

УДК 615.272.4;615.036.8

© Коллектив авторов

ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КОМПЛЕКСНОГО СОЕДИНЕНИЯ СИМВАСТАТИНА С ГЛИЦИРРИЗИНОВОЙ КИСЛОТОЙ (СИМВАГЛИЗИНА) В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ

**В.А. Вавилин^{1*}, Н.Ф. Салахутдинов², Ю.И. Рагино³, Н.Е. Поляков⁴,
М.Б. Тарабан⁴, Т.В. Лешина⁴, Е.М. Стахнева³, В.В. Ляхович¹,
Ю.П. Никитин³, Г.А. Толстиков²**

¹ГУ Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики СО РАМН; 630117, Новосибирск, ул. ак. Тимакова, д. 2; тел/факс: (383)332-31-47; эл. почта: drugsmet@soramn.ru

²Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН, 630090, Новосибирск, пр-т. акад. Лаврентьева, 9; эл. почта: anvar@nioch.nsc.ru

³ГУ Научно-исследовательский институт терапии СО РАМН, 630089 Новосибирск, ул. Богаткова, 175/1; эл. почта: office@iimed.ru

⁴Новосибирский институт химической кинетики и горения СО РАН, 630090 Новосибирск, Институтская ул., 3; эл. почта: root@ns.kinetics.nsc.ru

Синтезирован молекулярный комплекс симвастати́на (СВ) с глицирризи́новой кислотой (ГК) в соотношении 1:4, получивший наименование “симваглизин” (СВГ). Комплекс стабилен в водных и водно-спиртовых растворах при концентрациях ГК выше 0,2 мМ. *In vitro* СВГ является бесконкурентным ингибитором 3-гидрокси-3-метил-глутарил-СоА-редуктазы (3-HMG-СоА-редуктазы; K_i 94 нМ). СВГ обретает свойства ингибитора в результате цитохром Р450-зависимого метаболизма, поскольку добавление в суспензию микросом метирапона в концентрации 1 мМ полностью предотвращает ингибирование 3-HMG-СоА-редуктазы. В концентрации 300 нМ СВ и СВГ в одинаковой степени подавляют синтез мевалоната - на $39,15 \pm 8,27$ и $38,85 \pm 3,04$ процента, соответственно. В условиях *in vivo* СВГ оказывает дозо-зависимый холестерин-снижающий эффект. Сила гипохолестеринемического эффекта СВГ в весовых дозах, эквивалентных 66 и 100 мг/кг/сутки симвастати́на, соответствует эффекту, наблюдаемому при введении 200 мг/кг/сутки собственно СВ. Снижение уровня общего ХС сыворотки крови составляет 7% и 9% ($p < 0,05$) и 8% ($p < 0,05$) соответственно. Миотоксичность этих доз СВГ, оцениваемая по активности креатинфосфокиназы в сыворотке крови, была ниже, чем у СВ. У крыс, получавших СВ, этот показатель возрос на 79% ($p < 0,01$), а у получавших СВГ - на 30 и 36% ($p < 0,05$). Увеличения активности в сыворотке крови маркеров гепатотоксичности аланин- и аспаратаминотрансферазы не наблюдалось ни с одним из препаратов. Полученные данные свидетельствуют о фармакологическом синергизме в результате комплексообразования симвастати́на с глицирризи́новой кислотой и большей безопасности полученного комплекса в сравнении с исходным соединением.

Ключевые слова: симваглизин, симвастатин, глицирризи́новая кислота, ингибирование 3-HMG-СоА-редуктазы, гиперхолестеринемия у крыс.

ВВЕДЕНИЕ. Гиперхолестеринемия (ГХС) играет ключевую роль в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний (ССЗ) атеросклеротического генеза [1], заболеваемость и смертность от которых продолжают оставаться чрезвычайно

* - адресат для переписки

высокими в России [2]. В связи с этим при ишемической болезни сердца (ИБС) приоритетным является применение холестерин-снижающей терапии при уровнях общего холестерина (ХС) крови >5 ммоль/л и ХС липопротеинов низкой плотности (ЛНП-ХС) >3 ммоль/л [3]. На сегодняшний день, ингибиторы 3-гидрокси-3-метил-глутарил-СоА редуктазы (3-НМГ-СоА редуктазы), так называемые статины, наиболее эффективны в отношении снижения уровня ЛНП-ХС и смертности от атеросклероза и ИБС [4]. Однако, у большинства статинов эффективная терапевтическая суточная доза, равная 20-80 мг, обуславливает возникновение нежелательных побочных эффектов – гепатотоксичности, миалгии, миопатии и в редких случаях - рабдомиолиза [5]. Поэтому актуальны поиск и создание новых статинов с более низкой суточной дозой, более безопасных, пролонгированного действия и эффективных в отношении снижения уровней атерогенного ХС.

Одним из современных подходов к созданию новых лекарственных соединений является использование известных фармаконов в виде комплексов с природными комплексономами, в частности, с глицирризиновой кислотой. Ранее было продемонстрировано усиление лекарственного эффекта бутадiona, индометацина [6] и нифедипина [7] при использовании их в комплексах с глицирризиновой кислотой (ГК).

Целью настоящей работы было создание нового гипохолестеринемического средства путём образования комплекса глицирризиновой кислоты с известным ингибитором 3-НМГ-СоА редуктазы симвастатином и изучение его ингибиторных свойств в отношении этого фермента *in vitro* и гипохолестеринемического эффекта у экспериментальных животных *in vivo*.

МЕТОДИКА. В работе использованы дитиотрейтол, глюкозо-6-фосфат ("ICN", США), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа ("Sigma", США), NADPH ("Gerbu", Германия), трис-гидроксиметиламинометан, ЭДТА-Na, $MgCl_2$ ("Serva", Германия), 3-гидрокси-3-метил-[3- ^{14}C]-глутарил-СоА ("Amersham", Великобритания), DL-3-гидрокси-3-метил-глутарил-СоА ("Fluka", Германия), другие реактивы отечественного производства квалификации хч. Для создания комплексного соединения "симваглизин" были использованы субстанция симвастатина ("KRKA", г. Новоместо, Словения) и субстанция глицирризиновой кислоты (ОАО "Химфарм", г. Шимкент, Казахстан).

Синтез комплекса симвастатина и глицирризиновой кислоты проводили путём смешивания водно-спиртовых растворов СВ и ГК в мольном соотношении 1:4. В качестве спирта использовали метанол либо этанол. Ввиду низкой растворимости компонентов в воде, первоначально готовили спиртовые растворы исходных соединений в концентрациях 10 мМ, которые затем разводили дистиллированной водой в объемном соотношении спирт:вода 1:5. Полученный препарат высушивали. Процесс комплексообразования СВ с ГК наблюдали с использованием методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР спектрометр DPX-200 фирмы "Bruker" (Германия), резонансная частота на протонах 200 МГц) и электронной оптической UV-Vis спектроскопии (спектрофотометр UV-2401-PC). О стехиометрии комплекса судили по зависимости изменения оптической плотности раствора симвастатина на длине волны 247 нм от концентрации ГК. Для исключения вклада поглощения самой ГК, ее спектр поглощения вычитался из суммарного спектра. Измерения проводили в водно-метанольной смеси (20% метанола) при концентрации СВ 0,1 мМ в кварцевой кювете.

