

ПРОТИВОРЕВМАТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО АМИДА 3-ИМИДАЗОЛ-ЗАМЕЩЕННОЙ-4,5-ДИГИДРОИЗОКСАЗОЛКАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ — ИНГИБИТОРА ПРОТЕИНАЗА-АКТИВИРОВАННОГО РЕЦЕПТОРА II ТИПА

В. Н. Федоров^{1,2}, М. К. Корсаков¹, А. А. Шетнев^{1,2}, О. В. Гречищева^{1,2}, В. П. Вдовиченко³, Н. Н. Вольхин^{1,2}✉, Н. А. Смирнов², А. А. Хохлова⁴, А. В. Аршинов³

¹ Ярославский государственный педагогический университет им. К. Д. Ушинского, Ярославль, Россия

² Ярославский государственный медицинский университет, Ярославль, Россия

³ Гродненский государственный медицинский университет, Гродно, Беларусь

⁴ Российский университет медицины, Москва, Россия

Лечение ревматоидного артрита является сложным и длительным процессом, не всегда приводящим к значимым результатам как в следствие недостаточной эффективности препаратов, так и их лекарственной токсичности для человека. Это диктует поиск новых фармакологических мишеней воздействия на патологический процесс, одной из которых является блокада активности протеиназа-активированных рецепторов 2 типа (proteinase-activated receptors, II) — PAR2-рецепторов. В течение 2016–2019 гг. был осуществлен синтез низкомолекулярных антагонистов PAR2-рецепторов, относящихся к производным 4,5-дигидроизооксазол-5-карбоксамида, а в 2023 г. была доказана их противовоспалительная эффективность на модели формалинового отека. Наиболее эффективное соединение с лабораторным шифром R004 было испытано на модели аутоиммунного воспаления у крыс, вызванного пристаном. Применение соединения R004 в терапии хронического воспаления у крыс препятствовало значимому развитию отека стоп и поражению мелких суставов, предупреждало специфические изменения формулы белой крови, а по данным биохимического исследования крови приводило к нормализации функций печени и почек и энергетического обмена организма. Соединение R004 оказалось более эффективно и безопасно, чем препараты сравнения диклофенак натрия и дексаметазон.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, PAR2-рецепторы, пристан, аутоиммунное воспаление, производное 4,5-дигидроизооксазол-5-карбоксамида

Соблюдение этических стандартов: исследование выполнено с соблюдением всех этических стандартов, рекомендованных в Российской Федерации. В качестве тест-системы были выбраны крысы, как минимально удовлетворяющие по своим характеристикам животные для возможности проведения эксперимента: достаточный размер лап для удобства измерений и возможность забора необходимого для исследования объема крови. Животные содержались в клетках достаточной площади и с своевременной сменой подстилки (2 раза в неделю). Животным обеспечен свободный доступ к воде и пище, 12-часовой цикл смены освещения, оптимальные температура и влажность, наблюдение лицензированного ветеринара. Хотя протокол исследования не позволял применения обезболивающих препаратов, способных исказить результаты экспериментов, все процедуры проводились квалифицированным и опытным персоналом, что обеспечило минимизацию стресса и болезненных ощущений. Настоящему исследованию на животных предшествовали исследования препарата *in vitro*. Проведена оценка мощности используемых статистических тестов, что позволило сформировать оптимальные по размеру выборки. Исследование на животных одобрено независимым этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Ярославский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, протокол от 14.09.2023 № 6.

Финансирование: данное исследование было поддержано Министерством здравоохранения Российской Федерации (государственное задание 1022051600008-9-3.1.5;3.2.22) «Разработка лекарственного препарата для лечения ревматоидного артрита и других воспалительных заболеваний».

Вклад авторов: В. Н. Федоров — разработка идеи, анализ и компоновка собранного материала; М. К. Корсаков — написание текста; А. А. Шетнев — общая идея и планирование статьи, синтез исследуемого соединения; О. В. Гречищева — проведение эксперимента; В. П. Вдовиченко — сбор и первичный анализ материала, работа с литературой; Н. Н. Вольхин — проведение эксперимента; Н. А. Смирнов — первичный анализ собранного материала; А. А. Хохлова — сбор первичного материала, оформление списка литературы; А. В. Аршинов — редактирование текста.

Благодарности: работа выполнена в содружестве с научным отделом Института фармации Ярославского государственного медицинского университета, Ярославль.

