

На правах рукописи

Андрианова Елена Вячеславовна

**БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПРОРЕГЕНЕРАТОРНОГО ДЕЙСТВИЯ
НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО
N-АЦЕТИЛ-6-АМИНОГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

1.5.4 Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Тверь – 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель

Егорова Елена Николаевна

доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Официальные оппоненты

Соловьева Анна Геннадьевна

доктор биологических наук, заведующий отделом физико-химических исследований центральной научно-исследовательской лаборатории Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Томилова Ирина Константиновна

доктор медицинских наук, заведующий кафедрой биохимии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Санкт-Петербург.

Защита состоится «__» _____ 2023 года в 14.00 на заседании диссертационного совета 24.1.241.02 при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу 109240, г. Москва, Устьинский проезд, д. 2/14.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» и на сайте <http://www.ion.ru/>.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Шумакова Антонина Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема стимулирования регенерации тканей является актуальной для биологии и медицины, поскольку число случаев травматизма в России и мире остается чрезвычайно высоким [Мионов С.П. и соавт., 2019]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) травматизм входит в десятку основных причин смертности и заболеваемости населения при этом среди всех случаев травм в мирное время ожоги занимают третье место [Римжа М.И. и соавт., 2018; Бутрин Я.Л., 2019].

Восстановление тканей и органов независимо от причины, вызвавшей их повреждение, имеет закономерную стадийность и включает стереотипный комплекс физиологических и биохимических процессов [Ткачук В.А., 2016; Литвицкий П.Ф., 2017]. Биохимической основой репарации является усиление биосинтеза в тканях пластических субстратов (аминокислот, белков, пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, РНК и ДНК, фосфолипидов и т.д.) и ускорение процессов энергообеспечения благодаря активации специфических и общих путей метаболизма. Типовые физиологические процессы (экссудация, воспаление, пролиферация, ремоделирование и т.п.) также связаны с адаптивными изменениями протекания биохимических реакций (изменение кислотно-основного состояния, усиление свободнорадикальных реакций, активация синтеза эйкозаноидов, нарушение баланса протеолиз-синтез белков и т.д.) [Омельяненко Н.П., 2009; Ткачук В.А., 2012].

Среди многочисленных веществ, обладающих прорегенераторной активностью, известна N-ацетил-6-аминогексановая (ацексамовая) кислота (АК), для которой установлена способность ускорять заживление ран кожи и слизистых оболочек, переломов трубчатых костей [Петрова М. Б., 2011; Ключников О.В. и соавт., 2018]. Для совершенствования протективных свойств АК были синтезированы ее производные – ацексаматы цинка, натрия, магния, кальция, серебра, этилтиазолиламид, показавшие лучший прорегенераторный эффект [Пахомов Д.В. и соавт. 2020; Скачилова С.Я. и соавт., 2020; Hadj Abdallah N. et al. 2018]. Важно отметить, что для АК и указанных ее производных не установлены биохимические процессы, ассоциированные с их прорегенераторным действием.

Учитывая изложенное выше, представляется актуальным изучение влияния нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2- этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата – на регенерацию ожоговых ран кожи крыс при его местном применении, а также адаптивных биохимических процессов, сопровождающих репарацию раневых дефектов.

Степень разработанности темы исследования. У N-ацетил-6-аминогексановой (ацексамовой) кислоты в экспериментальных и клинических исследованиях была обнаружена слабо выраженная способность оптимизировать заживление ран кожи, слизистых оболочек и переломов трубчатых костей. С целью усиления ее прорегенераторных свойств в Российской Федерации и за рубежом были синтезированы производные ацексамовой кислоты – ацексаматы цинка, натрия, магния, кальция, серебра, этилтиазолиламида, которые продемонстрировали более

эффективное действие на процессы репарации различных тканей. Однако, как для ацетамидовой кислоты, так и ее производных не были расшифрованы биохимические механизмы, ассоциированные с их прорегенераторными свойствами.

Цель исследования: изучить биохимические аспекты прорегенераторного действия нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ) при его применении в виде мази при заживлении термических ожогов кожи крыс.

Задачи исследования:

1. Выполнить эксперимент по моделированию термических ожогов кожи у крыс и их ежедневной обработке мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ до полного заживления ран.

2. Провести планиметрическое исследование динамики заживления раневых дефектов кожи крыс при местном воздействии мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в ходе эксперимента.

3. Оценить эффективность использования курса аппликаций мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ при местном лечении термических ожогов кожи крыс.

4. Изучить выраженность оксидативного стресса в тканях раневых дефектов и сыворотке крови крыс при обработке экспериментальных термических ожогов кожи мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ на этапах регенерации ран.

5. Изучить динамику уровней матричной металлопротеиназы 9 типа (ММР-9) и ингибитора матричных металлопротеиназ 1 типа (ТИМР-1) в тканях раневых дефектов и сыворотке крови при аппликациях на экспериментальные термические ожоги кожи крыс мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в процессе регенерации ран.

6. Разработать методику количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии и определить его резорбцию из мази при аппликации на ожоговые раны животных.

7. Выявить наличие корреляционных связей между площадями раневых дефектов и изученными биохимическими показателями на различных фазах раневого процесса.

Легитимность исследования. На проведение настоящего исследования получено положительное решение Этического комитета ФГБОУ ВО Тверского ГМУ Минздрава России (протокол № 3 от 30.09.20) в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинской декларации.

Научная новизна исследования. Впервые выявлена прорегенераторная активность нового производного АК – 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, которая проявилась в сокращении сроков заживления термических ожогов кожи крыс в эксперименте при их ежедневной обработке мазью с данным веществом по сравнению с животными контрольных групп.

Впервые охарактеризована динамика выраженности оксидативного стресса в тканях раневых дефектов и сыворотке крови крыс при обработке экспериментальных термических ожогов кожи мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ на этапах восстановительного процесса в коже.

Впервые изучена динамика уровней ММР-9 и ТИМР-1 в тканях раневых дефектов и

сыворотке крови при обработке экспериментальных термических ожогов кожи крыс мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ на этапах регенерации ран.

Разработана методика количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в плазме крови крыс методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии с целью определения его резорбции из мази при аппликации на ожоговые раны животных.

Получены новые данные о взаимосвязи между площадями раневых дефектов и изученными биохимическими показателями в различные фазы раневого процесса.

Новизна полученных результатов подтверждается полученными свидетельствами на ноу-хау, базу данных и патентом на изобретение.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Установлена динамика биохимических процессов, ассоциированных с ускорением заживления экспериментальных термических ожогов кожи крыс при их местном лечении мазью с новым производным АК – 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ.

Разработана методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс.

Результаты проведенного исследования установили наличие прорегенераторных свойств у нового производного АК – 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ при его местном применении в форме мази для обработки термических ожогов кожи крыс, что свидетельствует о перспективности проведения полномасштабных доклинических и клинических исследований данной мази с целью ее последующего практического применения.

Методология и методы исследования. В работе использованы методы теоретического познания (анализ, синтез, сравнение, построение гипотез), методы эмпирического характера (изучение научной литературы, наблюдение, измерение), математические методы (статистический анализ). Диссертационное исследование включает экспериментальное и биохимические исследования.

Положения, выносимые на защиту

1. 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (ацексамат) обладает прорегенераторными свойствами при применении в виде курса ежедневных аппликаций на термические ожоги кожи крыс.

2. Прорегенераторная активность 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата ассоциирована со снижением выраженности свободнорадикальных реакций и протеолитической активности MMP-9 в регенерирующих тканях.

3. Существует достоверная взаимосвязь между площадями раневых дефектов и уровнями MMP-9/TIMP-1 в тканях, а также между уровнями MMP-9/TIMP-1 и индексом оксидативного стресса (ИОС) в тканях у животных, получавших на ожоговые раны курс аппликаций 2% мазью 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, в фазы воспаления и пролиферации.

4. Прорегенераторная активность нового производного N-A-6-АГ кислоты и ассоциированные с репарацией обнаруженные изменения биохимических показателей обусловлены местным действием вещества на регенерирующие ткани.

Степень достоверности результатов исследования. Достоверность результатов подтверждается применением стандартной методики эксперимента по моделированию термических ожогов у крыс, использованием объема выборки животных, рассчитанного методами математической статистики, рациональным выбором методов исследования, использованием высоко чувствительных и специфичных наборов реактивов для лабораторных исследований, современным сертифицированным лабораторным оборудованием, хранением полученных в настоящем исследовании результатов в компьютерной базе данных в программе Microsoft® Office® Excel® 2016, использованием адекватных методик статистической обработки данных исследования с помощью IBM® SPSS® Statistics 23.0, публикацией в рецензируемых научных журналах результатов исследования и их апробацией на многочисленных научных конференциях. Первичная документация результатов проведенного исследования проверена комиссией (акт проверки первичной научной документации от 26 апреля 2021 года).

