

УДК 615.21/.26

Лунин Владимир Глебович

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией биологически активных наноструктур, Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ
sevaloo@yahoo.com

Гитлин Илья Исаакович

кандидат биологических наук, руководитель проекта, G&G Health
sevaloo@yahoo.com

Гитлин Исаак Григорьевич

кандидат технических наук, руководитель научно-исследовательских работ, ЗАО «НПК ЭХО»
sevaloo@yahoo.com

Vladimir G. Lunin

Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Biologically Active Nanostructures, Federal State Budgetary Institution of the Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamalei of the Ministry of Health of the Russian Federation
sevaloo@yahoo.com

Ilya I. Gitlin

candidate of biological sciences, project manager, G&G Health
sevaloo@yahoo.com

Isaak G. Gitlin

Candidate of Technical Sciences, Head of Research Works, JSC NPK ECHO
sevaloo@yahoo.com

**ЭФФЕКТ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОГО ПРЕПАРАТА ГИТАГАМП
««ГИТАГАМП РУТИН – ЖЕЛЕЗО»»
ПРИ БЛЕОМИЦИН-ИНДУЦИРОВАННОМ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОМ
ЗАБОЛЕВАНИИ ЛЕГКИХ У МЫШЕЙ В СРАВНЕНИИ
С ПИРФЕНИДОНОМ**

**THE EFFECT OF USING THE NEW COMPOUND
«GITAGAMP RUTIN-IRON»
IN BLEOMYCIN-INDUCED INTERSTITIAL LUNG DISEASE MODEL IN
MICE IN COMPARISON WITH PIRFENIDONE**

Аннотация. Авторами статьи отмечается, что исследование эффективности применения нового препарата «Гитагамп рутин – железо» и референс-препарата Пирфенидона, по динамике веса и выживаемости мышей после инстилляций блеомицина показало потенциальную возможность использования препарата «Гитагамп рутин – железо» в качестве протективного средства, снижающего тяжесть протекания блеомицин индуцированного интерстициального заболевания легких (ИЗЛ) мышей в сравнении с Пирфенидоном.

Ключевые слова: блеомицин, интерстициальное заболевание легких мышей, «Гитагамп рутин – железо».

Annotation. The study of the effectiveness of the new drug «Gitagamp rutin-iron» and the reference drug Pirfenidone, according to the dynamics of weight and survival of mice after instillation of bleomycin, showed the potential possibility of using «Gitagamp rutin-iron» as a protective agent that reduces the severity of bleomycin-induced interstitial lung disease in mice in comparison with Pirfenidone.

Key words: bleomycin, interstitial lung disease of mice, «Gitagamp rutin-iron».

Введение.

Идиопатический легочный фиброз (ИЛФ) имеет сравнительно низкую заболеваемость (4 - 16 случая на 100 000 населения), но является смертельным заболеванием неизвестной этиологии. Эта патология характеризуется интерстициальным процессом и высокой смертностью. Фиброз тесно взаимосвязан с процессом воспаления, пролиферацией и миграцией фибробластов в легкие [11; 13]. Пациенты в возрасте проявляют пониженную способность устранять фиброз, что приводит к образованию рубцов на ткани и необратимому повреждению легких.

В настоящее время трансплантация легких является единственным способом лечения, которое способствует увеличению продолжения жизни пациентов, однако сопряженное с пересадкой применение иммуносупрессивных препаратов губительно для организма [16]. Существует несколько редких генетических вариантов, в основном, связанных с семейной IPF и общим однонуклеотидным полиморфизмом MUC5B, что является факторами, способствующими развитию ИЗЛ [13]. Существование генетических вариантов, связанных с восприимчивостью к ИЛФ, вероятно, обуславливают смертность [10; 14].

Одним из факторов, который может привести к прогрессированию ИЛФ и других интерстициальных заболеваний легких ИЗЛ, является усиление окислительного стресса. Окислительный стресс - это дисбаланс активных форм кислорода (АФК) и доступной антиоксидантной защиты от них. В нормальном физиологическом состоянии АФК используются иммунной системой для опосредования иммунного ответа и устранения патогенов

путем запуска воспалительных путей [15]. Отмена регулирования зазора АФК или условия, вызывающие накопление АФК, причиняют серьезный и непоправимый ущерб тканям либо напрямую, либо через изменение сигнальных путей[12].