✉ **Для корреспонденции:** Никита Николаевич Вольхин
ул. Технопарковая, д. 11/2, г. Ярославль, 150030, Россия; nvolkhin@ysmu.ru

Статья поступила: 29.10.2024 **Статья принята к печати:** 15.11.2024

Опубликована онлайн: 13.12.2024

DOI: 10.24075/medet.2024.022

ANTIRHEUMATIC ACTIVITY OF 3-IMIDAZOLE-SUBSTITUTED-4,5-DIARYLOISOXAZOL-3-CARBOXYLIC ACID AMIDE DERIVATIVE, A PROTEINASE INHIBITOR-ACTIVATED TYPE II RECEPTOR

Fedorov VN^{1,2}, Korsakov MK¹, Shetnev AA^{1,2}, Grechischeva OV^{1,2}, Vdovichenko VP³, Volkhin NN^{1,2}✉, Smirnov NA², Khokhlova AA⁴, Arshinov AV³

¹ Yaroslavl State Pedagogical University named after KD Ushinsky, Yaroslavl, Russia

² Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl, Russia

³ Grodno State Medical University, Grodno, Belarus

⁴ Russian University of Medicine, Moscow, Russia

Treatment of rheumatoid arthritis is a complex and time-consuming process that does not always lead to significant results both due to poor effectiveness of drugs and drug toxicity. It means we need to search for new pharmacological targets to influence the pathological process, one of which is inhibition of proteinase-activated receptors 2 (PAR2 receptors) activity. In 2016–2019, synthesis of low-molecular-weight antagonists of PAR2 receptors belonging to 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide derivatives was carried out, and in 2023 their anti-inflammatory efficacy was examined using the formaldehyde edema model. The most effective laboratory R004 compound was tested on a model of autoimmune pristane-induced inflammation in rats. During treatment of chronic inflammation in rats, R004 inhibited significant development of edema of feet, damage to small joints, and specific changes in the formula of white blood, and according to biochemical blood test led to normalization of liver and kidney functions and energy metabolism. R004 turned out to be more effective and safer than the comparator drugs such as diclofenac sodium and dexamethasone.

Keywords: rheumatoid arthritis, PAR2-receptors, pristane, autoimmune inflammation, 4,5-dihydroisoxazole-5-carboxamide amide derivative

Compliance with ethical standards: the study was carried out in compliance with all ethical standards recommended in the Russian Federation. Rats were selected as a test system, as animals with a minimum set of characteristics that make it possible to conduct an experiment: a sufficient size of paws for convenient measurements and possibility of taking the volume of blood necessary for the study. The animals were kept in cages of sufficient area and with timely bedding change (2 times a week). Animals are provided with free access to water and food, a 12-hour lighting cycle, optimal temperature and humidity, and supervision by a licensed veterinarian. Although the research protocol did not allow to use painkillers that could distort the results of experiments, all procedures were carried out by qualified and experienced personnel, which ensured minimization of stress and pain. The animal study was preceded by *in vitro* studies of the drug. The power of the statistical tests used was evaluated, which made it possible to form samples of an optimal size. The animal study was approved by the Independent Ethical Committee of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Yaroslavl State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Protocol No. 6 dated 09/14/2023.

Funding: this study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (state assignment 1022051600008-9-3.1.5;3.2.22) "Development of a drug for the treatment of rheumatoid arthritis and other inflammatory diseases".

Author contribution: Fedorov VN — idea development, analysis and layout of the collected material; Korsakov MK — writing the text; Shetnev AA — a general idea and planning of the article, synthesis of the compound under study; Grechishcheva OV — conducting an experiment; Vdovichenko VP — collection and primary analysis of material, working with literature; Volkhin NN — conducting an experiment; Smirnov NA — primary analysis of the collected material; Khokhlova AA — collection of primary material, design of the list of references; Arshinov AV — text editing.

Acknowledgement: the work was carried out in collaboration with the Scientific Department of the Institute of Pharmacy of Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl.

✉ **Correspondence should be addressed:** Nikita N Volkhin
Technopark str., 11/2, Yaroslavl, 150030, Russia; nnvolkhin@ysmu.ru

Received: 29.10.2024 **Accepted:** 15.11.2024 **Published online:** 13.12.2024

DOI: 10.24075/medet.2024.022

Ревматоидный артрит (РА) — неизлечимое на сегодняшний день иммуновоспалительное заболевание с многофакторной этиологией, от которого страдает до 1,0% населения Земли [1], его распространенность увеличивается с возрастом. По данным официальной статистики, в 2017 г. в России зарегистрировано более 300 тысяч пациентов с РА [2]. Его прогрессирование приводит к деформации суставов, разрушению хрящевой и костной ткани и последующей инвалидизации.

В настоящее время в лечении РА доминирует стратегия «лечение до достижения цели» («*treat to target*», T2T) [2, 3]. Она не рекомендует какие-то конкретные препараты, а дает лишь общие рекомендации по проведению лечения. Основная цель фармакотерапии РА — достижение ремиссии заболевания [2]. Для этого используются несколько классов лекарственных средств: базисные противовоспалительные препараты (БПВП), представляющие собой обширную группу синтетических и биологических препаратов, которые объединяет их способность влиять на патогенетические механизмы РА; глюкокортикоиды, которые рекомендуется применять в комбинации с БПВП, а для снятия острых и хронических болей используются нестероидные противовоспалительные препараты [4].

Лечение ревматоидного артрита является длительным процессом, а лекарственные средства, используемые для его лечения, далеко небезопасны и не всегда обладают значимой эффективностью. В среднем 20–50% пациентов вынуждены прекращать терапию вследствие отсутствия эффективности либо непереносимости назначенных медикаментов [5]. Поэтому существует острая необходимость в разработке новых фармакологических мишеней, при воздействии на которые повышалась бы эффективность и снижалась токсичность применяемых лекарств.

