

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Ярославский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Кафедра клинической фармакологии и этики применения лекарств ЮНЕСКО

**Выпускная квалификационная работа**

Специальность «Медицинская биохимия», 30.05.01

Уровень подготовки специалитет

**Тема работы:**

**Изучение острой токсичности инновационного препарата Оксазопт для  
лечения открытоугольной глаукомы на нелинейных  
породах крыс и мышей**

Выполнил:

Кистол Денис Викторович, 6 курс, группа 1

Дата 30 апреля 2021 г.

Подпись \_\_\_\_\_

Руководитель работы: Хохлов Александр Леонидович, чл.-кор. РАН, д-р мед. наук, проф.

Подпись \_\_\_\_\_

Отметка о допуске к защите:

секретарь ГЭК

Вологина Юлия Александровна, ассистент

Дата \_\_\_\_\_

Подпись \_\_\_\_\_

Ярославль, 2021 г.

## СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР.....	8
1.1. Глаукома: эпидемиология .....	8
1.2. Этиология и факторы риска развития глаукомы .....	9
1.3. Современные взгляды на патогенез глаукомы .....	10
1.4. Современные подходы к медикаментозной терапии глаукомы .....	12
1.5. Карбоангидразы: классификация, физиологические функции .....	16
1.6. Строение активного центра, механизм каталитической активности ...	19
1.7. Варианты механизмов ингибирования активности карбоангидраз.....	23
1.7.1. Ингибирование за счет связывания с ионом цинка $Zn^{2+}$ .....	24
1.7.2. Ингибирование за счет связывания с цинк-связанной водой .....	24
1.7.3. Ингибиторы, перекрывающие вход в полость активного сайта .....	25
1.7.4. Ингибирование за счет связывания вне активного сайта.....	26
1.8. Ингибиторы карбоангидраз как группа лекарственных препаратов для лечения глаукомы .....	28
1.9. Оксазопт – селективный ингибитор изоформы карбоангидразы II.....	31
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ .....	33
2.1. Материалы .....	33
2.2. Животные.....	33
2.3. Методология .....	34
2.4. Статистическая обработка результатов .....	35
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	36

3.1. Параметры острой токсичности Оксазопта у мышей при внутрижелудочном введении.....	36
3.2. Параметры острой токсичности Оксазопта у мышей при внутрибрюшинном введении.....	37
3.3. Параметры острой токсичности Оксазопта у крыс при внутрижелудочном введении.....	38
3.4. Параметры острой токсичности Оксазопта у крыс при внутрибрюшинном введении.....	40
3.5. Исследование вероятной кумуляции .....	41
3.6. Выводы.....	42
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	44
ЛИТЕРАТУРА .....	46

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – артериальная гипертензия

АД – артериальное давление

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота

АФС – активная фармацевтическая субстанция

ВГД – внутриглазное давление

ВГЖ – внутриглазная жидкость

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ГКС – ганглиозные клетки сетчатки

ДНЗ – диск зрительного нерва

ИКА – ингибиторы карбоангидразы

КА – карбоангидраза

КА-РБ – карбоангидраза-родственные белки

ЛД<sub>13</sub> – средняя доза вещества, вызывающая гибель 13% членов испытываемой группы

ЛД<sub>50</sub> – средняя доза вещества, вызывающая гибель 50% членов испытываемой группы

ЛД<sub>84</sub> – средняя доза вещества, вызывающая гибель 84% членов испытываемой группы

ПОУГ – первичная открытоугольная глаукома

СД – сахарный диабет

чКА – карбоангидраза человека

AG (Anchor Group) – якорная группа

Asn – аспарагин

Glu – глутамин

His – гистидин

Leu – лейцин

PG (prostaglandins) – простагландины

SG (Sticky Group) – липкая группа

Thr – треонин

Trp – триптофан

Tyr – тирозин

Val – валин

ZBG (Zinc-Binding Group) – цинк-связывающая группа

Å – ангстрем – внесистемная единица измерения длины, равная  $10^{-10}$  м

## ВВЕДЕНИЕ

Глаукома – это заболевание, при котором повреждается зрительный нерв глаза, что приводит к быстро прогрессирующей потере зрения, и его возникновение ассоциируется с высоким внутриглазным давлением. Важной отличительной чертой глаукомы является её прогрессирующий хронический характер. В свою очередь, имеющиеся в текущий момент медикаментозные средства не обеспечивают пролонгированного эффекта, в связи с чем требуют постоянный частый прием. Кроме того, в процессе лечения необходим систематический мониторинг эффективности и безопасности терапии. Это всё обуславливает постоянные значительные затраты на лечение, которые во многом ложатся на государственные бюджеты различных уровней. Поэтому перспективным направлением в медикаментозной терапии глаукомы является разработка новых лекарственных средств, обладающих более длительным терапевтическим действием и низкой частотой нежелательных реакций [29, 31, 34].

Объектом исследования является инновационный препарат «Оксазопт» (4-(2-метил-1,3-оксазол-5-ил)-бензолсульфонамид) – активная фармацевтическая субстанция для лечения открытоугольной глаукомы на основе высокоселективного ингибитора карбоангидразы II, которая является разработкой Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославского государственного педагогического университета им. К.Д. Ушинского». Активная фармацевтическая субстанция разработанного лекарственного средства представляет собой низкомолекулярный биядерный азолсодержащий сульфонамид.

Исследование острой токсичности лекарственного вещества производилось на базе Центра трансфера фармацевтических технологий им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «Ярославского государственного педагогического универ-

ситета им. К.Д. Ушинского». Для исследования использовались методы эксперимента на лабораторных животных (крыса, мышь) и статистического анализа полученных в ходе исследования результатов.

Целью дипломной работы является исследование острой токсичности инновационного лекарственного средства на основе азолсодержащего сульфонида для лечения открытоугольной глаукомы путем селективного ингибирования карбоангидразы II.

В связи с поставленной целью необходимо решить следующие задачи:

1. Оценить общетоксическое действие при однократном введении субстанции.
2. Определить переносимые, токсические и летальные дозы фармакологического вещества при однократном введении.
3. Определить зависимость токсических эффектов при увеличении дозировок при однократном применении.
4. Определить класс опасности на основании данных острой токсичности.

# ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

## 1.1. Глаукома: эпидемиология

Глаукома – одно из наиболее распространенных хронических глазных заболеваний, которое может привести к необратимым изменениям органа зрения и стать причиной слепоты, характеризующееся тремя основными признаками: (1) периодическим или постоянным повышением внутриглазного давления (ВДГ), (2) атрофией зрительного нерва и (3) характерными изменениями поля зрения [15].

Как в мире, так и в России глаукома занимает лидирующие позиции среди причин необратимой слепоты, что представляет собой важную медико-социальную проблему. Стоит отметить, что глаукома стоит на втором месте в структуре причин слепоты (21,6%), незначительно уступая первому последствием травм органа зрения (22,8%) [15]. Согласно данным ВОЗ, количество больных глаукомой в мире составляет 105 млн. человек, из которых 5,2 млн. слепы на оба глаза, что в среднем составляет 13,5% от всех случаев слепоты в мире [44].

Данные по заболеваемости в России широко варьируют: так, число больных глаукомой находится в интервале от 750 тыс. до 1,3 млн. [44]. При этом стоит отметить, что в последние годы заболеваемость глаукомой в Российской Федерации в 1,5-2 раза превышает среднеевропейский показатель. Женщины чаще болеют первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ) (56,6%), мужчины – несколько реже (43,4%). При этом возрастной интервал пациентов довольно широкий – от 40 до 90 лет, но дебют заболевания чаще возникает после 65 лет [15].

Исходя из данных статистики, в 2010 году количество больных глаукомой составляло 60,5 млн. человек в мире [27]. В 2020 году количество возросло до 76,0 млн. [11]. Если верить прогнозам, распространенность заболевания



должна неуклонно расти, и к 2040 году на долю больных глаукомой будет приходиться 111,8 млн. [27].

## **1.2. Этиология и факторы риска развития глаукомы**

Факторы, способствующие развитию и прогрессированию глаукомы, разнообразны и хорошо изучены. Условно можно разделить их на две группы: системные и локальные [15, 17].

Среди системных факторов выделяют наследственность, этническую принадлежность, возраст. Немаловажную роль играют органические (атеросклероз) и функциональные (сосудистая дисрегуляция, мигрень, болезнь Рейно, системная гипотензия) нарушения кровообращения, изменения реологии крови и нарушения системы гемостаза, пониженное перфузионное давление (разница  $\leq 50$  мм рт. ст. между диастолическим уровнем АД и величиной офтальмотонуса), артериальная гипертензия (АГ) и сахарный диабет (СД) [10, 15, 45]. Кроме того, сосудистые, эндокринные и обменные процессы также вносят свой вклад в развитие заболевания, поскольку способны изменять выраженность и распространенность дистрофических изменений [16].

Локальные факторы обусловлены анатомическими особенностями, предрасполагающими к блокаде шлеммова канала, что снижает эффективность механизма цилиарная мышца-склеральная шпора-трабекула, который отвечает за растягивание трабекулярной сети и обеспечивает поддержание шлеммова канала в открытом состоянии [16]. Сюда же стоит отнести миопию, раннее развитие пресбиопии, изменения вязкоэластических свойств фиброзной оболочки глаза, геморрагии на диске зрительного нерва (ДЗН), дистрофические изменения в трабекулярном аппарате, радужке и цилиарном теле, длительное применение стероидных инсталляционных препаратов и др. Последнее, в свою очередь, приводит к прогрессирующему ухудшению оттока ВГЖ из глаза и нарушению гидродинамики [15, 16, 45].

Согласно ряду исследований, дополнительно к факторам, предрасполагающим к развитию глаукомы, относят дислипидемию, курение, синдром обструктивного апноэ сна, деменцию и болезнь Альцгеймера, *Helicobacter pylori* [45].

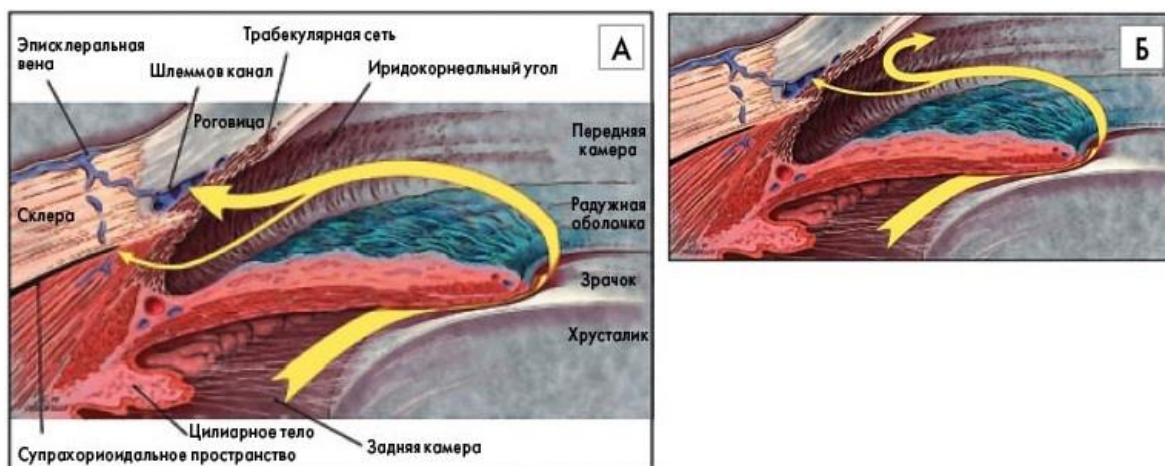
С другой стороны, глаукому можно рассматривать в качестве заболевания с генетической предрасположенностью. Имеются данные о возможном наличии определенных генов-маркеров, ассоциированных с глазными болезнями, в том числе и глаукомой. Среди таких генов наиболее подробно изучены *MYOC*, *OPTN* и *WDR36* [6].

