

*На правах рукописи*



**Мазов Ян Алексеевич**

**Эффективность топического применения солей  
N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при повреждениях периодонта в эксперименте**

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

3.1.7. Стоматология

Автореферат  
диссертации на соискание учёной степени  
кандидата медицинских наук

Москва – 2024

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарёва» и федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

**Научные руководители:**

доктор медицинских наук, доцент  
доктор медицинских наук, доцент

**Семелева Елена Владимировна**  
**Васильев Юрий Леонидович**

**Официальные оппоненты:**

**Яснецов Виктор Владимирович** - доктор медицинских наук, федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственного научного центра Российской Федерации - Институт медико-биологических проблем РАН Российской академии, лаборатория экспериментальной и клинической фармакологии, заведующий лабораторией, ведущий научный сотрудник, отдел космической радиобиологии и фармакологии наук, заведующий отделом

**Усманова Ирина Николаевна** - доктор медицинских наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра терапевтической стоматологии, профессор кафедры

**Ведущая организация:** федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет»

Защита состоится «28» мая 2024 года в 12.00 часов совета ДСУ 208.001.20 на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2).

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: [www.sechenov](http://www.sechenov).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор медицинских наук, профессор



**Дроздов Владимир Николаевич**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Пародонтит – одно из основных хронических воспалительных заболеваний тканей пародонта, представляющее наиболее распространенную форму патологии челюстных костей у человека [Ebersole et al., 2000]. Установлено, что большинство взрослых страдают пародонтитом средней степени тяжести, при этом до 15% населения планеты страдают тяжелым генерализованным пародонтитом с развитием периодонтита и вовлечением костной ткани челюсти и зубов [Nedzi-Gora et al., 2017]. Для этого заболевания характерно наличие инфекционного фактора, приводящего к возникновению деструкции соединительных тканей, опосредованной локальной выработкой иммуновоспалительных маркеров в ответ на патогены и их продукты [Cardoso et al., 2018]. В результате клеточных ответов на пародонтопатогены в ткани десен или в десневой жидкости были идентифицированы многочисленные про- и противовоспалительные медиаторы [Chen et al., 2017; Nazir, 2017; Taboza et al., 2018]. Показано, что среди медиаторов организма-хозяина, продуцируемых после распознавания микроорганизмов, провоспалительный цитокин интерлейкин (ИЛ)-1 играет важную роль в патогенезе периодонтита, поскольку он связан с миграцией воспалительных клеток и прогрессированием остеокластогенеза [Kothari et al., 2016; Khondkaryan et al., 2018]. В отличие от деструктивного механизма, в котором участвуют провоспалительные цитокины, регуляторные пути, опосредованные противовоспалительными медиаторами, такими как ИЛ-10, могут защищать ткани периодонта и пародонта. Было доказано, что мыши, полученные путем редактирования генома (ИЛ-10(-/-)) обладают повышенной восприимчивостью к потере альвеолярной кости, вызванной *P. gingivalis*, что указывает на роль ИЛ-10 в контроле деструктивного воспаления [Proks et al., 2002]. С топографической точки зрения прикрепительный аппарат делится на маргинальный, альвеолярный и апикальный периодонт. Так же как различия в структуре, различия в формах загрузки найдены в различных сегментах. Восстановление вызывает различную нагрузку на естественный зуб и, следовательно, различные сегменты периодонта.

В этом контексте в многочисленных исследованиях в последние годы изучены перспективные стратегии модуляции иммунно-воспалительной реакции организма-хозяина, связанной с заболеваниями периодонта. В ряде доклинических и клинических исследований было показано, что как классические нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), так и селективные ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2) способны модулировать иммунно-воспалительную реакцию организма человека [Kumar, Dey, 2002; Rakel et al., 2007; Madeira et al., 2012; Sarkar et al., 2012; Ozkan et al., 2017; Sojod et al., 2017]. Однако системное применение этих препаратов обычно связано с побочными эффектами, ухудшающими

соблюдение пациентами режима их употребления [Mogi et al., 2017]. Хотя местное применение НПВП и других противовоспалительных средств изучалось в некоторых исследованиях, многие из них выявили неудовлетворительные результаты в контроле воспаления при местном применении этих препаратов [Пахомов, 2022; Franco et al., 2017; Vlinova et al., 2021]. Кроме того, в последние годы были идентифицированы природные молекулы, которые способны как напрямую воздействовать на патогенные микроорганизмы, так и на ассоциированные процессы – образование биопленок, факторы вирулентности.

### **Степень разработанности темы исследования**

Производные N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащие в своей структуре ионы металлов, в частности, серебра и церия, а также различные органические заместители были разработаны и синтезированы совместно исследователями Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева и учеными Всесоюзного научного центра по безопасности биологически активных веществ.

В проведенных ранее исследованиях Пахомовым Д.В. и Новиковым А.В. было показано, что производные N-ацетил-6-аминогексановой кислоты обладают широким спектром фармакологического действия, в том числе активны по сдерживанию воспалительных реакций, модулируют свободнорадикальные реакции, обладают ранозаживляющим эффектом [Новиков, 2018; Пахомов, 2022]. В этой связи было чрезвычайно интересно изучить терапевтические возможности топического применения двух новых оригинальных соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащих остатки 3-гидроксипиридина и диметилфенилацетамида (лидокаина) в своей структуре, при повреждении периодонта – экспериментальном лигатурном периодонтите у лабораторных крыс. Указанная модель стоматологической патологии была выбрана неслучайно – ввиду высокой распространенности социальной значимости воспалительного поражения периодонта, влияния патологического состояния на качество жизни пациентов.

Гипотеза настоящего исследования строилась на предположении о том, что топическое применение 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) вследствие ограничения воспалительной реакции и активации антиоксидантных механизмов позволит предотвратить вызванные патологическим процессом периодонта резорбцию костной ткани зуба и альвеолярного отростка, деструкцию окружающих мягких тканей, позволит оптимизировать реализацию местнообезболивающей активности амидных местных анестетиков.

### **Цель и задачи**

Определить терапевтический потенциал 3-гидроксипиридиновой и диметилацетамидной солей N-ацетил-6-аминогексановой кислоты при их топическом применении в лечении

экспериментального лигатурного периодонтита, а также установить некоторые механизмы действия соединений.

1. Провести внеэкспериментальное прогнозирование видов активности и спектра биологических мишеней 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17), а также изучить цитотоксичность субстанций в культуре фибробластов.

2. Изучить влияние топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в виде 2% геля на линейную и объемную потерю костной массы зуба и альвеолярного отростка при лигатурном периодонтите второго верхнего моляра у крыс.

3. Определить гистопатологические изменения ткани пародонта у животных с лигатурным периодонтитом второго верхнего моляра на фоне топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в виде 2% геля.

4. Изучить особенности экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (MMP-2), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1), фактора подавления миграции макрофагов (MIF), фосфодиэстеразы Р13К, концентрации ИЛ-1бета и ФНОальфа в ткани пародонта у крыс с лигатурным периодонтитом второго верхнего моляра на фоне топического применения 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17).

5. Исследовать местноанестезирующую активность диметилфенилацетамидной соли N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) при дентальной инфраорбитальной анестезии крысы с лигатурным периодонтитом второго верхнего моляра в виде 2% раствора.