Апробация материалов работы. Результаты исследования в виде устных или стендовых докладов представлены на 7 российских и международных научно-практических форумах: V межвузовская научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и медицинская наука», 2017, Тверь (устный доклад) – диплом III степени; VII Межвузовская научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и медицинская наука», 2019, Тверь (устный доклад); VIII Межвузовская научно-практическая конференция молодых ученых «Молодежь и медицинская наука», 2020, Тверь (устный доклад) – диплом I степени; Международный научно-исследовательский конкурс «Исследователь года 2020», Петрозаводск (устный доклад) – диплом I степени; XXII Международный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке: глобальные вопросы и проблемы современности в аспекте модернизации в медицине и образовании», 2020, Москва (стендовый доклад) – диплом III степени; XV Международная научно-практическая конференция молодых ученых-медиков «СОБА», 2021, Курск (устный доклад) – диплом I степени; Всероссийская научная конференция с международным участием «Регенеративная биология и медицина», 2021, Москва (стендовый доклад).

Апробация материалов диссертационной работы проведена на расширенном заседании кафедр биохимии с курсом клинической лабораторной диагностики, биологии, гистологии, эмбриологии и цитологии, физиологии с курсом теории и практики сестринского дела, патологической физиологии, общей хирургии, фармакологии и клинической фармакологии, факультетской терапии, госпитальной терапии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Тверской государственной медицинской академии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России) от 22 декабря 2021 года, протокол № 1.

Внедрение результатов исследования. Методики определения общей оксидантной и антиоксидантной активности, концентраций MMP-9 и TIMP-1, а также данные об их динамике в ходе процесса регенерации термических ожогов кожи у животных используются в учебном процессе на кафедре управления и экономики фармации с курсами фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО

Тверской ГМУ Минздрава России и кафедре зоологии и физиологии ФГБОУ ВО «Тверской государственный университет».

На апробированную в ходе исследования методику эксперимента по моделированию термических ожогов кожи у крыс, использующуюся в работе кафедры биологии и вивария ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, оформлено «ноу-хау». По материалам исследования оформлены объекты интеллектуальной собственности – патент на изобретение и база данных.

Личный вклад автора в проведенное исследование. Лично Андриановой Е.В. выполнены: анализ отечественной и зарубежной научной литературы по теме диссертации, формулировка цели и задач исследования, выполнение эксперимента, набор фактического материала в ходе эксперимента и его обработка, выполнены лабораторные биохимические исследования, составлена база данных полученных результатов по группам исследования, выполнена статистическая обработка полученных результатов, написан текст диссертации, самостоятельно сформулированы выводы и практические рекомендации по результатам проведенного исследования, подготовлены статьи для публикации, устные и стендовые доклады для выступлений на научно-практических мероприятиях.

Публикации. Основные положения диссертации опубликованы в 16 научных работах, из которых 3 – статьи в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК РФ для опубликования основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, 1 – патент РФ, 1 – база данных, 11 – статьи и материалы научных конференций, опубликованные в других изданиях. Также получено 1 свидетельство ноу-хау.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 139 странице текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, двух глав результатов собственных исследований, главы обсуждения результатов исследования, выводов, практических рекомендаций, списка используемых сокращений, списка литературы. Список литературы содержит 222 источника, из них 99 отечественных и 123 зарубежных авторов. Диссертационная работа содержит 21 таблицу и иллюстрирована 29 рисунками.

Автор признательна руководителю отдела химии и технологии синтетических лекарственных средств АО «ВНЦ БАВ», лауреату Государственной премии РФ, д.х.н., проф. С.Я. Скачиловой за любезно предоставленное новое производное N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, а также выражает искреннюю благодарность заведующей кафедрой биологии д.б.н., профессору М.Б. Петровой за помощь при проведении эксперимента на животных, заведующей кафедрой управления и экономики фармации с курсами фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармацевтической и токсикологической химии ФГБОУ ВО Тверской ГМУ Минздрава России, д.м.н., проф. М.А. Демидовой за помощь в изготовлении мази, содержащей данное производное, и заведующему научно-исследовательской лабораторией к.фарм.н. Н.С. Попову за помощь в выполнении ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая научная работа является экспериментальным, рандомизированным и контролируемым исследованием. Манипуляции с животными проводили в соответствии с требованиями Руководства по работе с лабораторными животными при проведении доклинических испытаний (ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России, г. Москва, 2015), ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes (22.09.2010).

Схема эксперимента представлена на рисунке 1. Модельными объектами исследования выступили белые неинбредные половозрелые крысы, подбор которых осуществлялся по принципу аналогии исходной массы тела (180-200 г), пола (самки) и возраста (2-3 мес.). Перед постановкой эксперимента животных выдерживали в карантине в течение 14 суток на стандартном пищевом и водном рационах при естественном освещении и температуре воздуха в интервале 18-22°C, в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур». По окончании карантина проводили общую оценку физиологического состояния крыс по виду слизистых оболочек, уровню двигательной активности и потреблению корма и воды. Ко времени проведения исследования все животные были здоровыми, без изменений аппетита, поведения, режима сна и бодрствования.

Методика формирования термического ожога кожи у крыс. На дорзальной поверхности тела в межлопаточной области у животных выстригали ножницами волосяной покров, а затем с помощью крема-депилятора удаляли его остатки, добиваясь полного отсутствия шерсти. На подготовленном участке наносили экспериментальные полнослойные термические дефекты кожи площадью 225 мм² в условиях анестезии («Золетил-100» в дозе 20 мг/кг внутримышечно) контактно с помощью стального трафарета (температура накаливания 240°C, экспозиция 8 сек), в результате в месте воздействия получали термический ожог III Б степени.

Методика приготовления мази с новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты и режим обработки ожоговых ран. 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ) (рисунок 2) был синтезирован в отделе химии и технологии синтетических лекарственных средств АО «ВНЦ БАВ» (г. Старая Купавна; руководитель – лауреат Государственной премии РФ, д.х.н., профессор С.Я. Скачилова).

В работе использовали новое производное в виде 2% гомогенной мази на основе полиэтиленгликоля (на 100 г): 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ – 2,0 г, поливиниловый спирт – 10,0 г, полиэтиленгликоль (ПЭГ 400) – 5,0 г, вода – 83,0 г.