Таким образом, глаукому целесообразней рассматривать как полиэтиологичное заболевание. В этом контексте понятие «причина» следует заменить понятием «фактор риска» из чего вытекает, что большое число факторов риска обуславливает развитие болезни [13].

### **1.3. Современные взгляды на патогенез глаукомы**

Патогенетические звенья развития глаукомы разнообразны и складываются из большого числа факторов, таких как механические, дегенеративные, сосудистые [18]. Выделяют три основные патогенетические теории в развитии глаукомы: механическая, сосудистая и метаболическая [10, 13].

В основе первой, механической теории, причиной развития заболевания является повышенное ВГД, которое возникает в результате дисбаланса между образованием и удалением водянистой влаги (рисунок 1) [45]. В свою очередь, это приводит к механической деформации решетчатой пластинки склеры, гибели аксонов ганглиозных клеток сетчатки и нарушению микроциркуляции крови в этой зоне [10, 13, 14, 16], и как итог – атрофия зрительного нерва и утрата зрения.



**Рисунок 1** – Отток водянистой влаги в норме и при патологии. А – нормальный отток водянистой влаги через трабекулярную сеть (широкая стрелка) и увеосклеральный путь (маленькая стрелка). Большая часть водянистой влаги оттекает через трабекулярную сеть. Каждый путь дренируется в венозную сеть глаза. Б – ПОУГ: отток через трабекулярную сеть и увеосклеральный путь уменьшен [45]

Сосудистая теория первостепенную роль отводит интравазальным динамическим нарушениям, реализуемым через цепочку ишемия-гипоксия-реперфузия, которые находятся в тесной взаимосвязи с гидродинамическими расстройствами, обеспечивая в значительной степени механическое повреждение головки зрительного нерва с экскавацией [10, 13].

Метаболические сдвиги в условиях ишемии и гипоксии сопровождаются активацией процессов гликолиза, липолиза, протеолиза, развитием метаболического и респираторного ацидоза, набуханием митохондрий, разобщением окислительного фосфорилирования и свободного дыхания, дефицитом АТФ, подавлением энергозависимых реакций в клетках различной структурной и функциональной организации. В тканях нервной системы особенно интенсивно происходят процессы перекисного окисления липидов, так как они богаты ненасыщенными жирными кислотами и являются абсолютно аэробными. Начальные компенсаторные механизмы сохранения энергетических

субстратов со временем истощаются, что приводит к активации мембрано-повреждающих факторов. Эти процессы наряду с участием трофических факторов, поступающих из головного мозга, делают ганглиозные клетки сетчатки еще более чувствительными к вторичным повреждающим агентам, таким как L-глутамат, эндотелин-1, оксид азота, активные формы кислорода и т. п. [10, 13]. Так формируется «порочный круг» патофизиологических процессов, которые приводят к нарушению аксоплазматического транспорта в ганглиозные клетки сетчатки (ГКС), снижению устойчивости нервных клеток к стимуляторам апоптоза – эксайтаминокислотам и, в конечном счете, к гибели ГКС [13].

В настоящее время, по мнению ряда исследователей, глаукому можно рассматривать в качестве нейродегенеративного заболевания. Прослеживается некоторое сходство с такими заболеваниями как болезнь Альцгеймера, сенильная деменция, болезнь Паркинсона. Группа нейродегенеративных заболеваний имеет ряд схожих признаков: медленное прогрессирующее течение, транссинаптическая дегенерация, общие механизмы клеточной гибели (апоптоз и эксайтотоксичность), избирательная гибель нейронов. Данное предположение также подтверждает тот факт, что глаукома чаще встречается у лиц, страдающих Альцгеймером (25,9%) [10, 13, 45].

#### **1.4. Современные подходы к медикаментозной терапии глаукомы**

Основными направлениями снижения ВГД являются медикаментозная гипотензивная терапия, лазерное и хирургическое лечение [8, 9, 15, 18, 20]. Однако, несмотря на большой арсенал методов коррекции ВГД, именно медикаментозная терапия играет важнейшую роль в лечении глаукомы. В настоящее время при применении антигипертензивной терапии используются следующие основные принципы: (1) снижение уровня ВГД (достижение «целевого давления»); (2) улучшение глазного кровотока; (3) нейропротекция [15]. В то

же время, большее значение придается первому принципу, так как в медицинской практике существует множество препаратов, действующих в направлении снижения ВГД.

Все гипотензивные препараты для лечения глаукомы по механизму действия можно разделить на две основные группы: (1) препараты, улучшающие отток внутриглазной жидкости (ВГЖ) и (2) препараты, снижающие ее образование [8, 15]. В свою очередь, каждая группа включает в себя различные классы лекарственных средств. Препараты, улучшающие отток ВГЖ, включают простагландины (простамиды) и холиномиметики (М-холиномиметики); препараты, снижающие выработку ВГЖ – симпатомиметики ( $\alpha_2$ -адреномиметики), адреноблокаторы ( $\beta$ -адреноблокаторы,  $\beta$ - и  $\alpha$ -адреноблокаторы (гибридные)) и ингибиторы карбоангидразы (ИКА) [8, 15]. Каждый класс препаратов имеет как преимущества, так и недостатки, которые должны быть учтены при проведении терапии.

**Простагландины.** Эта группа включает 0,005% Латанопрост, 0,0015 Тафлупрост, 0,004% Травопрост. Препараты данной группы (аналоги простагландина  $F_{2\alpha}$ ) способствуют улучшению оттока ВГЖ по увеосклеральному пути, оказывая свое действие на PG-рецепторы [15]. Данная группа оказывает наибольший гипотензивный эффект (на 25-30% по сравнению с другими препаратами) при минимальных побочных эффектах (таблица 1). Среди местных побочных реакций можно отметить кратковременное чувство жжения, гиперемию конъюнктивы, увеличение пигментации радужки и длины ресниц, а также повышение риска развития увеита [8].

**Таблица 1** – Средняя степень снижения ВГД для разных групп гипотензивных препаратов [18]

Наименование группы препаратов	Степень понижения ВГД (в % от исходного)
--------------------------------	---

Простагландины	25-30
Простамиды	30-35
$\alpha_2$ -агонисты	20-25
$\beta$ -блокаторы	20-25
Ингибиторы карбоангидразы	15-20
Холиномиметики	20-25
Симпатомиметики	15-20

**М-холиномиметики.** В настоящее время применяют 1%-ный и 2%-ный растворы солянокислого пилокарпина. Продолжительность гипотензивного эффекта водного раствора значительно варьирует, что обусловлено особенностями внутриглазной фармакокинетики препарата. Поэтому для пролонгированного эффекта используют 0,5-1% раствор метилцеллюлозы, 2% раствор карбоксиметилцеллюлозы и 5-10% растворы поливинилового спирта, которые хорошо адсорбируются и обладают меньшим раздражающим действием [9, 15, 18]. Гипотензивный эффект обусловлен стимуляцией М-холинорецепторов парасимпатической нервной системы, что вызывает миоз и сокращение цилиарной мышцы. Сужение зрачка приводит к раскрытию угла передней камеры, а сокращение цилиарной мышцы улучшает отток водянистой влаги [9, 15]. Местные побочные эффекты могут выражаться в появлении миоза, на фоне которого сужаются поля зрения, при длительном применении – в виде аллергического дерматита век и конъюнктивита. Эффекты системного действия, проявляющиеся бронхоспазмом, усилением перистальтики кишечника, саливацией, болями в эпигастрии, потоотделением, затруднением мочеиспус-

кания, обусловлены влиянием на  $M_2$ -холинорецепторы сердца и  $M_3$ -холинорецепторы гладких мышц и экзокринных желез, что лимитирует его широкое и длительное использование данной группы в терапии глаукомы [8, 15].

**Симпатомиметики.** Для снижения уровня ВГД используют  $\alpha_2$ -адреноагонисты: 0,125%, 0,25% и 0,5% Клонидин и 0,15% Бримонидин. Фармакодинамика Бримонидина связана с активацией  $\alpha_2$ -адренорецепторов: уменьшение секреции ВГЖ способствует улучшению оттока по увеосклеральному пути с последующим снижением ВГД на 18-25%. Клонидин действует на пре- и постсинаптические  $\alpha_2$ -адренорецепторы, что снижает продукцию ВГЖ и, следовательно, ВГД [9, 15]. Применение Клонидина в настоящее время ограничено из-за серьезных системных реакций (сонливость, замедление скорости психических и двигательных реакций), поскольку препарат обладает высокой системной абсорбцией. Системные побочные эффекты Клонидина и Бримонидина почти одинаковы, но системное всасывание последнего происходит медленно, что снижает риск их развития [15].

**Адреноблокаторы.** Данная группа включает в себя: (1) неселективные  $\beta$ -адреноблокаторы (0,25%, 0,5% Тимолол), (2) селективные  $\beta_1$ -адреноблокаторы (0,25%, 0,5% Бетоксалол) и (3)  $\alpha$ - и  $\beta$ -адреноблокаторы (1%, 2% Проксодолол). Блокируя  $\beta$ -адренорецепторы цилиарного тела, препараты подавляют секрецию ВГЖ и, как следствие, способствуют снижению ВГД. Все препараты данной группой характеризуются серьезными побочными системными действиями (аритмия, гипотония, брадикардия, сердечная недостаточность), а селективные  $\beta_1$ -адреноблокаторы не могут быть использованы больными синусовой аритмией и бронхиальной астмой [15].

**Ингибиторы карбоангидразы.** Сейчас используют ингибиторы КА II местного действия (1% Бринзоламид и 2% Дорозоламид), поскольку применение системных ИКА (Ацетозоламид) ограничено в виду серьезных системных побочных реакций (онемение и покалывание в конечностях, преходящая миопия, слабость, потеря аппетита и тошнота, уретральные колики). Эта группа

антиглаукоматозных лекарственных средств, оказывая достаточно выраженное гипотензивное действие (ВГД снижается на 15-20% от исходного), практически лишена побочных эффектов системного характера [8, 9, 15]. Тем не менее, могут наблюдаться локальные побочные эффекты: сухость глаз, ощущение инородного тела в глазу, гиперемия сосудов конъюнктивы и склеры, слезотечение [9, 12, 15, 18].

