

УДК 615.324/.454.1

ИССЛЕДОВАНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭКСТРАКТА *HIRUDO MEDICINALIS*, МАЗИ И ГЕЛЯ НА ЕГО ОСНОВЕ ПРИ НАКОЖНОМ ПРИМЕНЕНИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Митрохин Н.М.¹, Ефимова А.О.²

¹Государственное автономное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский научно-практический центр медицинской реабилитации, восстановительной и спортивной медицины Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, e-mail: mitrokhin007@mail.ru;

²ЗАО «Международный центр медицинской пиявки», Московская область, пос. Удельная, e-mail: romanenkoao@mail.ru

Проведен сравнительный анализ специфической фармакологической активности экстракта медицинских пиявок *Hirudo medicinalis* (ЭМП) и потенциальных топических лекарственных препаратов на его основе с препаратами сравнения – гель и мазь диклофенака, гель и мазь гепарина. Показано, что ЭМП, мазь и гель с МВЕ уменьшают выраженность «формалинового» отека лапы у мышей и экссудативную реакцию при «фетровой» гранулеме у крыс, причем эффективность мазей превышала эффективность гелей. Показана способность мази и геля на основе ЭМП достоверно сокращать время восстановления геморрагических повреждений мягких тканей у крыс и, в отличие от лекарственных форм гепарина, увеличивать время свертывания крови кроликов соответственно в 1,25 раза и 1,19 раза. Таким образом, мазь и гель, содержащие ЭМП, являются потенциальными лекарственными средствами, обладающими противовоспалительными, противосвертывающими свойствами и свойством сокращать время восстановления геморрагических повреждений мягких тканей.

Ключевые слова: экстракт медицинской пиявки, мазь и гель с ЭМП, накожное нанесение, мыши, крысы, кролики, противовоспалительное, противоотечное, противосвертывающее действие, геморрагические повреждения.

RESEARCH OF EXTRACT *HIRUDO MEDICINALIS*, OINTMENT AND GEL ON ITS BASIS PHARMACOLOGICAL PROPERTIES AT CUTANEOUS APPLICATION IN EXPERIMENT

Mitrokhin N.M.¹, Yefimova A.O.²

¹Moscow Centre for Research and Practice in Medical Rehabilitation, Restorative and Sports Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow, e-mail: mitrokhin007@mail.ru;

²Joint-Stock Company «International Center of the Medical bloodsucker», Moscow region, village Udelnaja, e-mail: romanenkoao@mail.ru

The comparative analysis of an bloodsuckers *Hirudo medicinalis* extract (MBE) and potential topical medical products on its basis specific pharmacological activity with comparison drug products – diclofenacgel and ointment a, heparin gel and ointment was carried out. It is shown, that MBE, ointment and gel with MBE reduce expressiveness of a "formalin" hypostasis of a paw at mice and exudativ reaction at rats "felt" granulem, and efficiency of ointments exceeded efficiency of gels. Ability of ointment and gel on the basis of ЭМП authentically is shown to reduce restoration time геморрагических damages of soft fabrics at rats and, unlike medicinal forms гепарина, to increase time of curling of blood of rabbits accordingly in 1,25 times and 1,19 times. Thus, ointment and the gel containing MBE, are the potential medical products possessing anti-inflammatory, anti-coagulant action properties and to reduce time of restoration геморрагических of damages of soft fabrics.

Keywords: an extract of a medical bloodsucker, ointment and gel with MBE, cutaneous application, mice, rats, rabbits, anti-inflammatory, decongestant, anticoagulant action, hemorrhagic damages.

Современная медицина все большее внимание уделяет созданию новых высокоэффективных и безопасных лекарственных средств. В большинстве своем применение препаратов, представленных как продуктами химического синтеза, так и животного или растительного происхождения, сопровождается побочными эффектами, что часто ограничивает их клиническое применение. Актуальной остается проблема поиска

новых потенциальных лекарственных средств, в том числе и на основе природного сырья. При этом важным представляется поиск средств, проявляющих многоплановое действие (в том числе противовоспалительное, ранозаживляющее, противоожоговое, антигеморрагическое, противосвертывающее) при накожном применении для терапии повреждений в быту, при чрезвычайных ситуациях, в спортивной медицине и т.д.