Асбестоз и силикоз связаны с воспалительным процессом, стимулируют привлечение иммунных клеток, что, в свою очередь, приводит к повреждению, вызванному АФК. Некоторые лекарственные препараты могут также вызвать острое повреждение легких, например, характеризуется диффузным альвеолярным поражением. Лежащее в основе воспаление, связано с легочными сосудами, проницаемостью и гибелью эпителиальных и эндотелиальных клеток. Нарушение окислительного / антиоксидантного баланса важно в патогенезе острого повреждения легких и острый респираторный дистресс-синдром [9]. Наиболее известные лекарства в этом отношении являются радикально-генерирующими соединениями в легочную ткань. Цитостатический агент блеомицин, например, комплексов железа, принимает электрон и перемещает его в O_2 , образуя радикалы O^{2-} [8]. Использование антиоксиданта может оказаться логичным и эффективным способом предотвращения образования и развития ИЛЗ.

Результаты,[2; 5] полученные при обсуждении положительного влияния нового препарата (НП) на протекание бокового амиотрофического склероза (БАС), оказывают на один из возможных механизмов действия НП. Влияния НП [1] хорошо иллюстрируется кривыми хемилюминисценции (ХЛ) цельной крови больных БАС[1] и демонстрируют снижение сверх физиологических концентраций перекиси водорода.

Возрастание редокс потенциала (Пр/о) в организме свидетельствует о накоплении сверх физиологических концентраций перекиси водорода и вызывает существенное снижение растворимости кислорода в плазме крови со всеми вытекающими последствиями. Снижение энергетического ресурса организма возникает в результате дефицита кислорода в клетках организма и, в последствии, недостатка ко-ферментов перуватдегидрогеназы[3; 6]. Эффективность иммунной системы и иммунный ответ организма как основной потребитель энергетического ресурса[7] существенным образом зависит от энергоресурса организма.

Целью настоящего исследования являлось оценить эффективность препаратов для лечения и уменьшения ИПЛ.

Модель блеомицин-индуцированного ИЗЛ [9] позволяет исследовать препараты, улучшающие легочные функции и физическое здоровье пациента.

Материалы и методы.

Объектом исследования являлся препарат «Гитагамп рутин – железо» (рутин-дигидроаскорбиновая кислота, цитрат железа (III), ЗАО «НПК ЭХО», серия: 02.04.2020, форма выпуска: 10% раствор).

Все исследования проведены на мышцах-самцах Black C57/6, массой тела 24-26 г, полученных из Питомника «Андреевка» ФГБУ «НЦБМТ»

РАМН (№ 4681762791 от 18.03.2020). Маркировка клетки кодировала пол животных, породу, дату введения препаратов, название группы. Подбор животных в группы опыта проводили методом случайной выборки, вес животных не должен отличаться не более чем на 10%.

Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены институтской комиссией по уходу и использованию животных на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными [16].

Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. N 755).

Для кормления животных использовались экструдированные, полнорационные, экологически чистые, сбалансированные по содержанию питательных веществ корма для лабораторных животных, изготовленные без применения консервантов и искусственных красителей на основе высококачественного отечественного сырья по ГОСТ 3 502.58-92 производства ООО «МСТ».

Приготовление раствора «Гитагамп рутин – железо» 8 мг/кг: к 1 мл исходного раствора (концентрация 10%) добавляли 2 мл дистиллированной деионизированной воды. Полученный раствор вводили внутривентриально в дозе 8 мг/кг массы тела животного.

Приготовление раствора «Гитагамп рутин – железо» 16 мг/кг: к 2 мл исходного раствора (концентрация 10%) добавляли 1 мл дистиллированной деионизированной воды. Полученный раствор вводили внутривентриально 1 раз в сутки, в течение 7 дней (первое введение – через 24 часа после инфицирования) в дозе 4 мг/кг массы тела животного.