### 1.5. Карбоангидразы: классификация, физиологические функции

Карбоангидразы (КА, ЕС 4.2.1.1) представляют собой суперсемейство металлоферментов, которые катализируют обратимую гидратацию/дегидратацию диоксида углерода/бикарбонат-иона (реакция 1) [32, 36, 43]:



На сегодняшний день известно несколько семейств КА:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ -,  $\zeta$ -,  $\eta$ -,  $\theta$ -семейства [43].  $\alpha$ -КА обнаружены у млекопитающих (в том числе, и у человека), бактерий, водорослей [30, 36, 40]; КА некоторых архей (*Methanobacterium thermoautotrophicum*) [26], многих бактерий, хлоропластов высших растений принадлежат к  $\beta$ -семейству [30, 36, 40];  $\gamma$ -КА присутствуют у архей (впервые были выделены из метаногенной археи *Methanosarcina thermophila*) [26] и у некоторых бактерий [31]; два редких семейства  $\delta$  и  $\gamma$  обнаружены у диатомовых водорослей [25, 26, 30, 36];  $\eta$ -КА встречаются у простейших [30].

Карбоангидразы человека (чКА) относятся к  $\alpha$ -семейству. Существует 16 изоформ  $\alpha$ -КА человека, три из которых являются акаталитическими (таблица 2) [36]. Среди активных форм изоферментов есть несколько цитозольных форм (КА I-III, КА VII, КА XIII), четыре мембраносвязанных изофермента (КА IV, КА IX, КА XII и КА XIV), митохондриальная форма (КА VA и VB), а также секретлируемый изофермент КА (КА VI) [26, 36, 40]. Семейство чКА, помимо каталитических изоформ, включает подкласс трех некаталитических изоформ (чКА VIII, X и XI), называемых КА-родственными белками (КА-РБ) [36]. КА



присутствует во многих органах и тканях (таблица 3): клетках почечных канальцев, слизистой оболочке желудка, поджелудочной железе, радужной оболочке, роговице, реснитчатом теле глаза, мозге и эритроцитах [20, 26].

**Таблица 2** – Изоформы  $\alpha$ -КА высших позвоночных, их каталитическая активность, сродство к сульфаниламидным ингибиторам и субклеточная локализация [26]

<b>Изоформа</b>	<b>Каталитическая активность (гидратация CO<sub>2</sub>)</b>	<b>Сродство к сульфаниламидам</b>	<b>Субклеточная локализация</b>
КА I	низкая	среднее	цитозоль
КА II	высокая	очень высокое	цитозоль
КА III	очень низкая	очень низкое	цитозоль
КА IV	высокая	высокое	плазматическая мембрана
КА V	средняя-высокая <sup>#</sup>	высокое	митохондрия
КА VI	умеренная	средне-низкое	выделяется в слюну
КА VII	высокая	очень высокое	цитозоль
КА-СБ VIII	акаталитическая	*	цитозоль
КА IX	высокая	высокое	плазматическая мембрана
КА-СБ X	акаталитическая	*	цитозоль
КА-СБ XI	акаталитическая	*	цитозоль

КА XII	низкая	низкое	плазматическая мембрана
КА XIII	низкая	высокое	цитозоль
КА XIV	высокая	высокое	плазматическая мембрана

# Умеренная при рН 7,4, высокая при рН 8,2 или выше

\* Нативные изоферменты КА-РБ не содержат Zn (II), поэтому их сродство к сульфаниламидным ингибиторам не может быть измерена. Посредством сайт-направленного мутагенеза можно модифицировать эти белки и преобразовать их в ферменты с КА-подобной активностью, которые, вероятно, ингибируются сульфаниламидами, но в настоящее время нет исследований по этому вопросу

**Таблица 3** – Распределение изоформ чКА в организме по тканям/органам [36]

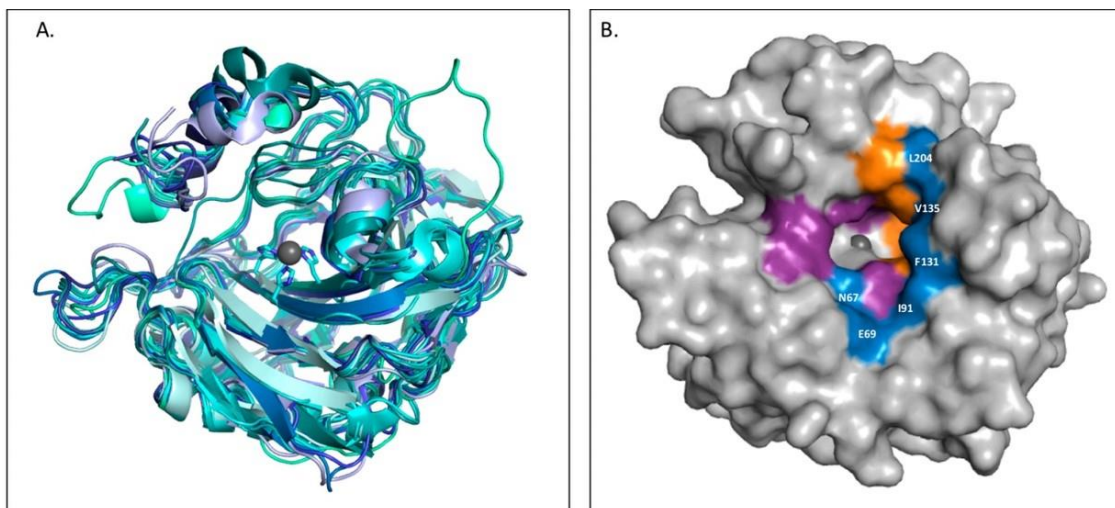
<b>Изоформа</b>	<b>Ткань/орган</b>
КА I	Эритроциты, желудочно-кишечный тракт
КА II	Эритроциты, желудочно-кишечный тракт, глаза, остеокласты, почки, легкие, яички, мозг
КА III	Скелетные мышцы, адипоциты
КА IV	Почки, легкие, поджелудочная железа, мозг, капилляры, толстая кишка, сердечные мышцы
КА VA	Печень

KA VB	Сердце и скелетные мышцы, поджелудочная железа, почки, желудочно-кишечный тракт, спинной мозг
KA VI	Слюнные и молочные железы
KA VII	ЦНС
KA-СБ VIII	ЦНС
KA IX	Опухоли слизистой оболочки ЖКТ
KA-СБ X	ЦНС
KA-СБ XI	ЦНС
KA XII	Почечный, кишечный, репродуктивный эпителий, глаз, опухоли
KA XIII	Почки, мозг, легкие, кишечник, половые пути
KA XIV	Почки, мозг, печень

### **1.6. Строение активного центра, механизм каталитической активности**

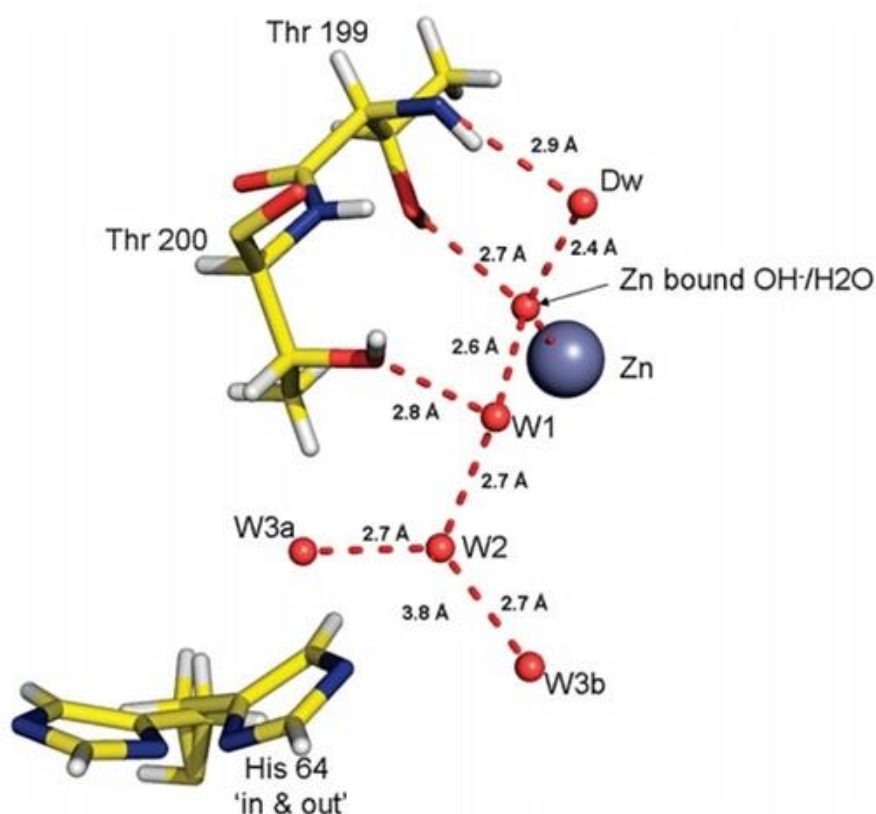
Каталитические домены всех чКА имеют высококонсервативную последовательность и трехмерную структуру. Структура активного сайта  $\alpha$ -КА является консервативной и имеет коническую форму с цинк-ионом  $Zn^{2+}$ , расположенным в основании глубиной 15 Å, который координируется тремя консервативными остатками гистидина (His94, His96, His119), формируя при этом тетраэдрический комплекс, в котором четвертая координационная связь может быть образована молекулой растворителя ( $H_2O/OH^-$ ) или же молекулой-ингибитором [22, 26, 30, 37]. чКА II является наиболее изученной изоформой данного фермента. Полость активного сайта образована гидрофобной (Val121, Val143, Leu198, Val207 и Trp209) и гидрофильной (Tyr7, Asn62, His64,

Asn67, Thr199 и Thr200) областями [26, 37] (рисунок 2). Фермент переходит в активную форму, когда  $Zn^{2+}$ -ион связывает гидроксил-ион. При этом важную роль играет His64, активно участвующий в протонном челноке, который отвечает за превращение связанной с  $Zn^{2+}$  молекулы воды в гидроксил-ион перед катализом [26].



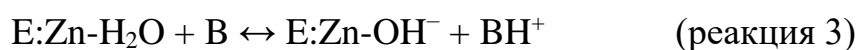
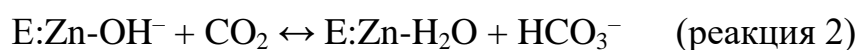
**Рисунок 2** – (А) Детали активного сайта чКА II. Видны ион цинка (II) (серая сфера), координированный His94, His96 и His119. (В) Поверхностное представление чКА II с гидрофобными и гидрофильными областями, окрашенными оранжевым и фиолетовым соответственно [30]

Особый интерес представляет структура водной сети растворителя представленная водородной связью, которая включает цинк-связанную молекулу растворителя. Эта сеть берет начало из глубокой воды ( $D_w$ ) в гидрофобном кармане, частично образованном боковыми цепями Val121, Val143, Trp209 и Leu198, до молекул воды, обозначенных W1, W2, W3a, W3b и W4 на рисунке 3. В кристаллических структурах эта цепь продолжается, но не находится в контакте водородной связи с остатком протона His64. Связанный с цинком растворитель, по-видимому, образует водородную связь с боковой цепью Thr199, а молекула глубокой воды ( $D_w$ ), вероятно, участвует в водородных связях с амидом основной цепи Thr199 и с молекулой воды, связанной с цинком [22].