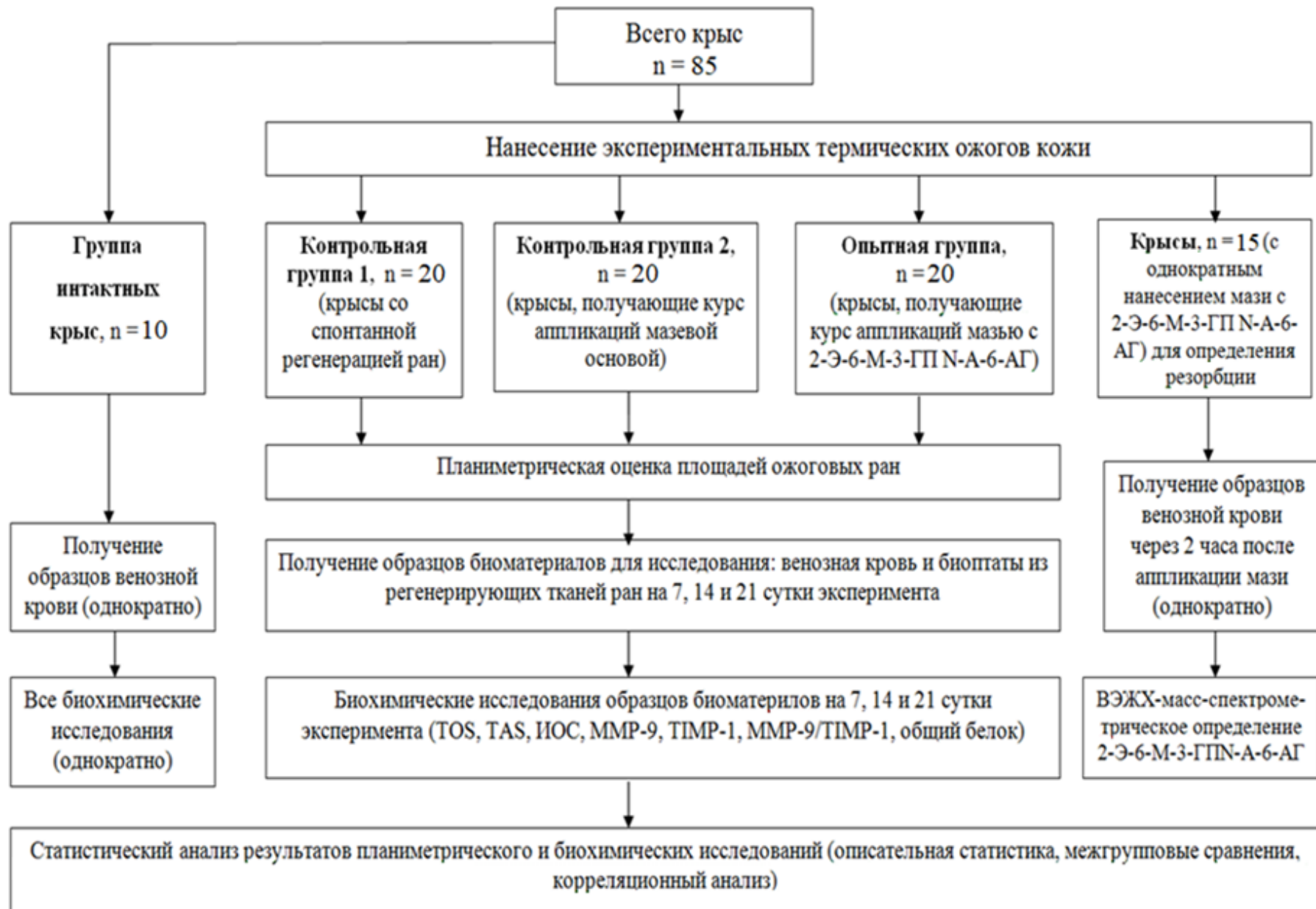


Рисунок 1 – Дизайн эксперимента по оценке прорегенераторных свойств нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на модели термических ожогов кожи крыс

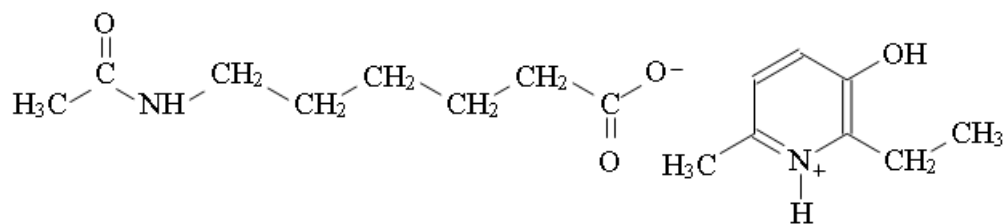


Рисунок 2 – Химическая структура 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N- ацетил-6-аминогексаноата.

Местные аппликации веществ крысам опытной и контрольной 2 групп проводили ежедневно однократно в количестве 2 г после измерения площади ожоговых ран, начиная с первых суток эксперимента до отторжения струпа. С крысами контрольной группы 1 после измерения площади ран проводили манипуляции, имитирующие нанесение аппликаций.

Оценку динамики заживления ожогового дефекта осуществляли *планиметрическим методом*. Начиная со вторых суток после нанесения повреждения, ежедневно на прозрачную пленку переносили контуры каждого дефекта, затем подсчитывали его площадь с помощью миллиметровой бумаги. Абсолютную площадь (S , мм²) поверхностного дефекта кожи рассчитывали по формуле [Пахомова А.Е., 2015] с изменениями: $S = n + \frac{1}{2} k$, где n – количество квадратов размером 1×1 мм, полностью находящихся в пределах контура раны; k – количество квадратов размером 1×1 мм, частично находящихся в пределах контура раны.

Относительное уменьшение площади раны ΔS за сутки, характеризующее скорость заживления ожоговых дефектов, вычисляли по формуле: $\Delta S = (S_{исх} - S_1) / S_{исх} \times 100\%$, где $S_{исх}$ – исходная площадь ожога (225 мм²), S_1 – площадь раны на текущий день измерения.

Получение биологического материала для биохимических исследований. Для определения биохимических показателей у животных получали кровь из хвостовой вены [Тимкин П. Д. и соавт., 2019] в объеме 1 мл в вакуумные пробирки для получения сыворотки с активатором свертывания «Vacuette» (Greiner Bio-one, Австрия). У 60 крыс (1, 2 контрольных и опытной групп) получение крови проводили на 7, 14 и 21 сутки в каждый временной срок исследования от 5 животных. По 5 крыс из каждой группы были оставлены для визуального наблюдения с целью определения полного заживления ожогов. У 10 интактных крыс кровь для биохимических исследований получали однократно на 21 сутки эксперимента. Для получения плазмы крови, необходимой для проведения ВЭЖХ-масс-спектрометрии, забирали кровь из хвостовой вены в объеме 1 мл в вакуумные пробирки «Vacuette» (Greiner Bioone, Австрия) с антикоагулянтом К₂ЭДТА (калиевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты) у 15 крыс через 2 часа после однократной аппликации мази на ожоговые поверхности.

Из жизнеспособных тканей периферии раневых дефектов хирургическими ножницами получали стандартные биоптаты регенерирующих тканей. Масса биоптатов после удаления струпа и подкожной жировой клетчатки с помощью хирургических ножниц в среднем составила 199,3±8,7 мг. Биоптаты помещали в пластиковые микропробирки типа Эппендорф (ROLL s.a.s.,

Италия) с 1,8 мл изотонического раствора натрия хлорида. После получения биоптатов животных выводили из эксперимента путем эвтаназии в соответствии с Приказом № 742 от 13.11.84 «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных».

Биохимические исследования

Методика ВЭЖХ-масс-спектрометрии для оценки резорбции 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ при местных аппликациях мази на ожоговые раны кожи крыс. Важной характеристикой лекарственных средств для местного применения является их биохимическая активность непосредственно в месте нанесения при отсутствии либо низком уровне резорбции в системный кровоток. Хроматографическое определение 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ в плазме крови крыс проводили по собственной методике [Попов Н.С. и соавт., 2021] с помощью ВЭЖХ Agilent Technologies 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Германия) и тандемного квадрупольного масс-спектрометра AB Sciex 3200MD QTrap с электрораспылительным источником ионов (Sciex, Сингапур).

Оптимизацию параметров масс-спектрометрического детектирования 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата осуществляли путем введения в источник ионов стандартного раствора вещества (40 нг/мл) с помощью шприцевого инжектора со скоростью 10 мкл/мин. В качестве растворителя использовали 0,1% раствор муравьиной кислоты в абсолютном ацетонитриле. Определяли m/z (отношение массы к заряду) ионов предшественников и ионов-продуктов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамовой кислоты и сульфацетамида (внутренний стандарт), полученные данные использовали для дальнейшего построения хроматограмм в режиме мониторинга множественных реакций.

Разделение анализов проводили с использованием хроматографической колонки Phenomenex Synerdgi C18 4 мкм, 2×50 мм. Элюирование осуществляли смесью деионизированной воды и абсолютного метанола с добавлением 0,1% муравьиной кислоты в градиентном режиме (таблица 1) при параметрах: температура колонки – 40 °С, объем вода – 10 мкл, общее время анализа – 5 минут, промывка инжектора 50% раствором изопропилового спирта в течение 3 секунд.

Образцы плазмы крови получали путем центрифугирования вакуумных пробирок с кровью с помощью центрифуги «Centrifuge 5804» (Eppendorf AG, Германия) при 1300g в течение 10 минут. Пробоподготовка 15 образцов плазмы крови представляла собой осаждение белков плазмы с помощью абсолютного метанола. Для этого в пробирку типа Эппендорф (ROLL s.a.s., Италия) объемом 2 мл с помощью автоматического микродозатора помещали 200 мкл плазмы крови крыс, добавляли 500 мкл метанольного раствора сульфацетамида (внутренний стандарт) в концентрации 200 нг/мл, охлажденного до -20°C, встряхивали на вортексе в течение 15 секунд, после чего центрифугировали в течение 10 минут при 38000 g и температуре 4°C. Супернатант в объеме 200 мкл переносили в одноразовые полиэтиленовые вставки в хроматографических виалах, которые помещали в автоматический пробоотборник хроматографа.

Таблица 1 – Хроматографические параметры определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата

Хроматографическая колонка	Phenomenex Synerdgi C18 4 мкм, 2×50 мм			
Подвижная фаза А	Деионизированная вода + 0,1% НСООН			
Подвижная фаза В	Абсолютный метанол + 0,1% НСООН			
Программа градиента	Время, мин	Скорость потока, мл/мин	% А	% В
	0,0	0,3	90	10
	1,0		90	10
	3,0		10	90
	4,0		10	90
	4,01		90	10
	5,0		90	10

Для приготовления калибровочных и контрольных образцов использовали пулированную плазму пяти интактных крыс. Исходный раствор 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата был приготовлен на деионизированной воде в концентрации 2000 мкг/мл и использовался для приготовления рабочих водных растворов аналита с концентрацией 5, 10, 50, 100, 500, 1000 и 5000 нг/мл. Калибровочные стандарты были получены путем добавления 50 мкл соответствующего рабочего раствора 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата к 1 мл плазмы крови до достижения концентраций: 0,25; 0,5; 2,5; 5; 25; 50 и 250 нг/мл. Образцы контроля качества были приготовлены аналогично в концентрации 1, 100 и 200 нг/мл. Кроме этого, были приготовлены холостые образцы, не содержащие анализируемое вещество, и внутренний стандарт.

