида по сравнению с нативным веществом.

Анализ образца проведен с использованием спектрометра ЯМР Bruker Avance III с рабочей частотой для протонов 600 МГц.

Для этого пробу растворяли в D₂O, раствор объемом 0,6 мл помещали в ампулу диаметром 5 мм. Тяжелую воду применяли для регистрации опорного сигнала ядер дейтерия с целью настройки однородности магнитного поля спектрометра. Спектры ЯМР регистрировались на ядрах ¹³C. Спектр ¹³C ЯМР (рис. 1) ре-

¹ ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет», Россия, Архангельск.

² ФГБУЗ «Северный медицинский клинический центр им. Н. А. Семашко федерального медико-биологического агентства», Россия, 163000, Архангельск, пр. Троицкий, д. 51.

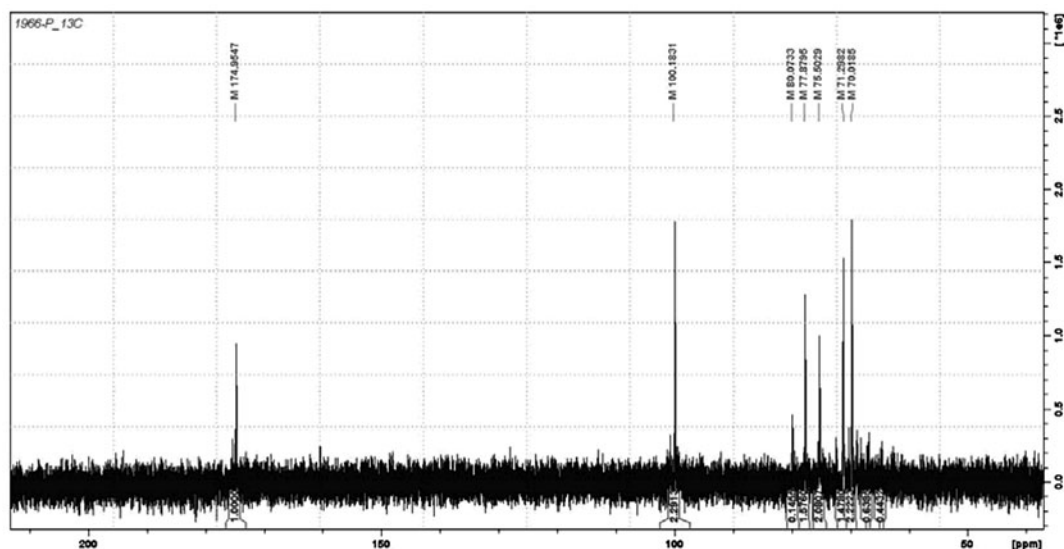


Рис. 1. ^{13}C ЯМР спектр образца энзиматически деструктированного альгината.

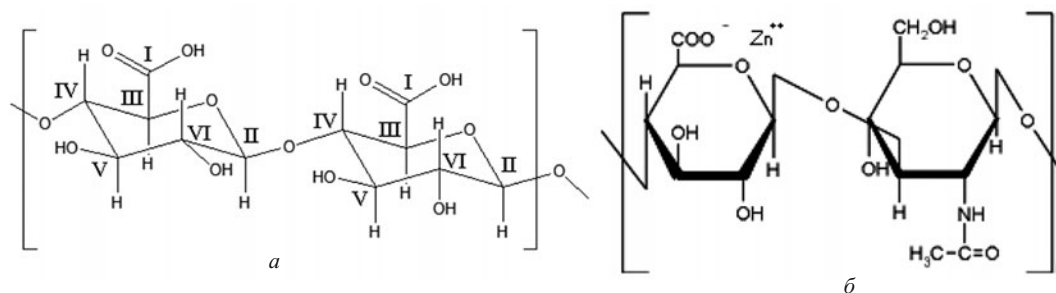


Рис. 2. Структурная формула тестируемой альгиновой кислоты (а) и гиалуроната цинка (б).

гистрировали с развязкой от протонов для подавления нежелательных спин-спиновых взаимодействий С-Н и улучшения отношения “сигнал/шум”. Длительность импульса составляла 12 мкс, время задержки между импульсами — 16 с. Число накоплений 4096.