Одной из перспективных терапевтических мишеней являются протеиназа-активированные рецепторы

(proteinase-activated receptors, PARs). Они относятся к классу связанных с G-белком рецепторов. Определяющей особенностью этих рецепторов является их необратимая активация протеазами. Обнаруженные в 1990-х гг. четыре формы PARs (PAR1, PAR2, PAR3 и PAR4) экспрессируются на мембране клеток практически всех органов и систем и регулируют многочисленные физиологические функции, в том числе сокращение гладкомышечных клеток, чувствительность к боли, высвобождение липидных медиаторов, цитокинов, нейропептидов. Активация PAR2 связана с клиническими проявлениями в виде воспаления, отека, боли. Они экспрессируются в иммунных клетках как врожденной, так и адаптивной иммунной системы и играют немаловажную роль в развитии широкого круга заболеваний [6]. Их активация способствует возникновению воспаления, фиброза и разрастанию соединительной ткани. Эксперименты продемонстрировали, что ингибирование активности PAR2 препятствует развитию патогенеза РА и положительно модифицирует течение заболевания [6]. Поиск лекарственных средств, ингибирующих PAR2, идет по следующим направлениям: косвенная блокада активности PAR2; создание моноклональных антител; поиск ингибиторов PAR2 среди пептидных соединений; синтез низкомолекулярных веществ-ингибиторов. Последнее направление считается наиболее перспективным [7].

В течение 2016–2019 гг. был осуществлен синтез низкомолекулярных антагонистов PAR-2, относящихся к производным 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксамидов. Работа проводилась на основании предварительного математического прогнозирования фармакологически значимых свойств большого ряда многоядерных производных имидазола, изоксазола и оксазола с широким структурным разнообразием. Антагонистическая активность соединений по отношению к PAR-2 оценивалась *in vitro* на клеточной линии CHO с высокой экспрессией человеческого PAR-2 [8]. Пять наиболее активных антагонистов PAR-2 — производных

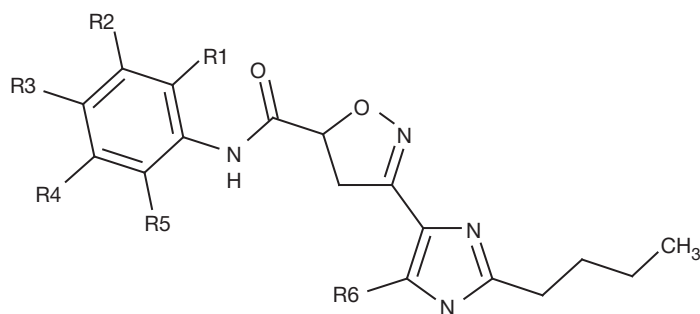


Рис. Общая формула синтезированных производных 4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксиамида

4,5-дигидроизоксазол-5-карбоксиамида, структура которых представлена на рисунке, в различных дозировках были исследованы *in vivo* на модели формалинового отека. Это позволило выбрать наиболее активное соединение для его тестирования на модели хронического аутоиммунного воспаления [9].

Цель исследования: определить потенциальную терапевтическую эффективность перспективного соединения из ряда производных амидов 3-имидазол-замещенной-4,5-дигидроизоксазолкарбоновой кислоты на модели аутоиммунного воспаления у крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Хронический воспалительный процесс воспроизводился при помощи однократного подкожного введения пристана в основание хвоста крысы в объеме 0,1 мл [10], после чего у белых крыс развиваются патологические изменения, характерные для ранних стадий развития РА: имеет место хроническое рецидивирующее течение процесса, характерные гистологические признаки поражения суставов, а также развитие специфических серологических иммунных аномалий [10].

В эксперименте было использовано 50 белых беспородных крыс массой тела 180–220 г, содержащихся при температуре 22 ± 2 °С, влажности $55 \pm 5\%$, в 12/12 часовом световом цикле, с неограниченным доступом к пище и воде. Все животные были подразделены на 5 групп по 10 крыс в каждой: первая группа — интактные животные; вторая группа — контрольная (крысам вводили пристан и физиологический раствор); крысам третьей группы вводили пристан + диклофенак натрия в дозе 5 мг/кг [11]; крысам четвертой группы вводили пристан + дексаметазон 1 мг/кг [10]; животным пятой группы вводили пристан + соединение R004 10 мг/кг. Продолжительность эксперимента была 28 суток; препараты вводились ежедневно: дексаметазон подкожно, физ. раствор, диклофенак натрия и R004 внутривенно. Динамическое обследование животных проводилось 5 раз: исходно и на 7, 14, 21 и 28 суток эксперимента. Изучались следующие параметры: объем пораженной стопы при помощи цифрового безводного плетизмометра PH1901 (Россия), ширина межсуставных щелей при помощи цифрового рентгена нижних конечностей (только на 28 сутки) [12], ректальная температура, общий анализ крови, биохимические показатели (общий белок, альбумины, глобулины, глюкоза, триглицериды, общий холестерин, АлАТ, АсАТ, общий билирубин, ГГТ, щелочная фосфатаза, креатинин, мочевины) крови.