Серия образцов была проанализирована пятикратно, после чего была установлена зависимость сигналов 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацесамовой кислоты, нормированных на сигнал сульфацетамида, от концентрации. Для полученных калибровочных кривых определяли аналитический диапазон, предел детектирования, нижний предел количественного определения, линейность. Обработка результатов была выполнена с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 365.

Методики получения сыворотки крови и приготовления гомогенатов тканей из области раневых дефектов. Образцы сыворотки крови отбирали в пластиковые микропробирки типа Эппендорф (ROLL s.a.s., Италия) после центрифугирования вакуумных пробирок с кровью с помощью центрифуги «Centrifuge 5804» (Eppendorf AG, Германия) при 1300g в течение 10 минут. Содержимое микропробирок типа Эппендорф (биопаты и изотонический раствор натрия хлорида в соотношении 1 : 9 (масса : объем)) переносили в пробирки с шариками для гомогенизации мягких тканей «Precellys Lysing Kit CK14» (Bertin Instruments, Франция) и гомогенизировали в гомогенизаторе «Minilys» (Bertin Technologies, Франция). Затем пробирки

центрифугировали при тех же параметрах, отбирали супернатанты в пластиковые микропробирки типа Эппендорф. Образцы хранили при температуре 4°C до выполнения биохимических тестов.

Методика определения общего количества метаболитов с окислительными и антиоксидантными свойствами. Определение общего окислительного статуса (TOS) и общей антиоксидантной способности (TAS) в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов выполняли фотометрическим методом соответственно по методикам O. Erel (2005) и (2004), используя тест-системы «Total Oxidative status/capacity PerOx (TOS) Kit» и «Total Antioxidative status/capacity PerOx (TAS) Kit» производства «Immundiagnostik AG» (Германия). Реакции проводили в пластиковых микропланшетах, имеющих лунки с плоским дном. Оптические плотности содержимого лунок измеряли при длине волны 450 нм с помощью микропланшетного ридера «Infinite F50» производства «TECAN» (Австрия). Индекс оксидативного стресса рассчитывался по формуле ИОС= TOS / TAS, где ИОС – индекс оксидативного стресса, TOS – значение общей окислительной способности, TAS – значение общей антиоксидантной способности.

Методика количественного определения матричной металлопротеиназы 9 типа (MMP-9). Определение концентрации MMP-9 в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов регенерирующих тканей выполняли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя тест-систему «Quantikine® Rat Total MMP-9» производства «R&D Systems» (США).

Методика количественного определения ингибитора матричных металлопротеиназ 1 типа (TIMP-1). Определение концентрации TIMP-1 в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов регенерирующих тканей выполняли методом иммуноферментного анализа (ИФА), используя тест-систему «Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit TIMP-1» производства «Cloud-Clone Corp.» (США).

Методика количественного определения белка. Содержание общего белка в сыворотке крови и супернатантах гомогенатов определяли фотометрически биуретовым методом [Ненашева О.Н., 2021].

Статистическая обработка результатов исследования. Результаты представлены в виде среднего арифметического значения и стандартного отклонения ($\bar{X} \pm SD$). Достоверность межгрупповых различий определяли по критерию Манна-Уитни и критерию Крускала-Уоллиса. Различия значений между группами считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Взаимосвязь между количественными признаками оценивали путем расчета коэффициента корреляции рангов Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика резорбции 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ при местных аппликациях мази на ожоговые раны кожи крыс

Построение хроматограмм осуществляли по ионному току в режиме множественных реакций (MRM). MRM-переходы для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамата и

сульфацетамида составили соответственно m/z 138,0 \rightarrow m/z 123,0, m/z 174,0 \rightarrow m/z 114,0 и m/z 215,2 \rightarrow m/z 156,0.

Анализ результатов хроматографического определения показал, что время удерживания 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина, ацексамовой кислоты и сульфацетамида (внутренний стандарт) составило соответственно 1,0, 1,25 и 1,2 минут (рисунок 3).

Для разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС были определены метрологические параметры, нижний предел детекции и нижний предел количественного определения для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты составили 0,25 и 0,5 нг/мл соответственно.

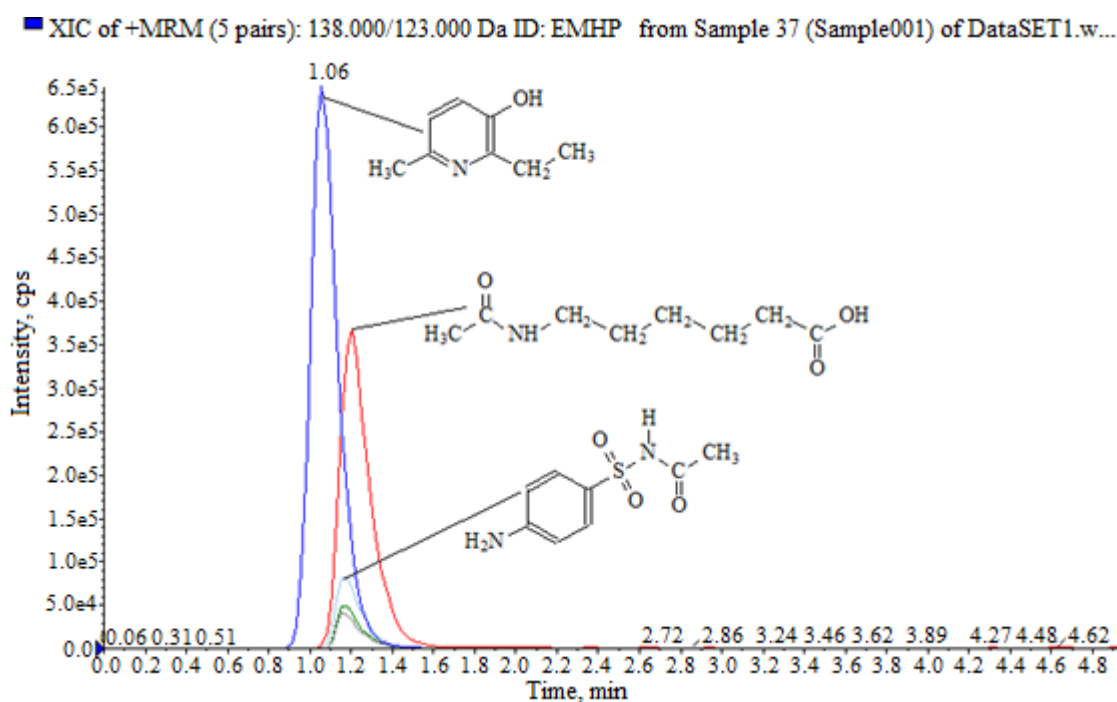


Рисунок 3 – Хроматограмма образца плазмы крови 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата концентрацией 50 нг/мл

Для построения калибровочного графика, описывающего зависимость нормированного сигнала аналита от концентрации, использовали регрессию без нормирования. Для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и ацексамовой кислоты аналитический диапазон составил от 0,5 нг/мл до 250 нг/мл в пересчете на 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ (рисунки 4 и 5).

Матричный эффект был установлен для трех уровней концентрации 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ: 1 нг/мл, 100 нг/мл и 200 нг/мл. По результатам исследования было выявлено, что величина матричного эффекта не превышала 15% для 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния ацексамовой кислоты на всех уровнях концентраций.

Оценку степени извлечения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния и ацексамовой кислоты из плазмы крови крыс осуществляли для трех уровней концентраций 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ (1,0 нг/мл, 100 нг/мл и 200 нг/мл) путем сравнения площадей хроматографических пиков экстрагированных образцов и образцов на чистом растворителе с добавлением экстракта

матрицы. Для всех анализируемых концентраций степень извлечения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния и ацексамовой кислоты составила более 90%.

