



Ферментные тест-системы *in vitro* для первичного скрининга биологически активных веществ

В.А. Дубинская

к.б.н., ведущий научный сотрудник
ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ВИЛАР); Москва

Т.В. Володина

к.б.н., ведущий научный сотрудник ВИЛАР;
Москва

Импортозамещение лекарственных средств, наметившееся в последнее время, является благоприятной основой для создания отечественных оригинальных лекарственных препаратов. Изыскание и исследование новых фармацевтических средств является длительным и дорогостоящим процессом, лишь одно из 10 000 веществ с предполагаемой терапевтической активностью доходит до создания лекарственного препарата. Поэтому разработка инновационных лекарственных средств обуславливает необходимость применения современных, высокоспецифичных и конкурентоспособных технологий, предназначенных для направленного поиска биологически активных веществ (БАВ) и создания на их основе новых эффективных лекарственных препаратов.

Традиционно оценку биологической активности, согласно Государственной фармакопее Российской Федерации, изд. XIII [1], проводят на лабораторных животных, используя несколько разнообразных тестов, интересующих исследователя. Однако общемировая тенденция к сокращению числа животных, используемых в острых экспериментах, в настоящее время определяет широкое применение биотест-систем на первом этапе скрининга фармакологически активных веществ. Это биосенсорные системы и системы, созданные на основе применения ферментов, культур растительных и животных клеток, изолированных органов и тканей, позволяющие эффективно и быстро выявлять в изучаемых веществах биологическую активность искомой направленности.

Известно, что метаболизм лекарственных веществ (ЛВ) и БАВ проходит в две фазы [2, 3]. В ходе фазы I метаболических превращений происходит первичное взаимодействие молекул ксенобиотика (ЛВ и БАВ) с «мишенями», в качестве которых обычно выступают активные центры ферментов, клеточ-

ные рецепторы, молекулы нуклеиновых кислот и др. Во второй фазе метаболизма наблюдается детоксикация и создание продуктов, которые далее могут быть элиминированы из организма. Таким образом, наличие фазы I метаболизма ЛВ и БАВ открывает возможность для выявления *in vitro* их целевой биологической активности и возможных первичных мишеней, т.е. изучения механизма действия.

Применение ферментов в качестве биотест-системы базируется на фундаментальных представлениях фармакологии и биохимии о специфических фармакофорах, которые представляют собой элементы структуры фармакологически активных соединений, комплементарные структуре соответствующих мишеней. Специфическое избирательное взаимодействие фармакофоров с эндогенными мишенями, в качестве которых часто выступают активные центры ферментов, играет ключевую роль в биологических процессах, обеспечивающих соответствующие физиологические функции. Ферменты, применяемые в биотест-системах *in vitro* в качестве тест-объектов, быстро реагируют на изменение (в том числе и под действием ЛВ) внутренней среды организма, ускоряя или замедляя скорость биохимических реакций.

Специфические ферментные тест-системы, используемые на первичном этапе поиска БАВ, не требуют наличия животных. Для проведения тестирования достаточно иметь соответствующие ферменты, выпускаемые современной промышленностью. Биохимическое тестирование *in vitro* в качестве первого этапа скрининга БАВ при адекватном выборе тест-объектов позволяет повысить эффективность скрининга, снизив материальные затраты и сократив время эксперимента.

В биохимических тест-системах *in vitro*, как правило, в качестве тест-объектов используют ключевые или лимитирующие ферменты. Так, например, при разработке оригинального теста на нейролептики в качестве тест-объекта был предложен ключевой фермент синтеза катехоламинов – тирозингидроксилаза [4]. Известно, что усиление действия ацетилхолина, накопление его в органах и тканях может быть достигнуто путем блокирования основного фермента, разрушающего ацетилхолин в организме, – ацетилхолинэстеразы. Этот фермент широко используется для направленного поиска лекарственных препаратов широкого спектра действия [5],

в том числе для лечения болезни Альцгеймера и других нейродегенеративных состояний. В настоящее время на моделях показано участие ацетилхолина в функциях познания и обучения [6, 7].

При первичном скрининге антидепрессантов применяют моноаминоксидазу – специфический фермент, катализирующий окислительное дезаминирование моноаминов [8].

Особенно важен скрининг при тестировании веществ растительного происхождения, т.к. извлечения из растений представляют собой не индивидуальные вещества, а смесь веществ и вследствие этого могут обладать широким спектром фармакологических свойств. Кроме того, фитопрепараты отличаются сбалансированным многокомпонентным химическим составом, который может варьировать в зависимости от погодных условий, места произрастания, изменений в составе почвы и прочих факторов.