Результаты подвергались статистической обработке при помощи программы Biostat. Количество определений каждого показателя в различных опытах составляло 6–10.

Для межгрупповых сравнений использовался критерий *t* Стьюдента (при наличии нормального распределения) и непараметрический критерий Уилкоксона (при его отсутствии), для множественных сравнений использовался критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. Достоверность внутригрупповых различий определялась по парному критерию *t* Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$ [13].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из исследуемых показателей наиболее специфично отражают процесс воспаления у крыс динамика ректальной температуры и объема лапы животных, а также ширина межсуставной щели их стоп.

В интактной группе на протяжении всего эксперимента имели место недостоверное изменение объема стоп (табл. 1). При введении белым крысам пристана на 14 сутки имело место достоверное повышение объема правой стопы от исходного уровня на 5,5% и среднее значение обеих стоп на 3,8%. На 21 сутки эксперимента достоверно повышался по отношению к исходному уровню объем обеих стоп: правой — на 7,6%, левой — на 3,1%; на 28 сутки объем правой стопы и обеих стоп оставались достоверно повышенными на 5,2% и на 2,7% соответственно. По отношению к здоровым животным у крыс на 14–28 дни пристанового воспаления объем стоп был достоверно увеличен на 6,5–11,2%.

При лечении крыс диклофенаком натрия достоверное повышение объема стоп (правой и среднее значение) по отношению к исходному уровню имело место только на 21 день опыта на 5,6% и 4,7%. На 28 сутки объем стоп крыс по отношению к исходному состоянию нормализовался, однако правая стопа стала достоверно объемней (+12%), чем у интактных животных. При лечении крыс дексаметазоном у них наблюдалось не повышение объема стоп, а, наоборот, начиная с 7 дня эксперимента и его до конца имело место достоверное снижение объема стоп по отношению к исходному уровню на 9,4–13,4% и по отношению к контрольной группе на 9,3–16,6%. При введении животным R004 достоверного нарастания объема стопы не наблюдалось и, более того, объем лап леченных крыс был достоверно ниже на 7,5–18,7%, чем в контроле и, одновременно, не отличался от таковых в интактной группе (табл. 2).

Эксперимент показал, что при введении животным пристана у них развивается хроническое воспаление, которое сопровождается отеком лап. Диклофенак натрия уменьшал (но полностью не предупреждал) выраженность воспалительного процесса; его лечебный эффект был более выражен в первые три недели развивающегося процесса, а затем несколько снизился (на фоне его введения имело

Таблица 1. Динамика объема лап у крыс с пристановым воспалением

Сроки	Лапы	Интактные	Контроль	Диклофенак натрия	Дексаметазон	R004
Исходное	Правая	193,6±9,9	194,3±8,3	203,2±13,0	196,7±7,9	188,0±8,1
	Левая	196,5±9,7	198,6±9,9	201,7±9,2	201,0±5,9	194,8±7,9
	Среднее значение	195,1±5,9	197,4±6,7	202,4±7,7	198,8±4,9	191,4±5,8
7 сутки	Правая	194,1±8,7	202,0±7,2	196,4±11,9	174,3±5,9*/***	185,0±9,1
	Левая	196,0±8,0	203,1±5,8	207,0±11,5	186,7±5,4***	189,8±6,1
	Среднее значение	195,0±5,1	202,7±4,6	201,7±9,1	180,5±4,8*/**/*	187,4±5,2***
14 сутки	Правая	184,3±7,0	205,0±4,1*/**	202,8±13,7	170,2±5,2*/***	168,0±6,0***
	Левая	193,3±7,3	204,8±7,5	205,0±14,0	180,2±5,6*/***	178,2±7,7***
	Среднее значение	188,8±4,8	204,9±5,1*/**	203,9±8,1	175,1±4,5*/**/*	173,6±6,0***
21 сутки	Правая	191,3±5,0	209,0±4,6*/**	214,5±9,1*	177,4±5,0*/***	170,0±7,0***
	Левая	195,1±6,6	207,8±5,5*	209,3±11,0	189,4±4,4*/***	182,8±7,7***
	Среднее значение	193,2±4,3	208,5±4,4*/**	211,9±8,0**	183,4±4,2*/***	176,4±6,0***
28 сутки	Правая	186,3±5,5	204,4±4,5*/**	208,6±8,8**	184,5±6,2*/***	175,0±6,0***
	Левая	190,3±5,3	200,6±6,5	203,8±8,8	194,1±5,4	185,2±7,0
	Среднее значение	188,3±4,7	202,7±4,8*/**	206,2±7,2	189,5±4,6***	180,1±5,6***

*) достоверная разница с исходным фоном (в динамике)