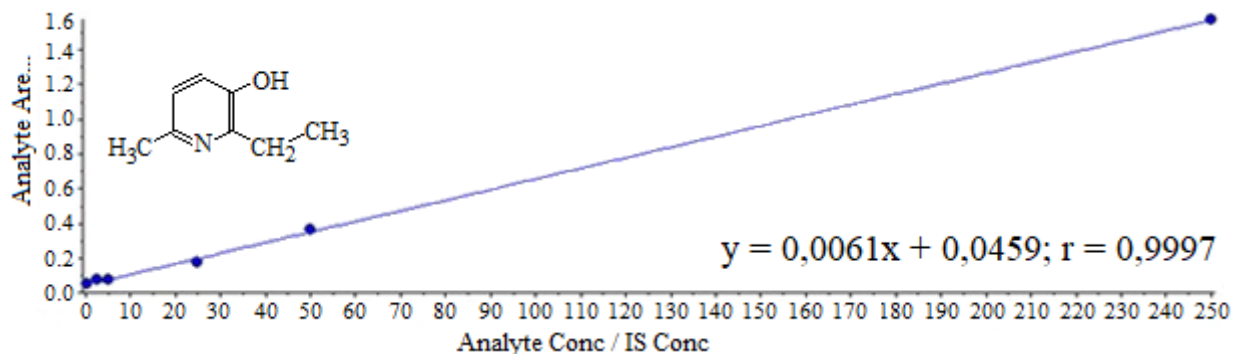


Рисунок 4. Калибровочная прямая для количественного определения 2-этил- 6-метил-3-гидроксипиридина в плазме крови крыс в пересчете на 2-этил-6- метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (по оси X представлена концентрация аналита в нг/мл, по оси Y – отношение площади хромото- графического пика 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина к площади пика сульфацетамида)

Для установления значения матричного эффекта были проанализированы образцы, приготовленные на чистом растворителе, и образцы, содержащие экстракт плазмы крови крыс.

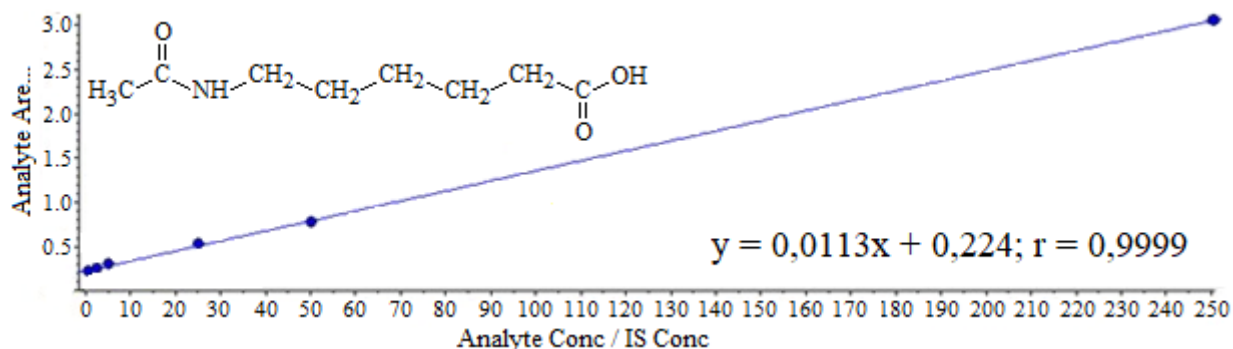


Рисунок 5 – Калибровочная прямая для количественного определения ацексамовой кислоты в плазме крови крыс в пересчете на 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноат (по оси X представлена концентрация аналита в нг/мл, по оси Y – отношение площади хромотографического пика ацексамовой кислоты к площади пика сульфацетамида)

Результаты исследования показали, что через 2 часа после однократного нанесения мази концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния и ацексамовой кислоты в плазме крови крыс составили $18,05 \pm 0,96$ нг/мл и $21,62 \pm 1,12$ нг/мл соответственно в пересчете на 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ. Полученные результаты свидетельствуют о незначительной резорбции исследуемого вещества через поверхность ожогового дефекта.

Анализ результатов *планиметрической оценки* динамики заживления экспериментальных ожоговых ран кожи крыс показал несомненный прорегенераторный эффект 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, примененного в виде 2% мази. Этот факт подтверждается тем, что в группе животных,

получающих аппликации мази, на всех этапах наблюдения средняя площадь ожогов была статистически значимо меньше (таблица 2, рисунок 6) и рубцевание раневых дефектов произошло достоверно быстрее, чем в обеих контрольных группах.

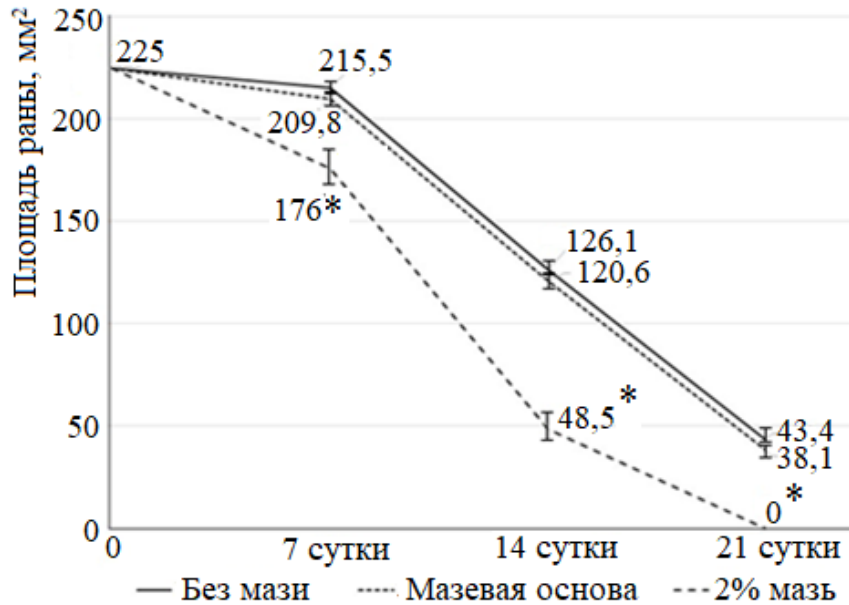


Рисунок 6 – Динамика сокращения площади дефектов кожи крыс при регенерации термического ожога.

Примечание (на рисунках 6-10): * – различие статистически значимо ($p < 0,05$) между показателем у животных опытной группы и контрольных групп 1 и 2 в тот же срок наблюдения

Причем статистически значимых различий значений площади ожоговых ран между 1 и 2 контрольными группами на всех стадиях раневого процесса и сроков рубцевания не наблюдалось, это позволяет утверждать, что аппликация на ожоговые дефекты только мазевой основы не оказывает стимулирующего эффекта на регенерацию.

В стадию воспаления к 7 суткам эксперимента сокращение площади ожогов в опытной группе крыс составило 21,7%, а в 1 и 2 контрольных группах – соответственно 4,4% и 7,1% от их исходной величины. На 14 сутки наблюдения, в стадию пролиферации, площади ожоговых дефектов животных сократились относительно их исходной площади в опытной группе на 78%, а в 1 и 2 контрольных группах – на 44% и 47% соответственно. В опытной группе животных в среднем на 19-е ($19,1 \pm 0,6$) сутки эксперимента наблюдалось отторжение струпа, тогда как в контрольных группах регистрировали наличие ран под струпом, площади которых сократились соответственно на 62% и 65% от их исходного размера. Полное же заживление с формированием соединительнотканного рубца у животных контрольных групп 1 и 2 отмечали в среднем на 23-е ($23,4 \pm 1,0$) и 22-е ($22,1 \pm 0,9$) сутки эксперимента соответственно, в среднем на 3,5 суток позже, чем в опытной группе.

Известно, что морфофункциональные изменения в тканях обусловлены биохимическими процессами, протекающими в поврежденных структурах. В проведенном исследовании было

изучено соотношение в крови и тканях из области раневых дефектов содержание веществ, обладающих оксидантными и антиоксидантными свойствами, соотношение которых характеризует выраженность оксидативного стресса (ОС) – одного из типовых патологических процессов. В тех же исследуемых биоматериалах был определен уровень MMP-9, соотношенный с содержанием TIMP-1, который специфически ингибирует действие данного фермента.

Сопоставляя динамику сокращения площадей раневых дефектов с изученными биохимическими показателями, можно проследить некоторые закономерности (таблица 2).

