DOI: 10.30906/0869-2092-2022-85-10-11-13

АНТИГИПОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ИНГИБИТОРА МАТРИКСНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ 2 ТИПА — ПРОИЗВОДНОГО ФЕНИЛСУЛЬФОНИЛ-L-ПРОЛИНА

О. С. Григоркевич*, К. Н. Колясникова, Г. В. Мокров[1]

Матриксные металлопротеиназы 2 и 9 типов (ММП-2, ММП-9) относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз и играют важную роль в патогенезе легочной артериальной гипертензии (ЛАГ). В связи с этим можно предположить, что использование ингибиторов ММП-2/-9 может стать одним из возможных вариантов лекарственного лечения ЛАГ. Ранее нами было сконструировано и синтезировано соединение АЛ-828 (1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин), которое в экспериментах *in vitro* продемонстрировало ингибирующую активность по отношению к ММП-2 (K_i = 45 мкМ). В экспериментах *in vivo*, выполненных на модели острого инфаркта миокарда у крыс, показано, что соединение АЛ-828 (30 мг/кг внутрижелудочно) проявляет кардиопротективную активность. В настоящей работе на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией у беспородных мышей-самцов изучена антигипоксическая активность соединения АЛ-828 в интервале доз 0,001 – 30 мг/кг внутрибрюшинно. Показано, что соединение АЛ-828 проявляет антигипоксическую активность в дозе 0,01 мг/кг, сравнимую с таковой для пирацетама в дозе 1000 мг/кг внутрибрюшинно.

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа; ММП-2; ингибитор ММП-2; соединение АЛ-828; антигипоксическая активность.

ВВЕДЕНИЕ

Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству цинк-зависимых эндопептидаз, способных разрушать основные компоненты белков внеклеточного матрикса (ВКМ). ВКМ составляет основу соединительной ткани, обеспечивает механическую поддержку клеток и транспорт химических веществ, активно участвует во многих процессах в организме [9].

ММП принимают участие в ремоделировании тканей, миграции и дифференцировке клеток, апоптозе и др. [10, 2, 13]. В процессе воспаления и окислительного стресса происходит активация ММП, что оказывает пагубное воздействие на компоненты ВКМ (коллаген, ламинин, фибронектин и др.), приводящее к развитию таких патологических состояний, как ревматоидный артрит, остеоартрит, сердечно-сосудистые заболевания, периодонтит, аутоиммунные заболевания, артериальная гипертензия и др. [8]. Гиперэкспрессия ММП, в том числе ММП-2 и ММП-9, активируется при патологии легочной артериальной гипертензии (ЛАГ) и влияет на ремоделирование легочных артерий [12, 13].

В основе патогенеза ЛАГ лежит патологическое увеличение давления в легочной артерии, приводящее к формированию правожелудочковой сердечной недостаточности [14]. Известно, что гипоксия играет достаточно важную роль в патогенезе развития ЛАГ [11]. Y. Liua et al. в экспериментах *in vitro* и *in vivo* обнаружили, что гипоксия увеличивает экспрессию ММП-2 и ММП-9 в эндотелии легочной артерии. Авторы этого исследования показали, что селективный ингибитор ММП-2/-9 MMI-166 ослабляет повышение давления в правом желудочке сердца и препятствует утолщению стенки легочной артерии, что характерно для ЛАГ [11].

Ранее нами был сконструировано и синтезировано соединение 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (АЛ-828) [4], которое в эксперименте *in vitro* показало свою ингибиторную активность по отношению к ММП-2 (K_i = 45 мкМ) [5]. В экспериментах *ex vivo* на крысах соединение АЛ-828 (30 мг/кг/сут внутрижелудочно) достоверно уменьшает содержание как ММП-2 [5], так и ММП-9 [4] в плазме крови с острым инфарктом миокарда (ОИМ). В модельном эксперименте *in vivo*, воспроизводящем ОИМ у крыс, была показана кардиопротективная активность АЛ-828 [7].