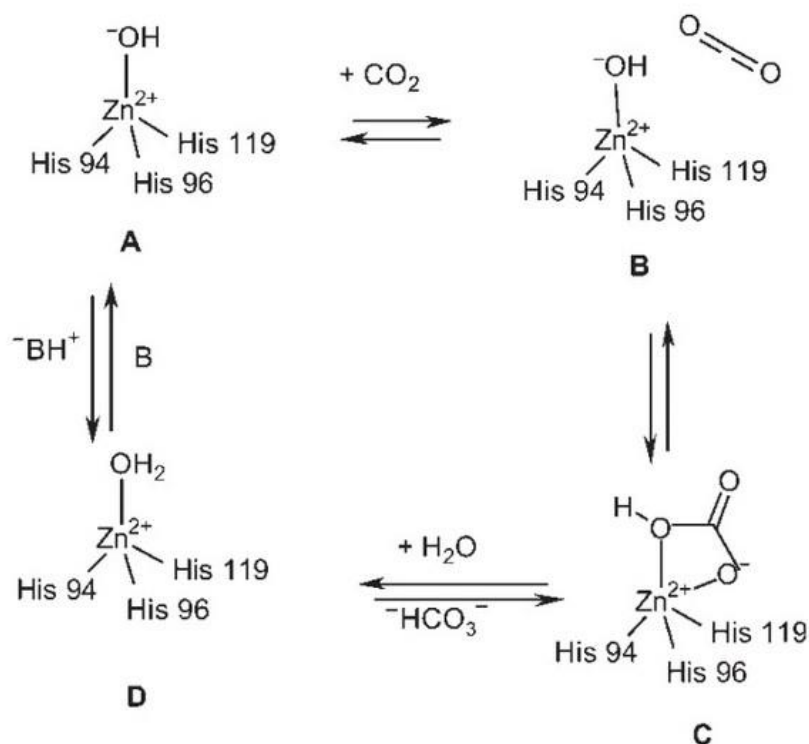
**Рисунок 3** – Упорядоченная водная сеть в активном сайте чКА II. Цинк представлен серой сферой, а атомы кислорода молекул воды представлены маленькими красными сферами. Пунктирные линии предполагают водородные связи с указанными расстояниями между атомами. Схематично показаны выбранные аминокислоты активного сайта с указанием как внутренней, так и внешней ориентации His64 [22]

чКА II способствует превращению воды и диоксида углерода в бикарбонат и протон через двухступенчатый механизм пинг-понга [25]:



Активная форма фермента (рисунок 4А) является сильным нуклеофилом и атакует молекулу  $\text{CO}_2$ , которая связывается в гидрофобном кармане, расположенном рядом с активным центром (субстрат-связывающий сайт содержит остатки Val131, Val143 и Leu198) (рисунок 4В) [26, 40]. Цинк-связан-

ная вода также участвует во взаимодействии водородной связи с гидроксильной частью Thr199, которая, в свою очередь, соединена с карбоксилатной частью Glu106; эти взаимодействия усиливают нуклеофильность связанной с цинком молекулы воды и ориентируют субстрат ( $\text{CO}_2$ ) в благоприятном месте для нуклеофильной атаки. В результате образуется бикарбонат, координированный с  $\text{Zn}^{2+}$  (рисунок 4C). Затем бикарбонат-ион замещается молекулой воды и переходит в раствор, что переводит фермент в неактивную форму, где  $\text{Zn}^{2+}$  координирован с водой (рисунок 4D). Чтобы регенерировать активную форму А, происходит реакция переноса протона из активного центра в окружающую среду, чему могут способствовать либо остатки активного сайта (такие как His64-протонный челнок в изоферментах КА I, II и IV), либо буферы, присутствующие в среде [25, 26, 36, 40].



**Рисунок 4** – Схематическое изображение реакций каталитической гидратации  $\text{CO}_2$  чКА II [26]

Наиболее активные карбоангидразы человека и крупного рогатого скота катализируют как гидратацию  $\text{CO}_2$ , так и дегидратацию в нейтральном

диапазоне рН с константами скорости от  $10^5$  до  $10^6$  с<sup>-1</sup>. Зависимость реакций, катализируемых карбоангидразой, от рН может быть описана утверждением, что активность зависит от группы в ферменте с рКа, равным 7, при этом основная форма E:Zn-OH<sup>-</sup> требуется для гидратации CO<sub>2</sub>, а неактивная форма E:Zn-H<sub>2</sub>O, по-видимому, требуется для дегидратации HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> [35].

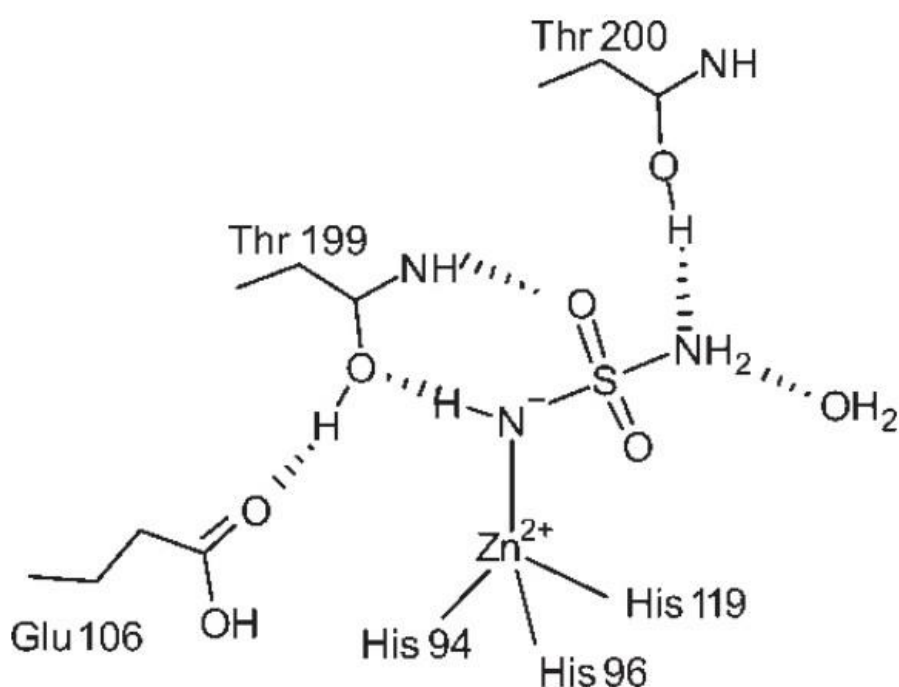
Стадия, ограничивающая скорость каталитической реакции, – это реакция переноса протона (3), которая регенерирует частицы гидроксида цинка фермента. В каталитически очень активных изоферментах, таких как КА II, КА IV, КА VII и КА IX, этому процессу способствует остаток гистидина, расположенный на входе в активный центр (His64), а также кластер гистидинов, который выступает от края активного центра на поверхность фермента, обеспечивая, таким образом, очень эффективный процесс переноса протонов. Это также объясняет, почему КА II является одним из наиболее активных известных ферментов (с  $k_{cat}/K_m = 1,5 \times 10^8$  М<sup>-1</sup>с<sup>-1</sup>), что также имеет важные последствия для разработки ингибиторов в клинических целях [26].

### **1.7. Варианты механизмов ингибирования активности карбоангидраз**

Известно четыре различных механизма ингибирования КА: (1) ингибиторы, координирующиеся с каталитически важным ионом Zn<sup>2+</sup> протетической группы фермента (сульфаниламиды и их изостеры, большинство анионов, дитиокарбаматы и их изостеры, карбоксилаты и гидроксаматы); (2) ингибиторы, которые связываются с молекулой воды/гидроксид-ионом, координированной Zn<sup>2+</sup> (фенолы, карбоксилаты, полиамины, 2-тиоксокумарины, сульфокумарины); (3) ингибиторы, которые перекрывают вход в полость активного центра (кумарины и их изостеры); (4) соединения, которые связываются вне полости активного центра (было замечено, что производное карбоновой кислоты ингибирует КА таким образом) [30, 42].

### 1.7.1. Ингибирование за счет связывания с ионом цинка $Zn^{2+}$

Данный способ ингибирования КА можно считать «классическим вариантом». Ингибиторы этого класса имеют в составе своей структуры так называемую цинк-связывающую группу (ZBG) (фрагменты  $SO_2NH^-$ ), которая непосредственно взаимодействует с металлом. ИКА связываются в депротонированной форме в виде анионов с  $Zn^{2+}$  активного центра фермента, имеющего тетраэдрическую геометрию, цинк-связывающей группой (ZBG). Таким образом, нарушается стадия образования комплекса E:Zn-H<sub>2</sub>O и каталитическая активность в целом (рисунок 5) [26, 42].



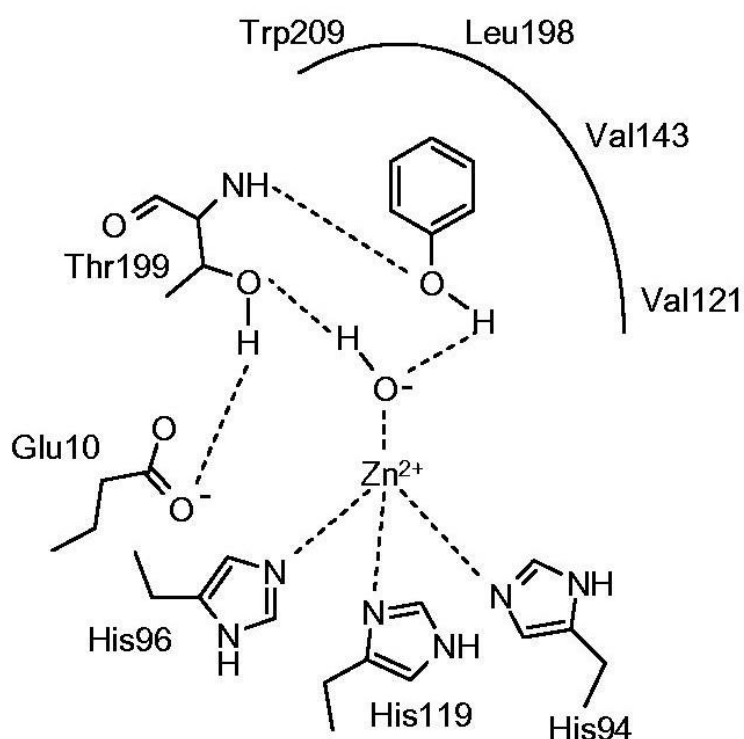
**Рисунок 5** – Рентгеноструктурный анализ схемы связывания сульфамида (в виде моноаниона) с чКА II [26]

### 1.7.2. Ингибирование за счет связывания с цинк-связанной водой

Первым соединением, для которого был описан этот «неклассический» механизм ингибирования КА, т. е. закрепление на координированной цинком молекуле воды/гидроксид-ионе, является фенол. Вторым был спермин. Соединения, ингибирующие КА по этому механизму (рисунок 6), характеризуются



наличием якорной группы (AG), которая прикреплена к каркасу [42]. Фрагмент -ОН прикрепляется к иону воды/гидроксида, связанному с цинком, посредством водородной связи, в то время как фенильная функциональная группа участвует в Ван-дер-Ваальсовых взаимодействиях с гидрофобной половиной активного центра, предотвращая связывание диоксида углерода [30]. Кроме того, вторая водородная связь включает остаток Thr199, удерживающий ворота, чья группа -NH участвует во второй водородной связи с фенолом [42].