Предложенная система биохимических ферментных тестов состоит из блоков, каждый из которых коррелирует с определенным видом фармакологической активности. Каждая ферментная тест-система *in vitro* позволяет оценить продукт по одному биологическому параметру, поэтому для выявления спектра биологически активных свойств, проявляющихся в биологическом действии, следует применять соответствующий набор ферментных тестов *in vitro*.

Во Всероссийском научно-исследовательском институте растительных и ароматических растений (ВИЛАР) разрабатываются специфические ферментные тест-системы *in vitro*, обладающие высокой специфичностью и чувствительностью, хорошей воспроизводимостью и значительной экономичностью. В частности, разработаны и запатентованы тест-системы на основе использования ферментов антиоксидантной защиты для выявления биологической активности адаптогенной, антиоксидантной, противомикробной и противовирусной направленности действия [9-11], а также тест-система на основе НАДФН-оксидазы, позволяющая выявлять вещества с иммуномодулирующей активностью [12]. Применение в качестве тест-объектов ферментов NO-синтазы, коллагеназы, гиалуронидазы и ксантиноксидазы позволило выявлять при первичном биохимическом тестировании БАВ, обладающих противовоспалительными, противоартритными и противовоспалительными свойствами [13, 14]. Тест-система на основе ферментов алкогольдегидрогеназы и альдегиддегидрогеназы позволяют проводить первичный скрининг антиалкогольных препаратов.

Кроме того, для выявления БАВ, обладающих антиоксидантным действием, была разработана биотест-система, включающая ключевые ферменты системы биотрансформации и детоксикации соединений в микросомах печени – цитохром P-450

и фермент глутатионтрансфераза [15]. Показана пригодность разработанных ферментных тест-систем для фармации.

Очень информативны и экономичны разработанные ферментные тест-системы при выборе оптимального технологического процесса выделения БАВ из растений [16].

Применение ферментных тест-систем оказалось полезным при оценке качества лекарственного сырья, полученного из культуры клеток растений. Дело в том, что оценка качества таких лекарственных препаратов сопряжена с определенными трудностями, связанными с изменением качественного и количественного состава метаболитов клеточной популяции в процессе длительно перевиваемого культивирования. Согласно Фармакопее, оценка качества препаратов производится по строго определенным показателям их химического состава. Поэтому снижение содержания веществ, которые служат показателями качества, оценивается как снижение качества сырья и препаратов из него. Между тем, в клетках перевиваемой культуры могут накапливаться не менее активные изомеры или различные производные, обладающие той же направленностью фармакологического действия.

В нормативных документах на препараты женьшеня определяющим показателем их качества служит наличие содержания панаксазидов. Тестируемые нами продукты культуры клеток женьшеня, по данным химического анализа, практически не содержали панаксазидов, однако по своей биологической активности они были вполне сопоставимы с действием изолированной фракции панаксазидов.

Еще один аналогичный пример. Исследования химического состава культуры клеток биорадиолы розовой показали, что в ней отсутствуют салидразид и фенилпропаноиды, которые считаются главными действующими веществами в корневище радиолы розовой. Однако проведенные ранее в Российской государственной медицинской академии им. И.М. Сеченова доклинические испытания показали, что продукты из культуры клеток радиолы обладают свойствами, характерными для адаптогенов. Использование ферментных тест-систем *in vitro* также выявили наличие адаптогенной активности. При этом, в зависимости от используемого экстрагента, можно получать продукты с различной направленностью фармакологического действия. Так, при использовании водно-спиртовых растворов экстрагируются вещества, которые проявляют свойства, характерные для адаптогенов. Продукты на водной основе являются активаторами антиоксидантных ферментов, а это характерно для веществ антиоксидантного действия [17, 18].

Большую сложность и серьезную проблему представляет оценка эффективности таких биологически



активных добавок (БАД), которые можно условно отнести к группе парафармацевтиков. Это БАД на основе натурального или биотехнологического сырья, имеющие в своем составе БАВ, стандартизация которых затруднена или невозможна. Часто неизвестно, какое именно вещество в данном натуральном продукте действует, либо вещество это полностью не идентифицировано и невозможно оценить его количество. С помощью ферментных тест-систем можно экспрессно определить направленность действия и биологическую активность этого БАДа.

Таким образом, даже краткий перечень возможностей ферментных тест-систем *in vitro* дает возможность судить об информативности биохимического тестирования, позволяющего проводить первичный поиск БАВ, обладающих определенной фармакологической активностью и способных служить ориентировочной основой для дальнейшего изучения их с помощью методов, регламентированных Государственной фармакопеей. Кроме того, в ВИЛАР разработанные биотест-системы широко применяют в технологии создания лекарственных форм, оценке качества и сроков годности препаратов. Все эти возможности методов могут найти спрос на рынке интенсивно развивающейся индустрии лекарственных средств: лечебных, профилактических, гигиенических, реабилитационных, парфюмерно-косметических и др.