Целью настоящего исследования было изучение антигипоксической активности соединения АЛ-828 на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Соединение АЛ-828 – 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]-фенил}сульфонил-L-пролин — синтезировано в отделе химии НИИ фармакологии имени В. В. Закусова. $T_{пл}$ 215 – 217 °С. ^{1}Н ЯМР-спектр (DMSO-d_6, δ, м.д.): 1,56, 1,85 (два м, 4 Н, $H_2C(3)_{Prl}$, $H_2C(4)_{Prl}$); 3,16, 3,36 (два м, 2 Н, $H_2C(5)_{Prl}$); 4,10 (дд, 1 Н, $HC(2)_{Prl}$, ^{3}J 7,8 Гц; ^{3}J 4,4 Гц); 7,64 (д, 2 Н, Н(3′), Н(5′), ^{3}J 8,8 Гц); 7,83 (д, 2

[1] ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В. В. Закусова", Россия, 125315, Москва, Балтийская ул., д. 8.
e-mail: oksana.grigorkevich@mail.ru

© 2022 Коллектив авторов

H, H(3), H(5), ^{3}J 8,8 Гц); 8,00 (д, 2 H, H(2′), H(6′), ^{3}J 8,8 Гц); 8,02 (д, 2 H, H(2), H(6), ^{3}J 8,8 Гц); 10,69 (с, 1 H, NH) [4]. В работе использовали Twin-80 (“Merck”, Германия); пирацетам (“Олайнфарм”, Латвия); воду с сопротивлением 19 мОм, полученную на установке Милли-Q (“Millipore”, США).

Исследование выполнено на беспородных мышах-самцах массой 21 – 29 г, полученных из ФГБНУ “Научный центр биомедицинских технологий ФМБА”, филиал “Столбовая”. Животных содержали по 5 особей в клетке в условиях вивария ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92) и воде в течение 7 сут до начала тестирования в соответствии с ГОСТ 33216-2014 “Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами”. Эксперименты проводили в соответствии с решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 81 “Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств”. Хендлинг проводили дважды в неделю (совместно с чисткой). Эксперименты проводили с 10 до 16 часов. Все манипуляции с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ “НИИ фармакологии имени В. В. Закусова” (протокол № 5 от 19 апреля 2022 г.).

Антигипоксическая активность соединения АЛ-828 была исследована на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией (“баночная” гипоксия”) в соответствии с рекомендациями “Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ” [1]. Нормобарическую гипоксию моделировали путем постепенного увеличения содержания углекислого газа в воздухе за счет дыхания (гипоксия с гиперкапнией в гермообъеме). За 1 ч до начала эксперимента животным внутрибрюшинно (в/б) вводили или соединение АЛ-828 (суспензия в 1 % водном Twin-80), или эталонный препарат пирацетам (суспензия в 1 % водном Twin-80). Животные контрольной группы получали аналогичный объем (0,8 мл/ кг) суспензии Twin-80 [3].

Через 1 ч животных помещали по одному в герметически закрытые сосуды вместимостью 250 мл (высота 10 см, диаметр 5,8 см) и фиксировали наступление смерти по времени последнего агонального вдоха. Животные были рандомизированы по массе и разделены на 9 групп по 10 мышей в каждой: 1 группа: контроль (1 % Twin-80 в воде); 2 группа: АЛ-828 в дозе 30 мг/кг (АЛ-828 + 1 % Twin-80 в воде); 3 группа: АЛ-828 в дозе 10 мг/кг (АЛ-828 + 1 % Twin-80 в воде); 4 группа: АЛ-828 в дозе 5 мг/кг (АЛ-828 + 1 % Twin-80 в воде); 5 группа: АЛ-828 в дозе 1 мг/кг (АЛ-828 + 1 % Twin-80 в воде); 6 группа: АЛ-828 в дозе 0,1 мг/кг (АЛ-828 + 1 % Twin-80 в воде); 7 группа: АЛ-828 в дозе 0,01 мг/кг (АЛ-828 + 1 % Twin-80 в воде); 8 группа: АЛ-828 в дозе 0,001 мг/кг (АЛ-828 + 1 % Twin-80 в воде); 9 группа: пирацетам в дозе 1000 мг/кг (пирацетам + 1 % Twin-80 в воде). Животные контрольной группы получали эквивалентный объем раствора 1 % Twin-80 в воде.

