

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ АТОРВАГЛИЗИНА НА МОДЕЛИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРХОЛЕСТЕРИНЕМИИ У КРЫС

Екатерина Михайловна СТАХНЁВА¹, Валентин Андреевич ВАВИЛИН²,
Юлия Игоревна РАГИНО¹, Нариман Фаридович САЛАХУТДИНОВ³,
Марина Викторовна ИВАНОВА¹, Ольга Геннадьевна САФРОНОВА²,
Светлана Ивановна МАКАРОВА²

¹ *НИИ терапии СО РАМН*
630089, г. Новосибирск, ул. Бориса Богаткова, 175/1

² *НИИ молекулярной биологии и биофизики СО РАМН*
630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2

³ *НИИ органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН*
630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 9

На модели экспериментальной гиперхолестеринемии у крыс показано, что гипохолестеринемический эффект комплексного соединения аторвастатина с глицерризиновой кислотой – аторваглизина – в дозах, соответствующих в весовом эквиваленте 20, 40 и 100 мкг/кг/сутки аторвастатина, сравним с тем, что наблюдается для дозы аторвастатина 200 мкг/кг/сутки. Содержание общего холестерина в крови крыс через 1 неделю после начала введения препаратов снизилось на 55, 53, 43 и 51 % ($p < 0,05$) соответственно от значения в контроле, принятого за 100 %.

Ключевые слова: аторваглизин, аторвастатин, гиперхолестеринемия, холестерин, липопротеины.

Повышенный уровень холестерина (ХС) в крови – важнейший фактор развития сердечно-сосудистых заболеваний, заболеваемость и смертность от которых остаются высокими во всех развитых странах [1]. Назначение холестеринснижающих лекарственных препаратов является приоритетным в терапии ишемической болезни сердца и гиперхолестеринемии (ГХС) [2]. Ингибиторы 3-гидрокси-3-метилглутарил-коэнзим А-редуктазы (ГМГ-КоА-редуктазы), так называемые статины, наиболее эффективны в отношении снижения содержания ХС в крови. Но лечение статинами подразумевает пожизненный прием препаратов. Со временем эффективность терапевтической суточной дозы снижается, что требует ее увеличения и приводит к возрастанию частоты возникновения

побочных эффектов – повышению активности печеночных ферментов аланин- и аспатаминотрансферазы (АлАТ и АсАТ), миалгиям, миопатиям с повышением активности креатинфосфокиназы (КФК) [2].

Таким образом, поиск статинов с более низкой суточной дозой, более безопасных, пролонгированного действия и эффективных по ХС-снижающему действию, является актуальной задачей современной науки. Использование углеводсодержащих метаболитов растительного происхождения для образования комплексов с известными фармаконами представляет собой перспективный подход к разработке новых транспортных форм лекарственных препаратов. Фармакологически перспективны комплексы с глицерризиновой кислотой (ГК), применение

Стахнёва Е.М. – к.б.н., научный сотрудник, e-mail: stakhneva@ngs.ru

Вавилин В.А. – д.м.н., проф., руководитель лаборатории фармакокинетики и метаболизма лекарств, e-mail: drugsmet@soramn.ru

Рагино Ю.И. – д.м.н., проф., руководитель лаборатории клинических биохимических и гормональных исследований, e-mail: ragino@mail.ru

Салахутдинов Н.Ф. – д.х.н., зав. отделом химии природных соединений, e-mail: anvar@nioch.nsc.ru

Иванова М.В. – старший научный сотрудник, e-mail: marivanova@mail.ru

Сафронова О.Г. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: saf@soramn.ru

Макарова С.И. – к.б.н., старший научный сотрудник, e-mail: drugsmet@soramn.ru

которой позволяет существенно снизить терапевтическую дозу лекарственного препарата с сохранением его эффективности. Показано усиление лекарственного эффекта в сравнении с исходными препаратами для комплексов ГК с бутационом, индометацином, нифедипином и симвастатином [3–5]. Такой подход был использован при создании нового молекулярного комплекса аторвастатина (АС) с ГК со стехиометрией 1:4 – аторваглизина (АГ). В 2010 г. на комплексное соединение «Аторваглизин» был получен патент Российской Федерации № 2396079 [6].