Эксперименты по оценке гипохолестеринемических свойств симваглизина выполнены на самцах крыс линии Вистар массой 180-200 г. Животных содержали в клетках по 5 особей при свободном доступе к воде и пище, которой служила стандартная лабораторная диета. В течение недели животные адаптировались к условиям вивария. По завершении этого периода у них под эфирным наркозом забирали 1 мл крови из хвостовой вены (точка "0") и приступали к формированию экспериментальной гиперхолестеринемии. С этой целью 25 экспериментальных

животных в течение 4 недель получали высокожировую холестериновую диету, широко используемую для развития ГХС с последующей оценкой ХС-снижающего эффекта различных соединений, в том числе статинов [8-10], которая содержала 3% ХС, 5% животного жира, 0,1% 6-N-пропил-2-тиоурацил (для подавления функции щитовидной железы) и 0,3% таурохолата (для улучшения всасывания ХС) [11, 12]. По истечении 4 недель у животных, как описано выше, забирали кровь (точка "4 недели"). После этого животных вновь переводили на стандартную лабораторную диету и разделяли на 5 групп по 5 крыс в каждой. Группа 1, без фармакологического воздействия, получала только стандартную лабораторную диету и служила контролем. Животные групп 2-5 в течение двух недель получали гипохолестеринемические соединения, водные растворы которых (СВГ) и суспензию (СВ) подмешивали в диету из расчета: группа 2 – симвастатин в дозе 200 мкг/кг/сутки (или 40 мкг/крысу/сутки); группы 3, 4 и 5 – симваглизин в дозах 400, 665 и 1000 мкг/кг/сутки (или 80, 133 и 200 мкг/крысу/сутки) соответственно. В перерасчете на СВ, массовая доля которого в СВГ составляет 0,1 от молекулярной массы, эти дозы в 3, 4 и 5 группах соответствовали 40, 66 и 100 мкг/кг/сутки. По истечении двух недель у животных еще раз брали кровь из вены хвоста (точка "6 недель"). В ночь перед экспериментом животных лишали корма при сохранении доступа к воде.

Показатели липидного профиля сыворотки крови у крыс (общий ХС, ЛВП-ХС и ТГ) и активности в сыворотке аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ) и креатинфосфокиназы (КФК, фракция КК-Nac) определяли с использованием наборов "Bioscop" (Германия) на биохимическом автоанализаторе "Labsystem" (Финляндия).

Крыс, использованных в экспериментах по ингибированию 3-НМГ-СоА СВГ *in vitro*, содержали только на стандартной лабораторной диете. Выделение микросом проводили общепринятым методом дифференциального центрифугирования в среде: 20 мМ трис-НСl, рН 7,4, 0,15 М КСl, ЭДТА 50 мМ и дитиотрейтол 2 мМ [13]. Конечный осадок – фракцию микросом – ресуспендировали в среде, содержащей 0,1 М KH_2PO_4 , 20% глицерин, рН 7,4. Концентрацию белка определяли методом Лоури. Микросомальный метаболизм 3-НМГ-СоА проводили по описанию Kleinsek и соавт. [14] с небольшими модификациями. В среду инкубации: 0,1 М KH_2PO_4 , рН 7,0, 4 мМ DTT, 10 мМ ЭДТА, 10 мМ MgCl_2 , 1 мМ NADPH, 4 мМ Гл-6-Ф, 2 ЕД Гл-6-ФДГ, – добавляли суспензию микросом и 2 мин преинкубировали при комнатной температуре. Затем вносили равные объемы СВГ для создания конечных концентраций 75, 150, 300 и 600 нМ и NADPH-генерирующую систему и инкубировали 8 мин при температуре 37°C и постоянном встряхивании для наработки метаболита - ингибитора 3-НМГ-СоА редуктазы. После этого добавляли меченый субстрат 3-НМ[3- ^{14}C]G-СоА в конечных концентрациях 28 или 47 мкМ. Общий объем реакционной смеси составлял 100 мкл, содержание белка - 0,24 мг. Реакцию, которая продолжалась в течение 10 мин, останавливали добавлением 10 мкл 2,4 М НСl и охлаждением реакционной смеси на льду. Сравнение силы ингибирования 3-НМГ-СоА-редуктазной реакции изучаемыми соединениями провели с эквимольной по симвастатину концентрацией симваглизина, равной 300 нМ.

Подготовку проб к хроматографии начинали спустя 1 час после остановки реакции, необходимой для конверсии мевалоновой кислоты в форму лактона [15]. К пробам добавляли 1,5 мкл 10 М КОН для их частичной нейтрализации до величины рН 3,5-4,5, затем центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин. На колонку наносили 50 мкл надосадка. Разделение продукта (мевалоната) и субстрата (3-НМГ-СоА) реакции проводили методом ион-парной обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии по методу Scharnagi и соавт. [16] на колонке Nucleosil C_{18} 5 мкм 250×2 мм с предколонкой Vydac C_{18} 30-40 мкм 30×2 мм. Мобильной фазой служил 53% водный раствор метанола (v/v) и 50 мМ тетрабутиламмоний фосфат, рН 5,1, Скорость потока – 150 мкл/мин. Детекцию

ГИПОХОЛИСТЕРИНЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИМВАГЛИЗИНА

осуществляли по поглощению на длине волны 254 нм. Для количественной оценки продукта реакции в вials собирали 4-минутные хроматографические фракции. Содержимое вial высушивали в токе воздуха при комнатной температуре, сухой остаток растворяли в 7 мл диоксанового сцинтиллятора, содержащего ПОПОП 300 мг/л, ППО 7 г/л и нафталин 100 г/л. Измерения радиоактивности в пробах проводили на бета-счетчике Delta 300 (Голландия). Реконструкция радиохроматографической картины и ее совмещение с UV-регистрируемой картиной показало, что полное время выхода пика мевалоната укладывается с 4 по 8 мин хроматографии, а 3-HMG-CoA – с 20 по 28 мин (рис. 1).