**) достоверная разница с интактными

***) достоверная разница с контролем

Таблица 2. Ширина межсуставных щелей стоп у крыс с пристановым воспалением

Группа	Предплюсне-плюсневый	Плюсне-фаланговый	Межфаланговый
Интактные	0,266±0,008	0,283±0,011	0,228±0,018
Контроль	0,236±0,004*	0,251±0,007*	0,204±0,008
R004	0,240±0,004*/***	0,256±0,011	0,226±0,007**/*
Диклофенак	0,213±0,010*/**	0,247±0,006*	0,198±0,014
Дексаметазон	0,223±0,010*	0,230±0,014*	0,202±0,009

*) достоверная разница с интактными

**) достоверная разница с контролем

***) достоверная разница с диклофенаком

****) достоверная разница с дексаметазоном

место достоверное повышение объема правой лапы крысы на 21 день и достоверное повышение ее объема по отношению к интактным животным на 28 день). Дексаметазон полностью блокировал процесс развития воспалительной отека стопы, но, одновременно, достоверно снижал объем лап крыс как по сравнению с исходным состоянием, так и по отношению к интактному контролю на 4 и 14 дни эксперимента. Это может являться свидетельством развития дексаметазоновой миопатии вследствие нарушения синтеза мышечных белков. Лечение крыс R004 было оптимально: у животных не наблюдалось достоверного нарастания отека стоп как при сравнении с исходным состоянием, так и по отношению к здоровым крысам.

Моделирование аутоиммунного воспаления пристаном вызывало поражение ткани суставов белых крыс, одним из проявлений которого было рентгенологическое изменение ширины суставной щели (табл. 2) — она достоверно уменьшалась на 11,1% в предплюсне-плюсневом и на 11,3% плюсне-фаланговом суставах; в межфаланговом суставе ее сужение наблюдалась в виде тенденции (-11,5%). Диклофенак натрия в данном случае не обладал терапевтической активностью: ширина суставной щели плюсне-фаланговом и плюсне-фаланговом суставах изменялась практически в той же степени, как в контроле (-12,7% и -13,2%), а в предплюсне-плюсневом суставе даже наблюдалось ухудшение: ширина межсуставной щели была достоверно меньше не только по отношению к интактным

животным (-20%), но и по отношению к контролю (-9,7%). Дексаметазон также не обладал терапевтической активностью: ширина суставной щели достоверно уменьшалась на 16,4% в предплюсне-плюсневом и на 18,7% плюсне-фаланговом суставах, а в межфаланговом суставе сужение суставной щели наблюдалась в виде тенденции (-11,4%). Введение R004 снижало степень сужения суставной щели: достоверно на 9,8% по отношению к здоровым животным это происходило только в предплюсне-плюсневом суставе. В то же время изменения ширины суставной щели в плюсне-фаланговом суставе не достигли уровня достоверности (-9,5%), а в межфаланговом суставе они отсутствовали. Здесь она была достоверно шире на 10,8% по отношению к контролю и на 11,9% по отношению к группе дексаметазона.

Таким образом, опыт показал, что при развитии пристанового воспаления происходит поражение суставных поверхностей. Применение диклофенака натрия и дексаметазона оказалось безрезультатно; R004 частично препятствовал поражающему действию пристана на суставную ткань.

Измерение ректальной температуры у белых крыс оказалось малоинформативным показателем: ее динамика во всех исследуемых группах фактически не отличалась от таковой у интактных животных.

Анализ крови у животных проводился в динамике — исходно до начала введения пристана и на 28 сутки

Таблица 3. Динамика показателей белой крови ($\times 10^9/\text{л}$) на фоне пристанового воспаления

Показатели	Сроки	Интактные	Контроль	Диклофенак натрия	Дексаметазон	R004
Лейкоциты	исходное	7,40±0,71	8,08±0,77	7,41±1,52	8,51±0,91	8,29±1,01
	28 суток	9,32±1,12	9,20±1,67	9,80±1,82	7,88±1,92	9,01±1,12
Базофилы	исходное	0,008±0,001	0,015±0,007	0,018±0,006	0,017±0,008	0,024±0,010
	28 суток	0,032±0,014	0,022±0,008	0*/**/**	0*/**/**	0,006±0,006
Эозинофилы	исходное	0,098±0,016	0,137±0,046	0,114±0,036	0,067±0,031	0,144±0,048
	28 суток	0,148±0,016*	0,152±0,031	0,178±0,038	0*/**/**	0,188±0,042
Нейтрофилы	исходное	1,62±0,45	1,95±0,45	1,63±0,25	1,76±0,21	2,34±0,55
	28 суток	2,12±0,43	4,80±1,02**	6,48±1,75**	7,05±1,57**	3,96±0,81
Лимфоциты	исходное	5,32±0,85	5,48±0,89	5,30±1,49	6,05±1,19	5,30±0,56
	28 суток	6,22±0,88	3,55±0,36**	2,88±0,56**	0,33±0,02 */**/**	3,97±0,69**
Моноциты	исходное	0,368±0,105	0,493±0,135	0,348±0,088	0,620±0,105	0,486±0,125
	28 суток	0,663±0,110*	0,610±0,216	0,260±0,84**/**	0,500±0,146	0,590±0,136