Для статистической оценки результатов использовали критерий Краскела–Уоллиса с последующими попарными межгрупповыми сравнениями с помощью теста Данна.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Антигипоксическую активность соединения АЛ-828 изучали на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в диапазоне доз от 0,001 до 30 мг/кг. Выбор доз препарата осуществляли, исходя из раннее полученных данных:

- В экспериментах *in vitro* при изучении нейропротекторной активности АЛ-828 (неопубликованные данные) было показано, что его эффективная концентрация равняется 10^{-8} М, что в пересчете активной дозы соединения для проведения экспериментов *in vivo* составляет 0,001 мг/кг.
- В экспериментах *in vivo* было показано, что АЛ-828 в дозе 30 мг/кг/сут на модели ОИМ у крыс значимо уменьшает интенсивность ремоделирования левого желудочка сердца и обладает кардиопротективной активностью [7]. В связи с этим в данной работе верхняя граница доз была отобрана как 30 мг/кг.

При изучении активности АЛ-828 в диапазоне доз от 0,001 до 30 мг/кг в опытах на беспородных белых мышах на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией было показано, что соединение АЛ-828 проявляет антигипоксическую активность в дозе 0,01 мг/кг, в/б ($p < 0,05$) (таблица).

В качестве препарата сравнения было выбрано ноотропное лекарственное средство — пирацетам, кото-

Антигипоксическая активность АЛ-828 и пирацетама при однократном внутрибрюшинном введении на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в опытах на мышах

Вещество	Доза, мг/кг	Время жизни, мин		Активность, в % от контроля
		Контроль	Вещество	
АЛ-828	0,001	22,67 ± 0,37	23,30 ± 0,79	103
	0,01	21,60 ± 0,50	24,70 ± 0,63*	114
	0,1	21,60 ± 0,50	22,90 ± 0,79	106
	1	21,60 ± 0,50	22,90 ± 0,88	106
	5	26,45 ± 1,66	27,50 ± 1,22	104
	10	26,45 ± 1,66	25,70 ± 1,38	97
	30	26,45 ± 1,66	27,60 ± 1,11	104
Пирацетам	1000	22,67 ± 0,37	27,09 ± 0,93**	119

Примечание: Различия достоверны по критерию Краскела–Уоллеса: * с контролем при $p < 0,05$; ** с контролем при $p < 0,01$.
В каждой группе было не менее 10 животных.

рое проявило антигипоксический эффект на модели гипоксической гипоксии с гиперкапнией в дозе 1000 мг/кг, в/б [3, 6].

Полученные данные по пирацетаму сопоставимы с результатами ранее проведенных исследований, в которых показано, что препарат, в экспериментах на беспородных мышах в дозах 300 и 600 мг/кг (в/б), не оказывал антигипоксического эффекта, но статистически значимо увеличивал продолжительность жизни мышей в дозах 900 и 1000 мг/кг (в/б) [3, 6].

Установлено, что соединение АЛ-828 в дозе 0,01 мг/кг (в/б) в опытах на беспородных белых мышах обладает антигипоксическим действием, что выражается в способности вещества увеличивать продолжительность жизни животных в условиях нормобарической гипоксии с гиперкапнией. При анализе зависимости дозы от изучаемого эффекта была выявлена одна активная доза, что соответствует куполообразной зависимости.

Эффект соединения АЛ-828 по выраженности сравним с таковым для пирацетама, но в дозе, на 5 порядков меньшей.

ВЫВОДЫ

1. 1-({4-[(4-Хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин (соединение АЛ-828) в дозе 0,01 мг/кг в/б обладает антигипоксической активностью в условиях гипоксической гипоксии с гиперкапнией.

