

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК [616.276+615.212]:547.466

ВОЛЧЕК
Александр Владимирович

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА N-АЦЕТИЛ-L-ПРОЛИНА

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

по специальности 14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Минск 2012

Работа выполнена в УО «Белорусский государственный медицинский университет»

- Научный руководитель:** **Дубовик Борис Валентинович,**
доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии УО «Белорусский государственный медицинский университет»
- Официальные оппоненты:** **Питкевич Эдуард Сергеевич,**
доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой лечебной физкультуры и спортивной медицины УО «Витебский государственный университет им. П.М. Машерова»
- Кравченко Елена Валериевна,**
кандидат биологических наук, ведущий фармаколог ГП «Академфарм»
- Оппонирующая организация:** УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Защита состоится 21 декабря 2012 года в 13⁰⁰ на заседании совета по защите диссертаций Д 03.18.10 при УО «Белорусский государственный медицинский университет» по адресу: 220116, г. Минск, пр. Дзержинского, 83, e-mail: rector@bsmu.by, тел. (017) 272-55-98.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Автореферат разослан 20 ноября 2012 года.

Ученый секретарь совета
по защите диссертаций,
канд. мед. наук, доц.



А.П. Шепелькевич

ВВЕДЕНИЕ

Современный арсенал противовоспалительных средств включает три основные группы препаратов – нестероидные противовоспалительные средства (НПВС), глюкокортикоиды и так называемые модификаторы болезни. Наибольшее распространение имеют НПВС, используемые в качестве базисной терапии воспалительных заболеваний костно-мышечной системы и анальгетиков (Green G.A., 2001). Несмотря на весьма высокую противовоспалительную и анальгезирующую активность, НПВС, ингибируя ЦОГ2 и ЦОГ1, являются, по сути, симптоматическими средствами, поскольку не влияют на патогенетические механизмы развития воспалительных заболеваний и не модифицируют их исход, включая деструктивные процессы в опорно-двигательной системе (Rainsford K.D., 2004).

В связи с этим, очевидна актуальность поиска потенциальных противовоспалительных и болеутоляющих агентов среди соединений, ускоряющих заживление и восстановление тканевых структур. Подобный спектр фармакологической активности имеют производные L-пролина, которые обладают репаратным потенциалом на многих экспериментальных моделях (Harris A., 1998; Ionac M., 1996; Parnham M.J., 1999), подавляют клеточную инфильтрацию и продукцию кислородных радикалов при воспалении (Бизунок Н.А., 2006), ингибируя таким образом деструкцию тканей. Одним из важных потенциальных преимуществ использования производных пролина в качестве противовоспалительных средств может также явиться их меньшее гастротоксическое действие (Волчек А.В., 2003), которое является основным негативным последствием длительной противовоспалительной терапии с использованием НПВС. Необходимо отметить, что производные пролина могут быть использованы в комбинации с классическими НПВС, обеспечивая недостающую репаратную компоненту противовоспалительной терапии.

Совокупность вышеперечисленных данных показывает перспективность разработки новых противовоспалительных средств на основе производных пролина. Создание подобного лекарственного препарата соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности Республики Беларусь, а также современным тенденциям фармацевтической промышленности страны – производству лекарственных средств на основе высокоочищенных аминокислот (Указ Президента РБ 06.07.2005. №315).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с крупными научными программами. Тема диссертации соответствует приоритетным направлениям научно-технической деятельности

Республики Беларусь на 2006-2010 гг. по разделу «Медицина и фармация»: «Приоритетные макротехнологии: лечение и профилактика заболеваний, производство фармацевтических субстанций, лекарственных форм и препаратов».

Работа выполнена в рамках задания 02.11. «Разработать противовоспалительное и анальгетическое средство «Ацепрол» на основе производных L-пролина и освоить его производство на Гродненском заводе медпрепаратов», подпрограммы «Аминокислоты» Государственной научно-технической программы «Новые лекарственные средства», утвержденной Комитетом по науке и технологиям при Совете Министров Республики Беларусь №93 от 10 июля 2003 г., номер государственной регистрации 20033393.