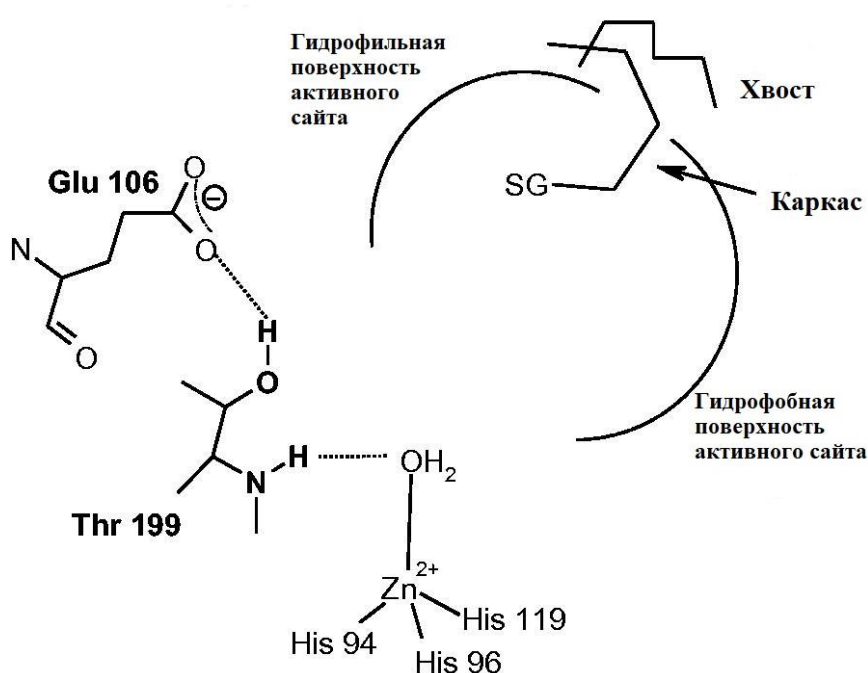


**Рисунок 6** – Механизм ингибирования КА фенолом. В качестве якорной группы (AG) выступает ОН-группа фенола [42]

### 1.7.3. Ингибиторы, перекрывающие вход в полость активного сайта

Соединения, действующие по этому механизму ингибирования, обладают липкой группой (SG), прикрепленной к каркасу, который может быть ароматическим, гетероциклическим или алифатическим (рисунок 7) [42]. Ку-

марины отличаются от многих других ИКА, потому что они считаются пролекарствами, которые могут связывать фермент только в форме продукта их гидролиза. Гидролизованная форма ингибитора связывается на входе в активный центр, блокируя проникновение субстрата и предотвращая катализ [30]. Сайт связывания располагается на границе активной полости (довольно далеко от цинк-иона), и при связывании с ингибитором нарушается процесс поступления субстрата в активный сайт.

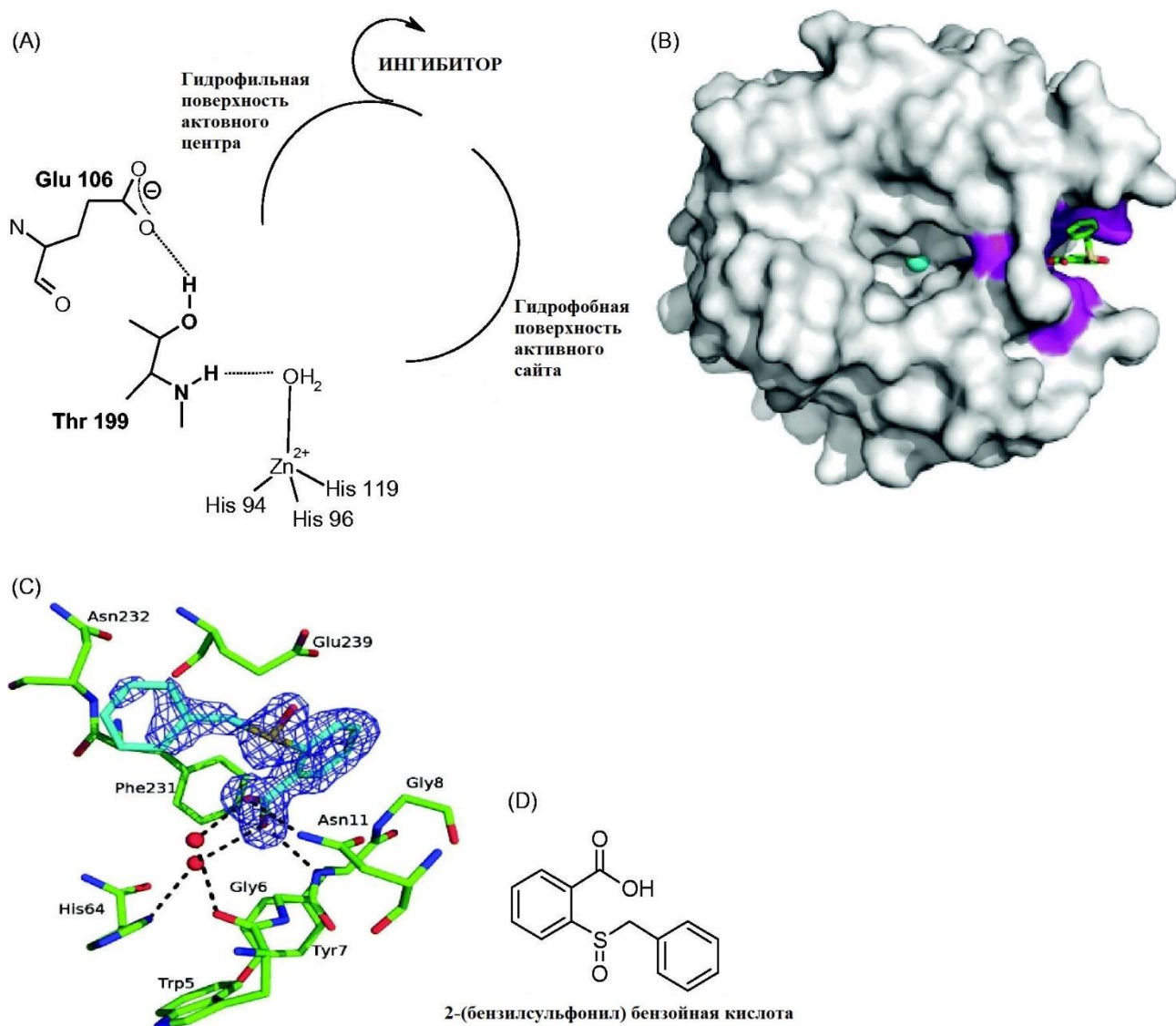


**Рисунок 7** – Механизм ингибирования активности КА за счет блокировки входа в активный сайт фермента [42]

#### 1.7.4. Ингибирование за счет связывания вне активного сайта

Механизм ингибирования КА с помощью 2-(бензилсульфонил) бензойной кислоты показан на рисунке 8А. В этом случае связывание с КА происходит вне активного сайта, в кармане, прилегающем ко входу (рисунок 8В). Это связывание блокирует His64, остаток протонного челнока, в его «внешней» конформации, что приводит к ингибированию каталитической активности [30]. Этот аминокислотный остаток (His64) обладает высокой гибкостью с двумя основными конформациями, «внутренней» (ближе к иону металла) и

«внешней»), по направлению к выходу из полости активного центра. Принимая протон из воды, координированной цинком, имидазольный фрагмент этого остатка становится протонированным (во внутренней конформации), тогда как, когда он находится во внешней конформации, тот же протон может переноситься в окружающую среду. Вмешательство в этот процесс может заблокировать весь каталитический цикл, и именно так соединение ингибирует фермент, блокируя протонный челнок через сеть водородных связей, подробно показанную на рисунке 8С.



**Рисунок 8** – Механизм ингибирования КА вне активного сайта. (А) Схематическое изображение сайта связывания ингибитора. (В) чКА II в ком-

плексе с карбоновой кислотой. (С) Взаимодействие между ингибитором и аминокислотными остатками из связывающего кармана. (D) Химическая структура ингибитора [42]

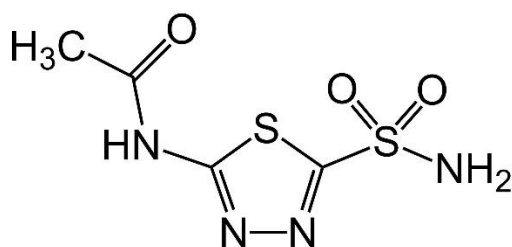
Таким образом, существует множество известных механизмов ингибирования каталитической активности КА. Кроме того, существует ряд соединений, для которой механизм ингибирования КА до сих пор остается неясным [42].

### **1.8. Ингибиторы карбоангидраз как группа лекарственных препаратов для лечения глаукомы**

Ингибиторы КА нашли широкое применение в фармакологии в качестве диуретиков, антиглаукомных, противоопухолевых и противосудорожных средств, средств против ожирения, в качестве диагностических средств. Также появляются предпосылки для разработки противоинфекционных препаратов, а именно противогрибковых, антибактериальных и противопротозойных средств с новым механизмом действия [43]. Сульфонамидные ИКА, среди которых можно отметить Ацетазоламид, Дихлорфенамид (средства системного действия), а также Дорзоламид и Бринзоламид (препараты местного действия), обычно используются в качестве средств терапии глаукомы. Они снижают секрецию бикарбоната и водянистой влаги, ингибируя изоформы КА, присутствующие в отростках цилиарного тела (КА II, IV и XII), с последующим снижением ВГД [41].

В 1954 году американская компания Sunamid в первый раз применила ИКА (Ацетозоламид, рисунок 9) как лекарственное средство для терапии глаукомы. К сожалению, локальное применение не оказало должного терапевтического эффекта, вследствие чего препарат принимался перорально [8]. Системно вводимые ингибиторы КА являются очень эффективными глазными гипотензивными средствами [28, 38]. Однако, ингибирование различных изоферментов КА (таких как КА I, КА II, КА IV, КА V, КА VII, КА IX и КА XIII),

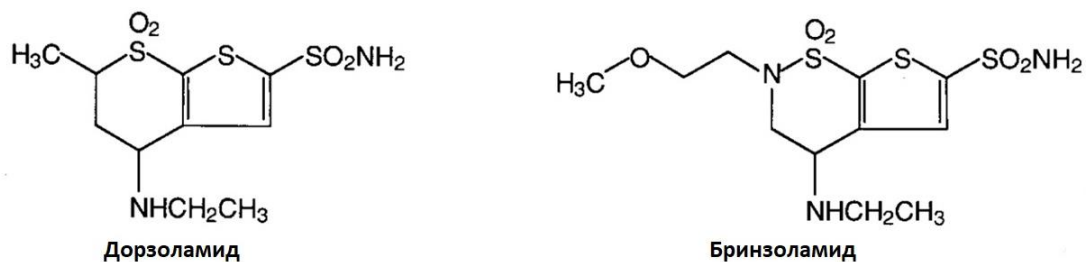
присутствующих, помимо глаза, и в других органах и тканях, таких как кровь, почки, легкие, желудочно-кишечный тракт, ЦНС и др. приводит к целому ряду побочных эффектов. Наиболее заметными из них являются: онемение и покалывание в конечностях, металлический привкус, депрессия, усталость, недомогание, потеря веса, снижение либидо, раздражение желудочно-кишечного тракта, метаболический ацидоз, почечные камни и преходящая миопия [26, 28].