2. По выраженности антигипоксического эффекта соединение АЛ-828 сравнимо с пирацетамом, но в дозе, в 100 000 раз (или на 5 порядков) меньшей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Т. А. Воронина, Р. У. Островская, Т. Л. Гарибова, Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия. В кн: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, А. Н. Миронов (ред.), Гриф и К, Москва (2012), сс. 276 – 296.
2. И. И. Ганусевич, *Онкология*, **12**(1), 10 – 16 (2010).
3. В. Г. Граник, Т. В. Головко, Р. Г. Глушков и др., *Хим.-фарм. журн.*, **23**(10), 1186 – 1193 (1989).
4. О. С. Григоркевич, Г. В. Мокров, А. С. Дябина и др., *Хим.-фарм. журн.*, **52**(1), 8 – 14 (2018); doi:
5. О. С. Григоркевич, Г. В. Мокров, Н. Н. Золотов и др., *Вопр. биол., мед. и фарм. химии.*, **23**(11), 46 – 51 (2020); doi: 10.29296 / 25877313-2020-11-04.
6. К. Н. Колясникова, Т. А. Гудашева, Г. А. Назарова и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **75**(9), 3 – 6 (2012); doi: 10.30906 / 0869-2092-2012-75-9-3-6.
7. С. А. Крыжановский, Е. О. Ионова, В. Н. Столярук и др., *Бюл. экспер. биол. и мед*., **168**(11), 582 – 587 (2019); doi:
8. Л. Н. Рогова, Н. В. Шестернина, Т. В. Замечник, И. А. Фастова, *Вестн. новых мед. технологий*, **18**(2), 86 – 89 (2011).
9. G. A Cabral-Pacheco, I. Garza-Veloz, C. Castruita-De la Rosa, et al., *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 9739 (2020); doi: 10.3390 / ijms21249739.
10. C. Kapoor, S. Vaidya, V. Wadhwan, et al., *J. Cancer Res. Ther.*, **12**, 28 – 35 (2016); doi: 10.4103 / 0973-1482.157337.
11. Y. Liua, H. Zhanga, L. Yana, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **121**, 36 – 50 (2018); doi: 10.1016 / j.yjmcc.2018.06.006.
12. Y. Miyazaki, A. Hara, K. Kato, et al., *Int. J. Oncol.*, **32**(1), 145 – 151 (2008).
13. S. Osinsky, I. Ganusevich, L. Bubnovskaya, et al., *Exp. Oncol.*, **27**, 202 – 205 (2005).
14. K. Riches, M. E. Morley, N. A. Turner, et al., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **47**, 391 – 399 (2009); doi: 10.1016 / j.yjmcc.2009.06.002.

Поступила 26.04.22

ANTIHYPOXIC ACTIVITY OF PHENYLSULFONYL-L-PROLINE DERIVATIVE, THE INHIBITOR OF MATRIX METALLOPOTEIINASE 2 (MMP-2)

O. S. Grigorkevich*, K. N. Koliasnikova, G. V. Mokrov

Research Zakusov Institute of Pharmacology, Baltiyskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia
e-mail: oksana.grigorkevich@mail.ru

Matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2, MMP-9) belong to a family of zinc-dependent endopeptidases and play an important role in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH). Thereby, MMP-2/-9 inhibitors may become one of the possible approaches to the medicinal treatment of PAH. Previously, we designed and synthesized AL-828 (1-({4-[(4-chlorobenzoyl)amino]phenyl}sulfonyl-L-proline) which demonstrated the inhibitory activity against MMP-2 (K_i = 45 mM)in in vitro experiments. In vivo experiments carried out on a model of acute myocardial infarction in rats revealed that AL-828 (30 mg/kg intragastrically) exhibits cardioprotective activity. Antihypoxic activity of the compound AL-828 was studied on a model of normobaric hypoxia with hypercapnia in outbred male mice in a dose range of 0.001 – 30 mg/kg intraperitoneally. It is shown that AL-828 exhibits antihypoxic activity at a dose of 0.01 mg/kg comparable in the effectiveness to that of piracetam at a dose of 1000 mg/kg intraperitoneally.

Keywords: matrix metalloproteinase; MMP-2; MMP-2 inhibitor; compound AL-828; antihypoxic activity.