*) достоверная разница с исходным состоянием

**) достоверная разница с интактными

***) достоверная разница с контролем

Таблица 4. Влияние пристанового воспаления на биохимические показатели крови

Показатели	Интактные	Контроль	Диклофенак натрия	Дексаметазон	R004
Общий белок г/л	70,63±1,05	70,50±0,45	57,90±2,64*	66,67±2,16	70,20±0,71
Альбумины г/л	36,25±0,31	34,00±0,90	30,20±0,31*	31,33±2,31	35,40±0,90
Глобулины г/л	34,38±0,81	36,50±0,55	27,00±0,81*	35,34±2,01	34,80±0,78
Альбумины/глобулины	1,08±0,04	0,93±0,04*	1,19±0,06**	0,87±0,07*	1,02±0,04
Глюкоза ммоль/л	9,10±0,09	8,22±0,15*	8,81±0,13**	9,73±0,61**	9,05±0,30**
Триглицериды	0,44±0,05	0,57±0,07	0,68±0,17	2,30±0,25**	0,51±0,06
Глюкоза/триглицериды	20,70±1,41	14,42±1,12*	12,96±1,56*	4,23±1,02**	17,75±1,18**
Общий холестерин	2,86±0,09	2,19±0,08*	2,57±0,12**	2,50±0,29	2,39±0,26
АлАТ	43,25±5,30	43,08±3,32	64,30±10,30	80,50±15,30**	47,75±2,80
АсАт	93,25±5,07	126,58±8,03*	117,50±11,07	150,17±18,96*	105,12±1,64**
Билирубин общий	1,93±0,07	1,88±0,06	2,07±0,09	1,95±0,04	2,14±0,09
ГГТ	4,00±0,00	4,00±0,00	4,00±0,00	7,33±1,20*	4,00±0,00
Креатинин	30,75±0,30	34,83±0,80*	33,80±1,00*	26,00±2,30**	33,75±0,60*
Мочевина	3,43±0,18	3,46±0,11	4,30±0,16*	4,45±0,18*	3,81±0,08
Щелочная фосфатаза	74,75±17,65	73,17±8,62	103,40±16,60	225,00±76,85	97,40±3,67

*) достоверная разница с интактными

**) достоверная разница с контролем

эксперимента. В интактном контроле за время эксперимента наблюдалось повышение всех показателей белой крови, но достоверно только эозинофилов на 51% и моноцитов на 80%. После введения пристана для большинства исследуемых показателей качественная картина не изменилась, лишь два показателя достоверно отличались от таковых в интактном контроле: происходило более резкое в 2,5 раза от исходного ($p < 0,05$) повышение уровня нейтрофилов, а содержание лимфоцитов снизилось на 35% (табл. 3).

На фоне применения диклофенака натрия происходило еще большее повышение содержания нейтрофилов в крови (в 4 раза по отношению к исходному, $p < 0,05$) и почти в 2 раза снизился здесь уровень лимфоцитов ($p < 0,05$). Дополнительно к этому в крови перестали определяться базофилы. При использовании дексаметазона имела место тенденция к снижению содержания лейкоцитов (в остальных группах их содержание повышалось), в 4 раза увеличивалось содержание нейтрофилов, но в 20

раз падал уровень лимфоцитов. В крови перестали определяться базофилы и эозинофилы. Введение R004 нивелировало изменения крови, спровоцированные пристаном: ни один из изучаемых показателей не обладал достоверной динамикой. Качественные отличия животных данной группы от интактных крыс заключались в тенденции к снижению у них содержания в крови базофилов и лимфоцитов, а достоверные количественные различия касались только лимфоцитов: их уровень в группе R004 по отношению к интактным животным был ниже на 36,2% при практически равном исходном уровне (табл. 3).

Таким образом, достоверное повышение в контрольной группе крыс содержания в крови нейтрофилов и снижение здесь содержания лимфоцитов свидетельствуют о заинтересованности иммунной системы. Лечебное применение R004 до некоторой степени нивелирует данные процессы, чего нельзя сказать о препаратах-эталонах. На фоне использования диклофенака натрия данные изменения усугублялись (к падению уровня лимфоцитов

добавлялись моноциты и базофилы), а дексаметазон сам по себе обладал значимой иммунодепрессивной и лимфотоксической активностью, способствуя еще большему изменению исследуемых параметров.

Анализируя полученные данные в отношении красной крови, можно отметить, что введение пристана практически не оказало отрицательного влияния на ее показатели.

Обмен белков, жиров и углеводов. Введение пристана привело к изменению баланса белкового обмена — несмотря на то, что изменение содержания в крови альбуминов и глобулинов носит характер тенденции, достоверное снижение альбумин/глобулинового индекса (АГИ) на 13,9% свидетельствует о сдвиге синтеза белка в сторону глобулинов, к которым структурно относятся и антитела, играющие важную роль в аутоиммунном воспалении. Также имело место достоверное снижение в крови концентрации глюкозы на 9,7% и холестерина на 23,6% (снижение скорости синтеза стероидных гормонов и репарации клеточных мембран). На фоне снижения концентрации глюкозы и тенденции к повышению содержания ТГ достоверно на 30% уменьшился углеводно-жировой индекс (УЖК — соотношение уровней глюкозы и триглицеридов), что свидетельствует о переключении организма на «жировую» энергетику, более расходную в плане кислорода и энергетических субстратов (табл. 4).