Медицинская пиявка является источником уникальных соединений, синтезируемых только этим видом животных. Прежде всего это литические соединения, обеспечивающие разрушение тканей, влияющие на проницаемость межклеточного матрикса дермы (гирудин [1], простагландины [2], пептидаза – дестабилазный комплекс [3, 4], коллагеназа, антигемостатики – препятствующие развитию механизмов свертывания крови (калин, апираза, антагонист PAF, ингибитор Ха фактора, гирудин), блокаторы защитных реакций организма (бделлины, гирустазин, ингибитор триптазы, ингибитор карбоксипептидазы А, эглины), вспомогательные вещества [1], биологически активные компоненты, проникающие через гемато-энцефалический барьер [5]. По мнению ряда исследователей, гирудин и подобные ему препараты являются одними из наиболее перспективных антикоагулянтов и рассматриваются как альтернатива гепарину [6]. Интерес к уникальным свойствам фермента подтверждается растущим числом публикаций по изучению его эффективности при различных тромботических состояниях, включая тромбозы коронарных, мозговых и др. артерий [2].

До настоящего времени в качестве лекарственных форм препаратов на основе медицинской пиявки используют жидкие (в виде растворов для внутривенных инъекций) или твердые лекарственные формы (в виде таблеток или капсул).

Цель исследования. Определение перспективности разработки препаратов на основе экстракта пиявки *Hirudo medicinalis* при накожном применении.

Материалы и методы исследования

Все исследования выполнены в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [7].

Эксперименты проведены на 100 мышах линий Balb/c массой $20,2 \pm 0,4$ г белых неинбредных, 240 белых неинбредных крысах массой 210 ± 4 г и 20 кроликах породы Шиншилла массой 3000 ± 10 г, самцах и самках. Исследования проводили в соответствии с правилами качественной лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ [8], а также выполнены с соблюдением национальных и международных требований по содержанию и гуманному обращению с животными [9, 10]. Объектами исследования являлись экстракт медицинской пиявки (ЭМП), фармакопейная статья МЗ РФ 42-2384-94), «Гирулюкс, 1 % мазь для наружного применения» и «Гирулюкс, 1 % гель для

наружного применения». Согласно проведенному ОКК ЗАО «МЦМП» анализу испытанные образцы соответствуют разработанной ФСП. Субстанцию ЭМП стандартизировали по антитромбиновой и антикоагулянтной активности [11].

В работе дозы исследуемых мази Гирулюкс 1 % и геля Гирулюкс 1 %, пересчитанные с учетом межвидового пересчета доз [8, с.22], с человека ($4\text{г}/70\text{кг}=57,1\text{мг}/\text{кг}$) на мышь (1:11), крысу (1:7) и кролика (1:3,2) составили для мышей 630мг/кг, для крыс 400мг/кг и для кроликов 183мг/кг. ЭМП использовали в тех же дозах в виде 1 % раствора на 0,9 % NaCl. Препараты сравнения – Диклофенак гель 1 %, ОАО «Биохимик», Гепариновая мазь, ОАО «НИЖФАРМ», Heparin-Akhrigel 1000; Акрихин ХФК ОАО – применялись в тех же дозах (мл/кг), что и исследуемые потенциальные лекарственные средства на килограмм массы тела для аналогичных экспериментальных животных, мазь диклофенака Ортофен, мазь 2 %; ЗАО «Вертекс» – в 2 раза меньшем объеме. Исследованные образцы наносили на животных за несколько раз.

Противовоспалительную активность оценивали на модели «формалинового» отека лапы у мышей при субплантарном введении в заднюю лапу 0,1 мл 2 % водного раствора формалина. Подопытным животным наносили исследованные образцы на подошву лапы с легким растиранием ежедневно в течение 10 дней, контрольной группе – изотонический раствор натрия хлорида. Выраженность отека оценивали, измеряя толщину лапки до и через 4 часа после введения формалина. Оценку противовоспалительной активности проводили также на модели «фетровой» гранулемы у крыс. Хроническое пролиферативное воспаление вызывали имплантацией под кожу медиальной части спины простерилизованных кусочков фетра массой 40 ± 2 мг. Ежедневно на выстриженный участок с легким растиранием наносили исследуемые образцы. На 8-е сутки после операции кусочки фетра с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью извлекали, взвешивали и высушивали до постоянной массы. Рассчитывали пролиферативную и экссудативную реакцию в %.