В качестве препарата сравнения был использован Пирфенидон (5-Methyl-1-phenylpyridin-2 (1H)-one, MatrixScientific; 53179-13-8, 27.02.2020 г.). Приготовление препарата сравнения: к 40 мг Пирфенидона добавляли 4,0 мл деионизированной воды для получения исходного раствора Пирфенидона в концентрации 10 мг/мл. Пирфенидон вводили животным внутривентриально в дозе 100 мг/кг.

Для индукции идиопатического легочного фиброза (ИЛФ) применяли препарат Блеомицин ((3-{{(2'-{{(5S,8S,9S,10R,13S)-15-{{6-Амино-2- {{(1S)-3-амино-1-{{(2S)-2,3-диамино-3-оксопропил}амино}-3-оксопропил} -5-метилпиримидин-4-ил}-13-{{[(2R,3S,4S,5S,6S)-3- {{[(2R,3S,4S,5R,6R)-4-(карбамоилокси)-3,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил]окси} -4,5-дигидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидро-2H-пиран-2-ил]окси} (1H-имидазол-5-ил)метил]-9-гидрокси-5-[(1R)-1-гидроксиэтил]-8,10-диметил-4,7,12,15-тетраоксо-3,6,11,14-тетраазапентадец-1-ил}-2,4'-би-1,3-тиазол-4-ил)карбонил}амино}пропил)(диметил)сульфоний, «Ниппон Кайяку Ко., Лтд.», Япония, 480642, 04.2018 г.). Приготовление раствора Блеомицина (БЛМ): к 50 мг (1,5 ед/мг) БЛМ приливают 31,25 мл стерильного 0,9% хлорид натрия для получения раствора 1,6 мг/мл. Раствор БЛМ храниться

при -20 ± 4 °С в аликвотах. Одной внутритрахеальной инстилляцией 50 мкл (2,0 мг / кг с объемом дозирования 1,25 мл/кг исходного раствора; объем 50 мкл дополняли 0,9% физиологическим раствором).

Индукцированное БЛМ повреждение легких у мышей является хорошо документированной моделью интерстициального заболевания легких мышей. Это модель используется для исследования эффективности инновационных противовоспалительных и антифиброзных лекарственных средств для уменьшения легочного фиброза.

Раствор БЛМ вводили животным всех групп посредством интратрахеальной инстилляцией в 1-ые сутки с использованием катетера BDInsyte 20G со шприцом Norm-JectTuberkulin объемом 1 мл в дозе 50 мкл.

Дизайн исследования представлен в Таблице 1.

Таблица 1. - Характеристика исследуемых групп животных.

Параметр	Группа животных				
	Интактный контроль (0.9% NaCl)	Отрицательный Контроль (0.9% NaCl)	«Гитагамп рутин – железо» 8 мг/кг	«Гитагамп рутин – железо» 16 мг/кг	Пирфенидон
Количество мышей (n=)	6	10	10	10	10
Инстилляция БЛМ	Нет	Да	Да	Да	Да
Доза	25 мкл	50 мкл	25 мкл	25 мкл	25 мкл
Способ введения (1 раз в сут.)	Под-кожно	Под-кожно	Внутри-желудочно	Внутри-желудочно	Внутри-желудочно
Дни введения	7, 11, 14, 18	7, 11, 14, 18	С 1 по 21	С 1 по 21	С 7 по 21

Проводилось ежедневное наблюдение за поведением и общим состоянием здоровья животных. Суточная масса тела учитывалась с 1-ых до 26-е сутки. Животных ежедневно осматривали во время развития болезни на предмет изменений в поведении общего состоянии здоровья. Эвтаназию и извлечение легких проводили через 120 часов после последнего введения препарата животным на 26-е сутки. Легкие каждой мыши извлекали, взвешивали, промывали раствором 0,9%-ым NaCl и помещали в 10% нейтральный раствор формалина (НФИЗЛ).

Стандартный статистический анализ выполняли с применением программного обеспечения Microsoft Excel.

Результаты исследования.

Стандартная модель БЛМ-индуцированного интерстициального заболевания легких имела типичные конечные точки для воспалительной и фиброзной фаз 7 и 14 дней. С целью исследования влияния «Гитагамп рутин – железо» и Пирфенидона на БЛМ-индуцированный легочный фиброз, мышам вводили внутривентрикулярно «Гитагамп рутин – железо» (8 мг/кг и 16 мг/кг) один раз в сутки с 1 по 21 день после инстилляций БЛМ. Пирфенидон вводили внутривентрикулярно начиная с 7 суток после инстилляций БЛМ. Затем определяли массу животных с 1-ых по 26-е сутки (рис.1).