6. Определить влияние диметилфенилацетамидной соли N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в диапазоне концентраций от 0,00001 до 0,001 мкМ на проводимость одиночных натриевых каналов и проводимость нервного проводника при нормальных значениях рН и на фоне ацидоза.

### **Научная новизна**

Проведено комплексное исследование фармакологических свойств оригинальных веществ – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) – в качестве потенциальных кандидатов в лекарственные средства для топического лечения периодонтита и оптимизации местноанестезирующего действия при воспалительно-деструктивном поражении пародонта.

При проведении внеэкспериментального скрининга «структура – активность» были впервые определены потенциальные мишени и виды активности, среди которых с высокой вероятностью – противовоспалительная и местноанестезирующая (ЛХТ-9-17). Впервые было установлено, что исследуемые вещества – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) – не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от от 0,0001 и до 1000 мкМ, при этом соединение ЛХТ-6-17 в концентрациях 100 мкМ и выше стимулирует пролиферацию фибробластов в клеточной культуре.

Показано, что на модели экспериментального лигатурного периодонтита верхнего второго моляра у лабораторных крыс 10-суточная местная аппликация 2% геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в качестве действующего вещества, приводит к предотвращению резорбции костной ткани как по линейному так и по волюметрическому показателю, при этом, наибольшей активностью обладает вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17).

При патоморфологическом исследовании препаратов верхней челюсти экспериментальных животных было установлено, что экспериментальная терапия в течение 10 суток с применением 2% геля, содержащего соли N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, уменьшала тяжесть течения патологического процесса, что выражалось в ограничении воспалительной реакции, сохранении костной основы зуба и альвеолярного отростка. Наибольший эффект установлен у 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17): на фоне назначения содержащего его геля нейтрофильная инфильтрация тканей была минимально выражена, сохранялся цемент второго моляра и костная основа альвеолярного отростка, в меньшей степени, чем на фоне диметилацетамидной соли страдали окружающие патологический процесс мягкие ткани десны.

При изучении молекулярной основы установленного протекторного эффекта впервые показано, что 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) при топическом применении в виде 2% гидрогеля подавлял клеточную экспрессию матриксной металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, что свидетельствовало об ингибировании активности остеокластов, ограничивало активность свободнорадикальных процессов, что в совокупности со снижением тканевой концентрации провоспалительных ИЛ-1бета и ФНО-альфа обосновывало наличие противовоспалительного эффекта в спектре действия вещества.

При инфраорбитальном однократном введении лабораторной крысе с экспериментальным пародонтитом и без такового диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) в виде 2% раствора обладает местноанестезирующим

действием, которое характеризуется медленным развитием достаточного по глубине обезболивания продолжительностью до 120 минут, и обусловлено в том числе ингибированием одиночных натриевых каналов и подавлением проводимости нервного проводника. Реализация местного обезболивающего эффекта соединения на фоне острого воспалительного процесса сдерживает формирование местноанестезирующего эффекта. Это проявляется как снижением глубины, так и продолжительности действия на 25%.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Полученные научные результаты о цитотоксичности, спектре терапевтической активности и потенциальных биологических мишенях могут быть использованы для расширения представлений о фармакологии производных N-ацетил-6-аминогексановой кислоты с органическими заместителями.

При проведении доклинических исследований кандидата в лекарственное средство из группы соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты необходимо учитывать полученные результаты о противовоспалительном, остеопротекторном и местноанестезирующем действии соединений ЛХТ-6-17 и ЛХТ-9-17.

Форма 2% геля может рассматриваться как перспективная лекарственная форма кандидата в лекарственное средство, содержащего диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) в качестве действующего вещества, для топического лечения местнораспространенного воспалительно-деструктивного процесса периодонта.

Настоящее экспериментальное лабораторное неклиническое исследование получило частичную финансовую поддержку гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых кандидатов наук, молодых докторов наук и ведущих научных школ Российской Федерации НШ-843.2022.3, при частичном научно-методическом сопровождении ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Основные положения и выводы диссертации используются в учебной работе (при чтении курса лекций и проведении практических занятий со студентами) кафедр фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, общественного здоровья и здравоохранения, стоматологии медицинского института ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарёва» (Саранск) и клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней, оперативной хирургии и топографической анатомии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Москва), а также используются в научно-исследовательской

работе (научного семинара) лабораторий Центра доклинических исследований инновационных лекарственных

### **Методология и методы исследования**

Проведено экспериментально-лабораторное неклиническое исследование, методологической основой которого явились принципы единства и неделимости исследовательской концепции, целостность, комплексность и мультидисциплинарность методических подходов, включающих методы молекулярной и фундаментальной фармакологии и фармхимии, экспериментальной стоматологии, молекулярной биологии, патологической анатомии, биохимии и биофизики.

*In silico* прогнозированию спектра биологической активности 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) было проведено с помощью математических методов, заложенных в основу специального программного продукта – PASSonline.

Цитотоксические характеристики исследуемых соединений определяли путем оценки выживаемости клеток в культуре фибробластов человека с помощью калориметрического метода с использованием триметилфенилтетразолия хлорида.

В качестве базовой модели повреждения периодонта выбрали лабораторную модель экспериментального лигатурного периодонтита второго верхнего моляра у крыс-самцов линии Wistar. Каждая экспериментальная группа включала по 5 лабораторных животных. С помощью методов микро-КТ определили влияние топического применения гелей, содержащих 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) на линейную потерю костной ткани при патологии и, по данным трехмерной реконструкции, - на объем костной массы / общий вес тканей. Также выполняли микроморфологическое исследование тканей пародонта в области патологического процесса при окрашивании препаратов гематоксилином и эозином. Для количественной оценки степени повреждения тканей применяли специальную морфологическую шкалу.

Поскольку при изучении влияния соединений на морфологию и структуру кости и мягких тканей пародонта наибольший эффект был установлен у геля, содержащего 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17), молекулярный раздел работы по определению экспрессии матриксной металлопротеиназы-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1) методом иммуногистохимии, экспрессии фактора подавления миграции макрофагов (MIF), фосфодиэстеразы P13K методом



иммунофлюоресценции, концентрации ИЛ-1бета и ФНОальфа методом количественного иммуноферментного анализа провели только для указанного соединения.

Местноанестезирующую активность диметилфенилацетамидной соли N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) изучали на модели проводниковой инфраорбитальной местной анестезии нерва верхнего второго моляра лабораторных крыс с лигатурным периодонтитом и без такового. В аспекте определения возможных механизмов локального обезболивающего воздействия соединения были проведены исследования *in vitro* по определению ионной проводимости изолированных натриевых каналов методом точечной фиксации потенциала на одиночных нейронах, выделенных из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*) и на живых свежих препаратах седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*), помещенных в специальную перфузионную камеру, позволяющую при изменении рН перфузионного раствора воспроизводить условия, подобные воспалительной реакции.

Анализ и обобщение полученных экспериментальных результатов выполняли с помощью методов описательной и сравнительной статистики с применением пакета программ STATA 17.0.