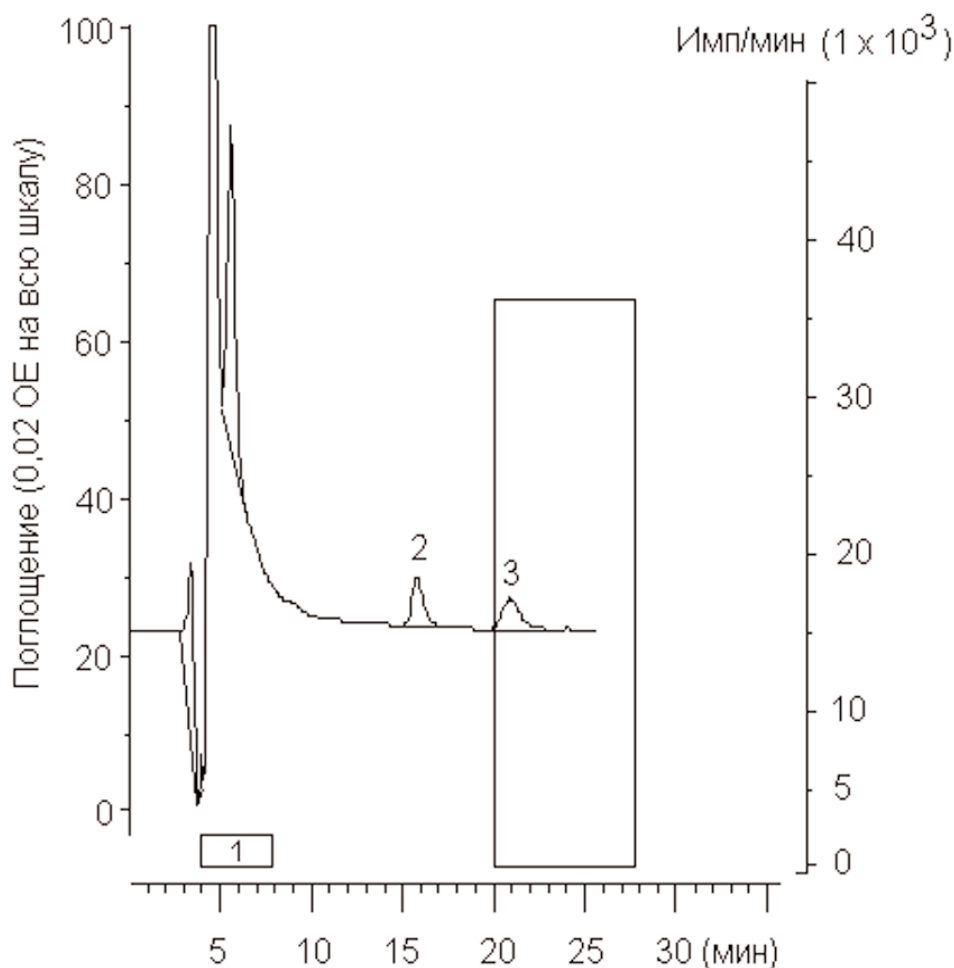


Рисунок 1.

Радиохроматограмма пробы микросомального метаболизма 3-гидрокси-3-метил[3-¹⁴C]глутарил-CoA. Непрерывная линия - UV- картина хроматографии стандарта 3-HM[3-¹⁴C]G-CoA и 3-HMG-CoA, добавленных к среде инкубации микросом. В этой хроматографии сигнал с 4 по 8 мин (мевалонат) отсутствует;
2 - неизвестный пик; 3 - 3-HM[3-¹⁴C]G-CoA.
Столбики - радиохроматографическая картина пробы микросомального метаболизма 3-HM[3-¹⁴C]G-CoA; 1 - мевалонат; 3 - 3-HM[3-¹⁴C]G-CoA.

Константы ингибирования рассчитывали в программе Excel. Статистическая обработка результатов проводилась в программе SPSS for Windows (версия 12.0) с применением критерия Стьюдента, корреляционного, линейного регрессионного анализов и дисперсионного анализа (One-Way ANOVA) с использованием критерия Даннета для множественного сравнения. Статистически достоверными считали различия с $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ.

Синтез и свойства симваглизина. Синтезированное новое химическое соединение, получившее наименование “симваглизин” (СВГ), является молекулярным комплексом симвастатина (СВ) с глицирризиновой кислотой (ГК) (рис. 2). На наличие связывания СВ и ГК указывало изменение в оптическом спектре поглощения СВ при смешивании их растворов (рис. 3). UV-VIS-спектрофотометрический анализ смеси СВ и ГК показал, что с увеличением концентрации ГК при его синтезе в результате образования комплекса меняется форма спектра, максимум становится ниже и смещается в область коротких длин волн. (рис. 3). При малых концентрациях ГК (до 0,2 мМ) изменений в спектре поглощения СВ не наблюдалось, в то время как при дальнейшем росте концентрации ГК происходило существенное изменение вида спектра (рис. 4). Для расчета констант стабильности и стехиометрии комплексов включения обычно применяется формула Бенеси-Хилдебранда (1) (Benesi-Hildebrand plot) [17, 18]. В настоящей работе константы стабильности комплекса СВ с ГК оценивали на основании анализа изменений величин оптической плотности СВ при его фиксированной концентрации в растворах, в которых варьировали концентрации ГК. Формула (1) применима при выполнении определенных экспериментальных условий (концентрация СВ меньше концентрации ГК). Это позволяет в рамках одного эксперимента не только оценить константу стабильности комплекса (K), но и определить стехиометрическое соотношение (n):

$$D/\Delta D - 1 = 1/[ГК]^n \times 1/K \quad (1)$$

где $\Delta D = \Delta \varepsilon \times [СВ]$ – изменение оптической плотности раствора, а K – константа стабильности комплекса, определяемая для реакции:



как

$$K = \frac{[СВ-ГК_n]}{[СВ] \times [ГК]^n} \quad (2)$$

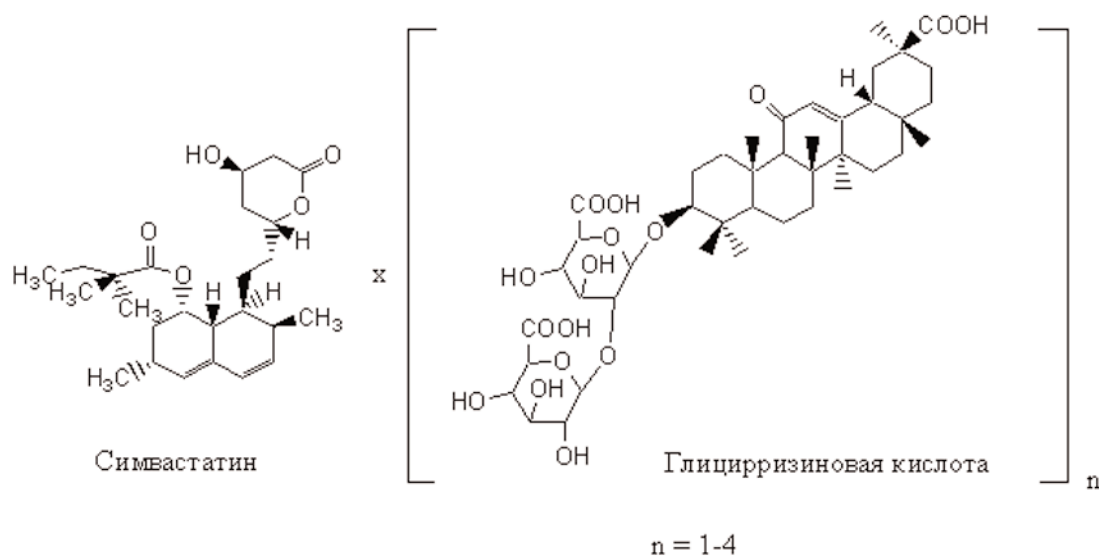


Рисунок 2.