Сигналы с химическими сдвигами ~ 175 м.д. отвечают атомам углерода, входящим в состав групп COOH (рис. 1). В спектре исследуемого образца в области ~ 100 м.д. наблюдаются сигналы, соответствующие атомам углерода углеводного кольца, связанным с 2 атомами кислорода. Группы сигналов в области 65 – 80 м.д. соответствуют остальным атомам углерода углеводного кольца. Анализ химических сдвигов показывает, что при наличии в полисахаридной цепи боковых ответвлений, присоединенных к атомам углерода, химические сдвиги сигналов, отвечающих этим атомам, находились бы между 80 и 90 м.д. В зарегистрированном спектре сигналы в указанной области не наблюдаются, из чего можно предположить, что исследуемый образец является неразветвленным полисахаридом в котором полностью сохранена структура нативной альгиновой кислоты (рис. 2, а).

Определение молекулярной массы исследуемого вещества проведен с использованием ВЭЖХ системы LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), состоящей из автосамплера SIL-20A, двухплунжерного насоса LC-20AD, вакуумного дегазатора DGU-A3, термостата колонок STO-20A и рефрактометрического детектора RID-10A. Разделение проводилось при температуре 50°C на колонках для анализа водорастворимых полимеров MCX 300×8 мм с размером пор $1000 - 1000000 \text{ \AA}$ (PSS, Германия). В качестве элюента использовали водный раствор нитрата калия (0,2 моль/л) и дигидрофосфата натрия (0,01 моль/л) с рН 8,0. Градуировка системы проводилась по монодисперсным стандартным образцам полистиролсульфонатов натрия (PSS, Германия) с известной молекулярной массой в диапазоне от 891 до 976000 Да. Сбор и обработку данных осуществляли с помощью ПО WinGPC (PSS, Германия). Молекулярная масса энзиматически деструктированного альгината составляет 5,15 кДа.

Полученное оригинальное вещество (энзиматически деструктурированная натриевая соль альгиновой кислоты) является водорастворимым. Следует отме-

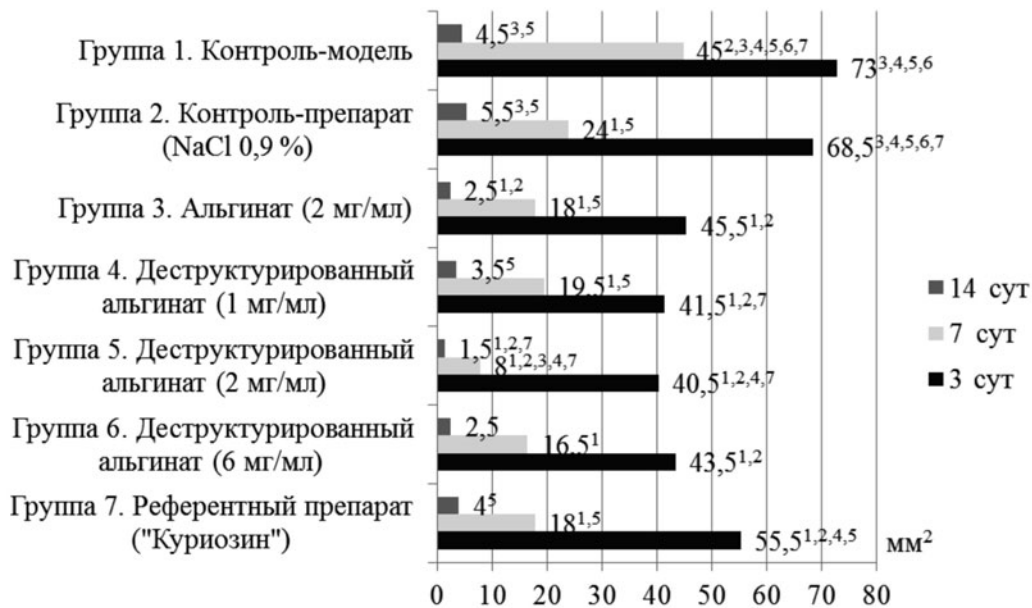


Рис. 3. Результаты планиметрического исследования (площадь раневого дефекта, мм²). Статистически значимые различия при сравнении групп лабораторных животных: ¹ с группой 1 — контроль-модель ($p < 0,05$); ² с группой 2 — 0,9 % раствор хлорида натрия ($p < 0,05$); ³ с группой 3 — альгинат в концентрации 2 мг/мл ($p < 0,05$); ⁴ с группой 4 — деструктурированный альгинат в концентрации 1 мг/мл ($p < 0,05$); ⁵ с группой 5 — деструктурированный альгинат в концентрации 2 мг/мл ($p < 0,05$); ⁶ с группой 6 — деструктурированный альгинат в концентрации 6 мг/мл ($p < 0,05$); ⁷ с группой 7 — референтный препарат "Куриозин" ($p < 0,05$).