Цель данного исследования – изучение холестеринснижающей эффективности и безопасности комплексного соединения аторваглизин на экспериментальной модели ГХС у крыс *in vivo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент продолжительностью 6 недель выполнен на 30 самцах крыс Вистар массой 180–200 г. Животные содержались в клетках и имели свободный доступ к воде и пище. Для развития ГХС животные в течение 4 недель получали диету, содержащую 5 % животного жира, 3 % ХС, 0,1 % пропилтиоурацила (для подавления функции щитовидной железы) и 0,3 % урсодезоксихолевой кислоты («Урсосан») от объема пищи [7, 8]. В дальнейшем крысы были разделены на 6 равных групп. В период с 4 по 6 неделю эксперимента животные получали гипохолестеринемические соединения на фоне обычной лабораторной диеты: группа 1 – контрольная, без вмешательства; группа 2 – АС 200 мкг/кг/сутки; группы 3, 4 и 5 – АГ 1000, 400 и 200 мкг/кг/сутки соответственно, 6 группа – ГК 900 мкг/кг/сутки. Принимая во внимание, что массовая доля АС в АГ составляет 0,1 от молекулярного веса, то в 3, 4 и 5 группах доза АС снижена в 2, 5 и 10 раз соответственно. Дозы субстанций животные получали *per os* с пищей. Заборы крови у крыс осуществлялись утром из хвостовой вены по 1 мл в точках «4, 5, и 6 недель» эксперимента. За 12 часов до забора крови животные лишались корма при сохранении доступа к воде.

Показатели липидного профиля сыворотки крови – содержание общего ХС, липопротеинов высокой плотности и триглицеридов определяли энзиматическим способом с использованием наборов «Bioson» (Германия) на биохимическом анализаторе «Labsystem» (Финляндия). Активность аланинаминотрансферазы (АлАТ) и аспаратаминотрансферазы (АсАТ) и креа-

тинфосфокиназы (КФК, фракция СК–Nac) определяли с использованием наборов (Bioson, Германия).

Эффекты субстанций в группах анализировали с применением непараметрической статистики для анализа различий трех и более связанных групп по Фридмену, парных сравнений по Вилкоксоу. Различия между группами анализировали с использованием процедуры Краскелла–Уоллеса для трех и более независимых групп с последующими парными сравнениями по Манну–Уитни. Статистически достоверными считали различия при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание крыс на холестериновой диете в течение 4 недель эксперимента привело к развитию выраженной ГХС ($206,5 \pm 25,4$ мг/дл). Эффекты субстанций на липидные показатели изучались в динамике обратного развития ГХС в период после перевода животных на стандартную лабораторную диету. В контрольной группе уровень общего ХС снизился на 35 % от исходного через 1 неделю после отмены высокожировой диеты. В группах животных, которым вводили АС и 1000, 400 и 200 мкг/кг/сутки АГ, через 1 неделю получено достоверное уменьшение содержания общего ХС на 51, 43, 53, 55 % соответственно (см. таблицу). Таким образом, снижение концентрации ХС в сыворотке крови крыс, получавших среднюю и минимальную дозу АГ, сходно и сравнимо с показателями снижения содержания общего ХС в группе АС, несмотря на то, что дозы АГ были в 5 и 10 раз меньше дозы АС. При сравнении экспериментальных групп АГ с группой АС обнаружено, что в сыворотке крови крыс, получавших 400 мкг/кг/сутки АГ, уровень общего ХС ниже, чем у получавших АС, на 34 % ($p < 0,05$). В группе ГК снижение составило 44 % в сравнении с контролем. То есть результаты указывают на хорошую холестеринснижающую эффективность АГ с учетом уменьшения в 5 и 10 раз доз АС в АГ.

Статистически достоверных изменений уровня липопротеинов высокой плотности и триглицеридов в динамике эксперимента не получено ни для АС, ни для разных доз АГ. Согласно данным других авторов, статистически значимые изменения этих показателей были достигнуты при использовании дозы АС 0,2 мг/кг [9]. Возможно, несоответствие наших результатов и данных других авторов обусловлено межлинейными различиями крыс.

Таблица

Динамика уровня общего ХС крови (мг/дл) у крыс в эксперименте *in vivo* при приеме аторваглизина