#### **Личный вклад автора**

Диссертант самостоятельно выдвинул научную гипотезу и сформулировал научный вопрос, в соответствии с которым лично автором были поставлены цель и задачи исследования. Автор лично на основе богатого реферативного материала написал литературный обзор, выбрал и определил методологическую основу работы. Автор лично выполнил внеэкспериментальное прогнозирование активности соединений и изучил их цитотоксичность. Автором было предложено в качестве базовой модели патологического процесса периодонта использовать модель лигатурного пародонтита у крыс. Лично автор выполнил все эксперименты на лабораторных крысах. Автором самостоятельно проводилось топическое применение гелей исследуемых соединений. Лично автор забирал ткани для исследования, осуществлял их консервацию, проводку. При непосредственном участии автора проводилась микро-КТ с обработкой изображений и вычислением показателей. Автор погруженно участвовал в выполнении иммуногистохимического, иммунофлюоресцентного и иммуноферментного исследований. Автор самостоятельно выполнял изучение местного анестезирующего действия соединения ЛХТ9-17 и производил инфраорбитальные инфекции. При непосредственном и включенном участии автора выполнялись исследования на изолированных клетках и препаратах седалищного нерва. Автор лично проводил анализ полученных результатов, непосредственно и деятельно участвовал в написании научных публикаций. Лично подготовил настоящую рукопись и автореферат диссертации.

## **Положения, выносимые на защиту**

1. При внеэкспериментальном анализе структура – активность у диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) был выявлен широкий спектр биологических мишеней и видов действия, позволяющих в том числе, предполагать и противовоспалительную активность. Оба вещества не обладают цитотоксическим действием в отношении фибробластов человека в широком диапазоне концентраций.

2. Установлено, что диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) вследствие подавления тканевой экспрессии металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К ограничивают остеокластогенез и обеспечивают сохранение целостности костной ткани при лигатурном периодонтите второго верхнего моляра; ограничение на фоне их топического применения продукции MIF, в также провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНОальфа сопровождается развитием местного противовоспалительного и антирадикального эффекта.

3. Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) подавляет натриевый ток и ингибирует проведение импульса по нервному волокну, что, наряду с его умеренным цитопротекторным эффектом обуславливает наличие у вещества свойств местного анестетика.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология, областям исследований по п. 3 «Изыскание, дизайн *in silico*, конструирование базовых структур, воздействующих на фармакологические мишени. Выявление фармакологически активных веществ среди природных и впервые синтезированных соединений, продуктов биотехнологии, геной инженерии и других современных технологий на экспериментальных моделях *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*», п..44. Исследование зависимости «структура–активность» в различных классах фармакологических веществ. Целенаправленный синтез и скрининг фармакологических веществ, п. 5. Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток и паспорту научной специальности 3.1.7. Стоматология п.3 Изучение проблем хирургической стоматологии с разработкой методов диагностики и лечения заболеваний челюстей и полости рта, п.8. 8. Экспериментальные исследования по изучению этиологии, патогенеза, лечения и профилактики основных стоматологических заболеваний.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность положений и выводов диссертации определяется тем следующим: 1) выбор базовой модели патологического состояния соответствует мировой практике

неклинических исследований в фундаментальной фармакологии и экспериментальной стоматологии; 2) дизайн и протокол исследования прошли рассмотрение и признаны соответствующими этическим требованиям при работе с лабораторными животными; 3) экспериментальные группы составлены из животных одного вида, полученных из сертифицированного питомника и прошедших карантинизацию; 4) количество животных в группах позволяет получить репрезентативные результаты; 5) использованное лабораторное оборудование и расходные материалы, реактивы находились в надлежащем состоянии, сроки годности соответствовали установленным; 6) методы анализа результатов соответствовали современному уровню развития статистической науки.

Апробация диссертационной работы проведена на совместном расширенном межучрежденческом заседании кафедр общественного здоровья и организации здравоохранения, педиатрии, фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, стоматологии Медицинского института федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева» и кафедр оперативной хирургии и топографической анатомии, клинической фармакологии и пропедевтики внутренних болезней Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) протокол №1 от 9.10.2023.

Результаты проведенного диссертационного исследования обсуждались и докладывались на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Морфологические школы сегодня (Воронеж, 2022), XXIII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2021), XXIV Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, 2022).

### **Публикации по теме диссертации**

По теме диссертационного исследования опубликовано 9 научных работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных журналов Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки Россия, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 5 статей в изданиях, индексируемых в международных базах Web of Science, Scopus, PubMed, MathSciNet, zbMATH, Chemical Abstracts, Springer (из них 1-обзорная), получен 1 патент на изобретение РФ.

## **Структура и объём диссертации**

Диссертация написана по традиционному плану, имеет четкую структуру, включающую введение; первую главу – литературный обзор; вторую главу с описанием материалов и методов исследования; третьей, четвертой и пятой глав с описанием результатов исследования; шестой главы заключения, обобщающей и критически анализирующей полученные результаты; выводов; практических рекомендаций; списка сокращений и условных обозначений; списка литературы.

Диссертация изложена на 139 страницах компьютерного текста, иллюстрирована 17 рисунками и 3 таблицами. Список литературы содержит выходные данные 200 работ, из которых 11 работ отечественных и 189 – зарубежных авторов.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Настоящее диссертационное исследование выполнено в соответствии с требованиями приказа Минздрава России №199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и иными нормативными правовыми актами, основываясь на принципах гуманного обращения с подопытными животными.

### **Исследуемые соединения и препараты сравнения**

В работе исследованы два соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты – 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17). Дизайн химической структуры, синтез и лабораторная технология получения чистой субстанции разработаны в отделе химии, технологии и аналитического контроля АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ» (г. Старая Купавна Московской области) и любезно предоставлены нам разработчиками<sup>1</sup>. Принципиальные химические структуры соединений представлены на рисунке 1.

Оба соединения были представлены субстанциями с чистотой 99,8% в виде белого с кремоватым оттенком мелкокристаллического порошка. Оба вещества растворяли в воде при небольшом нагревании.

Для достижения цели и задач настоящего диссертационного проекта вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) использовали в одной лекарственной форме – в виде 2% геля, в то время как вещество диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) применяли как в виде 2% геля, так и в инъекционной

---

<sup>1</sup> Автор признателен профессору С.Я. Скачиловой за предоставленные соединения и лекарственные формы ЛХТ-6-17 и ЛХТ-9-17

лекарственной форме – в виде 2% водного раствора с рН 7,3. Для приготовления водного инъекционного раствора использовалась дважды дистиллированная вода. В 1 мл инъекционной формы содержалось 20 мг действующего вещества ЛХТ-9-17.