тить, что раствор не имеет ни вкуса, ни запаха, прозрачен и бесцветен, при нанесении на кожный покров не оказывает раздражающего действия, не пачкает одежду. При длительном хранении (6 мес) не выпадает в осадок. Данная оригинальная фармацевтическая субстанция является предметом настоящего исследования. Препаратом сравнения в исследовании является

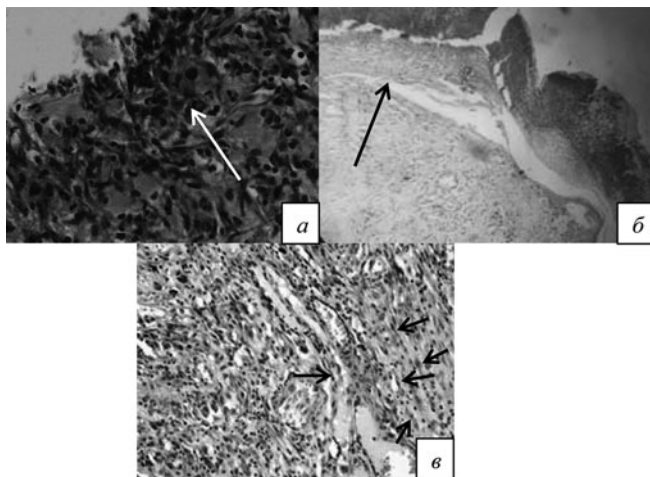


Рис. 4. Гистологическая картина на 3 сут эксперимента: а) группа контроль-модель (стрелкой указана нейтрофильная инфильтрация, увеличение $\times 1000$); б) группа, получавшая деструктурированный альгинат в концентрации 2 мг/мл (стрелкой обозначено начало реэпителизации, увеличение $\times 100$); в) грануляционная ткань в группе, получавшей деструктурированный альгинат в концентрации 2 мг/мл (стрелками обозначены фибробласты, увеличение $\times 400$). Окраска гематоксилин-эозином.

"Куриозин" — гиалуронат цинка с молекулярной массой 900 кДа (рис. 2, б).

Нами определен профиль безопасности (острая токсичность) оригинальной фармацевтической субстанции на основе альгиновой кислоты, установлена эффективная доза этого вещества и изучено влияние на течение раневого процесса в эксперименте.

Экспериментальное исследование выполнено на базе кафедр фармакологии, оперативной хирургии и топографической анатомии ГБОУ ВПО "Северный государственный медицинский университет" (Архангельск) Минздрава России. Экспериментальное моделирование раневого процесса на лабораторных животных осуществлено в асептических условиях учебной операционной кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, там же осуществлялось наблюдение за животными.

Эксперименты выполнялись с соблюдением современных требований к проведению исследований на лабораторных животных [3, 7, 11, 14] и одобрены локальным Этическим комитетом ГБОУ ВПО "СГМУ" (Протокол № 01/1 – 13 от 27.02.2013 г.).

Острую токсичность соединений определяли по следующей методике [7]: тестируемые соединения вводили однократно интрагастрально 30 белым нелинейным мышам (питомник "Рапполово", Ленинградская обл., Всевожский район, поселок Рапполово) массой (23 ± 2) г в дозах 50, 500, 5000 мг/кг. В качестве растворителя использовали стерильный 0,9 % раствор хлорида натрия. Наблюдение за животными проводилось в течение 14 дней. Определяли среднесмер-