**Рисунок 9** – Химическая структура Ацетозоламида

Сегодня применяются препараты местного действия, преимущественно блокирующие изоформу II КА [33, 38, 39]. Разработка водорастворимых сульфонамидных ИКА, которые будут использоваться в качестве глазных капель, началась в 1990-х годах, а к 1995 году первое такое фармакологическое средство, Дорзоламид, было выпущено компанией Merck под торговой маркой Trusopt [40]. В 1998 году второй местный ингибитор КА – Бринзоламид (выпущен компанией Alcon под торговой маркой Azopt) стал клинически доступен в США. Химические структуры Дорзоламида и Бринзоламида показаны на рисунке 10 [38]. Дорзоламид и Бринзоламид являются сильнодействующими водорастворимыми ИКА, которые достаточно жирорастворимы, чтобы проникать через роговицу, и их можно вводить местно в виде гидрохлоридной соли (при pH 5,5) или в виде свободного основания, соответственно [40]. Тем не менее, наблюдаемые побочные эффекты, включая жжение или покраснение глаз, помутнение зрения, зуд и горький вкус, могут привести во многих случаях к несоблюдению пациентом требований и необходимости использования

других лекарств или к разработке сульфаниламидов местного действия, обладающих меньшими побочными эффектами. Все, кроме последних, вероятно, связаны с тем, что Дорзоламид и Бринзоламид являются солями слабых оснований (вторичных аминов) с очень сильной кислотой (HCl), так что pH раствора препарата довольно кислый (обычно около 5,5) [18, 20, 38, 39].



**Рисунок 10** – Химическая структура Дорзоламида и Бринзоламида [38]

КА были обнаружены в передней части сосудистой оболочки глаза и, как доказано, ответственны за секрецию бикарбоната ( $\text{HCO}_3^-$ ) [40]. КА IV играет важную роль в образовании  $\text{HCO}_3^-$  и секреции водянистой влаги, тогда как КА II отвечает за клеточное равновесие  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  [32]. Образование водянистой влаги глаза осуществляется за счет перемещения путем активного транспорта бикарбонат-ионов в заднюю камеру из цитоплазмы беспигментных клеток, чтобы компенсировать градиент положительных ионов, обусловленный активным транспортом ионов натрия. Ингибиторы КА подавляют образование угольной кислоты, что, таким образом, способствует снижению продукции  $\text{HCO}_3^-$ . В условиях недостаточной концентрации гидрокарбонат-ионов увеличивается позитивный ионный градиент, что, в свою очередь, вызывает снижение продукции водянистой влаги. Предполагают, что именно этот механизм действия ИКА, играет ключевую роль в снижении уровня ВГД [20].

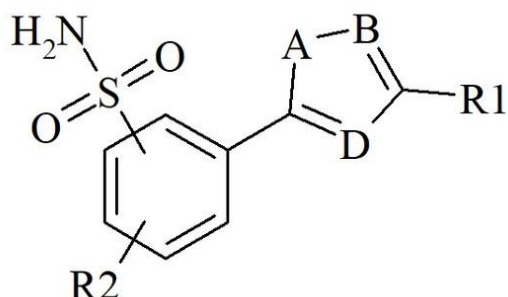
Таким образом, применение ИКА представляет собой наиболее физиологичный способ лечения глаукомы, так как путем ингибирования фермента цилиарного тела – чувствительного к сульфонамиду изофермента КА II – снижается скорость секреции бикарбоната и водянистой влаги, что приводит к

снижению ВГД на 25-30% [26]. Для эффективного снижения ВГД, требуется 99,99% ингибирование КА II и 98% ингибирование КА IV [32].

В настоящее время предпринимаются попытки по разработке новых ИКА местного действия, которые наряду с большей эффективностью имеют меньшее количество побочных эффектов [29, 31, 34]. Это направление перспективно, особенно если принять во внимание, что уровень больных глаукомой с каждым годом неуклонно возрастает.

### 1.9. Оксазопт – селективный ингибитор изоформы карбоангидразы II

Оксазопт – АФС на основе сульфонамидного производного азолсодержащего двуядерного соединения (рисунок 11) – нового селективного ингибитора карбоангидразы II типа, разработанного в ЦТФТ им. М.В. Дорогова ФГБОУ ВО «ЯГПУ им. К.Д Ушинского».

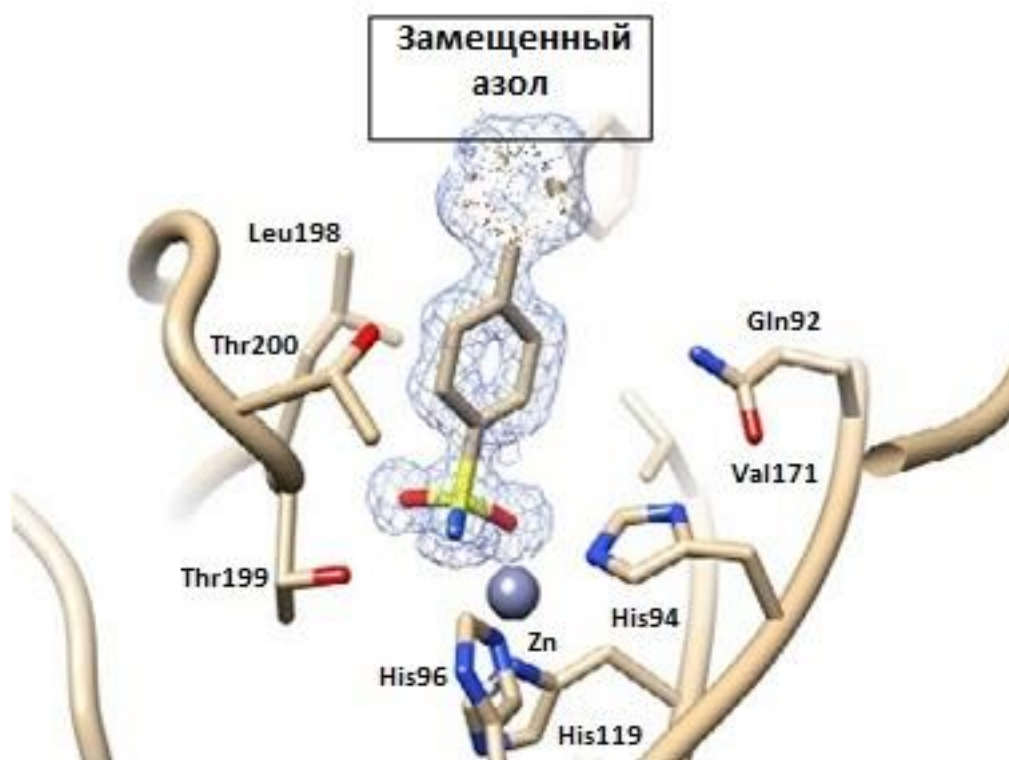


**Рисунок 11** – Структура биядерного азолсодержащего первичного сульфонида

Механизм действия заключается в избирательном подавлении активности II изоформы карбоангидразы человека, вследствие чего уменьшается продукция водянистой влаги камер глаза и снижается ВГД.

Для детального установления механизма взаимодействия соединения Оксазопт с активным сайтом молекулы чКА II были проведены исследования образующегося комплекса с помощью метода дифракции рентгеновских лу-

чей. Рентгеноструктурный анализ строения комплекса показал наличие характерной координации сульфонамидного фрагмента с каталитически активным  $Zn^{2+}$ , обеспечивающей потентное ингибирующее действие, а также ряд липофильных и гидрофильных взаимодействий молекулярной периферии с аминокислотными остатками белкового скелета каталитической щели фермента, объясняющих высокую селективность препарата по отношению к изоформе II чКА (рисунок 12).



**Рисунок 12** – Результат рентгеноструктурного исследования комплекса молекулы Оксазопта с активным центром чКА II



## ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### 2.1. Материалы

Исследуемое вещество (название): Оксазопт.

Производитель: Ярославский Центр трансфера фармацевтических технологий ЯГПУ им. К.Д. Ушинского.

Серия опытного образца АФС: «ОХА-0018-01».

### 2.2. Животные

В исследовании острой токсичности были использованы беспородные половозрелые крысы и мыши самцы и самки.

Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, прописанным в Санитарно-эпидемиологических правилах СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Уход за животными осуществляли в соответствии со стандартными операционными процедурами.

Животные содержались в комнатах с контролируемыми параметрами микроклимата (температура  $22 \pm 3$  °С, относительная влажность 30-70%, воздухообмен 10-15 объемов комнаты в час, 12 часовой цикл освещения день/ночь). Мониторинг температуры и влажности осуществляется с помощью компьютеризированной установки.

Животных содержали по 6 голов в стандартных поликарбонатных клетках на подстиле. Клетки снабжены решетчатой крышкой из нержавеющей стали с углублением для корма, съемным разделителем, поликарбонатной поилкой с крышкой-ниппелем из нержавеющей стали и держателем для этикетки.

Животные имели свободный доступ к воде и корму. Корм – стандартный сертифицированный корм для лабораторных грызунов. Для поения использовали фильтрованную воду.

Замену клеток с подстилом производили трижды в неделю, смену бутылок с водой – ежедневно. Влажную уборку комнат содержания проводили ежедневно.

### **2.3. Методология**

Исследование острой токсичности активной фармацевтической субстанции выполнено в соответствии со следующими требованиями и нормативными документами:

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (2012 г.);
2. Приказ Министерства здравоохранения РФ от 1 апреля 2016 г. № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики»;
3. ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» от 1 августа 2015;
4. Санитарно-эпидемиологические правила СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

Исследование проводилось на крысах и мышах обоего пола. Животные были распределены в группы методом рандомизации. В группы отбирали животных без видимых признаков отклонений от нормы. Группы формировали методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака так, чтобы индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на 10%.

Каждому животному присваивался индивидуальный номер, который наносили на хвост животного специальным маркером. На клетках закрепляли этикетки со следующей информацией: № протокола-заявки, вид, пол и количество животных, начало и окончание эксперимента, ответственный сотрудник, название, дата и способ введения исследуемых веществ.

Время адаптации перед началом эксперимента составило более 14 дней. В период адаптации проводили ежедневный осмотр внешнего состояния животных. Животных с отклонениями в ходе осмотра обнаружено не было.

Эвтаназия производилась путём ингаляции CO<sub>2</sub>.

Исследуемое вещество вводилось внутривенно и внутривентриально. Препарат вводили в возрастающих дозах в виде 10-15% взвеси на 1% крахмальном геле.

Для исследования каждой дозы использовались группы по 6 животных одного пола. Контрольным животным вводили эквивалентные объёмы 1% крахмального геля. Для выявления признаков интоксикации и случаев гибели за животными наблюдали в течение 24 часов после введения Оксаптопа и далее дважды в сутки в течение 14 дней.

#### **2.4. Статистическая обработка результатов**

Результаты экспериментов подвергались статистической обработке. Нормальность распределения определяли с помощью критериев Колмогорова-Смирнова. Статистический анализ проводили с использованием программы Statistica 10.

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение острой токсичности Оксазопта проводилось на мышах и крысах обоего пола. Препарат вводили в возрастающих дозах в виде 10-15% взвеси на 1% крахмальном геле.