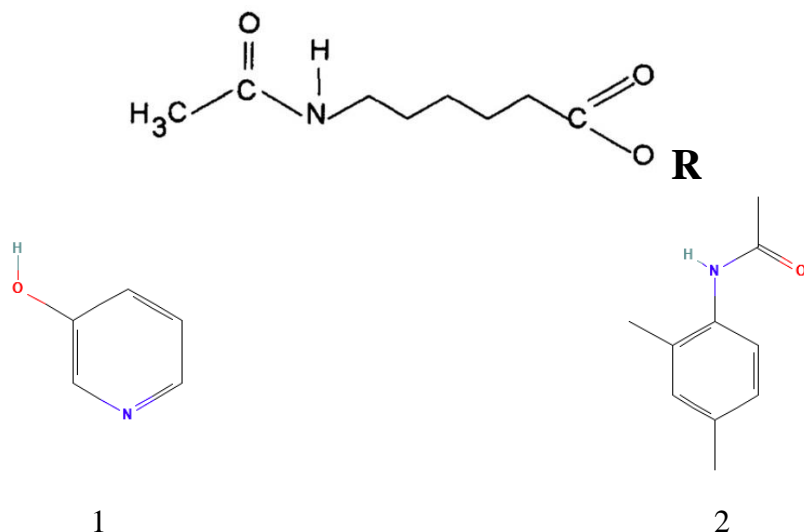


Рисунок 1 – Химическая структура соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты: R – заместитель (1 – 3-гидроксипиридин; 2 – 2,4-(N-диметилфенилацетамид)

3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) в опытах на животных применяли в форме 2% гидрогеля. Технологически его изготавливали следующим образом (АО «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ», Россия): в 50 мл дважды дистиллированной воды растворяется натриевая соль гиалуроновой кислоты 1 г в виде порошка до достижения 1% концентрации (по соотношению масса – объем). К раствору гиалуроновой кислоты осторожно прибавляли 2,67% масса/объем раствора натрия периодата в молярном соотношении 1:1. Таким образом запускали окислительную реакцию, которая протекала в течение 24 ч при температуре 25°C, после чего ее останавливали и в реакционную смесь прибавляли диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) в массовом соотношении 2 к 100 в закрытой камере. Реакционная смесь гомогенизировалась при 500 об/мин при помощи магнитного шейкера на протяжении получаса при температуре 65°C с последующим центрифугированием при 700 об/мин на протяжении 5 минут с целью удаления пузырьков воздуха.

В качестве препаратов сравнения на этапах работы, в которых изучалась роль веществ в локальном контроле лигатурного периодонтита, использовали гель гиалуроновой кислоты. При изучении местноанестезирующего действия раствора диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) при лигатурном периодонтите в качестве препарата сравнения использовали 2% раствор лидокаина гидрохлорида, изготавливаемый *ex tempore*

непосредственно перед применением с использованием дважды дистиллированной стерильной воды и субстанции лидокаина гидрохлорида (Merck SIGMA-Aldrich, Германия).

### **Лабораторные животные**

Эксперименты поставлены на 60 белых лабораторных крысах-самцах линии Wistar массой 200-220 г, приобретенных в филиале «Электрогорский» ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России.

Животные содержались в экспериментально-биологической клинике (учебном виварии) медицинского факультета ФГБОУ ВО «МГУ им. Н.П. Огарева» и виварии Центра биомедицинских технологий ФГАОУ Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет).

В работе также использовали одиночные нейроны, выделенные из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*) и живые свежие препараты седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*). Пресноводные моллюски и земноводные были любезно предоставлены коллегами из Института биофизики клетки – обособленного структурного подразделения ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» и транспортировались в специальных охлаждаемых контейнерах для сохранения жизнеспособности особей.

При постановке опытов были сформированы экспериментальные группы, каждая из которых состояла не менее, чем из 5 особей. Такое количество животных было необходимо для получения репрезентативных результатов и соответствовало общемировому тренду к максимальному ограничению использования теплокровных животных в медико-биологических исследованиях. Маркировка животных проводилась при помощи цветных пометок на холке.

Все болезненные процедуры выполняли под общей анестезией, для чего применяли уретан (800 мг/кг) внутривенно. Выведение из эксперимента проводили с помощью ингаляционной наркозной приставки для аппарата ИВЛ RWD для грызунов (Китай) и препарата для ветеринарного наркоза изофлуран (Германия).

### **Методы исследования**

*In silico* прогнозированию спектра биологической активности 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) было проведено с помощью математических методов, заложенных в основу специального программного продукта – PASSonline [Филимонов, Поройков, 2006; Поройков и др., 2010], при этом программа рассчитывает максимальную вероятность активации (Pa) или подавления (Pi) функции / активности.

Цитотоксические характеристики исследуемых соединений определяли путем оценки выживаемости клеток в культуре фибробластов человека с помощью калориметрического метода с использованием триметилфенилтетразолия хлорида (МТТ-тест).

В качестве базовой модели повреждения периодонта выбрали лабораторную модель экспериментального лигатурного периодонтита второго верхнего моляра у крыс-самцов линии Wistar. Каждая экспериментальная группа включала по 5 лабораторных животных. С помощью методов микро-КТ определили влияние топического применения гелей, содержащих 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) и диметилфенилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) на линейную потерю костной ткани при патологии и, по данным трехмерной реконструкции, - на объем костной массы / общий вес тканей.

Микроморфологическое исследование тканей пародонта в области патологического процесса проводили после окрашивания препаратов гематоксилином и эозином на светооптическом уровне. Для количественной оценки степени повреждения тканей применяли специальную морфологическую шкалу.

Экспрессию матричной металлопротеиназы-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, супероксиддисмутазы первого типа (СОД-1) оценивали методом иммуногистохимии, экспрессию фактора подавления миграции макрофагов (MIF), фосфатидилинозитол-3-киназы PI3K – методом иммунофлюоресценции. Тканевую концентрацию ИЛ-1бета и ФНОальфа определяли методом количественного иммуноферментного анализа (ИФА) только для 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17).

Местноанестезирующую активность диметилфенилацетамидной соли N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) изучали на модели проводниковой инфраорбитальной анестезии дентального нерва верхнего второго моляра лабораторных крыс с лигатурным периодонтитом и без такового.

Возможные механизмы локального обезболивающего воздействия соединения ЛХТ-9-17 были изучены *in vitro*. Ионную проводимость изолированных натриевых каналов изучили методом точечной фиксации потенциала на одиночных нейронах (patch-clamp [Sakman and Neer, 1987]), выделенных из окологлоточного вегетативного ганглия брюхоногого моллюска – прудовика большого (*Limnea stagnalis*). Амплитуду потенциала действия определяли на живых свежих препаратах седалищного нерва лягушки озерной (*Rana radibunda*), помещенных в специальную перфузионную камеру, позволяющую при изменении рН перфузионного раствора воспроизводить условиях, подобные воспалительной реакции.

Результаты исследования обобщались в форме непрерывных или дискретных величин. Непрерывные величины в зависимости от однородности статистических совокупностей были представлены средней или медианой (при несимметричном распределении признака). Достоверность различий между средними величинами вычисляли с помощью t критерия Стьюдента (при сравнении двух групп) или ANOVA (при сравнении 3 и более групп) с применением post-hoc теста Тьюки, или тестов Крускала-Уоллиса или Манна-Уитни при 5% уровне значимости. Анализ данных выполняли в программной среде STATA 17.3 (США).