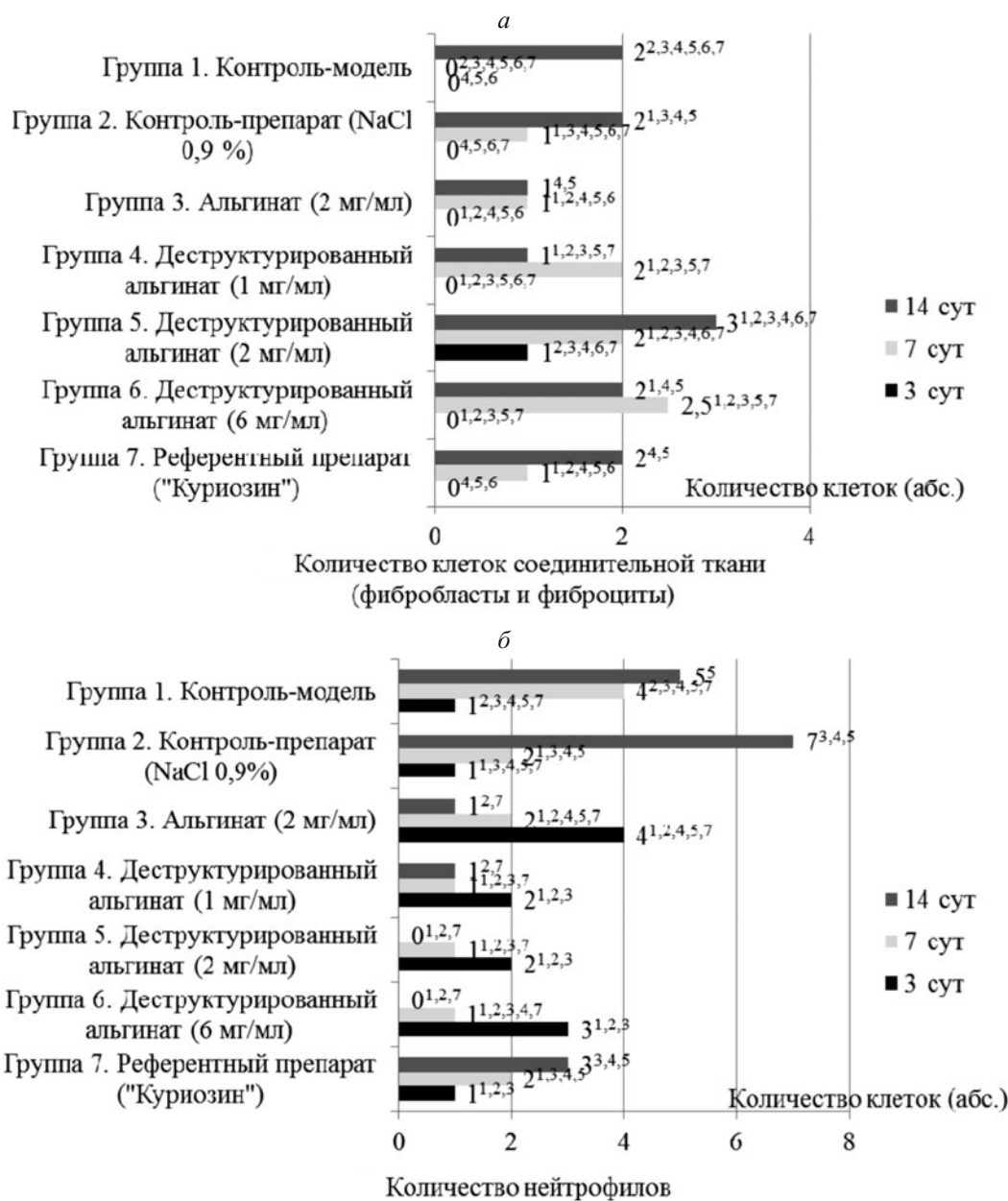


Рис. 5. Результаты окулярной планиметрии (количество клеток в малом квадрате окулярной сетки акад. Г. Г. Автандилова при увеличении $\times 1000$). Статистически значимые различия при сравнении групп лабораторных животных: ¹ с группой 1 – контроль-модель ($p < 0,05$); ² с группой 2 – 0,9 % раствор хлорида натрия ($p < 0,05$); ³ с группой 3 – альгинат в концентрации 2 мг/мл ($p < 0,05$); ⁴ с группой 4 – деструктурированный альгинат в концентрации 2 мг/мл ($p < 0,05$); ⁵ с группой 5 – деструктурированный альгинат в концентрации 2 мг/мл ($p < 0,05$); ⁶ с группой 6 – деструктурированный альгинат в концентрации 6 мг/мл ($p < 0,05$); ⁷ с группой 7 – референтный препарат "Куриозин" ($p < 0,05$).

тельную дозу (LD_{50}). Оценку острой токсичности проводили по ГОСТ 12.1.007–76 [2].

