

Список литературы

1. **Кукес В.Г.** Клиническая фармакология. М:ГЭОТАРМЕД. 2008.
2. **Кукес В.Г.** Метаболизм лекарственных средств; клинико-фармакологические аспекты. М.: Рефарм. 2004.
3. **Ayanian J.Z., Fuchs C.S., Stone R.M.** Lovastatin and rhabdomyolysis. *Ann. Intern. Med.* 1988. 109: 682-683.
4. **Corsini A., Bellosa S., Baetta R. et al.** New insights into the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of statins. *Pharmacol. Ther.* 1999. 84: 413-428.
5. **Desager L.P., Horsmans Y.** Clinical pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 1996. 31: 348-341.
6. **Kivisto K.T., Kantola T., Neuvonen P.J.** Different effects of itraconazole on the pharmacokinetics of fluvastatin and lovastatin. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1998. 46: 49-53.
7. **Lennernas H., Fager G.** Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 1997. 32: 403-425.
8. **Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group.** Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N. ENGL. J. MED.* 1998. 339: 1349-1357.
9. **Muck W.** Rational assessment of the interaction profile of atorvastatin supports its low propensity for drug interactions. *Drugs.* 1998. 56 (Suppl. 1): 15-23.
10. **Richter W.O., Jacob B.G., Schwandt P.** Interaction between fibre and lovastatin. *Lancet.* 1991. 338: 706.
11. **Shepherd J., Cobble S.M., Ford J. et al.** Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 1995. 333: 1301-1307.
12. **Stern R.H., Gibson D.M., Whitfield L.R.** Cimetidine does not alter atorvastatin pharmacokinetics or LDL-cholesterol reduction. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1998. 53: 475-478.

Pharmacokinetics and clinical efficacy of the lipid-lowering drug Atorvastatin

A.S. Sivkov, S.K. Sivkova, V.G. Kukes, G.V. Ramenskaya

The pharmacokinetics of lipid-lowering drug of the statin – Atorvastatin by HPLC in 18 healthy humans are examined. In 30 patients with hyperlipidemia studied the clinical efficacy of Atorvastatin. The treatment marked by a pronounced hypolipidemic effect with a significant decrease in atherogenic lipids profile. A slight antiplatelet effect of this drug also noted.

Key words: pharmacokinetics, hyperlipidemia.

Оценка токсичности *in vitro* нового перевязочного материала

А.А. Чурин, М.Г. Данилец, А.М. Дыгай

НИИ фармакологии Сибирского отделения РАМН, Томск

Контактная информация: М.Г. Данилец 634028, г. Томск, пр. Ленина, 3

В сообщении представлены результаты изучения прямой и непрямой цитотоксичности нового перевязочного материала (ПМ) в сравнении со стандартной марлевой повязкой. Было обнаружено, что при прямом контакте нетканого полимерного микроволокнистого ПМ с клетками в течение 24 ч культивирования не происходило изменений морфологии клеток и не увеличивалось количество погибших клеток как при визуальной оценке, так и в МТТ-тесте. Экстракт, полученный из ПМ, также не проявлял цитотоксического действия в отношении тестируемых клеток. Полученные результаты позволяют сделать заключение, что ПМ соответствует международному стандарту ISO 10993-5, применяемому к медицинским изделиям, и может в дальнейшем применяться в клинической практике для лечения инфицированных ран.

Ключевые слова: цитотоксичность, перевязочные материалы, разработка биосовместимых биоматериалов.

В ранее проведенном экспериментальном исследовании были выявлены ранозаживляющие и антибактериальные свойства нового перевязочного материала, в котором неорганические волокна оксидно-гидроксидных фаз алюминия нанесены на полимерные ацетилцеллюлозные волокна. Нетканые материалы с диаметром волокон 1–3 мкм обладают более развитой поверхностью и высокопористой структурой, чем материалы из более толстых волокон, что обеспечивает способность быстро впитывать и хорошо удерживать питательную жидкость. Впитывающая способность материала усилена за счет введения в основу пористых частиц гидрата окиси алюминия, полученных из порошка алюминия электровзрывным способом. Было показано, что этот материал уменьшает период заживления и значительно ускоряет са-

нацию инфицированной раны, оказывая положительное влияние на процессы регенерации тканей [2].