Тема диссертации включена в утвержденный план научно-исследовательской работы ЦНИЛ БГМУ на 2004-2006 гг.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлась разработка в рамках доклинического изучения нового противовоспалительного и болеутоляющего средства на основе N-ацетил-L-пролина (далее – АЦП).

Для достижения указанной цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить противовоспалительную активность и эффективность АЦП, отобранного предварительным скринингом, на экспериментальных моделях флогогенной реакции.
2. Изучить анальгетические свойства АЦП на моделях воспалительной и невоспалительной боли.
3. Изучить антипиретическую активность АЦП при экспериментальной лихорадке.
4. Оценить ульцерогенный потенциал АЦП в отношении слизистой желудка в сравнении с ацетилсалициловой кислотой (далее – АСК).
5. Исследовать фармакологические свойства АЦП, модулирующие течение воспалительной реакции (иммунотоксичность, противоотечное, антигистаминное, капилляропротекторное, антиоксидантное действие).
6. Исследовать токсико-биологическую безопасность АЦП.
7. Обосновать целесообразность клинического изучения АЦП в качестве потенциального противовоспалительного и анальгетического лекарственного средства для перорального применения.

Объект исследования – субстанции N-ацетил-L-пролина, N-ацетил-4-гидрокси-L-пролина, 4-гидрокси-L-пролина, ацетилсалициловая кислота, мелоксикам.

Предмет исследования – противовоспалительные, болеутоляющие, антипиретические и другие фармакологические свойства, токсикологическая и биологическая безопасность АЦП.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Впервые показано, что АЦП обладает высокой противовоспалительной эффективностью. По силе проявления противовоспалительного эффекта на моделях острого воспалительного отека и серозита АЦП равен АСК – эталону среди НПВС.

2. АЦП равноэффективен АСК по анальгетическому действию на моделях термической, висцеральной и воспалительной боли.

3. В отличие от классических НПВС – ингибиторов циклооксигеназы – АЦП не проявляет антипиретических свойств и не обладает ульцерогенным действием на слизистую желудка в противовоспалительных и болеутоляющих дозах, что позволяет отнести АЦП к атипичным нестероидным противовоспалительным агентам.

4. АЦП не обладает иммунотоксическими, антигистаминными, капилляропротекторными и антикомплементарными свойствами, способными модулировать развитие иммунной и сосудистой реакций тканей на воздействие флогенных агентов, однако подавляет макрофагальную продукцию активных форм кислорода, играющих важную роль в развитии воспалительных тканевых повреждений.

5. АЦП относится к малотоксичным агентам (ЛД₅₀ внутрь > 3 г/кг), не вызывает нарушений функции желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистой и нервной систем, не обладает алергизирующим и местно-раздражающим действием. При хроническом 3-х месячном интрагастральном введении в дозах до 600 мг/кг является потенциально безвредным.

6. По спектру фармакологических и токсико-биологических свойств АЦП является новым перспективным противовоспалительным и болеутоляющим средством.

Личный вклад соискателя. Направление работы, ее методология, оценка итогов и практических приложений были определены и сформулированы автором совместно с научным руководителем д-ром. мед. наук, проф. Б.В. Дубовиком. Автор самостоятельно выполнены все исследования по изучению специфической и общей фармакологической активности АЦП, проведен статистический анализ результатов, сформулированы научные положения и выводы, написаны все разделы диссертации. Морфологические исследования выполнены при консультативном участии канд. мед. наук, доц. А.М. Неровни, иммунологические исследования проведены с участием сотрудников Медицинского радиологического научного центра Российской академии медицинских наук. Изучение антиоксидантных свойств производных пролина выполнено совместно с канд. мед. наук, доц. Н.А. Бизунок.