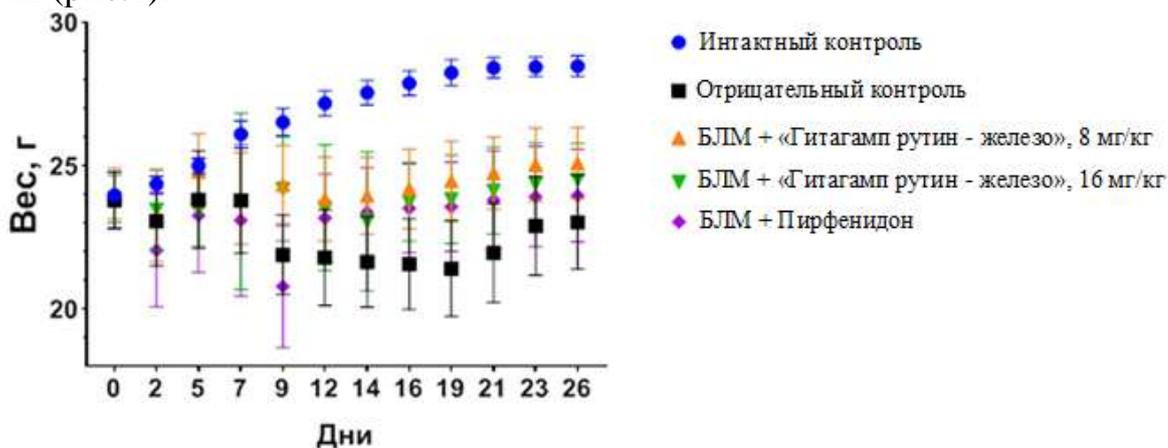


Рисунок 1. Динамика веса мышей по группам.

Примечание: при отклонении веса мышей на 10 % от среднестатистического значения - результат не учитывался.

Анализ динамики веса (рис.2) в течение 26-и дней после инстилляций БЛМ показал разницу между испытываемыми группами. Мыши, получавшие БЛМ, начали терять вес на 7-й день, гибель при этом не отмечалась. Тенденция потери веса была меньше в группах получавших «Гитагамп рутин – железо» (рис. 2А и Б) и Пирфенидон (2В). На фоне введения «Гитагамп рутин – железо» в дозе 8 мг/кг гибель животных не отмечалась.

Таким образом, мыши, получавшие «Гитагамп рутин – железо» в дозе 8 мг/кг, начиная с 1-ого дня, показали значительное улучшение показателя потери массы тела (рис. 2А).