Таблица 2 – Площадь дефектов и биохимические показатели в гомогенатах тканей в динамике регенерации термического ожога кожи крыс

Группы животных	Показатели		
	Площадь ожога, мм ²	ИОС, ед.	MMP-9/TIMP-1, ед.
7 суток			
Контрольная 1	215,5±3,74	7,09±0,80	70,3±4,83
Контрольная 2	209,8±2,37	6,84±0,94	65,0±5,28
Опытная	176,0±12,62*	3,93±0,57*	48,2±1,84*
14 суток			
Контрольная 1	126,1±3,50	5,96±0,83	78,9±3,24
Контрольная 2	120,6±2,37	4,72±0,52	72,5±2,20
Опытная	48,5±6,71*#	2,75±0,26*#	35,7±1,05*#
21 сутки			
Контрольная 1	43,3±5,49#	0,92±0,04#	49,0±0,84#
Контрольная 2	38,1±5,01#	0,86±0,07#	46,8±1,96#
Опытная	0 (рубец)* #	0,66±0,05*#	22,5±0,70*#

Примечание: * – различие статистически значимо ($p < 0,05$) между показателями у животных опытной группы и 1 и 2 контрольных групп в тот же срок наблюдения, # – различие статистически значимо ($p < 0,05$) между соответствующими показателями у животных группы по сравнению с предыдущим сроком эксперимента.

По мере заживления ожогов во всех обследованных группах наблюдалось уменьшение выраженности ОС и соотношения MMP-9/TIMP-1, но в разной степени, в зависимости от вида воздействия на зону экспериментального ожога. Так, индекс ОС, как в гомогенатах регенерирующих тканей, так и в крови животных опытной группы, получавших местную обработку ран 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, во все сроки наблюдения был достоверно ниже, чем в обеих контрольных группах, между которыми различия по данному показателю были статистически не значимыми (рисунки 7 и 8).

На 7 сутки наблюдения, в стадию воспаления, значение ИОС в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови крыс опытной группы было ниже соответственно на

44,6% и 15,7%, чем в 1 контрольной группе животных со спонтанным заживлением экспериментальных ожогов.

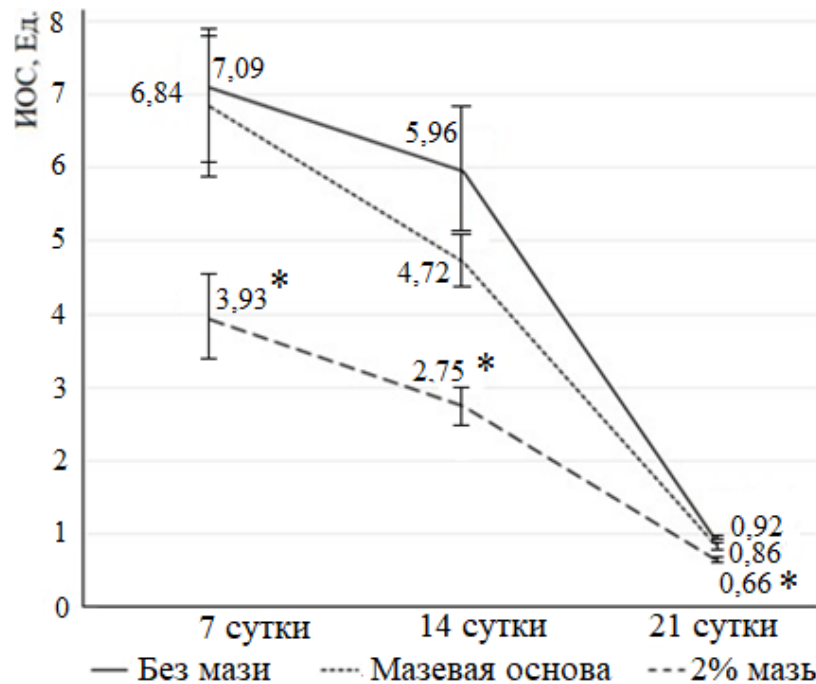


Рисунок 7 – Динамика индекса ОС в гомогенатах регенерирующих тканей при аппликациях экспериментальных термических ожогов крыс 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ.

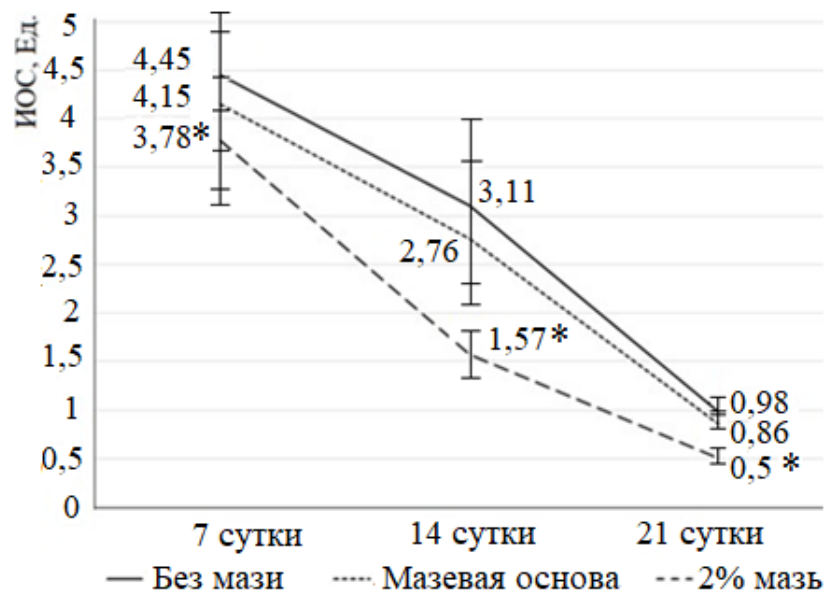


Рисунок 8 – Динамика индекса ОС в сыворотке крови крыс при аппликациях экспериментальных термических ожогов 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ

На 14 сутки эксперимента, в стадию пролиферации, значение ИОС у крыс опытной группы по сравнению с 1 контрольной группой было ниже на 53,8% и 49,5% в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови соответственно. Сравнение значений ИОС в этот срок наблюдения с таковыми на предыдущей неделе выявило достоверное различие только у животных опытной группы, но не контрольных. Так, снижение значения ИОС в опытной группе

крыс на 14 сутки эксперимента по сравнению со значениями на 7 сутки составило 30,0% и 58,5% соответственно в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови.

В стадию эпителизации, на 21 сутки наблюдения, в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови животных опытной группы значение ИОС по сравнению с контрольной группой 1 было ниже на 28,3% и 48,9% соответственно. Сравнение значений ИОС на 21 сутки эксперимента по сравнению с таковыми на предыдущей неделе показало достоверное различие у всех групп животных. Так, снижение значений ИОС в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови в этот срок наблюдения по сравнению со значениями на 14 сутки у опытной группы крыс составило 76,0% и 68,1%, у контрольной группы 2 – 81,8% и 68,8%, у контрольной группы 1 – 84,6% и 68,5% соответственно.

На момент завершения эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови всех крыс количество антиоксидантов превышало количество оксидантов, причем у животных опытной группы примерно в 2 раза. Учитывая данные научной литературы о показателях ОС в тканях и крови [Hazman Ö., Çelik S., 2014; Verma P.K. et al., 2016; Wojnar W. et al., 2020], а также собственные результаты о значении ИОС в крови для интактных крыс, можно говорить о восстановлении баланса веществ, обладающих оксидантными и антиоксидантными свойствами, то есть отсутствии оксидативного стресса. У животных опытной группы, получавших обработку ран мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, по сравнению с контрольными группами устранение дисбаланса веществ с оксидантными и антиоксидантными свойствами происходит интенсивнее на всех этапах восстановительного процесса в коже. Логично предположить, что восстановление баланса оксидантов–антиоксидантов в проведенном эксперименте связано с ослаблением воспалительной реакции и нормализацией кровообращения в тканях, причем у животных опытной группы в большей степени и в более ранние сроки.

Процесс заживления ожоговых ран во всех обследованных группах сопровождался уменьшением не только активности ОС, но и соотношения MMP-9 и TIMP-1. Выраженность данной тенденции проявлялась в разной степени и зависела от вида воздействия на зону экспериментального ожога. Соотношение уровней MMP-9 и TIMP-1 как в гомогенатах регенерирующих тканей, так и в крови крыс, получавших местные аппликации ожоговых ран 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, во все сроки эксперимента было достоверно ниже, чем в обеих контрольных группах, между которыми различия по данному показателю были статистически не значимыми (рисунки 9 и 10).

В стадию воспаления (на 7 сутки наблюдения) значение MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови крыс опытной группы было ниже соответственно на 31,4% и 47,9%, чем в контрольной группе животных со спонтанным заживлением экспериментальных ожогов.

На второй неделе эксперимента, в стадию пролиферации, значение MMP-9/TIMP-1 у крыс опытной группы по сравнению с контрольной группой 1 было ниже на 54,6% и 55,5% соответственно в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови. Обращает на себя внимание, тот факт, что в контрольных группах наблюдалось повышение значений MMP-

9/TIMP-1 в обоих исследованных биоматериалах по сравнению со значениями на предыдущей неделе, хотя и статистически не значимое, тогда как у животных опытной группы за данный период произошло достоверное снижение индекса MMP-9/TIMP-1. Так, снижение значения данного показателя в опытной группе крыс на 14 сутки эксперимента по сравнению с соответствующими значениями на 7 сутки было достоверным и составило 25,9% и 17,8% в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови соответственно.