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

Для внеэкспериментальной проверки этой гипотезы провели количественный анализ структура – активность при помощи математической программы PASSonline, операционный компонент которой насчитывает базу из более 800000 различных активностей и химических структур. Мы установили, что соединение N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, содержащее в качестве радикала фрагмент диметилацетамида (ЛХТ-9-17), с наибольшей вероятностью проявляет свойства, локатора быстрых натриевых каналов задержанного выпрямления (0,891), что является предпосылкой наличия у соединения местноанестезирующих свойств. Спрогнозированные высокие коэффициенты для таких биологических свойств как лечение воспаления мягких тканей (0,914), протектор мембран слизистых оболочек (0,766) свидетельствует о высокой вероятности реализации противовоспалительного эффекта диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17). Модификация воспалительной реакции под действием соединения может быть также обусловлена выявленным при прогнозировании агонизмом с колониестимулирующим фактором макрофагов (0,779), ингибированием плазменного фактора свертывания В (0,765), ингибированием фибролазы (0,768), стимуляцией лейкопоза (0,732). При прогнозировании фармакологической активности 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) нами были получены во-многом схожие предиктивные показатели, обусловленные структурным сходством молекул. Высокая рассчитанная вероятность ингибирования дисульфидных протеинредуктаз (глутатиона) (0,874) и метиламино-глутамат N-метилтрансферазы (0,769) наряду со свойствами скавенджера активных форм кислорода (0,762) и антигипоксантной активностью могут придавать молекуле мощные антиоксидантные свойства. А подавление активности остеокластов (0,873), ингибирование IgA-специфичных сериновых эндопептидаз (0,766) – обуславливать сохранение костно-белкового матрикса ткани зуба при его воспалительном процессе.

При оценке цитотоксичности, проведенной на следующем этапе работы, инкубирование культуры фибробластов человека в присутствии диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ не сопровождалось гибелью клеток в



культуре до достижения концентрации 10 мкМ. Некоторое снижение выживаемости клеток (до 97,5%) при повышении концентрации вещества в среде культивирования до 100 мкМ не выходит за рамки статистической погрешности и не может рассматриваться как значимый цитотоксический эффект вещества. При повышении концентрации вещества в среде культивирования до 100 мкМ наблюдали рост клеток в исходной культуре (в среднем до 106,4%), что было статистически значимым результатом ( $p = 0,03$  по сравнению с предыдущим значением, критерий Уилкоксона).

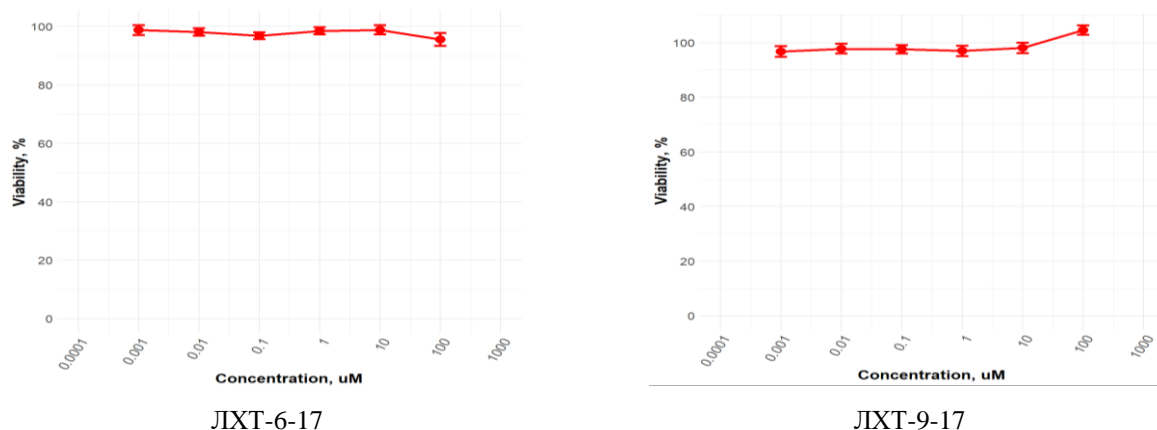


Рисунок 2 – Выживаемость клеток культуры фибробластов через 48 часов после инкубации в присутствии LXHT-6-17 и LXHT-9-17 в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ ( $n = 3$ );  $M \pm SD$ ; \*  $p = 0,03$  при сравнении с предыдущим значением (критерий Уилкоксона)

Развитие воспалительной реакции при периодонтите включает активацию различных путей, участвующих в метаболической регуляции клеточных и тканевых функций. Основными задачами следующего раздела исследования было изучение роли диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (LXHT-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (LXHT-6-17) в воспалении, потере костной массы и активации ряда ассоциированных сигнальных путей на экспериментальной модели периодонтита на крысах.

По данным компьютерной микрофотографии (микро-КТ) верхних челюстей лабораторных крыс с экспериментальным периодонтитом, рассчитали линейную потерю костной массы, выраженную в миллиметрах между цементно-эмалевым соединением пораженного патологическим процессом зуба и гребнем альвеолярного отростка верхней челюсти. Топическая аппликация соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в зубодесневой карман в течение 10 суток приводила к статистически достоверному сокращению линейной потери костной массы, отличающейся также от группы животных, получавших в качестве лечения гель гиалуроновой кислоты. Так, в частности, в группе животных, которым с терапевтической целью вводили гель LXHT-9-17 показатель составил  $0,87 \pm 0,05$  мм ( $p = 0,005$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,02$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты, с интактными фрагментами челюсти). В группе лабораторных крыс, которые

получали топическое воздействие гелем, содержащим в качестве действующего вещества ЛХТ-6-17, расстояние между цементно-эмалевым соединением и гребнем альвеолярного отростка верхней челюсти составило в среднем  $0,65 \pm 0,04$  мм ( $p = 0,001$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,03$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты, с интактными фрагментами челюсти) (Рисунок 3А).

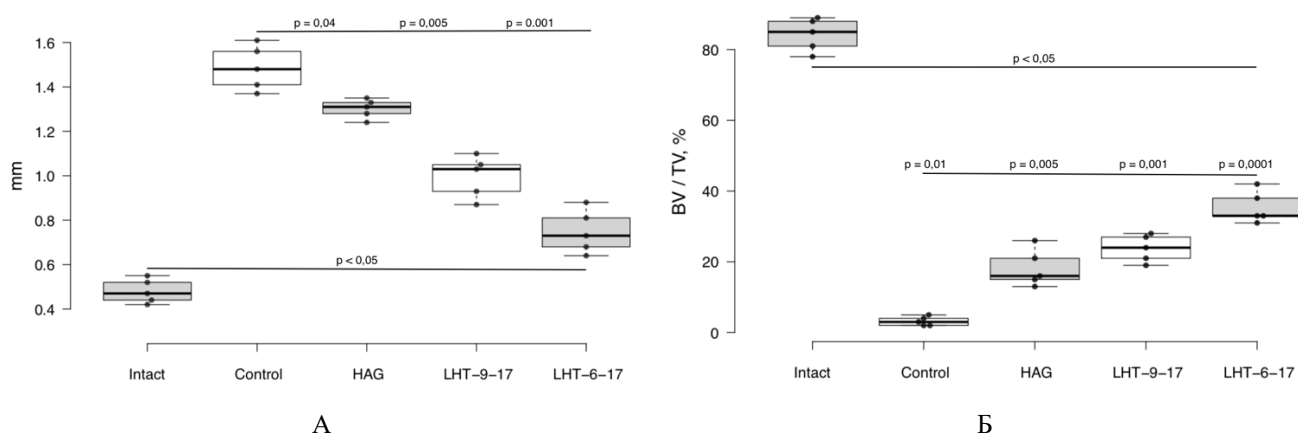


Рисунок 3 – Влияние топического применения 2% геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты на линейную (А) и объемную (Б) потерю костной ткани и у лабораторных крыс с экспериментальным периодонтитом в области второго моляра: 1 – интактная группа; 2 – контроль; 3 – гель с гиалуроновой кислотой; 4 – ЛХТ-9-17; 5 – ЛХТ-6-17; HAG – гель с гиалуроновой кислотой;  $n = 5$  в каждой группе;  $M \pm SD$ ; значимость различий вычислена при помощи ANOVA, post-hoc тест Тьюки