Оценку терапевтического действия при геморрагических повреждениях осуществляли на белых неинбредных крысах. У подопытных животных удаляли волосяной покров на части кожи спины. Геморрагические повреждения мягких тканей с использованием местной анестезии (лидокаин) вызывали путем нанесения стандартного тупого удара фиксированной силы. Крысам ежедневно в течение 6 дней накожно с легким втиранием наносили исследованные образцы до полного исчезновения гематом.

Ранозаживляющее действие изучали на белых нелинейных крысах. Предварительно у подопытных животных удалили волосяной покров на части кожи спины площадью 3×3 см². Послойные кожные раны наносили с помощью трафарета площадью 225 мм² с использованием местной анестезии (лидокаин). На кожу подопытных животных ежедневно

наносили исследованные образцы до полного заживления.

Оценку противосвертывающего действия проводили на кроликах при нанесении в течение 10 дней подопытным животным с легким втиранием исследуемых образцов на участок кожи с удаленным волосяным покровом площадью 4x4 см². До эксперимента и через 10 дней из краевой вены уха забирали кровь для регистрации времени свертывания крови по данным анализа гемокоагуляции с помощью АГКМ 1-01.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета программы ПО Microsoft Office EXCEL 2010 и STATISTICA Version 10. Наличие нормального распределения данных проверяли с использованием критерия Колмогорова – Смирнова. Параметры нормальных распределений признаков в выборках описывали в формате $M \pm m$ (среднее значение \pm стандартная ошибка среднего). Статистическую достоверность различий результатов исследований между группами проверяли по t-критерию Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

При субплантарном введении 0,1 мл 2 % раствора формалина у подопытных мышей развивается выраженный отек лапы, о чем свидетельствует достоверное увеличение ее объема. Через 4 часа после введения формалина объем лапы у подопытных животных контрольной группы увеличился на $72,1 \pm 2,8$ %. При накожном нанесении ЭМП отмечается уменьшение выраженности индуцированного формалином отека лапы у мышей до $52,28 \pm 4,60$ %, что в 1,38 раза ($p < 0,05$) меньше, чем в контроле. Выраженность противовоспалительного эффекта 1 %, мази с ЭМП соответствовала активности водного извлечения ЭМП, тогда как гель с ЭМП действовал слабее (рис. 1). Вышесказанное проявилось также в отношении активностей мази и геля диклофенака.