Применение диклофенака натрия вызывало равномерное снижение синтеза как альбуминов, как и глобулинов, что может быть связано с нарушением функций печени. Также имело место дальнейшее снижение УЖК на 37,4% по сравнению с интактными животными, что свидетельствует об усилении липидной составляющей энергетического баланса организма. На фоне использования дексаметазона усиливался диссонанс в пользу синтеза глобулинов (достоверное по отношению к здоровым животным снижение АГИ на 19,5%) и резко почти в 5 раз снижался УЖК, что свидетельствует о переходе организма преимущественно на «липидную» энергетику (действие высоких доз глюкокортикоидов). Терапевтическое введение R004 купирует изменения в обмене белков, жиров и углеводов, возникающие на фоне пристанового воспаления.

Литература

1. GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*. 2023; 5 (10): e594–e610. DOI: 10.1016/S2665-9913(23)00211-4. PMID: 37795020; PMCID: PMC10546867.
2. Клинические рекомендации. Ревматоидный артрит. 2021–2022–2023 (24.08.2021). Утверждены Минздравом РФ.
3. Tanaka Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med*. 2016; 31(2): 210–218. DOI: 10.3904/kjim.2015.137. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26932398; PMCID: PMC4773729.
4. Насонов Е. Л. Лечение ревматоидного артрита. Клиническая фармакология и фармакотерапия. 2017; 26 (1): 4–10.
5. Prasad P, Verma S, Surbhi, Ganguly NK, Chaturvedi V, Mittal SA. Rheumatoid arthritis: advances in treatment strategies. *Mol Cell Biochem*. 2023; 478 (1): 69–88. DOI: 10.1007/s11010-022-04492-3. PMID: 35725992.
6. McCulloch K, McGrath S, Huesa C, Dunning L, Litherland G, Crilly A, et al. Rheumatic Disease: Protease-Activated Receptor-2 in Synovial Joint Pathobiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 257. DOI: 10.3389/fendo.2018.00257. PMID: 29875735; PMCID: PMC5974038.
7. Cho NC, Seo SH, Kim D, Shin JS, Ju J, Seong J, et al. Pharmacophore-based virtual screening, biological evaluation and binding mode analysis of a novel protease-activated receptor 2 antagonist. *J Comput Aided Mol Des*. 2016; 30 (8): 625–37. DOI: 10.1007/s10822-016-9937-9. PMID: 27600555.
8. Abassi YA, Xi B, Zhang W, Ye P, Kirstein SL, Gaylord MR, et al. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol*. 2009; 16 (7): 712–23. DOI: 10.1016/j.chembiol.2009.05.011. PMID: 19635408; PMCID: PMC2836189.
9. Korsakov MK, Fedorov VN, Smirnov NA, Shetnev AA, Leonova OV, Volkhin NN, et al. Screening of anti-inflammatory activity of 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide (PAR-2 inhibitors) based on formaldehyde oedema model among white lab rats. *Research Results in Pharmacology*. 2023; 9 (4): 105–111. DOI: 10.18413/rpharmacology.9.10061.
10. Tuncel J, Haag S, Hoffmann MH, Yau AC, Hultqvist M, Olofsson P, et al. Animal Models of Rheumatoid Arthritis (I): Pristane-Induced Arthritis in the Rat. *PLoS One*. 2016 May 26; 11 (5): e0155936. DOI: 10.1371/journal.pone.0155936. PMID: 27227821; PMCID: PMC4881957.
11. Бибик Е. Ю., Ярошевская О. Г., Девдера А. В., Деменко А. В., Захаров В. В., Фролов К. А. и др. Поиск

Функциональная биохимия печени и почек. При введении пристана имело место достоверное повышение в крови активности АсАТ на 35,7% и содержания креатинина на 14% (табл. 4). Это свидетельствует о возможной заинтересованности печени и почек в развивающемся воспалительном процессе. На фоне введения R004 наблюдалось лишь достоверное повышение содержания креатинина в крови (+9,8%), но в меньшей степени, чем в контроле. При использовании диклофенака натрия у больных животных достоверно повышались лишь содержание в крови креатинина (+9,9%) и мочевины (+25,4%), что свидетельствует о возможном поражении почек. Тенденция к повышению активности в крови обеих трансаминаз и щелочной фосфатазы, а также к увеличению концентрации билирубина говорит о напряжении функций печени. На фоне применения дексаметазона наблюдались достоверное повышение активности АлАТ почти в 2 раза, АсАТ — в 1,6 раза, ГГТ — в 1,8 раза и щелочной фосфатаза — в 3,1 раза (последнее $p > 0,05$), что свидетельствует о цитолизе гепатоцитов и развивающемся холестазае. Достоверное повышение содержания в крови мочевины показывает на снижение реабсорбционной функции почек.