Структура химического соединения "Симваглизин".

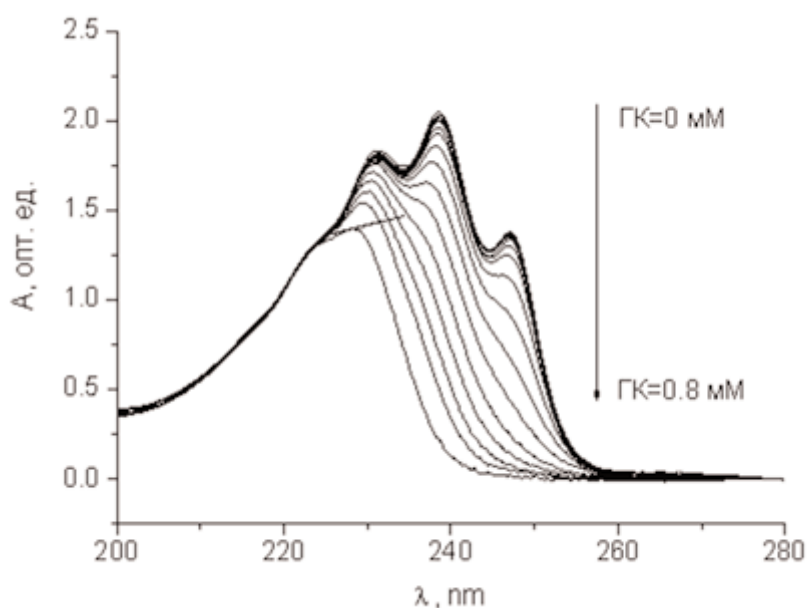


Рисунок 3.

Изменение спектра поглощения симвастати́на в зависимости от концентрации ГК. Концентрация симвастати́на в эксперименте - 0,1 мМ в 20% CH_3OH . Линия нижнего спектра соответствует спектру поглощения при концентрации ГК 0,8 мМ, линия верхнего спектра - спектру поглощения в отсутствие ГК.

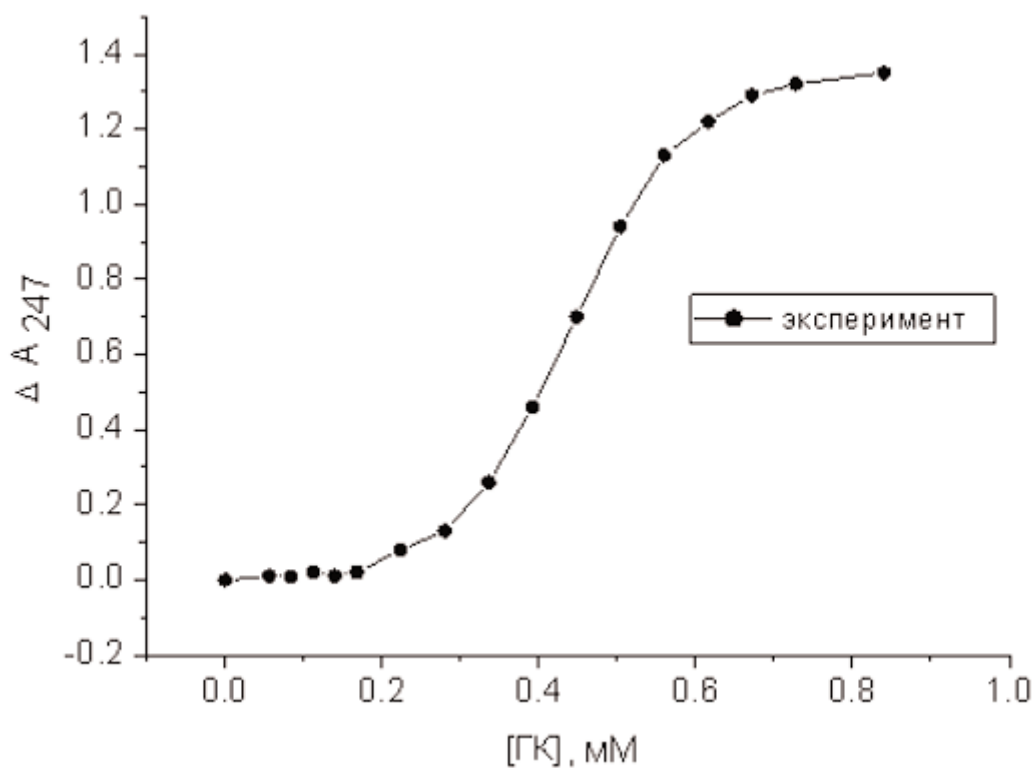


Рисунок 4.

Зависимость интенсивности поглощения симвастати́на от концентрации ГК. Регистрация поглощения проводилась на длине волны 247 нм, концентрация SV составила 0,1 мМ.

Построение графика $D/\Delta D$ от $1/[ГК]^n$ на участке роста (0,2–0,6 мМ ГК, рис. 4) для различных значений параметра n дало линейную зависимость только для $n = 4$. Отсюда был сделан вывод, что в результате реакции комплексообразования образуется соединение состоящее из одной молекулы СВ и тетрамера ГК. Из наклона прямой $D/\Delta D$ от $1/[ГК]^4$ по формуле (1) была оценена константа стабильности комплекса, $K = 3 \times 10^{14} \text{ М}^{-4}$.

Ещё один важный вывод, который следует из рисунков 3 и 4, связан с зависимостью структуры комплекса от концентрации ГК. На основании полученных результатов и известных литературных данных [18-21] можно сделать вывод, что в диапазоне концентраций от 0,2 до 0,8 мМ ГК образует циклические ассоциаты, состоящие из 2-4 молекул ГК. Дальнейший сдвиг полос поглощения комплекса в сторону коротких волн при больших концентрациях ГК (рис. 3) указывает на то, что с ростом концентрации ГК около 0,8 мМ и выше происходит укрупнение комплекса и изменение его стехиометрии. Данный результат хорошо согласуется с результатами по измерению динамической вязкости водно-этанольных растворов ГК [19], которая скачком увеличивается при $[ГК] = 0,1 \text{ мМ}$ и 0,8 мМ с дальнейшим плавным увеличением, что связывается с ростом ассоциатов, причем положение точек перегиба зависит от содержания спирта в растворе. Аналогичные скачкообразные изменения наблюдались ранее на кривой зависимости от концентрации ГК растворимости нифедипина - известного блокатора кальциевых каналов, а также зависимости интенсивности флуоресценции каротиноидов от концентрации ГК. В обоих случаях было продемонстрировано образование комплексов исследуемых соединений с ГК [18]. По изменению времени спин-спиновой релаксации T_2 протонов ГК было продемонстрировано образование мицелл ГК при ее концентрации выше 0,8 мМ [21]. Мицеллообразование исследовалось также в работе японских авторов, посвященной водорастворимым производным глицирризина, в частности, сульфатам натрия [22].