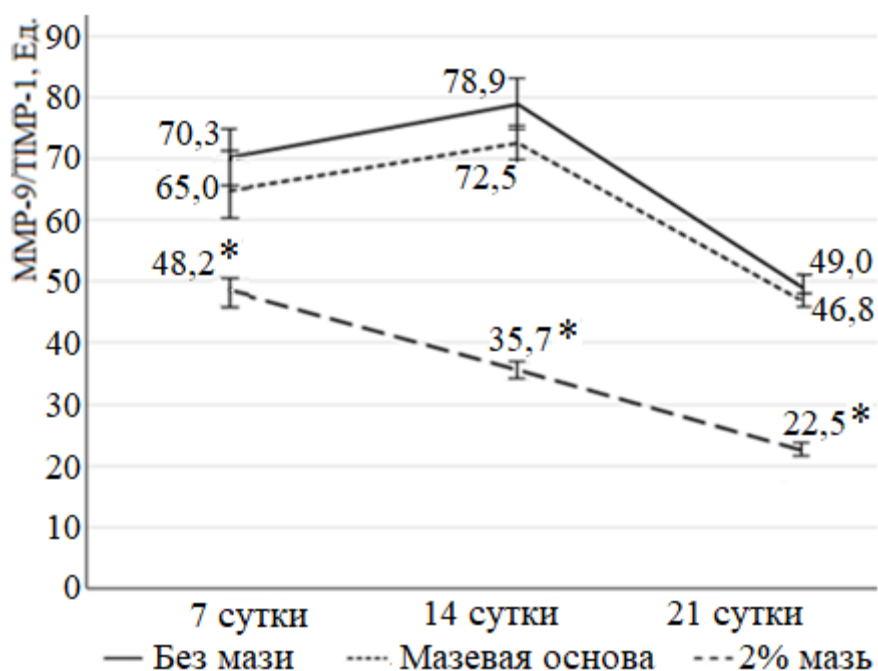


Рисунок 9 – Динамика MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах регенерирующих тканей при аппликациях экспериментальных термических ожогов крыс 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ

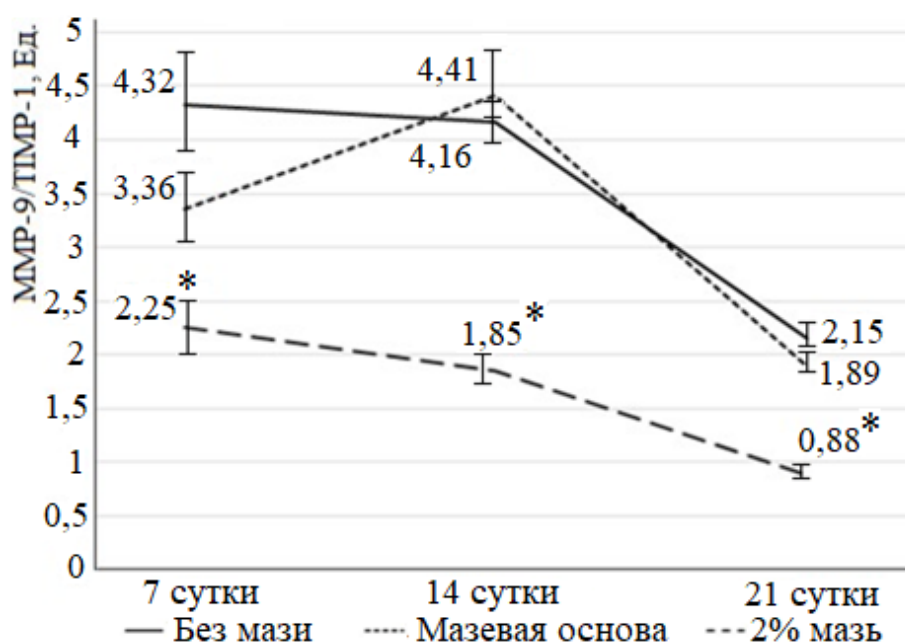


Рисунок 10 – Динамика MMP-9/TIMP-1 в сыворотке крови крыс при аппликациях экспериментальных термических ожогов 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ

На третьей неделе эксперимента, в стадию эпителизации, в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови животных опытной группы значение ММР-9/ТИМР-1 у крыс опытной группы по сравнению с контрольной группой 1 было ниже на 54,1% и 59,1% соответственно. Значения ММР-9/ТИМР-1 как в гомогенатах регенерирующих тканей, так и в крови, в данный срок наблюдения по сравнению с таковыми на предыдущей неделе были достоверно ниже у всех групп животных.

Так, снижение значений ММР-9/ТИМР-1 в гомогенатах регенерирующих тканей и сыворотке крови в этот срок наблюдения по сравнению со значениями на 14 сутки у опытной группы крыс составило 37,0% и 52,4%, у контрольной группы 2 – 35,4% и 57,1%, у контрольной группы 1 – 37,9% и 48,3% соответственно.

При однократной аппликации 2 грамм 2% мази на раны наносилось 40 мг 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6- АГ, что с учетом массы крыс 180-200 г, составляет 200-222 мкг/кг. Учитывая данные научной литературы [Миронов М. А., Блинова Е.В., 2018] о значении показателя острой токсичности (LD50) N-A-6-АГ кислоты и ее производных – 1234-2558 мг/кг, применяемая в данном исследовании однократная доза действующего вещества является нетоксичной. Результаты, полученные с помощью разработанной в данном исследовании методики количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии, показали, что концентрации 2-этил- 6-метил-3-гидроксипиридина и N-A-6-АГ кислоты в плазме крови крыс через 2 часа после однократного нанесения 2 грамм мази составили $18,05 \pm 0,96$ нг/мл и $21,62 \pm 1,12$ нг/мл соответственно в пересчете на 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ. Эти данные, свидетельствуют о незначительной резорбции 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ через поверхность ожогового дефекта и позволяют утверждать, что его прорегенераторная активность и ассоциированные с репарацией обнаруженные изменения биохимических показателей, обусловлены местным действием нового производного N-A-6-АГ кислоты.

Результаты проведенного корреляционного анализа между изученными биохимическими маркерами и площадями ожоговых ран показали, что только у крыс опытной группы в гомогенатах тканей из области ожогов, полученных на 7 и 14 сутки эксперимента, имеется взаимосвязь средней силы между ИОС и ММР-9/ТИМР-1, а также между площадями термических дефектов (S) и ММР-9/ТИМР-1 (рисунок 11).

Статистически значимая корреляция в отношении S и ИОС в гомогенатах тканей во всех группах животных и во все сроки наблюдения не обнаружена.

Учитывая патогенез раневого процесса и причинно-следственные связи между его факторами можно предложить следующую логическую цепочку взаимосвязи изученных в данном исследовании параметров. Термическое воздействие вызывает повреждение эпидермиса, дермы и подкожной клетчатки, формируя раневой дефект, при этом развивается местное воспаление. Стандартным типовым патологическим процессом в фазу воспаления является оксидативный стресс, в отношении которого и протеолитической активности ММР-9 (ММР-9/ТИМР-1) в гомогенатах тканей крыс опытной группы обнаружена корреляции средней силы.



Рисунок 11 – Влияние биохимических показателей в регенерирующих тканях на репарацию термических ожогов кожи у крыс, получавших курс аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ

В свою очередь, в данной группе животных между уровнем MMP-9/TIMP-1 в гомогенатах тканей и площадями раневых дефектов также выявлена корреляция средней силы, свидетельствующая о том, что площадь заживающего ожога зависит, в том числе, от соотношения MMP-9 и TIMP-1, характеризующего активность MMP-9. Подобная ситуация (влияние ОС и протеолитической активности MMP-9) наблюдается и на стадии пролиферации, но исчезает на последней стадии раневого процесса – эпителизации. Предложенная схема влияния ОС на продукцию MMP-9 и, в свою очередь, воздействие последней на процесс заживления ран кожи, представляется логичной, поскольку, именно, на стадии пролиферации раневого процесса преимущественно происходят процессы морфогенеза тканей кожи.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, проведенное исследование подтвердило у нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата (2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ) наличие прорегенераторного потенциала, который реализуется местно при его использовании в виде 2% мази для курса аппликаций на экспериментальные термические ожоги кожи у крыс на стадиях воспаления и пролиферации.

Прорегенераторные свойства исследуемого вещества проявились в достоверном ускорении заживления ожоговых ран кожи. Так, рубцевание раневых дефектов кожи в группе животных, получавших аппликацию мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, произошло в среднем на 3,5 суток раньше, чем у крыс контрольных групп.