Таким образом, эксперимент показал, что при развитии пристанового воспаления возможно поражение печени и почек. Введение R004 ослабляет этот процесс, а применение диклофенака натрия и дексаметазона его усиливает.

Выводы

1. Применение соединения R004 в терапии хронического воспаления у крыс препятствовало значимому развитию отека стоп и поражению мелких суставов, предупреждало специфические изменения формулы белой крови, а по данным биохимического исследования крови приводило к нормализации функций печени и почек и энергетического обмена организма.

2. Соединение R004 оказалось более эффективно и безопасно, чем препараты сравнения диклофенак натрия и дексаметазон.

- средств с противовоспалительной активностью среди производных тетрагидропиридо [2,1] [1,3,5] тиадиазина. *Химико-фармацевтический журнал*. 2017; 51 (8): 16–19.
12. Скупневский С. В., Пухаева Е. Г., Бадтиев А. К., Руруа Ф. К., Батагова Ф. Э., Фарниева Ж. Г. Метод неинвазивной оценки развития ревматоидного артрита у лабораторных грызунов. *Вестник новых медицинских технологий*. 2022; (4): 69–72. DOI: 10.24412/1609-2163-2022-4-69-72.
13. Гланц С. *Медико-биологическая статистика*. М.: Практика, 1998; 459 с.

References

- GBD 2021 Rheumatoid Arthritis Collaborators. Global, regional, and national burden of rheumatoid arthritis, 1990–2020, and projections to 2050: a systematic analysis of the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Rheumatology*. 2023; 5 (10): e594–e610. DOI: 10.1016/S2665-9913(23)00211-4. PMID: 37795020; PMCID: PMC10546867.
- Klinicheskie rekomendatsii. *Revmatoidnyy artrit*. 2021–2022–2023 (24.08.2021). Utverzheny Minzdravom RF. Russian.
- Tanaka Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis. *Korean J Intern Med*. 2016; 31 (2): 210–218. DOI: 10.3904/kjim.2015.137. Epub 2016 Feb 26. PMID: 26932398; PMCID: PMC4773729.
- Nasonov EL. Lechenie revmatoidnogo artrita. *Klinicheskaya farmakologiya i farmakoterapiya*. 2017; 26 (1): 4–10. Russian.
- Prasad P, Verma S, Surbhi, Ganguly NK, Chaturvedi V, Mittal SA. Rheumatoid arthritis: advances in treatment strategies. *Mol Cell Biochem*. 2023; 478 (1): 69–88. DOI: 10.1007/s11010-022-04492-3. PMID: 35725992.
- McCulloch K, McGrath S, Huesa C, Dunning L, Litherland G, Crilly A, et al. Rheumatic Disease: Protease-Activated Receptor-2 in Synovial Joint Pathobiology. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2018; 9: 257. DOI: 10.3389/fendo.2018.00257. PMID: 29875735; PMCID: PMC5974038.
- Cho NC, Seo SH, Kim D, Shin JS, Ju J, Seong J, et al. Pharmacophore-based virtual screening, biological evaluation and binding mode analysis of a novel protease-activated receptor 2 antagonist. *J Comput Aided Mol Des*. 2016; 30 (8): 625–37. DOI: 10.1007/s10822-016-9937-9. PMID: 27600555.
- Abassi YA, Xi B, Zhang W, Ye P, Kirstein SL, Gaylord MR, et al. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol*. 2009; 16 (7): 712–23. DOI: 10.1016/j.chembiol.2009.05.011. PMID: 19635408; PMCID: PMC2836189.
- Korsakov MK, Fedorov VN, Smirnov NA, Shetnev AA, Leonova OV, Volkhin NN, et al. Screening of anti-inflammatory activity of 4,5-dihydroisoxazol-5-carboxamide (PAR-2 inhibitors) based on formaldehyde oedema model among white lab rats. *Research Results in Pharmacology*. 2023; 9 (4): 105–111. DOI: 10.18413/rpharmacology.9.10061.
- Tuncel J, Haag S, Hoffmann MH, Yau AC, Hultqvist M, Olofsson P, et al. Animal Models of Rheumatoid Arthritis (I): Pristane-Induced Arthritis in the Rat. *PLoS One*. 2016 May 26; 11 (5): e0155936. DOI: 10.1371/journal.pone.0155936. PMID: 27227821; PMCID: PMC4881957.
- Bibik EYu, Yaroshevskaya OG, Devdera AV, Demenko AV, Zakharov VV, Frolov KA, et al. Poisk sredstv s protivovospalitel'noy aktivnost'yu sredi proizvodnykh tetragidropirido [2,1] [1,3,5] tiadiazina. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2017; 51 (8): 16–19. Russian.
- Skupnevskiy SV, Pukhaeva EG, Badtiev AK, Rurua FK, Batagova FE, Farnieva Zh G. Metod neinvazivnoy otsenki razvitiya revmatoidnogo artrita u laboratornykh gryzunov. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2022; (4): 69–72. DOI: 10.24412/1609-2163-2022-4-69-72. Russian.
- Glants S. *Mediko-biologicheskaya statistika*. М.: Praktika, 1998; 459 p. Russian.