Литература

1. Государственная фармакопея Российской Федерации. М.: 2015. – Т. I.
2. Куценко С.А. Основы токсикологии. 2004. – «Фолиант». СПб. – С. 311 – 329.
3. Граник В.Г. Метаболизм экзогенных соединений. 2006. «Вузовская книга». М. – С. 25–41.
4. Минеева М.Ф., Колхир В.К., Быков В.А. Программный скрининг биологически активных веществ растительного происхождения. // Сб. тезисов I-го Съезда Российского научного общества фармакологов 9–13 октября 1995 г. Волгоград «Фундаментальные исследования как основа создания лекарственных средств». – М. – 1995. – С. 281.
5. Дубинская В.А., Минеева М.Ф., Вахнина Е.В. и др. Ферментная тест-система *in vitro* для направленного поиска холинергических веществ и изучения их механизма действия. // Вопр. биол., мед. и фарм. химии – 2007. – № 2. – С. 32–37.
6. Бачурин С.О. Медико-химические подходы к направленному поиску препаратов для лечения и предупреждения болезни Альцгеймера // Вопросы медицинской химии. – 2001. – № 2. – С. 1–41.
7. Граник В.Г. Нейродегенеративные заболевания. Химический и медико-биологический аспекты. М-СПб. Нестор-история. 2014. – 467 с.

8. Андреева Н.И., Горкин В.З., Машковский М.Д. Новое в изучении антидепрессантов – ингибиторов MAO. // Хим.фарм.ж. – 1985. – № 6. – С. 650–657.

9. Быков В.А., Минеева М.Ф., Дубинская В.А. и др. Способ выявления веществ, обладающих адаптогенными свойствами, *in vitro*. Патент РФ № 2181890. 2001. Chem.Abstr. 137:379958 (2003).

10. Быков В.А., Минеева М.Ф., Дубинская В.А. и др. Способ выявления веществ, обладающих противомикробными и противовирусными свойствами, *in vitro*. Патент РФ № 2181891. 2001. Chem.Abstr. 137:348784 (2003).

11. Быков В.А., Дубинская В.А., Минеева М.Ф. и др. Способ выявления веществ, обладающих антиоксидантными свойствами, *in vitro*. Патент РФ № 2181892. 2001. Chem.Abstr. 137:379959 (2003).

12. Быков В.А., Минеева М.Ф., Попова Н.Б. Способ выявления веществ с потенциальной иммуномодулирующей активностью *in vitro* с применением НАДФН-оксидазной тест-системы. Патент РФ № 218892. 2003.

13. Стрелкова Л.Б., Кондакова Н.В., Дубинская В.А. Индуцибельная NO-синтаза как фермент биотест-системы для выявления веществ с противовоспалительными свойствами *in vitro*. // Вопр. биол., мед. и фарм. химии. 2013. – № 11. С. 81–86.

14. Кондакова Н.В., Стрелкова Л.Б., Дубинская В.А., Быков В.А. Ксантиноксидаза как ферментная биотест-система для выявления *in vitro* биологически активных веществ с противовоспалительными и противодартритными свойствами. // Вопр. биол., мед. и фарм. химии. 2013. – № 11. – С. 75–80.

15. Быков В.А., Минеева М.Ф., Стрелкова Л.Б. и др. Способ выявления антиоксидантных свойств биологически активных веществ. Патент РФ № 2316597. 2008.

16. Быков В.А., Минеева М.Ф., Колхир В.К. и др. Применение специфических ферментных биотест-систем *in vitro* для скрининга пептидов на биологическую активность. Пептиды – 2003. // Мат. Российского симпозиума по химии и биологии пептидов. – М. 2003. – С. 63.

17. Быков В.А., Минеева М.Ф., Дубинская В.А. и др. Оценка качества культуры клеток растений с применением молекулярных тест-систем. // Междунар. конфер. «Физиология растений – наука III тысячелетия» М. 4-9 октября 1999 г. С. 541.

18. Чернышев Р.В., Александрова И.С., Дубинская В.А., Изучение влияния продуктов из культуры клеток родиолы розовой (*Rhodiola rosea*) на ферменты антиоксидантной защиты. // Биомед. технологии. ТР. научн.-исследов. и учебно-методического центра биомед. технологии. М.-2000. В. 15. – С. 21–26.