Также, после проведения трехмерной реконструкции полученных микромографических изображений провели анализ соотношения объема костной массы / общего веса тканей в исследованных фрагментах верхней челюсти (в области второго моляра) лабораторных животных. Топическая аппликация соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты к статистически достоверному сокращению потери волюметрических показателей костной массы, вместе с тем не отличающейся от группы животных, получавших в качестве лечения гель гиалуроновой кислоты. Так, в частности, в группе животных, которым с терапевтической целью вводили гель ЛХТ-9-17 исследуемый показатель BV / TV составил  $24 \pm 4$  % ( $p = 0,005$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,0001$  при сравнении с интактными фрагментами верхней челюсти лабораторных крыс), а у крыс, получавших гель ЛХТ-6-17 – в среднем  $36 \pm 3$  мм ( $p = 0,0001$  при сравнении с контрольной группой животных,  $p = 0,005$  при сравнении с гелем гиалуроновой кислоты,  $p = 0,0001$  при сравнении с интактными фрагментами челюсти) (Рисунок 3Б).

Гистопатологическое исследование среза альвеолярного отростка верхней челюсти крыс, получавших топическое воздействие гелем, содержащим соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты, выявило значимую позитивную динамику: в группе животных, получавших ЛХТ-6-17 регистрировали клеточную инфильтрацию легкой степени

выраженности, ограниченную область десны, с сохраненной альвеолярной костью и цементом. Средний гистопатологический балл в этой группе составил 1 (диапазон 1 – 1;  $p < 0,001$  при сравнении с интактными контралатеральными областями и контрольными животными). На фоне местного воздействия гелем ЛХТ-9-17 средний гистопатологический балл был равен 2,5 (диапазон 2 – 3;  $p < 0,05$  при сравнении с интактными контралатеральными областями) (Рисунок 4).

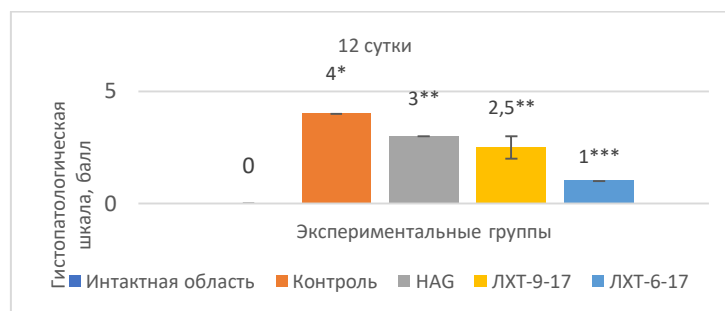


Рисунок 4 – Влияние топического применения 2% геля ЛХТ-6-17 на морфологию исследованных фрагментов верхней челюсти (в области второго моляра);  $M \pm IQ$ ; значимость различий вычислена при помощи теста Манна-Уитни:  $p < 0,05$  \* при сравнении с интактными областями, \*\* с контролем, \*\*\* с ЛХТ-9-17 и гелем гиалуроновой кислоты (HAG)

Поскольку наибольший терапевтический эффект был установлен у 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата с применением ИГХ метода изучили влияние 10-суточного местного применения ЛХТ-6-17 в виде 2% геля на экспрессию MMP-2, RANKL, RANK, катепсина-K, СОД-1. У животных, получавших 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) в виде геля в течение 10 суток в зубодесневой карман в области экспериментального лигатурного периодонтита на 12 сутки патологического процесса была установлена гипоэкспрессия либо отсутствие экспрессии матричной металлопротеазы MMP-2 (желатиназы), рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-кВ, его рецептора RANK, катепсина-K и супероксиддисмутазы первого типа. Полученные результаты соотносятся с полученными ранее гистологическими данными и позволяют заключить, что 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) сдерживает активацию остеокластов, ведущую к резорбции костной основы зуба и кости альвеолярного отростка верхней челюсти, тем самым тормозит развитие периодонтита. Одним из ключевых механизмов в реализации воспалительной реакции служит мобилизация макрофагов в очаг воспаления. Подавление миграционного процесса происходит под действием специального хемокина – фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF). Изучили влияние топического применения ЛХТ-6-17 на экспрессию MIF в ткани пародонта лабораторных грызунов в интактной области, в области второго моляра с явлениями лигатурного периодонтита. У животных, получавших ЛХТ-6-17 в области экспериментального лигатурного периодонтита на 12 сутки

патологического процесса было установлено статистически значимое снижение экспрессии фактора, ингибирующего миграцию макрофагов (MIF), до в среднем 2,3 ( $p = 0,001$  при сравнении с контролем,  $p = 0,03$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти) (Рисунок 5А). Поскольку ранее было установлено PI3K сигнального пути в реализации патологического процесса при периодонтите, в рамках настоящей диссертационной работы изучили экспрессию маркера.

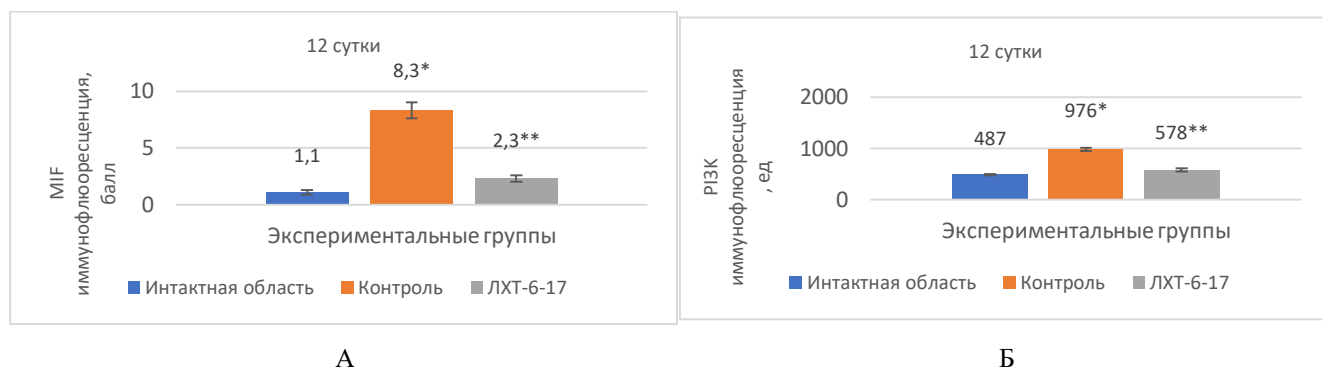


Рисунок 5 – Влияние топического применения геля, содержащего соединения ЛХТ-6-17 на MIF (А) и PI3K (Б) иммунофлуоресценцию;  $n = 5$  в каждой группе;  $M \pm SD$ ; значимость различий вычислена при помощи теста ANOVA и Тьки:  $p < 0,05$  \* при сравнении с интактными областями,  $p < 0,05$  \*\* при сравнении с интактными областями и с контрольной группой

Мы установили, что ЛХТ-6-17 приводит к снижению экспрессии PI3K как в клетках пародонта, так и в области дентина второго моляра до в среднем  $578 \pm 31$  ед. ( $p = 0,005$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти;  $p = 0,005$  при сравнении с контролем) (Рисунок 5Б).