В связи с этим, **целью** настоящего исследования являлось изучение соответствия перевязочного материала международным стандартам, применяемым к медицинским изделиям, и, в частности, изучение цитотоксичности нового перевязочного материала *in vitro* согласно стандарту ISO 10993-5 [1, 3].

Материалы и методы

Характеристика образца. Перевязочный материал (ПМ) выполнен на основе нетканой микроволокнистой ткани из биологически инертного полимера – ацетата целлюлозы методом электроформования в Институте физики прочности и материаловедения СО РАН, г. Томск. На микроволокнах закреплены высоко-

дисперсные частицы гидрата окиси алюминия, полученные из электровзрывных порошков алюминия, размером 0,2-5,0 мкм с удельной поверхностью 100-250 м²/г и пористостью 50-95%.

Клеточные культуры. Использовали четыре линии опухолевых клеток – мастоцитомы мыши Р-815, аденокарцинома мыши Эрлиха, фибросаркома мыши L-929 и эритромиелолойкоз человека К-562. Все клеточные линии хранились в условиях глубокой заморозки в жидком азоте. Для исследования были взяты клетки, прошедшие 2-4 пассажа. Клеточные линии культивировались в полной культуральной среде, содержащей RPMI 1640 (Sigma), 10% фетальной бычьей сыворотки (Hyclone), 2 mM L-глутамин (Sigma), 10 mM HEPES (Serva), 0,05 mM 2-меркаптоэтанола (Fluka) и 50 мг/мл гентамицина (Sigma).

Непрямая цитотоксичность. Вытяжки из нового перевязочного материала получали путем проведения экстракции исследуемого образца площадью 12 см² в 4 мл полной культуральной среды (ПКС) в течение 72 ч при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали вытяжку из медицинского бинта (ГОСТ 1172-93), которую получали путем проведения экстракции исследуемого образца площадью 24 см² в 4 мл ПКС в течение 72 ч при 37°C. Экстракцию проводили в стерильных, химически инертных контейнерах. Вытяжки использовали сразу после приготовления. В качестве положительного контроля применяли 0,01% раствор фенола, в качестве контроля реактива – ПКС без исследуемого материала.

Опухолевые клетки культивировали в пластиковой посуде (96-луночные планшеты, Costar) в концентрации 2x10⁵ кл/мл культуральной среды в присутствии вы-

тяжек из нового перевязочного материала, отрицательного и положительного контролей в конечном объеме 50%, 25%, 12,5% и 6,25%. На каждый контроль и опыт использовали 4-5 лунок. Инкубировали планшеты 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Далее определяли цитотоксичность ПМ методом качественной и количественной оценки. Качественная оценка: визуальное исследование клеток с помощью светового микроскопа, оценивали общую морфологию, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Результаты выражали в процентах. Количественная оценка: подсчитывали число живых и погибших клеток с использованием суправитальной окраски (0,1% трипановый синий) и пролиферацию клеток с помощью МТТ-теста [4]. Для этого по 0,1 мл клеточной суспензии переносили в 96-луночный планшет, добавляли 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (МТТ, «Serva»), концентрация которого в лунках составляла 200 мкг/мл, культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ и абсолютной влажности 4 ч, после чего надосады удаляли, осадок растворяли диметилсульфоксидом (DMSO, Sigma) и измеряли абсорбцию растворов при длине волны 550 нм с использованием спектрофотометра («LabSystems»). Результаты выражали в единицах оптической плотности.