#### 3.1. Параметры острой токсичности Оксазопта у мышей при внутрижелудочном введении

При внутрижелудочном введении Оксазопта мышам обоего пола в дозе 1000 мг/кг поведение, состояние, внешний вид животных, потребление пищи и воды в течение всего периода наблюдения не отличалось от мышей контрольной группы.

При внутрижелудочном введении Оксазопта в дозе 3000 мг/кг в течение первых двух часов отмечалась незначительная заторможенность животных. Затем состояние мышей нормализовалось и не отличалось от контроля.

При внутрижелудочном введении Оксазопта в дозе 5000 мг/кг в течение первых двух часов отмечалась заторможенность животных, отказ от воды и пищи, низкая двигательная активность. Затем состояние мышей нормализовалось и не отличалось от контроля.

Летальности при внутрижелудочном введении не было (таблицы 4; 5).

**Таблица 4** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопта у мышей-самок при внутрижелудочном введении

	Исследуемые дозы мг/кг		
	1000	3000	5000
Оксазопт	0/6	0/6	0/6
Контроль	0/6	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	-		
ЛД <sub>16</sub>	-		
ЛД <sub>84</sub>	-		

**Таблица 5** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопта у мышей-самцов при внутрижелудочном введении

	Исследуемые дозы мг/кг		
	1000	3000	5000
Оксазопт	0/6	0/6	0/6
Контроль	0/6	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	-		
ЛД <sub>16</sub>	-		
ЛД <sub>84</sub>	-		

### **3.2. Параметры острой токсичности Оксазопта у мышей при внутрибрюшинном введении**

При внутрибрюшинном введении Оксазопта мышам обоего пола в дозе 1000 мг/кг по всем наблюдаемым параметрам животные опытной группы практически не отличались от контрольных в течение всего периода наблюдения.

При внутрибрюшинном введении дозы 2000 мг/кг – наступала заторможенность мышей в течение первых часов после введения Оксазопта, реакция на тактильные раздражители была снижена. В первые сутки после введения животные не принимали пищу, были малоподвижны, часть животных находилась в боковом положении. Гибель мышей наступала на 1-2 сутки после введения. У выживших мышей выраженность интоксикации постепенно уменьшалась и через 3-4 суток по поведению, внешнему виду, потреблению корма и воды опытные мыши не отличались от контрольных.

При внутрибрюшинном введении Оксазопта мышам в дозе 3000 мг/кг в течение первого часа развивалась заторможенность, реакция на тактильные раздражители была слабая, большинство животных через два часа были малоподвижны, дыхание затруднённое. Боковое положение у половины мышей

развивалось через 10-12 часов после введения препарата. Все мыши в первые сутки не принимали воду и корм. Мыши погибли в первые-вторые сутки после введения Оксазопта.

ЛД<sub>50</sub> у мышей-самок при внутрибрюшинном введении Оксазопта – 2149 ± 333 мг/кг (таблица 6). ЛД<sub>50</sub> у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении Оксазопта – 1929 ± 126 мг/кг (таблица 7).

**Таблица 6** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопта у мышей-самок при внутрибрюшинном введении

	Исследуемые дозы мг/кг		
	1000	2000	3000
Оксазопт	0/6	2/6	6/6
Контроль	0/6	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	2149 ± 333		
ЛД <sub>16</sub>	1571		
ЛД <sub>84</sub>	2726		

**Таблица 7** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопта у мышей-самцов при внутрибрюшинном введении

	Исследуемые дозы мг/кг		
	1000	2000	3000
Оксазопт	0/6	3/6	6/6
Контроль	0/6	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	1929 ± 126		
ЛД <sub>16</sub>	1164		
ЛД <sub>84</sub>	2695		

### **3.3. Параметры острой токсичности Оксазопта у крыс при внутрижелудочном введении**

При внутрижелудочном введении Оксазопта в дозе 1000 мг/кг крысам обоего пола поведение, состояние, внешний вид животных, потребление пищи

и воды в течение всего периода наблюдения не отличалось от крыс контрольной группы.

При внутрижелудочном введении Оксазопта в дозе 5000 мг/кг крысам обоего пола в течение первых двух часов отмечалась незначительная заторможенность животных. Затем состояние крыс нормализовалось и не отличалось от контроля.

Летальности при внутрижелудочном введении не было (таблицы 8; 9).

**Таблица 8** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопта у крыс-самок при внутрижелудочном введении

	Исследуемые дозы мг/кг	
	1000	5000
Оксазопт	0/6	0/6
Контроль	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	-	
ЛД <sub>16</sub>	-	
ЛД <sub>84</sub>	-	

**Таблица 9** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопта у крыс-самцов при внутрижелудочном введении

	Исследуемые дозы мг/кг	
	1000	5000
Оксазопт	0/6	0/6
Контроль	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	-	
ЛД <sub>16</sub>	-	
ЛД <sub>84</sub>	-	

### **3.4. Параметры острой токсичности Оксазопта у крыс при внутрибрюшинном введении**

При внутрибрюшинном введении Оксазопта крысам обоего пола в дозе 1000 мг/кг по всем наблюдаемым параметрам крысы опытных групп не отличались от контрольных в течение всего периода наблюдения.

При внутрибрюшинном введении дозы 3000 мг/кг наступала заторможенность крыс в течении первого часа после введения Оксазопта, реакция на тактильные раздражители была снижена. В первые сутки после введения животные не принимали пищу, были малоподвижны, часть животных находилась в боковом положении. Гибель крыс наступала на 1-2 сутки после введения. У выживших крыс выраженность интоксикации постепенно уменьшалась и через 3-4 суток по поведению, внешнему виду, потреблению корма и воды опытные крысы не отличались от контрольных.

При внутрибрюшинном введении Оксазопта крысам обоего пола в дозе 4000 мг/кг в течение первого часа развивалась выраженная заторможенность, реакция на тактильные раздражители слабая, большинство животных через два часа были малоподвижны, дыхание затруднённое. Боковое положение у половины крыс развивалось через 10-12 часов после введения препарата. Все особи в первые сутки не принимали воду и корм. Самки погибли в первые сутки, самцы погибали на 2-3 сутки после введения Оксазопта. У выживших особей нормализация состояния происходила на 4-5 сутки.

При внутрибрюшинном введении Оксазопта крысам обоего пола в дозе 5000 мг/кг выраженное заторможенное состояние развивалась в течение первого часа. Половина особей заняла боковое положение через 5-7 часов после введения Оксазопта, эти крысы погибли в первые сутки. У остальных особей отмечалось затруднённое дыхание, адинамия. Боковое положение животные принимали через 12-20 часов после введения Оксазопта. Животные не принимали пищу и воду. Смерть оставшихся крыс наступила на вторые сутки.



ЛД<sub>50</sub> у самок при внутрибрюшинном введении Оксазопта – 2500 ± 223 мг/кг (таблица 10). ЛД<sub>50</sub> у самцов при внутрибрюшинном введении Оксазопта – 2740 ± 390 мг/кг (таблица 11).

**Таблица 10** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопт у крыс-самок при внутрибрюшинном введении

	Исследуемые дозы мг/кг			
	1000	3000	4000	5000
Оксазопт	0/6	3/6	5/6	6/6
Контроль	0/6	0/6	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	2500 ± 223			
ЛД <sub>16</sub>	1034			
ЛД <sub>84</sub>	3886			

**Таблица 11** – Показатели (погибло/всего) и параметры острой токсичности Оксазопт у крыс-самцов при внутрибрюшинном введении

	Исследуемые дозы мг/кг			
	1000	3000	4000	5000
Оксазопт	0/6	2/6	5/6	6/6
Контроль	0/6	0/6	0/6	0/6
ЛД <sub>50</sub>	2740 ± 390			
ЛД <sub>16</sub>	1487			
ЛД <sub>84</sub>	4003			

### 3.5. Исследование вероятной кумуляции

Несмотря на то, что параметры острой токсичности при внутрижелудочном введении Оксазопта крысам установлены не были, с целью выявления потенциально возможной кумуляции была проведена серия экспериментов на 10 самцах и 10 самках крыс. Животным вводили Оксазопт в возрастающей дозе. За точку отсчёта была взята доза в 5000 мг/кг, как максимальная при исследовании параметров острой токсичности. Летальности крыс при использовании всего диапазона возрастающих доз установлено не было (таблица 12).

**Таблица 12** – Дозы Оксазопта при исследовании вероятной кумуляции

Дни введения	Доля от дозы 5000 мг/кг	Летальность	
		Самцы	Самки
1-4	0,1	0	0
5-8	0,15	0	0
9-12	0,22	0	0
13-16	0,34	0	0
17-20	0,50	0	0
21-24	0,75	0	0
25-28	1,12	0	0

Таким образом, на основании проведённого эксперимента можно предположить, что Оксазопт не кумулирует.

### **3.6. Выводы**

Данные, полученные при проведении исследования острой токсичности Оксазопта на крысах и мышах, свидетельствуют об отсутствии летальности крыс и мышей при внутрижелудочном введении Оксазопта в дозах до 5000 мг/кг.

Параметры острой токсичности (ЛД<sub>50</sub>) при внутрибрюшинном введении Оксазопта крысам и мышам, самцам и самкам находятся в пределах 1929 ± 126 мг/кг – 2740 ± 390 мг/кг.

Данных, подтверждающих возможность кумуляции Оксазопта, не установлено.

Полученные параметры острой токсичности Оксазопта при внутрижелудочном введении позволяют отнести АФС по ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» к малоопасным веществам (4 класс опасности) [1].

Параметры острой токсичности Оксазопта при внутрибрюшинном введении позволяют отнести АФС по классификации И. В. Березовской (таблица 13) к веществам малоопасным (4 класс опасности) [5].

**Таблица 13** – Проект классификации токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 [5]

Показатели	Классы токсичности			
	1	2	3	4
<b>DL<sub>50</sub> внутрижелудочно, мг/кг</b>	< 15	15-150	151-5000	> <b>5000</b>
DL <sub>50</sub> подкожно, мг/кг	8	> 8-80	> 80-2000	> 2000
<b>DL<sub>50</sub> внутрибрюшинно, мг/кг</b>	4	> 4-40	> 40-1250	> <b>1250</b>
DL <sub>50</sub> внутривенно, мг/кг	2	> 2-20	> 20-700	> 700

*Примечание:* 1 класс – Чрезвычайно токсичны; 2 класс – Высокотоксичны; 3 класс – Умеренно токсичны; 4 класс – Малотоксичны

Таким образом, на основании исследования острой токсичности при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении Оксазопт относится к малоопасным веществам (4 класс опасности).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение острой токсичности препарата Оксазопт проведено при однократном внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении препарата на нелинейных породах мышей и крыс обоего пола.

На основании полученных экспериментальных данных можно прийти к следующим выводам:

1. Общетоксическое действие определяется острой и хронической токсичностью. В контексте моей дипломной работы рассматривается изучение острой токсичности препарата на модельных лабораторных животных (мыши, крысы). Результаты исследований указывают на малую токсичность Оксазопта: при внутрижелудочном введении препарата в дозировке 5000 мг/кг мышам и крысам обоего пола летальных эффектов не наблюдалось.

2. При определении переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества при однократном введении получены следующие результаты:

- при внутрижелудочном введении Оксазопта в дозах до 5000 мг/кг отсутствует летальность крыс и мышей;
- при внутрибрюшинном введении Оксазопта крысам и мышам, самцам и самкам параметры ЛД<sub>50</sub> находятся в пределах  $1929 \pm 126$  мг/кг –  $2740 \pm 390$  мг/кг;
- данных подтверждающих возможность кумуляции Оксазопта не установлено.