Изучение репаративной активности оригинальной фармацевтической субстанции на основе альгиновой кислоты проводилось на лабораторных белых беспородных крысах-самцах массой (200 ± 20) г в количестве 210 особей (питомник "Рапполово", Ленинградская обл., Всевожский район, поселок Рапполово), которые содержались в одинаковых условиях вивария с доступом к воде и корму *ad libitum*, с 12-часовым режимом освещения. Исследование проведено на моде-

ли раневого процесса — плоскостной асептической раны, полученной по методике [5]. У животных в условиях наркотизации диэтиловым эфиром на предварительно депилированной коже спины после обработки операционного поля йодопираном и 70 % спиртом стерильным скальпелем формировалась плоскостная округлая рана диаметром 1 см. Стандартизация полученной кожно-фасциальной раны была соблюдена путем применения трафарета из тонкого оргстекла (2 мм), в котором было сделано отверстие диаметром 1 см. Для формирования одинаковых по глубине ран

использовался ограничитель. Животных выводили из эксперимента на 3, 7 и 14 сут путем передозировки диэтилового эфира.

Лабораторные животные были разделены на 7 групп (таблица).

Динамику изменений в области экспериментальной раны оценивали макроскопическим (визуальным), планиметрическим [10] и гистологическим методами. Материал фиксировали в растворе нейтрального формалина, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 4 мкм. Гистологические препараты окрашивали гематоксилин-эозином. Затем осуществляли патогистологическое исследование [12] и проводили количественную морфометрическую оценку по методике [1].

Фармакологическую активность количественно оценивали по разнице площади раневого дефекта на 3, 7 и 14 сут эксперимента.

Тип распределения данных определяли по критерию Шапиро – Уилко. Поскольку распределение данных статистически значимо отличалось от нормального, то для их описания использовали медиану (Me), процентилю (P_{25-75}) и 95 % доверительные интервалы для медианы (ДИ). Для проверки нулевых гипотез применяли непараметрический критерий Манна – Уитни. Статистически значимыми считали значения $p < 0,05$. Статистический анализ данных выполнен с использованием программного обеспечения STATA 12.1.

Характеристика групп лабораторных животных

Номер группы	Описание группы	Количество животных
1	Контрольная, модель. Раны лабораторных животных ничем не обрабатывались	30
2	На область раневого дефекта наносилось индифферентное в фармакологическом смысле вещество – стерильный 0,9 % раствор хлорида натрия	30
3	На рану наносили раствор неизмененного альгината натрия 2 мг/мл	30
4	Рану обрабатывали раствором модифицированного (низкомолекулярного) альгината 1 мг/мл	30
5	На раневую поверхность наносили раствор модифицированного (низкомолекулярного) альгината 2 мг/мл	30
6	Область раневого процесса орошали раствором модифицированного (низкомолекулярного) альгината 6 мг/мл	30
7	Контроль, референтный препарат. На раны наносили препарат сравнения “Куриозин” (гиалуронат цинка 2 мг/мл, Гедеон Рихтер, Германия)	30

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе изучения острой токсичности оригинальной субстанции было установлено, что интрагастральное введение исследуемых веществ ни в одной из групп не вызывало гибели лабораторных животных, кроме того, в ходе наблюдения за ними каких-либо изменений как в популяции, так и в поведении отдельных особей не наблюдалось. На основании этого изучаемая деструктурированная альгиновая кислота была отнесена, в соответствии с ГОСТ [2], к IV классу опасности — веществам малоопасным. По этой причине рассчитать среднесмертельную дозу (LD_{50}) не представляется возможным.

Макроскопически (визуально) выявлена положительная динамика процессов ранозаживления у групп лабораторных животных, получавших тестируемую субстанцию на основе деструктурированного альгината натрия и была подтверждена количественно методом планиметрии (рис. 3).

На 3 сут эксперимента были выявлены статистически значимые различия между группой животных, получавших деструктурированный альгинат в концентрации 2 мг/мл (группа 5), и группами контроль-модель (группа 1, $p < 0,001$), контроль-препарат (группа 2, $p < 0,001$), сравнимым препаратом (группа 7, $p = 0,010$). Между группами деструктурированного альгината (группы 4, 5 и 6) в концентрациях 1, 2, 6 мг/мл и группой неизмененного альгината (группа 3) на 3 сут эксперимента статистически значимых отличий выявлено не было. На 7 сут эксперимента было выявлено статистически значимое ($p < 0,017$) уменьшение площади экспериментальной раны у животных 2 групп, получавших деструктурированный альгинат (группы 5 и 6) в концентрациях 2 и 6 мг/мл. На 14 сут эксперимента отмечалось уменьшение площади раны у группы, обрабатываемой деструктурированным альгинатом в концентрации 2 мг/мл (группа 5), и статистически значимо отличалось от групп контроль – модель (группа 1, $p = 0,01$), контроль-препарат (группа 2, $p = 0,005$), деструктурированный альгинат в концентрации 1 мг/мл (группа 4, $p = 0,024$), референтный препарат (группа 7, $p = 0,021$). Методом планиметрии было установлено, что деструктурированный альгинат (группа 5) уже в концентрации 2 мг/мл начинает оказывать влияние на скорость репаративной регенерации экспериментальной плоскостной асептической раны.