Методом количественного ИФА определили тканевую концентрацию провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНОальфа в ткани пародонта лабораторных животных экспериментальных групп. Применение при экспериментальном лигатурном периодонтите ЛХТ-6-17 в виде геля сопровождается снижением концентрации обоих провоспалительных цитокинов в области дентина второго моляра: показатель составил для ИЛ-1бета в среднем  $246 \pm 17$  пг/мл ( $p = 0,03$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти;  $p = 0,005$  при сравнении с контрольными областями верхней челюсти), для ФНОальфа –  $1976 \pm 77$  пг/мл ( $p = 0,001$  при сравнении с интактными областями верхней челюсти и контролем).

Воспалительный процесс в периодонте и окружающих зуб тканях создают неблагоприятные условия для реализации анестезирующего действия местных анестетиков, особенно имеющих амидную структуру. В связи с тем, что на этапе внеэкспериментального прогнозирования фармакологической активности у соединения ЛХТ-9-17 был вычислен высокий коэффициент подавления быстрых натриевых каналов, а также поскольку при создании вещества в структуру молекулы был введен остаток диметилфенилацетамида

(основание молекулы лидокаина), были основания предполагать, что ЛХТ-9-17 может проявлять свойства местного анестетика. Применение водного 2% раствора диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата вызывало полную анестезию через  $32,1 \pm 1,7$  мин после инфраорбитальной инъекции у животных без воспаления. Крысы этой группы не реагировали на болевые стимулы в течение  $90,1 \pm 2,6$  мин стимуляции ( $p < 0,001$  по сравнению с лидокаином гидрохлоридом) (Рисунок 6).

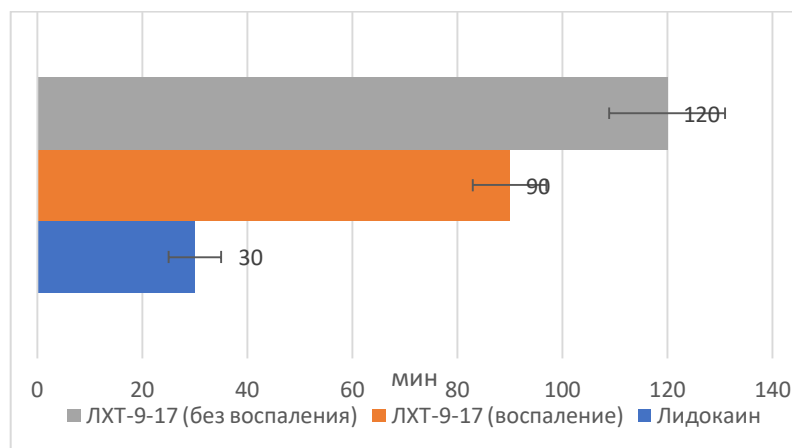


Рисунок 6 – Продолжительность местного обезболивающего действия диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) у лабораторных крыс с лигатурным периодонтитом и без такового при проводниковой анестезии второго верхнего моляра

На заключительном этапе нашей работы мы провели ряд экспериментов, в которых попытались объяснить природу анестезирующего действия ЛХТ-9-17. Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат в зависимости от концентрации подавляет проводимость изолированных натриевых каналов, при этом в максимальной концентрации –  $0,01$  мкМ проводимость канала для иона натрия ингибируется полностью (Рисунок 7А).

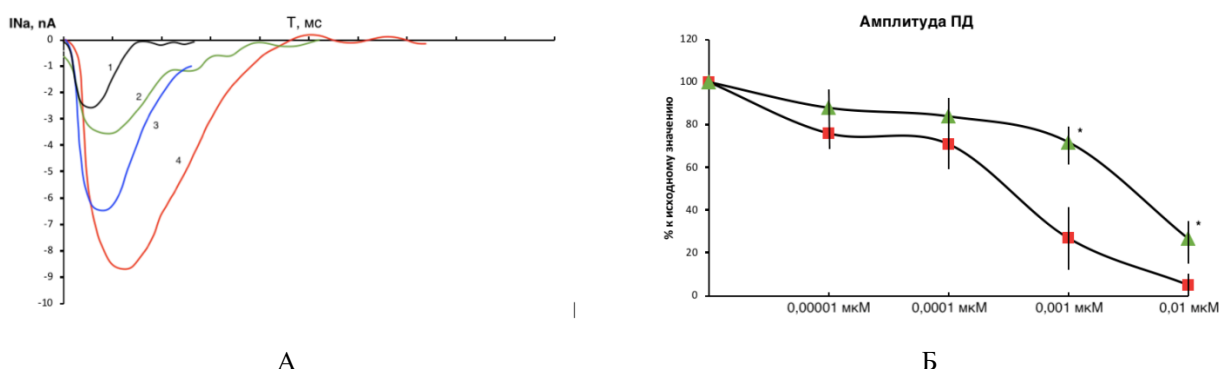


Рисунок 7 – Запись тока через быстрый натриевый канал ( $I_{Na}$ ) (А) и амплитуды ПД (Б) изолированного препарата седалищного нерва на фоне перфузии  $0,00001$  (1),  $0,0001$  (2),  $0,001$  (3) и  $0,01$  (4) мкМ соединения ЛХТ-9-17 при рН в перфузионной камере  $7,3$  (красный квадрат) и  $6,0$  (зеленый треугольник): \*  $p < 0,05$  при сравнении с соответствующими значениями при нормальном рН (критерий t Стьюдента);  $n = 5$  для каждой концентрации

Перфузия препаратов седалищного нерва лягушки озерной раствором соединения ЛХТ-9-17 в диапазоне концентраций от  $0,00001$  до  $0,01$  мкМ при нормальном рН практически

полностью подавляла проведение импульса по изолированному нервному проводнику. В условиях метаболического ацидоза наблюдали лишь незначительное снижение амплитуды ПД (не превышающее 70% от исходно зарегистрированных значений показателя), при увеличении концентрации диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноата (соединение ЛХТ-9-17) в перфузионном растворе до 0,01 мкМ происходило подавление амплитуды ПД на 73%, что, тем не менее, было статистически значимо меньше, чем в экспериментах без ацидоза ( $p = 0,01$ ) (Рисунок 7Б).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17) вследствие подавления тканевой экспрессии металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора- $\kappa$ B (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-K ограничивают остеокластогенез и обеспечивают сохранение целостности костной ткани при лигатурном периодонтите второго верхнего моляра; ограничение на фоне их топического применения продукции MIF, в также провоспалительных цитокинов ИЛ-1бета и ФНОальфасопровождается развитием местного противовоспалительного и антирадикального эффекта. Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-9-17) подавляет натриевый ток и ингибирует проведение импульса по нервному волокну, что, наряду с его умеренным цитопротекторным эффектом обуславливает наличие у вещества свойств местного анестетика.