Вопросы о структуре комплексов ГК и о том, какие именно функциональные группы ГК участвуют в комплексообразовании, на сегодняшний день остаются дискуссионными. В случае комплексов СВ с ГК в настоящей работе исследовались изменения в спектрах протонного магнитного резонанса (ПМР). В спектре ПМР ГК при добавлении в раствор СВ наблюдался сдвиг линии протона при двойной связи, расположенного в центральной части молекулы вблизи карбонильной группы, что указывает на участие тритерпенового остатка в образовании комплекса с СВ. Кроме того, изменения в положении линий ПМР, наблюдающиеся для протонов нафталинового кольца СВ, позволяют предположить включение в комплекс именно этого фрагмента (рис. 2). К сожалению, перекрывание линий карбоксильных групп, также как и метильных протонов в спектре ПМР ГК не дают возможности судить об остальных вероятных кандидатах на участие в процессах ассоциации молекул ГК и образовании комплекса этого ассоциата с СВ. Таким образом приходится констатировать, что метод ЯМР, часто применяемый для анализа комплексов с циклодекстринами, используемых в фармакологии [23, 24], оказался недостаточно информативным для установления строения комплексов ГК. Кроме упомянутого выше перекрывания линий, это связано с низкой растворимостью ГК в водных растворах. Мы полагаем, что различие в чувствительности спектров ПМР к комплексообразованию циклодекстринов и ГК может быть обусловлено и открыто-цепным строением молекулы ГК. Изменения в химических сдвигах внутренних протонов циклодекстринов объясняются вытеснением молекул воды из внутренней полости при комплексообразовании, чего может не происходить в случае комплексов ГК.

Таким образом, на основании полученной информации мы можем утверждать только, что соединение “симваглизин” является молекулярным комплексом СВ с ГК в соотношении 1:4, которое стабильно в растворе при концентрациях ГК выше 0,2 мМ. Отметим, что полученные нами ранее данные [18, 25] указывают на стабильность комплексов ГК не только в водном растворе,

ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИМВАГЛИЗИНА

но и в других органических растворителях: метанол, этанол, ацетонитрил, ДМСО. Этим комплексы ГК выгодно отличаются от комплексов включения циклодекстринов.

Ингибирование 3-НМГ-СоА редуктазы симваглизином. Известно, что СВ подвергается превращениям в многочисленные продукты. С участием эстераз или путем неферментативного гидролиза образуется гидрокси-кислота симвастатина [26, 27], являющаяся более сильным ингибитором 3-НМГ-СоА редуктазы, чем исходное соединение, и именно ей приписывают гипохолестеринемический эффект СВ. Кроме того, в результате главным образом цитохром Р450 3А4 и 3А5-зависимого метаболизма, СВ превращается в три основных (3'-гидрокси-СВ, 6'-гидрокси-СВ и 3',5'-дигидродиол-СВ) и несколько минорных метаболитов, некоторые из которых также образуют гидрокси-кислоты, ингибирующие 3-НМГ-СоА редуктазу [28]. С целью установить связь ингибиторных свойств синтезированного комплекса с предшествующим метаболизмом, нами были проведены эксперименты по ингибированию синтеза мевалоната в присутствии 300 нМ симваглизина и нарастающих концентраций метирапона - ингибитора цитохрома Р450. Результаты показали, что ингибирование уменьшается с увеличением концентрации метирапона и составляет без него 37,7%, при его концентрации 10 мкМ - 18,7%, и вовсе отсутствует при концентрации 1 мМ. Таким образом, СВГ приобретает свойства ингибитора в результате цитохром Р450-, но не эстераза-зависимого метаболизма.

Определение типа и константы ингибирования было проведено с использованием двух концентраций субстрата, равных 28 и 47 мкМ, и четырех концентраций СВГ, равных 75, 150, 300 и 600 нМ. Анализ типа ингибирования графическим методом Корниш-Боуден (рис. 5а) в координатах "отношение концентрации субстрата к скорости реакции" – "концентрация ингибитора" дал величину $K_i = 94,18$ нМ и свидетельствовал о бесконкурентном типе ингибирования. Однозначным подтверждением бесконкурентного типа ингибирования являются параллельные прямые (рис. 5б) для различных концентраций субстрата, получаемые в обратных координатах "обратная скорость реакции" – "концентрация ингибитора" по методу Диксона, поскольку для такого типа ингибирования максимальная скорость реакции и константа Михаэлиса меняются в одинаковое число раз.

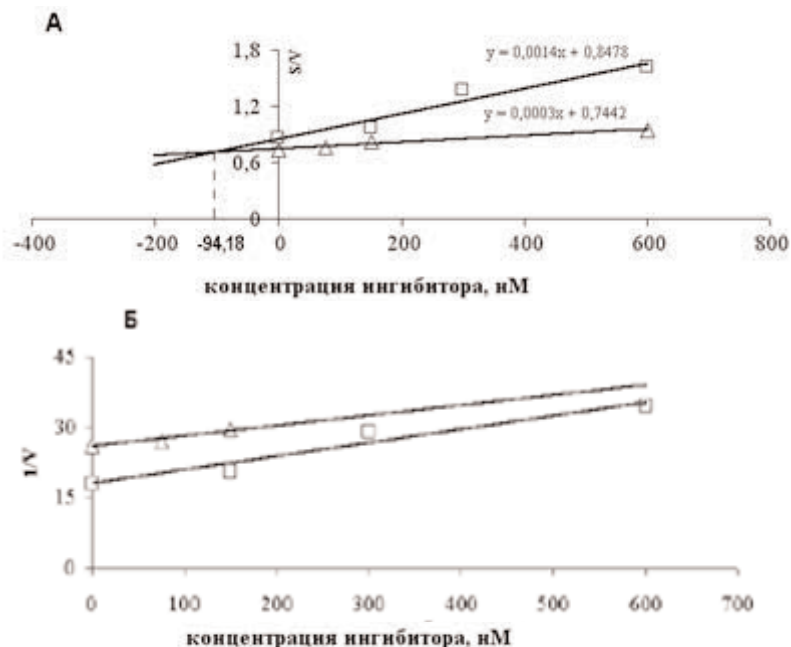


Рисунок 5.