Уменьшение площади раневого дефекта у животных 5 группы было значимо больше, по сравнению с группой 7 на 3 ($p = 0,01$), 7 ($p = 0,025$) и 14 ($p = 0,021$) сут эксперимента. Разница в изменении площади на 3 сут составила 65 %, на 7 сут 16,5 % и на 14 сут 3,5 %.

В ходе проведения обзорной гистоморфологии отмечена меньшая распространенность нейтрофильной инфильтрации в тканях животных, получавших низкомолекулярный альгинат (рис. 4, б), по сравнению с

животными групп контроля (рис. 4, *а*) и высокомолекулярного альгината. Также были отмечены признаки начала реэпителизации (рис. 4, *б*) в гистологических препаратах крыс группы, обрабатываемой низкомолекулярным альгинатом. Уже на 3 сут эксперимента у крыс, получавших низкомолекулярный альгинат, выявлена молодая грануляционная ткань, насыщенная клеточными элементами (фибробластами) и новообразованными сосудами (рис. 4, *в*). У крыс остальных групп грануляционная ткань на 3 сут эксперимента была развита слабо — содержала малое количество фибробластов и сосудов.

В ходе изучения влияния концентрации действующего вещества на репаративные процессы (рис. 5, *а*) были установлены статистически значимые отличия в количествах клеток соединительной ткани (фибробластов и фиброцитов) на 3, 7 и 14 сут эксперимента (группы 4, 5 и 6, $p < 0,001$). Известно, что клетки соединительной ткани играют ключевую роль в репаративных реакциях раневого процесса, поскольку благодаря им разрушенные структуры замещаются соединительной (в том числе рубцовой) тканью [9]. Статистически значимых отличий при сравнении количества нейтрофилов в группах 4, 5 и 6 не выявлено, за исключением близкого к статистически значимому отличию на 14 сут эксперимента между животными, получавшими изучаемую субстанцию в концентрациях 1 и 2 мг/мл (группы 4 и 5, $p = 0,06$).

С учетом изложенного эффективной дозой исследуемой деструктурированной альгиновой кислоты является 2 мг/мл.

В ходе проведения окулярной планиметрии было выявлено, что клетки соединительной ткани у животных, получавших деструктурированный альгинат, появляются уже на 3 сут эксперимента (рис. 5, *а*) и их количество нарастает к концу эксперимента (14 сут), результаты статистически значимы ($p < 0,05$). В то же время положительное влияние на процессы репаративной регенерации в области раневого повреждения оказывает антиэкссудативная активность тестируемого соединения. На рис. 5, *б* показано количество нейтрофилов, которое минимально у групп животных, получавших деструктурированный альгинат, в отличие от других (контрольных) групп. Несмотря на то, что статистически значимых отличий в количестве нейтрофилов у крыс между группами, получавшими деструктурированный альгинат, не выявлено, при сравнении с контрольными группами были отмечены статистически значимые отличия (рис. 5, *б*).

В основе описанного эффекта деструктурированной альгиновой кислоты лежат несколько причин. Одну из них следует искать, вероятно, в изменении молекулярной массы и снижении степени полимеризации модифицированного соединения. Что, очевидно, повлияло на степень контакта с раневым дефектом кожи и, как следствие, повысило репаративную активность. Последняя обусловлена присутствием в хими-

ческой структуре альгинатов L-гулурановой кислоты [13]. Между тем традиционные средства, применяемые для ускорения процессов репаративной регенерации при раневом процессе и, в том числе, изученный нами куриозин, имеет в своей структуре D-глюкуроновую кислоту, являющуюся пространственным изомером гулурановой кислоты. D-глюкуроновая кислота — одна из составных частей химической структуры гликозаминогликанов, участвующих в регуляции многих процессов жизнедеятельности клеток, включая пролиферативную активность, чем и объясняется репаративная активность куриозина [6, 15].