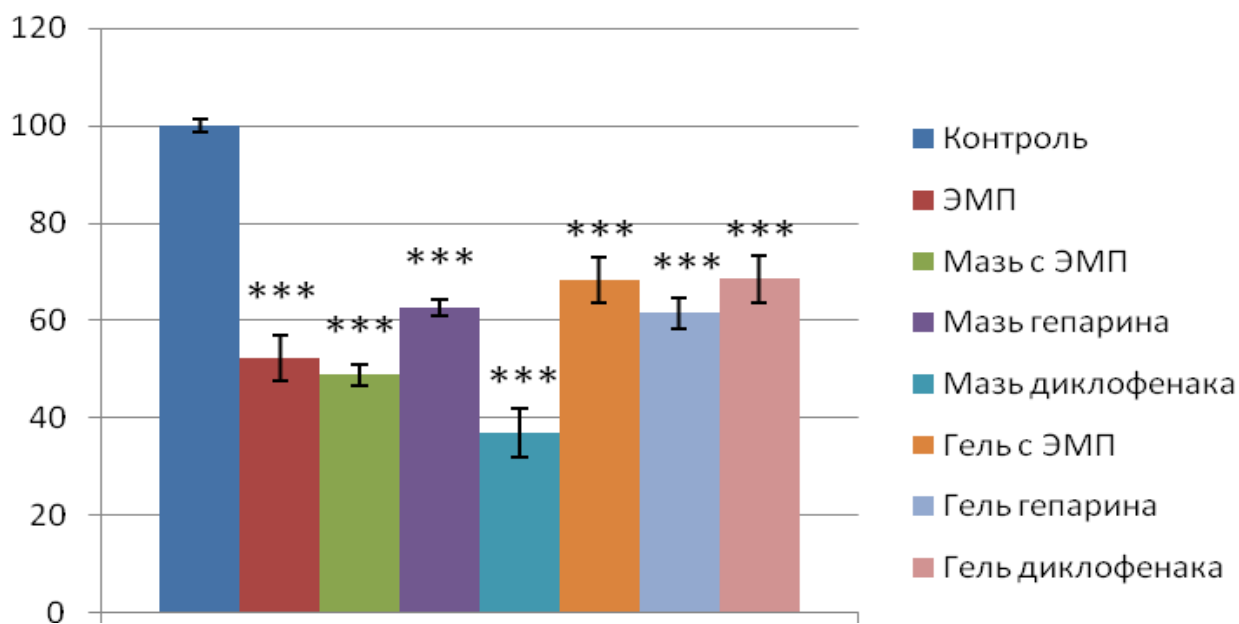


Рис.1. Влияние субстанции Гирулюкс, мази и геля Гирулюкс, гепарина и диклофенака на выраженность «формалинового» отека лап мышей. По оси абсцисс – выраженность отека в %. Примечание: здесь и далее *, ** и *** – различия с контролем достоверны при $P < 0.05$, 0.01 и 0,001

Так, наибольший эффект в отношении противоотечного действия проявила мазь диклофенака ($63,22 \pm 4,96$ %), в 1,64 раза более выраженный ($P < 0,05$), чем гель диклофенака ($38,5 \pm 4,8$ %). Также достаточно высокий достоверный эффект проявил ЭМП и мазь на основе ЭМП, составивший $47,72 \pm 4,6$ % и $51,3 \pm 2,2$ %, соответственно, против $31,74 \pm 4,6$ % для геля на основе ЭМП, в 1,6 раза более выраженный, чем для геля. Наименьший, но достоверный эффект выявлен для мази и геля гепарина, составивший $37,5 \pm 1,7$ % против $38,5,5 \pm 3,18$ %.

На 8-е сутки экссудативная и пролиферативная реакции при «фетровой» гранулеме у крыс составили $66,1 \pm 3,3$ % и $9,4 \pm 0,8$ %, соответственно. При оценке пролиферативной реакции при «фетровой» гранулеме у крыс на 8 сутки выявлено отсутствие достоверных отличий от контрольной группы. В то же время для экссудативной реакции достоверное уменьшение выявлено при применении субстанции ЭМП, мази на основе ЭМП, мази гепарина и мази диклофенака с $66,1 \pm 3,3$ % в контроле до $52,5 \pm 2,0$ %, $57,5 \pm 4,1$ %, $56,6 \pm 2,7$ % и $42,9 \pm 4,6$ %, соответственно. Для геля на основе ЭМП, геля гепарина и геля диклофенака отмечается лишь тенденция к уменьшению этого показателя (рис. 2).

Таким образом, анализ результатов экспериментального исследования

противовоспалительной активности показал, что при накожном нанесении ЭМП на модели «фетровой» гранулемы у крыс отмечается уменьшение выраженности экссудативной реакции без влияния на пролиферативную.