3. Внутрижелудочное и внутрибрюшинное введение препарата мышам обоего пола в дозе 1000 мг/кг достоверно не влияло на поведение, состояние, внешний вид животных, потребление пищи и воды в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. При внутрижелудочном введении препарата в дозах 3000 и 5000 мг/кг отмечались незначительные поведенческие отклонения, которые спустя два часа возвращались к исходному

состоянию. При внутрибрюшинном введении препарата в дозах 2000 и 3000 мг/кг отмечались выраженные отклонения в поведенческих реакциях, животные принимали боковое положение, летальность наблюдалась в 41,7 и 100% соответственно.

Внутрижелудочное и внутрибрюшинное введение препарата крысам обоего пола в дозе 1000 мг/кг достоверно не влияло на поведение, состояние, внешний вид животных, потребление пищи и воды в течение всего периода наблюдения по сравнению с контрольной группой. При внутрижелудочном введении препарата в дозе 5000 мг/кг отмечались незначительные поведенческие отклонения, которые спустя два часа возвращались к исходному состоянию. При внутрибрюшинном введении препарата в дозах 3000, 4000 и 5000 мг/кг отмечались выраженные отклонения в поведенческих реакциях, животные принимали боковое положение, летальность наблюдалась в 41,7, 83,3 и 100% соответственно.

4. На основании исследования острой токсичности при внутрижелудочном и внутрибрюшинном введении Оксазопт относится к малоопасным веществам (4 класс опасности).

Стоит отметить, что Оксазопт показал низкую токсичность в остром эксперименте. Таким образом, основываясь на полученных данных, препарат Оксазопт можно рассматривать в качестве кандидата для дальнейших исследований специфической токсичности, фармакологической эффективности и фармакокинетики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с Изменениями N 1, 2). Утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета СССР по стандартам от 10.03.76 N 579: дата введения 1977-01-01. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/5200233> (дата обращения: 20.01.2021). – Текст: электронный.

2. ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. Принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 20 октября 2014 г. N 71-П): дата введения 2015-08-01. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/1200115791> (дата обращения: 16.08.2020). – Текст: электронный.

3. СП 2.2.1.3218-14. Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) от 29 августа 2014 года N 51. – URL: <http://docs.cntd.ru/document/420219460> (дата обращения: 16.08.2020). – Текст: электронный.

4. Безопасность лекарств: от доклиники к клинике [Текст]: монография / Т.А. Гуськова, Б.К. Романов и др.; под редакцией А.Л. Хохлова. – М.; Ярославль: ФГБОУ ВО «ЯГМУ», 2018. – 276 с.

5. Березовская, И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения / И.В. Березовская // Хим.-фарм. журн. – 2003. – Т. 37(3). – С. 32-34.

6. Бойко, Э.В. Молекулярно-генетические аспекты патогенеза глаукомы / Э.В. Бойко, С.В. Чурашов, Т.А. Камилова // Вестник офтальмологии. – 2013. – Т. 4. – С. 76-82.

7. Гуськова, Т.А. Токсикология лекарственных средств / Т.А. Гуськова. – М.: Издательский дом «Русский врач». – 2003. – 154 с.
8. Егоров, А.Е. Гипотензивная и нейропротективная терапия глаукомы: реалии и перспективы / А.Е. Егоров, Н.Г. Глазко, А.Б. Мовсисян // РМЖ «Клиническая офтальмология». – 2019. – Т. 19(3). – С. 128-135.
9. Егоров, Е.А. Современные аспекты гипотензивного лечения глаукомы / Е.А. Егоров, Т.В. Ставицкая // РМЖ «Клиническая офтальмология». – 2000. – № 1. – С. 51.
10. Еричев, В.П. О патогенезе первичной открытоугольной глаукомы / В.П. Еричев, Е.А. Егоров // Вестник офтальмологии. – 2014. – Т. 6. – С. 98-104.
11. Курышева, Н.И. Ингибиторы карбоангидразы в лечении глаукомы. Обзор. Часть 1. / Н.И. Курышева // Офтальмология. – 2020. – 17(3S). – С. 542-549.
12. Курышева, Н.И. Ингибиторы карбоангидразы в лечении глаукомы. Обзор. Часть 2. / Н.И. Курышева // Офтальмология. – 2020. – 17(4). – С. 676-682.
13. Малишевская, Т.Н. Современные представления об этиологии и патогенезе первичной открытоугольной глаукомы (ПОУГ) с позиции закономерностей общепатологического процесса / Т.Н. Малишевская, С. Ю. Астахов // Медицинская наука и образование Урала. – 2017. – № 4. – С. 202-208.
14. Мачехин, В.А. К вопросу о новых представлениях патогенеза первичной открытоугольной глаукомы / В.А. Мачехин // Вестник ТГУ. – 2014. – Т. 19(4). – С. 1178-1182.
15. Национальное руководство по глаукоме: для практикующих врачей / под ред. проф. Е.А. Егорова, проф. Ю.С. Астахова, проф. В.П. Еричева. – 3-е изд., испр. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2015. – 456 с.

16. Нестеров, А.П. Глаукома / А.П. Нестеров. – М.: Медицина, 1995. – 256 с.
17. Нестеров, А.П. Патогенез и проблемы патогенетического лечения глаукомы / А.П. Нестеров // РМЖ «Клиническая офтальмология». – 2003. – № 2. – С. 47-48.
18. Оценка гипотензивной эффективности, переносимости и безопасности ингибитора карбоангидразы Бринзопта в медикаментозной терапии глаукомы и коррекции послеоперационной офтальмогипертензии у пациентов с катарактой / В.П. Еричев [и др.] // Национальный журнал глаукома. – 2017. – Т. 16(3). – С. 81-88.
19. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / под ред. А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян и др. – М.: Изд-во Гриф и К. – 2012. – 944 с.
20. Хлобыстов, А.А. Бринзоламид – новый ингибитор карбоангидразы / А.А. Хлобыстов, Е.А. Егоров, Т.В. Ставицкая // РМЖ «Клиническая офтальмология». – 2001. – № 2. – С. 51.
21. A class of sulfonamide carbonic anhydrase inhibitors with neuropathic pain modulating effects / F. Carta [et al.] // Bioorg. Med. Chem. – 2015. V. 23. – P. 1828-1840.
22. A short, strong hydrogen bond in the active site of human carbonic anhydrase II / B.S. Avvaru [et al.] // Biochemistry. – 2010. – Vol. 49(2). – P. 249-251.
23. Capasso, C. An overview of the alpha-, beta- and gamma-carbonic anhydrases from Bacteria: can bacterial carbonic anhydrases shed new light on evolution of bacteria? / C. Capasso, C.T. Supuran // J Enzyme Inhib Med Chem. – 2015. – Vol. 30(2). – P. 325-332.



24. Carbonic anhydrase I and II inhibition with natural products: leucas cephalotes / K. K. Sethi [et al.] // *Pharmacognosy Communications*. – 2011. – Vol. 1(2). – P. 41-46.
25. Carbonic anhydrases and their biotechnological applications / C.D. Boone [et al.] // *Biomolecules*. – 2013. – Vol. 3. – P. 553-562.
26. Carbonic Anhydrases: current state of the art, therapeutic applications and future prospects / S. Pastorekova [et al.] // *J Enzyme Inhib Med Chem*. – 2004. – Vol. 19(3). – P. 199-229.
27. Global prevalence of glaucoma and projections of glaucoma burden through 2040: a systematic review and meta-analysis / Y.C. Tham [et al.] // *Ophthalmology*. – 2014. – Vol. 121(11). – P. 2081-2090.
28. Gloster, J. Effect of a carbonic anhydrase inhibitor (Diamox) on intraocular pressure of rabbits and cats / J. Gloster, E.S. Perkins // *Br. J. Ophthalmol.* – 1955. – V. 39. – P. 647-658.
29. Lavik, E. Novel drug delivery systems for glaucoma / E. Lavik, M.H. Kuehn, Y.H. Kwon // *Eye*. – 2011. – Vol. 25. – P. 578-586.
30. Lomelino, C.L. Non-classical inhibition of carbonic anhydrase / C.L. Lomelino, C.T. Supuran, R. McKenna // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – Vol. 17(7). – P. 1150.
31. Novel therapies for open-angle glaucoma / S. M. Wentz [et al.] // *F1000prime Rep.* – 2014. – Vol. 6. – P. 102.
32. Petchimuthu, S. Future perspective in carbonic aAnhydrase inhibitors and its drugs / S. Petchimuthu, Dr. N. Narayanan // *IJPRS*. – 2013. – V 2(3). – P. 83-97.

33. Schmidt, K. Topical carbonic anhydrase inhibition increases ocular pulse amplitude in high tension primary open-angle glaucoma / K. Schmidt, A. von Ruckmann and L. Pillunat // *E Br. J. Ophthalmol.* – 1998. – V. 82. – P. 758-762.
34. Schultz, C.L. A medical device/drug delivery system for treatment of glaucoma / C.L. Schultz, T.R. Poling, J.O. Mint // *Clin Exp Optom.* – 2009. – V. 92(4). – P. 343-348.
35. Silverman, D.N. The catalytic mechanism of carbonic anhydrase: Implications of a rate-limiting protolysis of water / D.N. Silverman, S. Lindskog // *Acc. Chem. Res.* – 1988. – V. 21. – P. 30-36.
36. Structural annotation of human carbonic anhydrases / M. Aggarwal [et al.] // *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 28. – P. 267-277.
37. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes / M.I. Hassan [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2013. – Vol. 21(6). – P. 1570-1582.
38. Sugrue, M.F. Pharmacological and ocular hypotensive properties of topical carbonic anhydrase inhibitors / M.F. Sugrue // *Progress in Retinal and Eye Research.* – 2000. – Vol. 19(1). – P. 87-112.
39. Supuran, C.T. Therapeutic applications of the carbonic anhydrase inhibitors / C.T. Supuran // *Therapy.* – 2007. – Vol. 4(3). – P. 355-378.
40. Supuran, C.T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators / C.T. Supuran // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2008. – Vol. 7(2). – P. 168-181.
41. Supuran, C.T. Structure-based drug discovery of carbonic anhydrase inhibitors / C.T. Supuran // *J. Enz. Inhib. Med. Chem.* – 2012. – Vol. 27(6). – P. 759-772.

42. Supuran, C.T. How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? / C.T. Supuran // J. Enz. Inhib. Med. Chem. – 2016. – Vol. 31(3). – P. 345-360.

43. Supuran, C.T. Carbonic anhydrases and metabolism / C.T. Supuran // Metabolites. – 2018. Vol. 8 – P. 25.

44. 6 марта – Всемирный день борьбы с глаукомой: сайт. – URL: <http://cgon.rospotrebnadzor.ru/content/63/552> (дата обращения: 29.01.2021). – Текст: электронный.

45. Глаукома: от факторов риска к современному медикаментозному лечению: сайт. – URL: <https://www.health-ua.com/article/29652-glaukoma-ot-faktorov-riska-k-sovremennomu-medikamentoznomu-lecheniyu> (дата обращения 19.02.2021). – Текст: электронный.