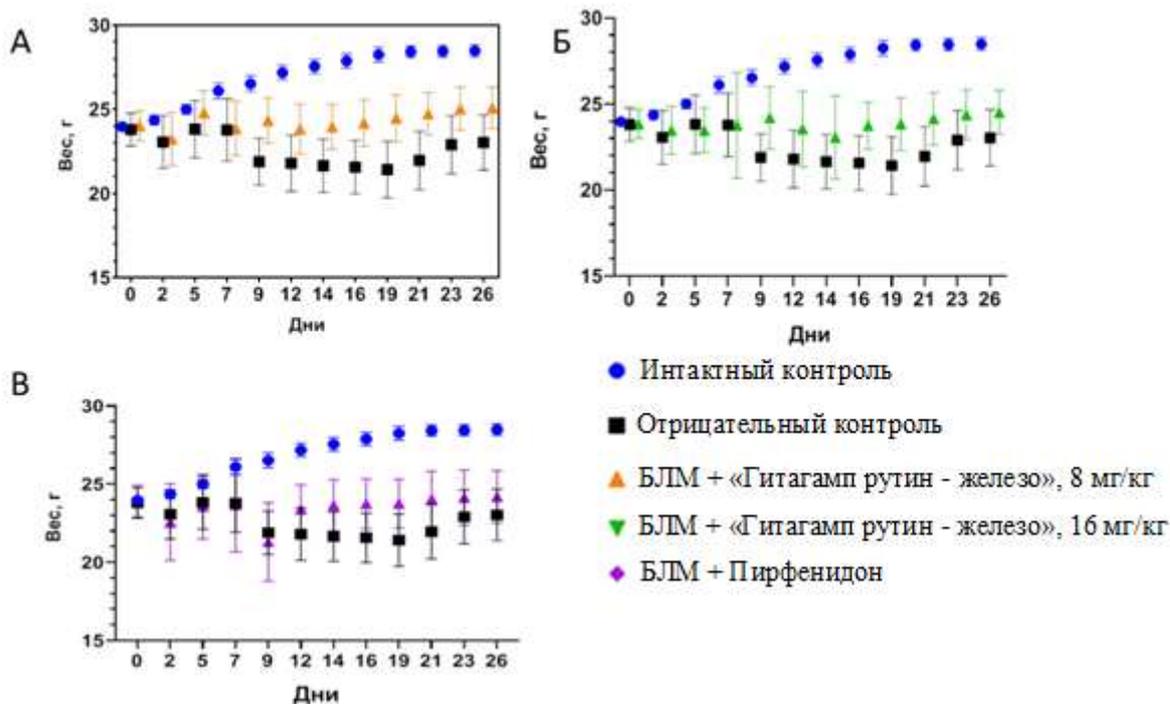


Рисунок 2. Динамика веса мышей.
 А) «Гитагамп рутин – железо» 8 мг/кг;
 Б) «Гитагамп рутин – железо» 16 мг/кг;
 В) Пирфенидон

Статистический анализ показал значимую разницу в динамике веса между группы экспериментальной модели БЛМ (отрицательный контроль) и группы БЛМ + «Гитагамп рутин – железо» 8 мг/кг при уровне значимости $p < 0,001$.

В группе мышей, получавших «Гитагамп рутин – железо» в дозе 16 мг/кг на 5-е, 6-е и 16-е сутки фиксировалась гибель животных. При этом уровень смертности в группе БЛМ на фоне препарата «Гитагамп рутин – железо» 16 мг/кг составил 30%.

При сравнении веса мышей в группе БЛМ + «Гитагамп рутин – железо» 16 мг/кг и массой животных в группе БЛМ (отрицательный контроль) наблюдали достоверную разницу ($p < 0,001$). При сравнении группы БЛМ + «Гитагамп рутин – железо» 8 мг/кг и БЛМ + «Гитагамп рутин – железо» 16 мг/кг разница веса животных статистически не значима ($p > 0,05$).

Увеличение веса мышей под влиянием Пирфенидона на модели БЛМ-индуцированного фиброза легких наблюдали с 12-е по 26-е сутки, при этом в сравнении с группой контроля БЛМ (отрицательный контроль) наблюдали достоверную разницу в динамике веса при уровне значимости $p < 0,05$ (рис. 2).

На 26-е сутки у мышей извлекали легкие с трахеей и взвешивали. Вес легких представлены на рисунке 3.

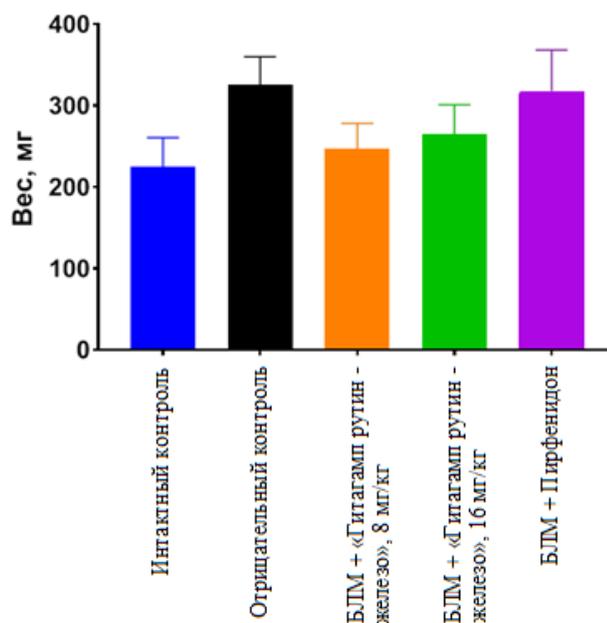


Рисунок 3. Вес легких мышей.