Прямая цитотоксичность. Это исследование позволяет осуществить качественную и количественную оценку цитотоксичности. Инкубировали культуру опухолевых клеток при температуре 37°C в воздухе в присутствии 5% CO₂ до тех пор, пока культура не вырастет приблизительно до соприкосновения клеток в конце логарифмической фазы кривой роста. Проводили визуальный контроль

культуры, используя микроскоп. Удаляли ПКС. Клетки помещали в 24-луночный планшет в концентрации 2x10⁵/мл в свежую ПКС, и в каждую лунку помещали отдельные препараты исследуемого образца и стерильного бинта на клеточный слой в центре каждой лунки с таким расчетом, чтобы препараты покрывали 1/10 поверхности клеточного слоя. В качестве положительного контроля применяли 0,01% раствор фенола, который добавляли к опухолевым клеткам в конечном объеме 50% и 25%, в качестве контроля реактива – ПКС без исследуемого материала. На каждый контроль и опыт использовали 3-5 лунок. Инкубировали планшеты 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Далее определяли цитотоксичность методом качественной и количественной оценки. Качественная оценка: осматривали клетки через световой микроскоп, оценивали общую морфологию, вакуолизацию, расщепление, лизис клеток и целостность мембран. Результаты выражали в процентах. Количественная оценка: подсчитывали число живых и погибших клеток с использованием суправитальной окраски (0,1% трипановый синий) и пролиферацию клеток с помощью МТТ-теста [4].

Статистическая обработка результатов осуществлялась с применением пакета статистических программ StatPlus 2009 (AnalystSoft Inc.) с предварительной оценкой нормальности распределения и использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Непрямая цитотоксичность. Исследование влияния вытяжек из изучаемого перевязочного материала показало, что добавление их в различных концентрациях в культуру опухолевых клеток достоверно не повышало процент клеток,

имеющих отклонения в морфологии, по сравнению с контролем реактива. Относительно группы отрицательного контроля (вытяжки из стерильного бинта) также не было выявлено статистически значимого негативного влияния вытяжек из исследуемого перевязочного материала на морфологию и жизнеспособность опухолевых клеток. Добавление в культуру опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно увеличивало процент клеток, имеющих отклонения в морфологии, как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой, и также значительно увеличивало процент гибели клеток как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Добавление вытяжек из исследуемого ПМ в различных концентрациях в культуру опухолевых клеток, в основном, не угнетало пролиферативную активность клеток различных линий по сравнению с контролем реактива (табл. 1). Лишь при внесении значительного объема вытяжек из ПМ (25% и 50%) в культуру клеток Эрлиха наблюдалось достоверное снижение пролиферативного потенциала опухолевых клеток, также как и в случае с добавлением вытяжек из стерильного бинта. При добавлении вытяжек из исследуемого перевязочного материала в культуру клеток мастоцитомы Р-815 отмечалось даже стимулирование пролиферации опухолевых клеток. Относительно группы отрицательного контроля также, в основном, не было выявлено статистически значимого негативного влияния вытяжек из исследуемого перевязочного материала на пролиферацию опухолевых клеток. Лишь при внесении вытяжек из ПМ в объеме 12,5% и 50% в культуру клеток К-562 наблюдалось достоверное

снижение пролиферативного потенциала опухолевых клеток по сравнению с группой отрицательного контроля, однако относительно контроля реактива статистически значимых изменений не отмечалось. Добавление в культуру

опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно угнетало дозозависимым образом пролиферацию опухолевых клеток как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Таблица 1

Влияние вытяжек из исследуемого перевязочного материала на пролиферацию клеток опухолевых линий (единицы оптической плотности) (M±m)

Экспериментальные группы	Концентрация вытяжек (в %)	Опухолевые линии			
		P-815	K-562	Опухоль Эрлиха	L-929
Контроль реактива	–	891,0±25,2	455,0±16,5	831,7±28,1	712,5±20,6
Отрицательный контроль (стерильный бинт)	6,25	992,3±16,5*	544,8±27,4*	747,5±38,7	655,5±22,9
	12,5	858,3±18,7	450,0±8,5	758,2±22,6	666,5±17,5
	25	840,8±10,3	492,2±19,3	676,7±15,3*	577,2±18,5*
	50	782,8±32,5*	558,0±30,1*	632,0±26,1*	544,5±49,3*
Опыт (исследуемый перевязочный материал)	6,25	985,7±16,7*\$	489,7±19,8\$	752,7±30,9\$	683,5±22,9
	12,5	988,2±22,3*\$#	412,5±6,0\$#	904,25±59,5\$	666,5±20,2
	25	1008,5±33,4*\$#	454,0±22,9\$	709,2±22,2*\$	761,5±43,7#
	50	980,7±59,5\$#	432,6±14,3\$#	612,0±5,6*\$	688,0±31,1#
Положительный контроль (фенол)	6,25	432,5±20,3*	247,5±17,5*	553,5±36,7*	–
	12,5	222,7±21,9*	175,0±10,3*	349,2±26,2*	–
	25	141,6±8,9*	162,8±9,4*	203,7±19,7*	–
	50	83,2±3,0*	97,4±3,4*	108,5±11,3*	–