А - Графическое определение константы ингибирования 3НМГ-СоА -редуктазы исследуемым соединением СВГ по методу Корниш-Боудена.

Б - Ингибирование 3НМГ-СоА -КоА-редуктазы исследуемым соединением СВГ по бесконкурентному типу - графический анализ по методу Диксона.

Сравнение силы ингибирования 3-НМГ-СоА-редуктазы симваглизином и симвастатином в концентрации 300 нМ, которая находится в интервале опубликованных величин IC_{50} для СВ от 100 до 300 нМ [29], показало, что оба соединения оказывают равный по силе эффект и подавляют реакцию на $39,15 \pm 8,27$ (СВ) и $38,85 \pm 3,04\%$ (СВГ).

Полученный результат является удивительным с точки зрения измеренной в настоящей работе стабильности комплекса СВГ в этих условиях. Разбавление водного или водно-спиртового раствора до концентраций ниже 0,1 мМ должно однозначно привести к частичной диссоциации комплекса. Зная стехиометрию и константу стабильности комплекса легко оценить его мольную долю в растворе при концентрации СВГ 300 нМ.

$$\frac{[СВГ]}{[СВ]} = 3 \times 10^{-14} \times [ГК]^4 = 6 \times 10^{-10}$$

При этом мы учитывали, что при стехиометрии комплекса 1:4, концентрация $ГК = 4[СВГ]$. То, что комплекс работает при столь малых концентрациях, может означать, что его терапевтическая активность существенно превышает активность исходного СВ.

Полученные в условиях *in vitro* результаты о том, что СВГ снижает K_m и V_{max} синтеза мевалоната, делали целесообразным оценить его возможного гипохолестеринемического эффекта в условиях *in vivo*.

Гипохолестеринемическое действие у крыс. Результаты измерения показателей липидного профиля сыворотки крови у крыс показывают (табл. 1), что 4-недельное кормление крыс высокожировой диетой привело к развитию выраженной ГХС: общий ХС возрос на 45% ($p < 0,01$) по сравнению с исходным уровнем. Эффекты препаратов на основные показатели липидного профиля мы оценивали в динамике обратного развития гиперхолестеринемии в период после перевода животных на стандартную лабораторную диету. Чувствительность сравнений при этом возрастает в результате снижения вклада поступающего алиментарным путем холестерина. Можно видеть, что за две недели пребывания на стандартной диете уровень общего ХС крови достоверно снизился и в контрольной, и во всех экспериментальных группах (табл. 1). Сравнение опытных групп с контрольной показало, что у животных, получавших СВ в суточной дозе 200 мкг/кг, уровень общего ХС крови ниже на 8% ($p < 0,05$). Симваглизин оказывал дозо-зависимый эффект, и дозы 665 и 1000 мкг/кг/сутки, равные в весовом эквиваленте 66 и 100 мг СВ, приводят к достоверному снижению уровня общего ХС крови на 7% и 9% ($p < 0,05$). Полученные результаты свидетельствуют о более выраженном у СВГ в сравнении с СВ гипохолестеринемическом эффекте в условиях *in vivo*, что создает возможность снижения его дозы, имея ввиду содержание СВ в СВГ.

Таблица 1. Динамика изменения уровня общего ХС крови (ммоль/л, мг/дл) у крыс в эксперименте *in vivo* при приеме СВГ.

Точки забора крови	Контроль	СВ 200 мкг/кг/сутки	СВГ 400 (СВ 40) мкг/кг/сутки	СВГ 665 (СВ 66) мкг/кг/сутки)	СВГ 1000 (СВ 100) мкг/кг/сутки)
0 недель	2,52±0,10 ммоль/л, 97,4±4,1 мг/дл				
4 недели	3,66±0,15 ммоль/л, 141,6±5,9 мг/дл (+45%)				
6 недель	2,78±0,13, 107,5±4,9*	2,49±0,12, 96,5±4,4**	2,66±0,12, 103,1±4,5**	2,53±0,13, 98,1±4,7**	2,46±0,10, 95,3±4,0**
Абсолютная разница	-24%	-32%	-27%	-31%	-33%
Разница с контролем		-8%^	-3%	-7%^	-9%^

Примечание: * - сравнение с данными 4 недель при $p < 0,05$, ** - при $p < 0,01$; ^ - сравнение с контрольной группой при $p < 0,05$. Здесь и в таблице 2 результаты представлены в виде средней ± ошибка средней.

ГИПОХОЛЕСТЕРИНЕМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СИМВАГЛИЗИНА

Содержание ЛВП-ХС в крови у крыс после приема как СВ, так и СВГ повысилось на 3-5% ($p>0,05$), а уровень ТГ крови на - 3-18% ($p>0,05$). Согласно данным других авторов, статистически достоверные изменения этих показателей можно достигнуть при использовании доз СВ, на порядок превышающие использованные нами. Так, симвастатин в суточной дозе 2,5-10 мг/кг в течение 4-6 недель у кроликов с ГХС повышает уровень ЛВП-ХС на 5-15% и снижает уровень ТГ на 10-30% [8, 33], причем в работе [30] статистическая достоверность не достигается. Оценки эффектов симвастатина у 4444 пациентов с ИБС показали, что уровень ЛВП-ХС повысился в среднем на 8% после приема доз СВ 20-40 мг/сутки [31]. Действие симвастатина на ТГ крови опосредованное и связано со снижением образования и секреции гепатоцитами ЛОНП, содержащих около 30% ТГ, и усилением связывания и катаболизма ремнантов ЛОНП апо-В,Е-рецепторами гепатоцитов [32, 33].

Гепато- и миотоксичность у крыс. Известно, что наряду с ценным терапевтическим гипохолестеринемическим эффектом, статины присущ ряд побочных эффектов, среди которых выделяются гепато- и миотоксичность. Поэтому необходимо было оценить полученный комплекс и в этом отношении. Нами не выявлено какого-либо повышения уровней печеночных АСТ и АЛТ в крови в динамике эксперимента у крыс, получавших СВ и СВГ, что указывает на отсутствие гепатотоксичности препаратов в использованных дозах (табл. 2). Более того, ранее показан гепатопротекторный эффект ГК, выражающийся в снижении активности трансаминаз и липидных пероксидов в гепатоцитах при воздействии таких токсикантов, как аллилформат, четыреххлористый углерод [6]. Уровень активности креатинфосфокиназы в крови у крыс после двухнедельного воздействия исследуемыми препаратами повысился. У крыс, получавших СВ, этот показатель возрос на 79% ($p<0,01$), а у получавших СВГ - на 30-36% ($p<0,05$). С учётом содержания СВ в симваглизине, можно констатировать сходство в силе миотоксического эффекта двух этих препаратов. Однако, более сильный гипохолестеринемический эффект обеспечивает большую безопасность симваглизина в сравнении с симвастатином.