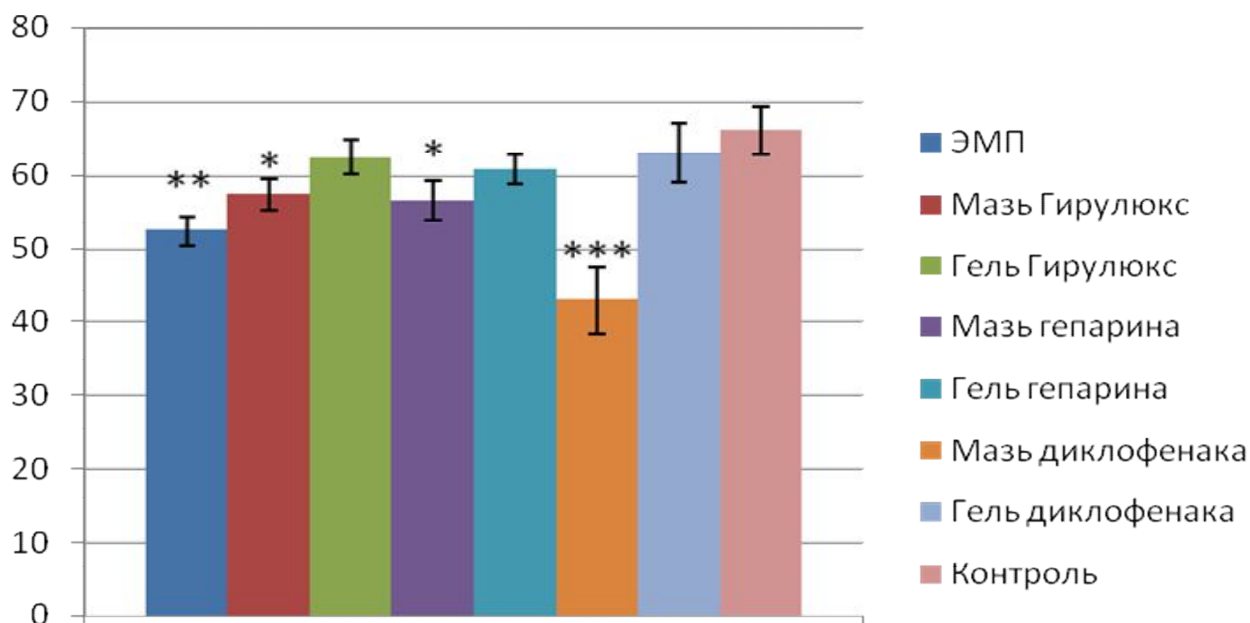


Рис. 2. Влияние ЭМП, 1 % мази и геля с ЭМП, гепарина и диклофенака на выраженность экссудативной реакции при «фетровой» гранулеме у крыс. По оси абсцисс – экссудативная реакция, % экссудата от массы сырой гранулемы в контрольной группе

При оценке терапевтического действия исследованных образцов при геморрагических повреждениях мягких тканей у крыс выявлено, что время рассасывания гематом при использовании ЭМП достоверно уменьшалось в среднем в 1,22 раза, а геля с ЭМП – в 1,16 раза. Представленные в таблице данные указывают на то, что как сам ЭМП, так и гель с ЭМП при накожном нанесении в течение 10 суток приводят в отличие от геля с гепарином к достоверному сокращению времени восстановления геморрагических повреждений мягких тканей у крыс.

Влияние геля гирулюкс и субстанции экстракта пиявки на течение геморрагических повреждений мягких тканей у крыс

	Сроки восстановления тканей после геморрагических повреждений, дни	
	Опыт	% изменений
Субстанция ЭМП	3,6±0,2*	-18,2±4,5*

Гель с ЭМП	3,8±0,2*	-13,6±4,5*
Гель гепарина	3,9±0,3	-11,4±6,8
Контроль	4,4±0,2	-0,0±4,5

Достоверных различий в скорости заживления кожных ран при действии ЭМП и мази с экстрактом пиявки отмечено не было, но наблюдалась тенденция к ускорению процесса заживления на 0,4 дня (4,8 %) и на 0,3 дня (3,6 %), соответственно.

Накожное нанесение экстракта пиявки кроликам приводит к достоверному увеличению времени свертывания крови подопытных животных в среднем на 40 %, мази с ЭМП на 25 %, а при использовании геля с ЭМП на 19 %. В то же время препараты гепарина при такой постановке эксперимента оказались неэффективными (рис. 3).