Примечание: * – различия с контролем реактива достоверны, p<0,05; # – различия между опытной группой и отрицательным контролем достоверны, p<0,05; \$ – различия между опытной группой и положительным контролем достоверны, p<0,05.

Прямая цитотоксичность. Исследование влияния прямого контакта нового ПМ показало, что добавление его в культуру опухолевых клеток достоверно не повышало процент клеток, имеющих отклонения в морфологии и уровне жизне-

способности, по сравнению с контролем реактива. Относительно группы отрицательного контроля (стерильный бинт) также не было выявлено статистически значимого негативного влияния исследуемого перевязочного материала на

морфологию и жизнеспособность опухолевых клеток. Добавление в культуру опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно снижало уровень жизнеспособности и увеличивало процент клеток, имеющих отклонения в морфологии, как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Добавление исследуемого ПМ в культуру опухолевых клеток не угнетало пролиферативную активность клеток различных линий по сравнению с кон-

тролем реактива (табл. 2). Относительно группы отрицательного контроля (стерильный бинт) также не было выявлено статистически значимого негативного влияния вытяжек из исследуемого ПМ на пролиферацию опухолевых клеток. Добавление в культуру опухолевых клеток раствора фенола (положительный контроль) значительно угнетало дозозависимым образом пролиферацию опухолевых клеток как по сравнению с контролем реактива, так и с опытной группой.

Таблица 2

Влияние исследуемого перевязочного материала на пролиферацию клеток опухолевых линий (единицы оптической плотности) (M±m)

	Опухолевые линии			
	P-815	K-562	Опухоль Эрлиха	
Контроль реактива	550,0±13,2	395,2±16,6	657,7±11,3	
Отрицательный контроль (стерильный бинт)	493,3±20,8	392,6±6,1	670,7±15,4	
Опыт (исследуемый перевязочный материал)	517,0±30,5\$	401,0±8,6\$	654,3±26,7\$	
Положительный контроль	фенол 25% от объема	141,6±8,9*	108,0±3,7*	134,7±9,3*
	фенол 50% от объема	83,2±3,0*	89,6±2,7*	101,0±5,0*

Примечание: * – различия с контролем реактива достоверны, p<0,05; # – различия между опытной группой и отрицательным контролем достоверны, p<0,05; \$ – различия между опытной группой и положительным контролем достоверны, p<0,05.

На основе полученных результатов показано, что прямой контакт ПМ и бинта медицинского с клетками в течение 24 ч культивирования не приводил к изменению их морфологии и жизнеспособности.

Экстракт, полученный из ПМ, также не проявлял цитотоксического действия в отношении тестируемых клеток. Однако экстракт из бинта медицинского в больших концентрациях мог оказывать повреждающее действие на тестовые

клетки, хотя и мало влиял на морфологию клеток. Это может быть связано с технологическими особенностями обработки бинта, при котором используются некоторые химические агенты. Остаточные количества этих агентов могли привести к наблюдавшемуся негативному влиянию. Такого недостатка лишен исследованный перевязочный материал.

Полученные результаты позволяют заключить, что исследованный ПМ со-

ответствует международному стандарту ISO 10993-5, применяемому к медицинским изделиям, и может в дальнейшем применяться в клинической практике для лечения ран.

Список литературы

1. ГОСТ Р ИСО 10993-5-2009. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Исследования на цитотоксичность: методы *in vitro*. – М.: Стандартиформ. 2010. 17 с.