Таблица 2. Динамика изменения уровня КФК крови (Ед/л) у крыс в эксперименте *in vivo* при приеме СВГ.

Точки забора крови	Контроль	СВ 200 мкг/кг/сутки	СВГ 400 (СВ 40) мкг/кг/сутки	СВГ 665 (СВ 66) мкг/кг/сутки)	СВГ 1000 (СВ 100) мкг/кг/сутки)
0 недель	432,7±23,9				
4 недели	373,1±21,6 (-14%)				
6 недель	384,1±15,7	667,6±26,0**	501,0±19,7*	484,6±21,0*	506,4±21,8*
Абсолютная разница	+3%	+79%	+34%	+30%	+36%
Разница с контролем		+76%^	+31%#	+27%#	+33%#

Примечание: * - сравнение с данными 4 недель при $p<0,05$, ** - при $p<0,01$; ^ - сравнение с контрольной группой при $p<0,05$, ^^ - при $p<0,01$; # - сравнение с группой СВ при $p<0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ. Как показано ранее, сам СВ является конкурентным ингибитором 3-НМГ-СоА-редуктазы [28, 34]. Структурную основу такого типа ингибирования составляет оккупация этим и другими статинами части участка связывания 3-НМГ-СоА и затруднения его доступа к активному центру фермента [35]. Физико-химической основой изменения типа ингибирования с конкурентного, присущего СВ, на бесконкурентный, выявленный для СВГ, по-видимому, является увеличение размера комплекса в сравнении с исходной молекулой СВ и наличие

несущих заряд функциональных групп у остатков глицирризиновой кислоты, что усиливает взаимодействие. Последнее, вероятно, проявляется увеличением времени распада комплекса “фермент-продукт” - кинетической основы бесконкурентного типа ингибирования [36]. Ожидаемым фармакокинетическим следствием этого должно быть замедление скорости элиминации комплекса в сравнении с симвастатином.

Принципиально важно, что ингибирующее действие СВГ на активность 3-НМГ-СоА редуктазы *in vitro* сопоставимо по силе с симвастатином, а в условиях *in vivo* холестерин-снижающий эффект СВГ превосходит таковой у СВ. Это свидетельствует о фармакологическом синергизме в результате образования комплекса симвастатина с глицирризиновой кислотой. Аналогичные проявления комплексообразования уже были показаны ранее на примере антиаритмических и гипотензивных препаратов [6, 7]. Исходя из химического строения СВГ, можно предположить большее, чем у СВ, число молекулярных мишеней, формирующих механизм его гипохолестеринемического эффекта *in vivo*. Вероятно, реализуются все присущие СВ фармакологические свойства: ингибирование 3-НМГ-СоА-редуктазы, что приводит к снижению синтеза ХС в гепатоцитах; стимуляция синтеза апо-В,Е-рецепторов к ЛНП на плазматических мембранах гепатоцитов, увеличение захвата гепатоцитами ЛНП из крови и снижение уровня холестеринемии [37]; ингибирование синтеза апо-В и за счет этого снижение образования гепатоцитами ЛНП и липопротеинов очень низкой плотности (ЛОНП), усиление связывания и катаболизма ремнантов ЛОНП апо-В,Е-рецепторами [33]. Кроме этого, ГК сама по себе обладает гиполипидемическими свойствами, являясь ингибитором активности фосфолипазы А₂ [6]. Отдельный интерес представляет возможность влияния самой ГК на активность цитохрома Р450 и всего набора микросомальных монооксигеназ. Известно, что *in vivo* ГК индуцирует цитохром Р450 и монооксигеназы [38], тогда как *in vitro* зарегистрированы ингибирующие эффекты ГК для цитохрома Р450 и NADPH-СYP редуктазы [39]. Возможны также различия в фармакокинетике СВ и СВГ вследствие физико-химических различий и вытекающих из них различий в транспорте и биотрансформации, что требует специального изучения.

Таким образом, результаты работы позволяют сделать следующие выводы:

1. Полученное соединение симвастатина с глицирризиновой кислотой (симваглизин) является молекулярным комплексом СВ с ГК в соотношении 1:4, стабильным в растворе при концентрациях ГК выше 0,2 мМ.
2. Симваглизин является ингибитором 3-НМГ-СоА редуктазы бесконкурентного типа.
3. В эксперименте на крысах симваглизин проявил себя более эффективным и безопасным гипохолестеринемическим агентом в сравнении с симвастатином.

Работа поддержана грантом ФЦНТП Минпромнауки РФ (тема № ИБ-37/02 по государственному контракту № 43.004.11.2535, 2004 г.) и Интеграционным проектом СО РАН и СО РАМН (№ 53, 2006-2008 гг.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Anderson K.M., Castelli W.P., Levy D. (1987) J. Am. Med. Assoc., **257**, 2176-2180.
2. Оганов Р.Г., Масленникова Г.Я. (2002) Кардиоваск. тер. профил., **3**, 4-8.
3. Диагностика и коррекция нарушений липидного обмена с целью профилактики и лечения атеросклероза. Российские рекомендации ВНОК. (2004) Кардиоваск. тер. профил.; 2 (прил.), 36 с.