В группе отрицательного контроля БЛМ наблюдалось достоверное увеличение среднего веса легких мышей по сравнению с интактной контрольной группой ($p < 0,001$). Средний вес легких группы мышей, получавших на 7-е сутки Пирфенидон статистически выше по сравнению с интактной группой животных, но увеличивается меньше, чем в группе отрицательного контроля БЛМ ($p > 0,05$). Значимая разница показана между контрольной группой БЛМ и весом мышей, получающих препарат «Гитагамп рутин – железо» в дозе 8 мг/кг ($p < 0,001$) и 16 мг/кг ($p < 0,01$).

Таким образом, исследование препарата «Гитагамп рутин – железо» и препарата сравнения Пирфенидона по изменению веса мышей и массы легкого показало, что препарат «Гитагамп рутин – железо» в дозе 8 мг/кг был достаточно эффективным в отношении БЛМ-индуцированного легочного фиброза. Высокая доза (16 мг/кг) данного препарата, вероятно, оказывала токсическое действие на животных, о чем свидетельствовала гибель животных (30%). Применение препарата Пирфенидона с 7-е по 21-е сутки способствовало улучшению состояния животных по сравнению с группой БЛМ (отрицательный контроль) к 26-ым суткам наблюдения при $p < 0,05$.

Выводы.

На основании проведенного исследования на модели БЛМ-индуцированного интерстициального заболевания мышей показана потенциальная возможность использования препарата «Гитагамп рутин – железо» в дозе 8 мг/кг в качестве протективного средства, снижающего прогрессивное образование соединительной ткани при блеомицин-индуцированного интерстициального заболевания легких.

Результаты о действии препарата «Гитагамп рутин – железо», полученные на экспериментальной модели легочного фиброза *in vivo*,

указывают на целесообразность проводить дальнейшие исследования препарата.

Авторы статьи выражают глубокую признательность коллективу Лаборатории иммунологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» под руководством Исаевой Е.И.

Литература:

1. Гитлин И.Г., Гольдберг Е.З. Неврология, психиатрия и оксидативный стресс. Защитные свойства «Гитагамп – Рутин Железо (GRuI)» // Журнал Международной медицины, 2013. - № 2 (3). – С. 101-106.

2. Гитлин И.Г. Нейродегенеративные заболевания. Опыт лечения амиотрофического склероза // Дневник казанской медицинской школы, 2015. – Т.1. – Вып. VII. – С. 72-76.

3. Гитлин И.Г. Особенности влияния тонуса мышечной системы на нарушение энергетического баланса и способы его коррекции // Медицинский советник, 2015. - №5. – С. 19-21.

4. Гитлин И.Г. Патент РФ 2309740, Евразийский патент 0166466, патент Китай ZL80033434.X, СА2659914 Канада США.

5. Захарова М.Н., Народитский Б.С., Логунов Д.Ю., Гитлин И.Г. Изучение роли антиоксидантов в патогенезе бокового амиотрофического склероза // «Практическая медицина», 2012. - № 1(56). – С. 186-187.

6. Кукес В.Г., Гитлин И.Г. Персонализированная медицина и окислительно восстановительный гомеостаз // лекарственные препараты и рациональная фармакотерапия, 2014. - №2. – С. 23-25 .

7. Тухватулин А.И., Гитлин И.Г., Калюжин О.В Изучение способности композиции клеточных стенок *BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM* и *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* активировать транскрипционный фактор NF-κB при взаимодействии с Toll-подобными рецепторами *IN VITRO* // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2013. - № 1. – С. 27-31.

8. Bast, Weseler, Haenen, & Hartog. Oxidative stress and antioxidants in interstitial lung disease // *Curr Opin Pulm Med*, 2010. - № 16(5). – P. 516-20.

9. Dianne M. Walters, Steven R. Kleberger. Mouse Models of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis // *Current Protocols in Pharmacology Chapter*, 2008. - № 5(1) – P 538 - 46.

10. Imre Noth, et al. Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study // *Lancet Respir Med*, 2013. - № 1(4). – P. 309-317.