2. Патент (RU) № 2397781 от 27.08.2010 г. «Нетканый материал медицинского назначения, обладающий

ранозаживляющей, антибактериальной и противовирусной активностью и перевязочное средство на его основе» / Дыгай А.М., Лернер М.И., Новицкий В.В., Огородова Л.М., Псахье С.Г., Чуринов А.А.

3. ISO 10993-5. Biological evaluation of medical devices, Part 5: Tests for cytotoxicity, *in vitro* methods. International Standardization Organisation, Geneva. 1992.

4. Mosmann T.R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // J. Immunol. Methods. 1983. N 5. P. 55-63.

Assessment of toxicity *in vitro* of a new bandaging material

A.A. Churin, G.M. Danilets, A.M. Dygai

Article presents results of the study of new bandaging material's direct contact and indirect cytotoxicity assays in comparison with cotton gauze. It has been found that in direct contact of nonwoven polymeric fibrous bandaging material (BM) with cells for 24 hours of cultivation no changes in cell morphology take place, nor does the amount of dead cells increase. These conclusions have been made by means of both a visual examination and an MTT assay. The BM extract did not have any cytotoxic effect on the tested cells either. The obtained results allow us to make a conclusion that the BM complies with the international standard ISO 10993-5, which is applied to medical goods, and can be applied in the treatment of infected wounds in clinical practice.

Key words: cytotoxicity, bandaging materials, development of biocompatible biomaterials.

Применение биологической модели для оценки кишечной проницаемости *in vitro* – монослоя эпителиальных клеток Caco-2

И.Е. Шохин^{1,2}, Ю.И. Кулинич^{1,2}, Г.В. Раменская^{1,2,3}, В.Г. Кукес^{1,2,3}

¹ – ГОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Минздравсоцразвития РФ, Москва

² – ФГБУ «НЦ ЭСМП», Минздравсоцразвития РФ, Москва

³ – Филиал «Клиническая Фармакология» НЦБМТ РАМН, Москва

Контактная информация: Кукес Владимир Григорьевич elmed@yandex.ru

Статья посвящена применению монокультуры клеток аденокарциномы толстого кишечника – Caco-2 для оценки проницаемости лекарственных веществ (ЛВ) *in vitro*. Описаны основные преимущества использования данной биологической модели. Приведены общие принципы, подходы и методология определения проницаемости на культуре клеток Caco-2. Показана корреляция между значениями кишечной проницаемостью, определенной в условиях *in vivo* и кажущимися коэффициентами кишечной проницаемости *in vitro*.

Ключевые слова: клетки Caco-2, проницаемость, абсорбция.

Введение

Одной из ключевых задач современной фармации и биомедицины является понимание процесса доставки лекарственного вещества (ЛВ) до органа или клеток-мишеней. Для этого необходимо объективно оценить поведение лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Для того чтобы действующее вещество достигло системного кровотока, оно должно пройти через следующие стадии: высвобождение из лекарственной формы, растворение в физиологических средах ЖКТ, абсорбция через кишечную (или желудочную) мембрану [1]. Степень проницаемости ЛВ через стенку кишечника можно достоверно определить в исследованиях *in vivo*: например, определением абсолютной биодоступности, анализом массового баланса, исследованиями методом кишечной перфузии [2]. Подобные дан-

ные являются наиболее достоверными, однако такие исследования достаточно трудоемкие и дорогостоящие, а также вовлекают в испытание здоровых добровольцев, что вызывает дополнительные этические сложности. Поэтому на протяжении последних 15 лет для исследователей в области биомедицины и биофармации стояла задача разработать метод, позволяющий косвенно, но с достаточной степенью достоверности, надежности и воспроизводимости оценить кишечную проницаемость [3-5].

Методы оценки кишечной проницаемости

Среди методов, позволяющих косвенно оценить степень абсорбции субстанций, можно выделить 3 основные группы: исследования *in situ* (например, на тонком кишечнике крыс) [4], исследования на моделях *in vitro* (например, на монокультурах различных линий клеток) [5],