Группа	Срок наблюдения (недели)	Результаты анализа по методу Фридмана: χ^2 (p) коэффициент Кендалла	Описательная статистика и результаты парных сравнений по Вилкоксоу		
			Медиана	Нижняя квартиль	Верхняя квартиль
Контроль (n = 5)	4	10,7 (0,01359) 0,71	214,0	167,0	257,0
	5		139,0*	95,0	144,0
	6		109,0*,^	89,0	115,0
АС 200 мкг/кг/сут (n = 5)	4	11,9 (0,00781) 0,79	237,0	205,0	301,0
	5		117,0*	117,0	149,0
	6		115,0*	103,0	115,0
АГ 1000 мкг/кг/сут (n = 5)	4	13,6 (0,00357) 0,9	224,0	193,0	255,0
	5		128,0*	122,0	131,0
	6		110,0*,^	99,0	110,0
АГ 400 мкг/кг/сут (n = 5)	4	12,1 (0,00698) 0,8	163,0	150,0	176,0
	5		77,0*	77,0	93,0
	6		88,0*	96,70	98,90
АГ 200 мкг/кг/сут (n = 5)	4	11,9 (0,00781) 0,79	213,0	183,0	223,0
	5		96,0*	94,0	100,0
	6		110,0*	108,0	113,0
ГК 900 мкг/кг/сут (n = 5)	4	9,2 (0,02627) 0,62	167,0	156,0	170,0
	5		93,0*	86,0	114,0
	6		87,0*	85,0	101,0

Примечание. Обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) в парных сравнениях по критерию Вилкоксона отличия от соответствующих показателей: * – значений на 4-й неделе эксперимента, ^ – значений на 5-й неделе эксперимента.

Таким образом, в отношении снижения уровня холестерина АГ более эффективен, чем АС, так как одинаковые уровни ХС в сыворотке достигаются меньшими дозами. В отличие от ранее полученных результатов изучения гиполипидемических свойств симваглизина [5, 10], мы не наблюдали прямой дозовой зависимости гиполипидемического эффекта для аторваглизина. Вероятной причиной этого является более низкая константа ингибирования ГМГ-КоА-редуктазы аторвастатином в сравнении с симвастатином [11–13], вследствие чего использованные нами в эксперименте дозы субстанций могли создавать концентрации, близкие к насыщающим, что обусловило сходный эффект разных доз.

Результаты измерения активности креатинфосфокиназы (КФК) показали, что к 5 неделе эксперимента повышение активности фермента составило 126 % в контроле, 105 % в группе крыс, получающих АС, а в группах, получающих АГ, этот показатель был значительно

ниже: 67 % в 3 группе; 63 % в 4 группе и 113 % в 5 группе. В группе ГК повышение составило 48 %. То есть можно говорить о сходстве в силе миотоксического эффекта АС и комплексного соединения АГ.

Каких-либо статистически значимых изменений активности печеночных ферментов АлАТ и АсАТ в динамике эксперимента нами не получено, что указывает на отсутствие гепатотоксичности доз экспериментальных субстанций. Кроме того, известно, что ГК, входящая в состав комплекса, обладает выраженным гепатопротекторным эффектом [3].