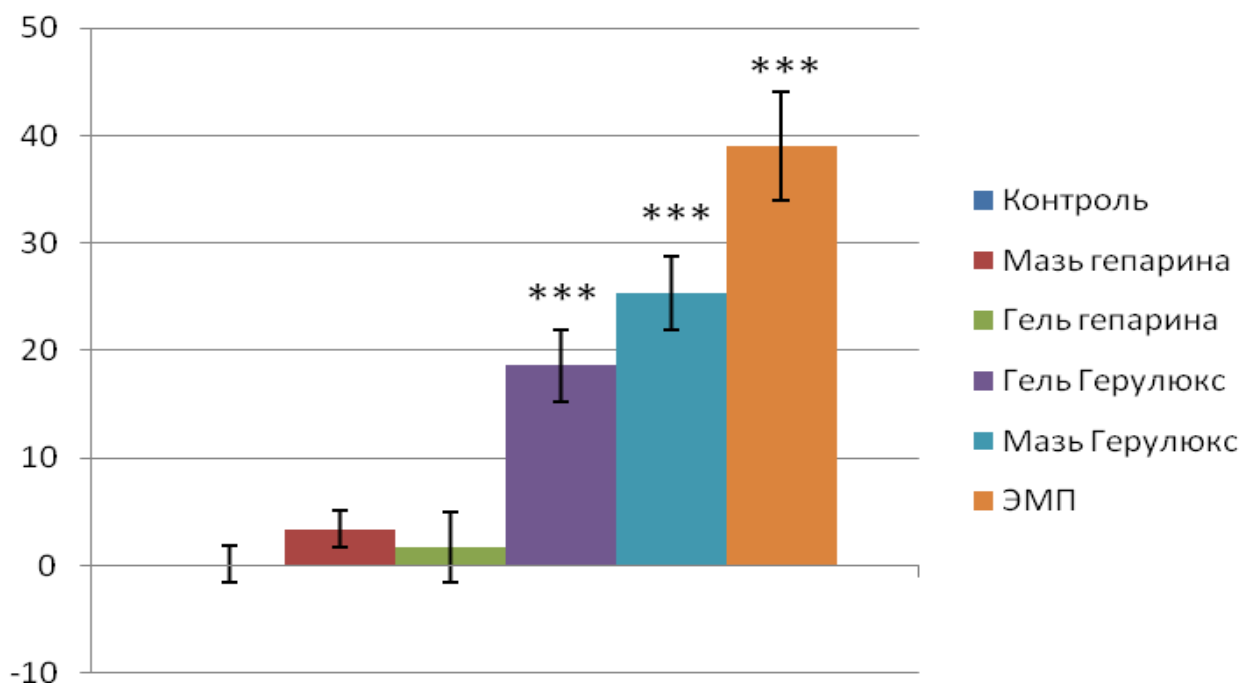


Рис. 3. Влияние субстанции, мази, геля с ЭМП и гепарина на время свертывания крови у кроликов. По оси ординат – увеличение времени свертывания крови относительно контроля, %

Таким образом, ЭМП, так же, как и образцы «Гирулюкс, гель для наружного применения» и «Гирулюкс, мазь для наружного применения» при накожном применении проявили противовоспалительные, противосвертывающие свойства и способность ускорять рассасывание геморрагических повреждений мягких тканей.

С учетом того, что ранее было показано ускорение заживления ожоговых ран у крыс при нанесении ЭМП в среднем в 1,2 раза быстрее, чем в контроле со значительным (в 3 раза) ускорением скорости эпителизации ожоговых ран с 5 дня после повреждения [12], возможно, что

терапевтическое действие образцов, содержащих вещества ЭМП, обусловлено способностью некоторых биологически активных компонентов проникать через эпителий кожи, оказывая регенерирующую и фибринолитическую активность, блокировать активность медиаторов воспаления и оказывать, в том числе и системное действие в отношении свертываемости крови.