4. *Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults: Executive Summary of the Third Report of the National Cholesterol Education, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III)*. (2001) JAMA, **285**, 2486-2497.
5. *Puddu P., Puddu G.M., Muscari A.* (2001) Acta Cardiol., **56**, 225-231.
6. Толстиков Г.А., Балтина Л.А., Шульц Э.Э., Покровский А.Г. (1997) Биоорганич. химия, **23**, 691-703.
7. Толстикова Т.Г., Сорокина И.В., Брызгалов А.О., Долгих М.П., Лифшиц Г.И., Хвостов М.В. (2006) Рациональная фармакотерапия в кардиологии, **1**, 55-58.
8. *Kobayashi M., Ishida F., Takahashi T., Taguchi K., Watanabe K., Ohmura I., Kamei T.* (1989) Jpn. J. Pharmacol., **49**, 125-133.
9. *Ishida F., Watanabe K., Sato A., Taguchi K., Kakubari K., Kitani K., Kamei T.* (1990) Biochim. Biophys. Acta, **1042**, 365-373.
10. *Hayashi T., Rani P.J.A., Fukatsu A., Matsui-Hirai H., Osawa M. Miyazaki A., Tsunekawa T., Kano-Hayashi H., Iguchi A., Sumi D.* (2004) Atherosclerosis, **176**, 255-263.
11. *Swift L.L., Soule P.D., LeQuire V.S.* (1982) J. Lipid Res., **23**, 962-971.
12. *Salter A.M., Hayashi R., Alseeni M., Brown N.F., Bruce J., Sorensen O., Atkinson E.A., Middleton B., Bleackley R.C., Brindley D.N.* (1991) Biochem J., **276**, 825-832.
13. *Kleinsek D.A., Ranganathan S., Porter J.W.* (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 1431-1435.
14. *Kleinsek D.A., Jabalquinto A.M., Porter J.W.* (1980) J. Biol. Chem., **255**, 3918-3923.
15. *Jemal M., Schuster A., Whigan D.B.* (2003) Rapid Commun. Mass Spectrom., **17**, 1723-1734.
16. *Scharnagi H., Marz W., Schliak M., Loser R., Gross R.* (1995) J. Lipid Res., **36**, 622-627.
17. *Lopez E.A., Bosque-Sendra J.M., Rodriguez L.C., Campana A.M.J., Aaron J.J.* (2003) Anal. Bioanal. Chem., **375**, 414-417.
18. *Polyakov N.E., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F., Kispert L.D.* (2006) J. Phys. Chem. B., **110**, 6991-6998.
19. Романко Т.В., Муринов Ю.И. (2001) Журн. физ. химии, **75**, 1601-1604.
20. Сангалов Е.Ю. (1999) Журн. Общ. Химии, **69**, 667-670.
21. Гусаков В.Н., Майстренко В.Н., Сафиуллин П.П. (2001) Журн. общ. химии, **71**, 1382-1386.
22. *Saito S., Furumoto T., Ochiai M., Hosono A., Hoshino H., Haraguchi U., Ikeda R., Shimada N.* (1996) Eur. J. Med. Chem., **31**, 365-369.
23. *Polyakov N.E., Leshina T.V., Hand E.O., Petrenko E., Kispert L.D.* (2003) J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **161**, 216-223.
24. *Polyakov N.E., Leshina T.V., Konovalova T.A., Hand E.O., Kispert L.D.* (2004) Free Radicals Biol. Med., **36**, 872-880.
25. *Polyakov N.E., Khan V.K., Taraban M.B., Leshina T.V., Salakhutdinov N.F., Tolstikov G.A.* (2005) J. Phys. Chem. B., **109**, 24526-24530.
26. *Prueksaritanont T., Gorham L.M., Ma B., Liu L., Yu X., Zhao J.J., Slaughter D.E., Arison B.H., Veas K.P.* (1997) Drug Metab. Dispos., **25**, 1191-1199.
27. *Prueksaritanont T., Ma B., Yu N.* (2003) Br. J. Clin. Pharmacol., **56**, 120-124.
28. *Vickers S., Duncan C.A., Vyas K.P., Kari P.H., Arison B., Prakash S.R., Ramjit H.G., Pitzenberger S.M., Stocker G., Duggan D.E.* (1990) Drug Metab. Dispos., **18**, 476-483.
29. *Dansette P.M., Jaoen M., Pons C.* (2000) Exp. Toxicol. Pathol., **52**, 145-148.
30. *Plosker G.L., McTavish D.* (1995) Drugs, **50**, 334-363.
31. *Scandinavian Simvastatin Survival Study Group: Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S).* (1994) Lancet, **344**, 1383-1389.
32. *Alberts A.W.* (1990) Cardiology, **77**, 14-21.

33. Ginsberg H.N., Le N.A., Short M.P., Ramakrishnan R., Desnick R.J. (1987) J. Clin. Investigations, **80**, 1692-1697.
34. Hoffman W.F., Alberts A.W., Anderson P.S., Chen J.S., Willard A.K. (1986) J. Med. Chem., **29**, 849-852.
35. Istvan E.S. (2002) Amer. Heart J., **144**, S27-S32.
36. Корниш-Бойден Э. (1979) Основы ферментативной кинетики, Мир, Москва.
37. Lennernas H., Fager G. (1997) Clin Pharmacokinet., **32**, 403-425.
38. Paolini M., Barrilari J., Broccoli M., Pozzetti L., Perocco P. (1999) Cancer Lett., **145**, 35-42.
39. Liu K.H., Kim M.J., Jeon B.H., Shon J.H., Cha I.J., Cho K.H., Shin J.G. (2006) J. Clin. Pharm. Ther., **31**, 83-91.

Поступила: 04. 10. 2007.

CHOLESTEROL LOWERING PROPERTIES OF COMPLEX COMPOUND SIMVASTATIN WITH GLYCYRRHIZIC ACID (SIMVAGLYZIN) IN EXPERIMENTAL MODELS

V.A. Vavilin¹, N.F. Salakhutdinov², Yu.I. Ragino³, N.E. Polyakov⁴, M.B. Taraban⁴, T.V. Leshina⁴, E.M. Stakhneva³, Yu.P. Nikitin³, V.V. Lyakhovich¹, G.A. Tolstikov²

¹Institute of Molecular Biology and Biophysics Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, Acad. Timakova ul., 2, Novosibirsk, 630117 Russia; fax: (383)332-31-47; e-mail: drugsmet@soramn.ru

²Novosibirsk Institute of Organic Chemistry Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Acad. Lavrentjeva pr., 9, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail: anvar@nioch.nsc.ru

³Institute of Internal Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences, B. Bogatkov ul., bd. 175/1, Novosibirsk, 630089 Russia, e-mail: office@iimed.ru

⁴Institute of Chemical Kinetics and Combustion, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul., 3, Novosibirsk, 630090 Russia, e-mail: root@ns.kinetics.nsc.ru

A molecular complex of simvastatin (SV) and glycyrrhizic acid (GA) (at the ratio of 1 : 4), has been synthesized. The complex named "simvaglyzin" (SVG) was stable in aqueous and aqua-alcohol solutions at GA concentrations exceeding 0.2 mM. *In vitro* SVG acted as uncompetitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA reductase (K_i = 94 nM). Appearance of this inhibitory activity is associated with the cytochrome P450-dependent conversion of SVG. The addition of 1 mM methyrapone into incubation medium fully prevented the inhibition of 3-HMG-CoA reductase. SV and SVG (used at 300 nM concentration) inhibited mevalonate synthesis rate by 39,15±8,27% and 38,85±3,04%, respectively. *In vivo* SVG showed dose-dependent cholesterol-lowering effect. In rats the cholesterol-lowering effect of SVG used at daily doses corresponding to 66 and 100 mg/kg of SV was equal to the effect of the daily dose 200 mg/kg of SV. The decreases of total cholesterol level in blood serum were 7%, 9% and 8%, respectively. Myotoxicity of those SVG doses estimated by creatine phosphokinase (CPK) activity in blood serum was lower than that of SV. In rats treated with SV the activity of CPK increased by 79% (p<0,01), while in SVG treated rats by 30% and 36% (p<0,05). Any increase of hepatotoxicity markers alanine aminotransferase or aspartate aminotransferase in blood serum was not observed. The data suggest pharmacological synergism attributed to the SV-GA complex formation and elevated safety of the resultant complex compared with the parent compound.

Key words: simvaglyzin, simvastatin, glycyrrhizic acid, 3-HMG-CoA-reductase inhibition, hypercholesterolemia in rats.