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о фармакологическом синергизме АС и ГК в комплексном соединении аторваглизин. С учетом результатов более ранних работ [5, 10], данное исследование указывает на перспективность комплексов статинов с ГК в достижении равных по силе статинам терапевтических эффектов существенно более низкими дозами и уменьшении риска побочных эффектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Istvan E.S., Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase // Science. 2001. 292. 1160–1164.
2. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2009. (6, прил. 3). 6–37.
Diagnostics and correction of lipid metabolism disorders by way of atherosclerosis prevention and treatment // Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika. 2009. (6, suppl. 3). 6–37.
3. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Гранкина В.П. и др. Солодка: биоразнообразие, химия, применение в медицине. Новосибирск: Гео, 2007. 311 с.
Tolstikov G.A., Baltina L.A., Grankina V.P. et al. Licorice: biodiversity, chemistry, application for medicine. Novosibirsk: Geo, 2007. 311 p.
4. Толстикова Т.Г., Хвостов М.В., Брызгалов А.О. и др. Улучшение фармакологических свойств нифедипина путем механохимического комплексования с глицирризиновой кислотой // Биомед. химия. 2010. 56. (2). 187–194.
Tolstikova T.G., Khvostov M.V., Bryzgalov A.O. et al. Improvement of the pharmacological activity of nifedipine by mechanochemical complexation with glycyrrhizinic acid // Biomed. khimiya. 2010. 56. (2). 187–194.
5. Вавилин В.А., Салахутдинов Н.Ф., Рагино Ю.И. и др. Гипохолестеринемические свойства комплексного соединения симвастатина с глицирризиновой кислотой (симваглизина) в экспериментальных моделях // Биомед. химия. 2008. 54. (3). 301–313.
Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F., Ragino Yu.I. et al. Cholesterol lowering properties of complex compound of simvastatin with glycyrrhizic acid (simvaglyzin) on experimental models // Biomed. khimiya. 2008. 54. (3). 301–313.
6. Пат. 2396079 РФ. Лекарственное средство с гиполипидемическим эффектом «Аторваглизин» / Г.А. Толстиков, Ю.П. Никитин, В.В. Ляхович и др.; опубл. 10.08.2010.
Patent 2396079 RF. Remedy with hypolipidemic effect «Atorvaglyzin» / G.A. Tolstikov, Yu.P. Nikitin, V.V. Lyakhovich et al.; published 10.08.2010.
7. Drew A.F. Animal models of diet-induced atherosclerosis // Methods Mol. Med. 2001. 52. 1–6.
8. Salter A.M., Hayashi R., al-Seen M. et al. Effects of hypothyroidism and high-fat feeding on mRNA concentrations for the low-density-lipoprotein receptor and on acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activities in rat liver // Biochem. J. 1991. 276. 825–832.
9. Amin K.A., Abd El-Twab T.M. Oxidative markers, nitric oxide and homocysteine alteration in hypercholesterolemic rats: role of atorvastatin and cinnamon // Int. J. Clin. Exp. Med. 2009. 2. (3). 254–265.
10. Рагино Ю.И., Вавилин В.А., Салахутдинов Н.Ф. и др. Изучение холестеринснижающего эффекта и безопасности симваглизина на модели гиперхолестеринемии у кроликов // Бюл. exper. биол. мед. 2008. 145. (3). 285–288.
Ragino Yu. I., Vavilin V.A., Salakhutdinov N.F. et al. Study of cholesterol-lowering effect and safety of simvaglyzin on rabbit model of hypercholesterolemia // Byul. eksper. biol. med. 2008. 145. (3). 285–288.
11. Prueksaritanont T., Gorham L.M., Bennett M. et al. In vitro metabolism of simvastatin in humans [sbt] identification of metabolizing enzymes and effect of the drug on hepatic P450s // Drug Met. Disp. 1997. 25. (10). 1191–1199.
12. Prueksaritanont T., Subramanian R., Fang X. et al. Glucuronidation of statin in animals and humans: a novel mechanism of statin lactonization // Drug Met. Disp. 2002. 30. (5). 505–512.
13. Jacobsen W., Kuhn B., Soldner A. et al. Lactonization is the critical first step in the disposition of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin // Drug Met. Disp. 2000. 28. (11). 1369–1378.

ASSESSMENT OF ATORVAGLYZIN EFFICIENCY AND SAFETY ON THE MODEL OF EXPERIMENTAL HYPERCHOLESTEROLEMIA IN RATS

**Ekaterina Mikhailovna STAKHNEVA¹, Valentin Andreevich VAVILIN²,
Yuliya Igorevna RAGINO¹, Nariman Faridovich SALAKHUTDINOV³,
Marina Viktorovna IVANOVA¹, Ol'ga Gennad'evna SAFRONOVA²,
Svetlana Ivanovna MAKAROVA²**

¹ *Institute of Internal Medicine SB RAMS
6630089, Novosibirsk, Boris Bogatkov str., 175/1*

² *Institute of Molecular Biology and Biophysics SB RAMS
630117, Novosibirsk, Timakov str., 2*

³ *Vorozhtsov N.N. Institute of Organic Chemistry SB RAS
630090, Novosibirsk, Akademik Lavrentjev av., 9*

It has been revealed on the model of experimental hypercholesterolemia in rat that hypocholesteremic effect of complex of atorvastatin (AS) with glycyrrhizic acid — atorvaglyzin (AG) — in doses relevant to weight equivalent of AS 20, 40 mkg/kg/per day is comparable to the effect of AS 200 mkg/kg/per day. The decrease in total blood cholesterol (CH) content was 55 %, 53 % и 51 %, respectively, compared to control group after 1 week of drugs administration.

Key words: atorvaglyzin, atorvastatin, hypercholesterolemia, cholesterol, lipoproteins.

Stakhneva E.M. – candidate of biological sciences, researcher, e-mail: stakhneva@ngs.ru

Vavilin V.A. – doctor of medical sciences, professor, head of laboratory of pharmacokinetic and drugs metabolism, e-mail: drugsmet@soramn.ru

Ragino Yu.I. – doctor of medical sciences, professor, head of the laboratory of clinical, biochemical and hormonal researches, e-mail: ragino@mail.ru

Salahutdinov N.F. – doctor of chemical sciences, head of the department for chemistry of natural products, e-mail: anvar@nioch.nsc.ru

Ivanova M.V. – senior researcher, e-mail: marivanova@mail.ru

Safronova O.G. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail: saf@soramn.ru

Makarova S.I. – candidate of biological sciences, senior researcher, e-mail: drugsmet@soramn.ru