Выводы

- ЭМП производства ЗАО «МЦМП», Мазь 1% с ЭМП и Гель 1% с ЭМП при курсовом накожном нанесении мышам в дозе 630мг/кг угнетает отек лап при введении формалина, причем мази диклофенака, с ЭМП и гепарина по эффективности угнетения воспаления превышают активность аналогичных гелей;

- На модели фетровой гранулемы у крыс субстанция ЭМП при курсовом нанесении уменьшает экссудативную реакцию;

- ЭМП и гель с ЭМП в отличие от геля гепарина достоверно уменьшают время восстановления тканей при геморрагических повреждениях у крыс;

- Ежедневное в течение 10 дней курсовое накожное нанесение кроликам мази с ЭМП в дозе 183мг/кг приводит к увеличению времени свертывания крови подопытных животных в среднем в 1,25 раза, а при использовании геля в 1,2 раза в отличие от препаратов гепарина;

- Мазь и гель с ЭМП при накожном нанесении экспериментальным животным обладают комплексным противовоспалительным действием, способствуют ускорению восстановления тканей после геморрагических повреждений, снижению скорости свертывания крови и являются потенциальными лекарственными средствами.

Список литературы

1. Барановский А.Ю., Каменев О. Лечение пиявками. Теория и практика гирудотерапии / А.Ю. Барановский, О. Каменев. – СПб.: Весь, 2015. – 340 с.
2. Добрынин Ю.В. с соавт. Оценка эффективности секрета слюны пиявки в лечении цереброваскулярной и гинекологической патологии / [Текст] Ю.В. Добрынин, Р.Н. Живогляд, К.А. Хадарцева, Т.Н. Шипилова // Вестник новых медицинских технологий. – 2008. – Т.15, № 1. – С. 96-97.
3. Фадеева Ю.И. с соавт. Высокоактивные фракции рекомбинантного дестабилазы-лизоцима медицинской пиявки/ [Текст] Ю.И. Фадеева, Н.В. Антипова, И.П. Баскова, Л.Л. Завалова // Биомед. Хим. – 2014. – №60(3). Май-июнь. – С. 332-7.
4. Завалова Л.Л. с соавт. Каталитические центры фермента дестабилазы-лизоцима медицинской пиявки (mlDL). Структурно-функциональная взаимосвязь / [Текст] Л.Л.

Завалова, Н.В. Антипова, Ю.И. Фадеева, М.С. Павлюков, Н.В. Плетнева, В.З. Плетнев, И.П. Баскова // Биоорганическая химия. – 2012. – 38 (2). – С. 229-233.

5. Котлова Н.Г. с соавт. Накопление эглина с в тканях крыс с помощью тритиевой метки при оральном введении // Клиническая и экспериментальная гирудология на пороге нового тысячелетия/ [Текст] Н.Г. Котлова, Г.А. Бадун, В.М. Федосеев; Матер. 6-й науч.-практ. конф. гирудологов России и стран СНГ. Под ред. И.П. Басковой и А.Н. Куланина. – Пятигорск, 1999. – С. 114–116.

6. Trontelj, P. Phylogeny and phylogeography of medicinal leeches (genus *Hirudo*): Fast dispersal and shallow genetic structure / P. Trontelj, S. Y. Utevsky // *Molecular Phylogenetics and Evolution*. – 2012. – Vol. 63. – P. 475–485.

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1/ ред. А.Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

8. Об утверждении Правил лабораторной практики [Текст]: Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н. Зарегистрирован в Минюсте РФ 13 октября 2010 г. Регистрационный № 18713// *Российская газета*. – 22 октября 2010. – № 240.

9. ГОСТ Р 53434 – 2009 Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Изд-во ФГУП Стандартинформ, 2010. – 11 с.

10. Guide for the care and use of laboratory animals. Eighth Edition. The National Academies press. – Washington, D.C., 2012. – 246 p.

11. Никонов Г.И. с соавт. Экстракт пиявок *Hirudo medicinalis* – биогенная субстанция для создания эффективных лекарственных средств/ [Текст] Г.И. Никонов, Е.А. Титова, А.О. Лебедева // *Эксп. клин. фарм.* – 2015. – №78 (2). – С. 15-19.

12. Попов Н.С. с соавт. Изменения в коже при наружном применении экстракта пиявки/ [Текст] Н.С. Попов, М.А. Демидова, В.Г. Шестакова, Т.И. Елисеева, Ю.Г. Казаишвили // *Тверской медицинский журнал*. – 2014. – №7. – С. 101-111.