Результаты изучения динамики в гомогенатах регенерирующих тканей и крови уровней общей оксидантной и антиоксидантной активности, а также матриксной металлопротеиназы 9 типа и тканевого ингибитора 1 типа, полученные в настоящем исследовании, свидетельствуют о том, что репарация термических ожогов при местном лечении мазью, содержащей 2% нового

производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, протекает на фоне нормализации свободнорадикальных процессов и протеолитической активности MMP-9 в тканях.

Проведенный корреляционный анализ показал у животных, получавших на ожоговые раны аппликации мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, наличие достоверной взаимосвязи между уровнями ИОС и MMP-9/TIMP-1, а также между уровнем MMP-9/TIMP-1 и площадью раневых дефектов в фазы воспаления и пролиферации процесса регенерации.

ВЫВОДЫ

1. Площади ожоговых ран кожи крыс, получавших курс аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, на 7, 14 и 21 сутки эксперимента были достоверно меньше, чем в контрольных группах.

2. Результаты местного применения для обработки термических ожогов кожи крыс 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ продемонстрировали наличие у нее прорегенераторных свойств. Полное заживление ожоговых ран у крыс, получавших курс аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, произошло раньше, чем у животных контрольных групп в среднем на 3,5 суток.

3. Прорегенераторная активность 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ ассоциирована со снижением выраженности оксидативного стресса в гомогенатах регенерирующих тканей, а именно, значения ИОС на всех этапах эксперимента были достоверно ниже в сравнении с животными контрольных групп.

4. Стимулирующий репаративный эффект 2% мази с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ ассоциирован со статистически значимым снижением протеолитической активности MMP-9 и коэффициента MMP-9/TIMP-1 на всех этапах эксперимента в гомогенатах регенерирующих тканей.

5. Концентрации 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина и N-A-6-АГ кислоты в плазме крови крыс через 2 часа после однократного нанесения 2 грамм мази составили $18,05 \pm 0,96$ нг/мл и $21,62 \pm 1,12$ нг/мл соответственно в пересчете на 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ согласно разработанной в данном исследовании методики количественного определения 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии. Незначительная резорбция этого вещества через поверхность ожогового дефекта свидетельствует о том, что прорегенераторная активность нового производного N-A-6-АГ кислоты и ассоциированные с репарацией обнаруженные изменения биохимических показателей обусловлены местным действием вещества на регенерирующие ткани.

6. У животных, получавших на ожоговые раны курс аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ, выявлено наличие достоверной корреляционной связи средней силы между уровнями ИОС и MMP-9/TIMP-1, а также между уровнем MMP-9/TIMP-1 и площадью раневых дефектов в фазы воспаления и пролиферации.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для оценки и прогнозирования эффективности репарации ожоговых ран кожи у крыс целесообразно использовать биохимические показатели – ИОС и ММР-9/TIMP-1.
2. При изучении эффективности репарации ожоговых ран кожи у крыс следует считать оптимальными для успешного протекания процесса значения ИОС и ММР-9/TIMP-1 в гомогенатах тканей – $0,66 \pm 0,05$ и $22,5 \pm 0,70$, а в сыворотке крови – $0,50 \pm 0,08$ и $0,88 \pm 0,08$.
3. Целесообразно провести доклинические исследования местного применения курса аппликаций 2% мазью с 2-Э-6-М-3-ГП N-A-6-АГ на раны кожи животных для решения вопроса о клинических испытаниях с целью терапевтического применения данной мази.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Научные статьи, опубликованные в журналах, рекомендованных ВАК РФ

1. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Петровская М.А., Скачилова С.Я. // Динамика металлопротеиназной активности как показатель прорегенераторных свойств нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при лечении ожогов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2020. – Т. 23, № 10. – С. 46-52.
2. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б., Пахомов М.А. Биохимические аспекты прорегенераторного действия 2-этил-6-метил-3- гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2021. – Т. 17, № 1. – С. 12-16.
3. Попов Н.С., Егорова Е.Н., Петрова М.Б., **Андрианова Е.В.**, Шикунова О.А. Применение ВЭЖХ-масс-спектрометрии для количественного определения 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридиния N-ацетил-6-аминогексаноата в плазме крови крыс // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24, №10. – С. 45-51.

Патент РФ

4. Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В., Блинов Д.С., Пахомов Д.В., Кильмяшкина М.Ф., Шимановский Д.Н., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., **Андрианова Е.В.**, Петровская М.А., Желтухин Н.К., Коротоножкин А.В. Мазь для лечения ожогов 1-3 степени // Изобретения. Полезные модели (официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности (РОСПАТЕНТ)). – 2020. – № 25. Патент на изобретение RU 2731175 С1 зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 31.08.2020 г.

База данных

5. Малыгин А.С., Богомолова О.А., **Андрианова Е.В.**, Демидова М.А. Характеристика масс-спектров новых лекарственных средств из группы производных пропилпентановой и аминогексановой кислот // Программы для ЭВМ.

Базы данных. Топологии интегральных микросхем (официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности (РОСПАТЕНТ)). – 2020. – № 4. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2020620659 от 09.04.2020 г.

Статьи и материалы научных конференций, опубликованные в других изданиях

6. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н. Оксидативный стресс в патогенезе заболеваний // Материалы V Межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука». – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2018. – С. 30-34.

7. Прохоров И.В., Городничев К.И., **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н. Терапевтический потенциал производных ацексамовой кислоты // Материалы 65-й Всероссийской межвузовской студенческой научной конференции с международным участием. – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2019. – С. 797-799.

8. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н. Производные ацексамовой кислоты и их биохимические эффекты // Вестник Тверского государственного университета. Серия: Химия. – 2019. – Т. 35, № 1. – С. 164-169.

9. **Андрианова Е.В.**, Петровская М.А., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., Скачилова С.Я., Павлова Н.В., Харитоновна Е.А. Динамика показателей оксидативного стресса и планиметрическая оценка ожоговых ран при лечении новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 3. – С.1-8; URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=29741>.

10. **Andrianova E.V.**, Petrovskaya M.A., Egorova E.N., Petrova M.B., Skachilova S.Y. Evaluation of dynamics of metalloproteinase activity and indicators of oxidative stress in the treatment of burns with a new derivative of N-acetyl-6-aminohexanoic acid // Science. Education. Practice : Materials of the International University Science Forum (Canada, Toronto, April 22, 2020). – 2020. – С. 137-143.

11. **Андрианова Е.В.**, Горбунова Д.В., Пахомов М.А. Биохимические механизмы действия антиоксидантов // Материалы I межвузовской научно-практической конференции «Химия в медицине: опыт, проблемы, перспективы». – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2020. – С. 9-12.

12. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б. Металлопротеиназная активность тканей крыс при лечении термических ожогов мазью с новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты // Материалы IV Международного научно-исследовательского конкурса «Исследователь года 2020». – Петрозаводск. – С. 268-274.

13. **Андрианова Е.В.** Биохимические механизмы прорегенераторного действия нового производного N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при лечении ожогов у

крыс // Natural resources of the Earth and environmental protection: материалы XXII Международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке: глобальные вопросы и проблемы современности в аспекте модернизации в медицине и образовании». – Vol. 1., № 7, 8, 9. – 2020. – С. 42-46.

14. **Андрианова Е.В.**, Петровская М.А., Петрова М.Б., Егорова Е.Н., Горбунова Д.В. Планиметрическая оценка и динамика показателей оксидативного стресса при лечении термического ожога у крыс новым производным ацетиламиногексановой кислоты // Материалы VII Всероссийской межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука». – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2020. – С. 39-42.

15. **Андрианова Е.В.**, Горбунова Д.В., Петровская М.А. Протеолитическая активность тканей из области термических ожогов при их лечении мазью с новым производным ацексамовой кислоты у крыс // Материалы VIII межвузовской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием «Молодежь и медицинская наука». – Тверь : РИЦ ТГМУ, 2020. – С. 8.

16. **Андрианова Е.В.**, Егорова Е.Н., Петрова М.Б. Корреляция металлопротеиназной активности и выраженности оксидативного стресса в процессе регенерации термических ожогов кожи крыс при лечении новым производным N-ацетил-6-аминогексановой кислоты // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием «Регенеративная биология и медицина» г. Москва. – 2021. – С. 33-34.

Объект интеллектуальной собственности (свидетельство ноу-хау)

Петрова М.Б., **Егорова Е.Н.**, Андрианова Е.В., Петровская М.А. Способ подготовки операционного поля для создания экспериментальной модели термического ожога кожи. – Тверь, Тверской ГМУ, Свидетельство ноу-хау № 01-147-2020 от 26.02.2020.