В ходе эксперимента установлено, что примененный референтный препарат (куриозин) несколько уступает по фармакологической активности тестируемому образцу оригинальной фармацевтической субстанции на основе деструктурированной альгиновой кислоты. Полученные данные с определенной долей вероятности могут быть объяснены большей доступностью биологически активных структурных элементов деструктурированной альгиновой кислоты, что является следствием меньшей степени полимеризации и низкой молекулярной массы субстанции по сравнению с производными гиалурановой кислоты.

Следует подчеркнуть, что еще одним важным преимуществом деструктурированного альгината в качестве перспективного оригинального отечественного препарата для ускорения процессов репаративной регенерации является низкая стоимость этого природного вещества и возможность его широкомасштабного промышленного получения.

ВЫВОДЫ

1. Расчетная величина LD_{50} деструктурированной альгиновой кислоты в изученном диапазоне доз оказалась недостижимой: гибель мышей не получена, токсические дозы рассчитать не удалось. Тестируемая субстанция была отнесена к IV классу опасности.

2. Энзиматически деструктурированная альгиновая кислота 2 мг/мл при наружном однократном применении в течение 14 дней обладает антиэкссудативной и репаративной активностью на модели плоскостной асептической кожно-фасциальной раны, превосходя препарат сравнения куриозин (2 мг/мл) в среднем на 3,5 % ($p = 0,021$).

ЛИТЕРАТУРА

1. Г. Г. Автандилов, *Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии*, Медицина, Москва (1984).
2. ГОСТ 12.1.007–76 Межгосударственный стандарт. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности, Госстандарт России, Москва (2007).
3. ГОСТ Р-543434–2009. Национальный стандарт Российской Федерации. Принципы надлежащей лабораторной практики. Стандартиформ, Москва (2010).
4. *Здравоохранение в России*, Росстат, Москва (2013).

5. Д. В. Королев, *Международ. эндокринолог. ж.*, **1**(13), (2008).
6. Е. А. Лебединская, И. Д. Макаренкова, О. В. Лебединская и др., *Биомед. химия*, **60**(5), 581 – 590 (2014).
7. А. Н. Миронов, Н. Д. Бунятыя, *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, Часть первая, Гриф и К, Москва (2012).
8. *О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2010*, Министерство природных ресурсов и экологии Российской Федерации, Москва (2011).
9. В. А. Попов, *Раневой процесс: нанобиотехнологии оптимизации*, СпецЛит, Санкт-Петербург (2013).
10. Л. Н. Попова, *Автореф. дис. д-ра мед. наук*, Воронеж (1942).
11. Приказ Минздравсоцразвития РФ № 708 от 23 августа 2010 г. “Об утверждении правил лабораторной практики”, Москва (2010).
12. С. М. Сулейманов, А. В. Гребенщиков, Е. В. Михайлов и др., *Методы морфологических исследований*, Воронежский ЦНТИ, Воронеж (2007).
13. А. И. Усов, *Успехи химии*, **68**, 1051 – 1058 (1999).
14. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ “Об обращении лекарственных средств”, Москва (2010).
15. С. Vasile, D. Pieptu, R. P. Dumitriu, et al., *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi*, **117**(2), 565 – 571 (2013).

Поступила 15.07.15

REPARATIVE ACTIVITY OF ORIGINAL SUBSTANCE BASED ON ALGINIC ACID

R. N. Zelentsov¹, I. A. Krylov¹, D. V. Nezgovorov¹, N. A. Martynova¹, and Yu. I. Shamshur²

¹ Northern State Medical University, Troitskii prosp. 51, Arkhangelsk, 163000 Russia.

² N. A. Semashko Northern Medical Clinical Center, Federal Medico-Biological Agency, Troitskii prosp. 115, Arkhangelsk, 163000 Russia.

The influence of an original substance based on enzymatically destructed alginic acid on the reparative activity has been studied using an experimental model of planar aseptic wound. Toxicity of the test compound was evaluated and its effective dose was determined using curiozin as the reference drug. It is found that the test compounds is non-toxic. It is established that the pharmacological activity of the reference drug (curiozin) is lower on the average by 3.5% ($\delta = 0.021$) than that of the original pharmaceutical substance based on destructed alginic acid

Keywords: alginic acid; enzymatic destruction; reparative activity.