## ВЫВОДЫ

1. Исследуемые вещества – диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) – не обладают цитотоксичностью в диапазоне концентраций от 0,0001 и до 1000 мкМ, при этом соединение ЛХТ-6-17 в концентрациях 100 мкМ и выше стимулирует пролиферацию фибробластов в клеточной культуре.

2. На модели экспериментального лигатурного периодонтита верхнего второго моляра у лабораторных крыс 10-суточная местная аппликация геля, содержащего соединения N-ацетил-6-аминогексановой кислоты в качестве действующего вещества приводит к предотвращению резорбции костной ткани как по линейному так и по волюметрическому показателю, при этом, наибольшей активностью обладает вещество 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (ЛХТ-6-17).

3. Экспериментальная терапия в течение 10 суток с применением геля, содержащего соли N-ацетил-6-аминогексановой кислоты смягчала течение патологического процесса, что выражалось в ограничении воспалительной реакции, сохранении костной основы зуба и альвеолярного отростка. Наибольший эффект установлен у 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-

аминогексаноата (ЛХТ-6-17): на фоне назначения содержащего его геля нейтрофильная инфильтрация тканей была минимально выражена, сохранялся цемент второго моляра и костная основа альвеолярного отростка, в меньшей степени, чем на фоне диметилацетамидной соли страдали окружающие патологический процесс мягкие ткани десны.

4. 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноата (ЛХТ-6-17) при топическом применении в виде 2% гидрогеля подавлял клеточную экспрессию матриксной металлопротеиназы-2, рецептора-активатора лиганда ядерного фактора-κВ (RANKL), его рецептора RANK, катепсина-К, что свидетельствовало об ингибировании активности остеокластов, ограничивало активность свободнорадикальных процессов.

5. Диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) обладает местноанестезирующим действием, которое характеризуется медленным развитием достаточной по глубине анестезии продолжительностью до 120 минут, и обусловлено в том числе ингибированием одиночных натриевых каналов и подавлением проводимости нервного проводника. Реализация местного обезболивающего эффекта соединения на фоне острого воспалительного процесса сдерживает формирование местноанестезирующего эффекта. Это проявляется как снижением глубины, так и продолжительности действия на 25%.

#### **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. При проведении доклинических исследований кандидата в лекарственное средство из группы соединений N-ацетил-6-аминогексановой кислоты необходимо учитывать полученные результаты о противовоспалительном, остеопротекторном и местноанестезирующем действии соединений ЛХТ-6-17 и ЛХТ-9-17.

2. Форма 2% геля может рассматриваться как перспективная лекарственная форма кандидата в лекарственное средство, содержащего диметилацетамида N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-9-17) и 3-гидроксипиридина N-ацетил-6-аминогексаноат (соединение ЛХТ-6-17) в качестве действующего вещества, для топического лечения местнораспространенного воспалительного процесса периодонта.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Blinova, E.V. Novel dimethylacetamide-containing formulation improves infraorbital anaesthesia efficacy in rats with periodontitis / Blinova E.V., Shikh E.V., Novikov A.V., Vediaeva A.P., **Mazov Y.A.**, Kogan E.A., Semeleva E.V., Vasilkina O.V., Yurochkina A.M., Blinov D.S., Lebedev A.B., Lobanova E.G. // **Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences**. 2020. Vol. 2020. P. 1-7 [**Scopus**]
2. Semeleva, E.V. Metal-containing taurine compounds protect rat's brain in reperfusion-induced injury / Semeleva E.V., Blinova E.V., Zaborovsky A.V., Gromova I.A., Shukurov A.S., Blinov D.S.,

- Turovsky E.A., Vasilkina O.V., Lobanova E.G., Samishina E.A., **Mazov Ya.A.**, Sokolov A.I., Dergunova Yu.V. // **Research Results in Pharmacology**. 2020. Vol. 6. № 4. P. 43-50. [Scopus]
3. Blinova, E. Cerium-containing n-acetyl-6-aminohexanoic acid formulation accelerates wound reparation in diabetic animals / Blinova E., Shimanovsky D., **Mazov Y.**, Demura T., Drozdov V., Butenko A., Sokolov A., Vavilova O., Sukhov A., Pakhomov D., Kilmyashkina M., Deryabina O., Vasilkina O., Alkhatatneh B.A., Shmatok D., Tumutolova O., Blinov D., Samishina E., Skachilova S., Sorokvasha I. et al. // **Biomolecules**. 2021. Vol. 11. № 6. P.1-21[Scopus]
4. Blinova, E.V. Novel hydroxypyridine compound protects brain cells against ischemic damage in vitro and in vivo / Blinova E.N., Turovsky E., Eliseikina E., Igrunkova A., Semeleva E.V., Golodnev G., Termulaeva R., Vasilkina O., Skachilova S.Ya., **Mazov Ya.A.**, Zhandarov K.A., Simakina E., Belanov K.Yu., Zalogin S., Blinov D.S. // **International Journal of Molecular Sciences**. 2022. Vol. 23. № 21. P. 1-19. [Scopus]
5. **Мазов, Я.А.** Изучение эффективности фармакологической композиции с производным диметилацетамида при инфраорбитальной анестезии у крыс с пародонтитом / Мазов Я.А., Блинова Е.В., Semeleva E.V., Елисейкина Е.В., Дагар Е.А., Вавилова О.В., Юрочкина А.М. // **Вестник Биомедицина и социология**. 2022. Т. 7. № 1. С. 88-94.
6. Дагар, Е.А. In vitro экспериментальное изучение тканевой и клеточной токсичности новых лекарственных веществ / Дагар Е.А., **Мазов Я.А.**, Блинова Е.В., Семелева Е.В., Елисейкина Е.В., Ревина Н.В., Тимошкин С.П., Блинов Д.С. // **Вестник Биомедицина и социология**. 2022. Т. 7. № 3. С. 90-94.
7. **Мазов, Я.А.** Соединение n-ацетил-6-аминогексановой кислоты подавляет нервную проводимость / Мазов Я.А., Дмитриев А.А., Пирожков А.С., Блинов Д.С., Тимошкин Д.Е., Термулаева Р.М., Семелева Е.В., Блинова Е.В. // **Вестник Биомедицина и социология**. 2023. Т. 8. № 3. С. 59-64.
8. Величко, Э.В. Химико-аналитический подход к оценке эффективности местных анестетиков / Величко Э.В., Лобаева Т.А., Рабинович С.А., Васильев Ю.Л., **Мазов Я.А.**, Лобанова Ю.Н. // **Российский журнал боли**. 2023. Т. 21. № 3. С. 35-42 [Scopus]
9. Спрей, обладающий ранозаживляющим и противовоспалительным действием / Скачилова С.Я., Ермакова Г.А., Блинова Е.В., Блинов Д.С., Проскурина О.В., Шилова Е.В., Алешина В.А., Кильмяшкина М.Ф., **Мазов Ян.А.**, Соколов А.И., Желтухин Н.К., Симакина Е.А., Пахомов Д.В., Шматок Д.О. // **Патент на изобретение** RU 2790489 С2, 21.02.2023. Заявка № 2021113416 от 12.05.2021.



## СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ИГХ – иммуногистохимия

ИЛ – интерлейкин

ИФА – иммуноферментный анализ

НПВС – нестероидное

противовоспалительное средство

ПД – потенциал действия

ФНО – фактор некроза опухолей

INa – натриевый ток