11. Lederer D.J., Martinez F.J. Idiopathic Pulmonary Fibrosis // *N Engl J Med*, 2018. - № 378(19). – P. 1811-23.

12. Maria Magallon,1,2 Maria Mercedes Navarro-Garcia, Francisco Dasi. Oxidative Stress in COPD // *J Clin Medv*, 2019. - № 8(11). – P. 2015 – 25.

13. Seibold et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis // *N Engl J Med*, 2011. - №364(16). – P.1503-12.

14. Singer et al. *Syndemics and the biosocial conception of health* // *Lancet*, 2017. - №389(10072). – P. 941-950.

15. Slimen et al. *Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage* // *International Journal of Hyperthermia*, 2014. – Volu.30. - P. 513-523.

16. Titman A., Rogers C.A., Bonser R.S., Banner N.R., Sharples L.D. *Disease-specific survival benefit of lung transplantation in adults: a national cohort study* // *American Journal of Transplantation*, 2009. - № 9 (7). – P. 1640-49.

References:

1. Gitlin IG, Goldberg EZ *Neurology, psychiatry and oxidative stress. Protective properties of "Gitagamp - Rutin Iron (GRuI)"* // *Journal of International Medicine*, 2013. - № 2 (3). - C. 101-106.

2. Gitlin IG *Neurodegenerative diseases. Experience in the treatment of amyotrophic sclerosis* // *Diary of the Kazan Medical School*, 2015. - Vol.1. - Issue. VII. - C. 72-76.

3. Gitlin IG *Peculiarities of the influence of the tone of the muscular system on the violation of energy balance and methods of its correction* // *Medicinskij sovetnik*, 2015. - №5. - C. 19-21.

4. Gitlin IG RF Patent 2309740, Eurasian Patent 0166466, Patent China ZL80033434.X, CA2659914 Canada USA.

5. Zakharova MN, Naroditsky BS, Logunov DY, Gitlin IG *Study of the role of antioxidants in the pathogenesis of lateral amyotrophic sclerosis* // *"Practical Medicine"*, 2012. - № 1 (56). - C. 186-187.

6. Kukes VG, Gitlin IG *Personalized medicine and oxidatively restoring homeostasis* // *drugs and rational pharmacotherapy*, 2014. - №2. - C. 23-25.

7. Tukhvatulin AI, Gitlin IG, Kalyuzhin OV *Study of the ability of the composition of the cell walls of BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM and SACCHAROMYCES CEREVISIAE to activate the transcription factor NF- κ B in the interaction with the Toll-like IN receptor «Man and his health»*, 2013. - № 1. - C. 27-31.

8. Bast, Weseler, Haenen, & Hartog. *Oxidative stress and antioxidants in interstitial lung disease* // *Curr Opin Pulm Med*, 2010. - № 16(5). – P. 516-20.

9. Dianne M. Walters, Steven R. Kleeberger. *Mouse Models of Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis* // *Current Protocols in Pharmacology Chapter*, 2008. - № 5(1) – P 538 - 46.

10. Imre Noth, et al. *Genetic variants associated with idiopathic pulmonary fibrosis susceptibility and mortality: a genome-wide association study* // *Lancet Respir Med*, 2013. - № 1(4). – P. 309-317.

11. Lederer D.J., Martinez F.J. *Idiopathic Pulmonary Fibrosis* // *N Engl J Med*, 2018. - № 378(19). – P. 1811-23.

12. Maria Magallon,1,2 Maria Mercedes Navarro-Garcia, Francisco Dasi. *Oxidative Stress in COPD* // *J Clin Medv*, 2019. - № 8(11). – P. 2015 – 25.

13. Seibold et al. A common MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis // *N Engl J Med*, 2011. - №364(16). – P.1503-12.

14. Singer et al. Syndemics and the biosocial conception of health // *Lancet*, 2017. - №389(10072). – P. 941-950.

15. Slimen et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage // *International Journal of Hyperthermia*, 2014. – Volu.30. - P. 513-523.

16. Titman A., Rogers C.A., Bonser R.S., Banner N.R., Sharples L.D. Disease-specific survival benefit of lung transplantation in adults: a national cohort study // *American Journal of Transplantation*, 2009. - № 9 (7). – P. 1640-49.