Апробация результатов исследования. Результаты работы представлены в виде докладов на Международной научной конференции «Медико-

социальная экология личности: состояние и перспективы» (Минск, 2003), на семинаре «Современные аминокислотные препараты для медицины и здравоохранения» в рамках республиканской научно-практической конференции «От артериальной гипертензии к сердечной недостаточности» (Минск, 2004), Научной сессии БГМУ (Минск, 2005, 2006, 2007, 2008), Международной Пироговской студенческой научной конференции (Москва, 2005, 2006), Международной научной конференции молодых ученых и студентов «Актуальные проблемы современной медицины» (Минск, 2001, 2002, 2003, 2004, 2006, 2007), 58-й итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (Витебск, 2006), Международной научной конференции НАН Беларуси «Экспериментальная и клиническая фармакология» (Минск, 2007, 2008, 2011), Международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения» (Санкт-Петербург, 2007).

Опубликованность результатов. Основные результаты работы отражены в 15 публикациях: 3 научных статьях объемом 1,3 авторского листа в журнале «Рецепт», рекомендованном ВАК, 3 статьях в рецензируемых сборниках научных трудов, 9 тезисах докладов международных и республиканских конференций. Без соавторов опубликовано 4 работы. Список публикаций приведен в конце автореферата.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы по теме, описания использованных методов исследования, оборудования и материалов, 4 глав оригинальных исследований, отражающих сущность и основные результаты работы, заключения и библиографического списка, включающего 210 использованных источников и 15 публикаций соискателя. Каждая глава собственных исследований имеет определенное целевое назначение. Вначале приведены данные изучения специфической активности АЦП: противовоспалительные, анальгетические, противоотечные, антигистаминные, капилляропротекторные, антипиретические и антиоксидантные свойства в условиях экспериментальной патологии, а также ульцерогенный потенциал препарата. Последние главы посвящены исследованию биологической и токсикологической безопасности субстанции. Работа изложена на 131 странице машинописного текста, включая 57 таблиц, 22 иллюстрации, 2 приложения (всего 137 стр.).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе диссертации обобщены литературные данные, характеризующие современный арсенал противовоспалительных средств с

позиций их эффективности и безопасности применения у человека. Рассмотрены перспективные направления совершенствования противовоспалительной терапии. На основании проведенного анализа сделано заключение о необходимости разработки новых противовоспалительных агентов, в частности средств, активирующих процессы восстановления в поврежденных тканях. Показано, что производные пролина в силу совокупности присущих им свойств являются перспективным классом для разработки противовоспалительных средств нового поколения, что обуславливает актуальность данного исследования.

Во **второй главе** (*материалы и методы исследования*) дана характеристика объектов исследования, экспериментальных животных и моделей.

В работе использовано 400 нелинейных и инбредных мышей, 450 крыс линии Wistar, 40 белшерстных морских свинок, 25 кроликов породы Шиншилла. Животные содержались в условиях вивария в соответствии с нормами группового или индивидуального размещения, получали стандартный пищевой рацион при свободном доступе к воде. Производные пролина были получены в ИФОХ НАН Беларуси, АСК – фармакопейная субстанция (Bayer, ФРГ). Испытуемые вещества вводили интрагастрально в виде суспензий на 1% крахмальном геле, который использовали и в качестве плацебо.

Противовоспалительную активность АЦП исследовали в опытах на мышах и крысах на моделях острого экспериментального воспаления – карагенинового отека лапы, перитонеального серозита, ирритантного конъюнктивита, воспроизводящих экссудативно-клеточную и пролиферативную фазы воспалительной реакции. Карагениновое воспаление лапы моделировали путем введения 1% водного раствора карагенина в объеме 0,08 мл (крысам) и 0,04 мл (мышам) под плантарный апоневроз правой задней лапы животных. Воспалительную реакцию оценивали по величине отека стопы через 1, 2, 3, 4, 5 и 24 ч после инъекции флогогена. Толщину стопы измеряли микрометрически с точностью до 0,1 мм в условиях постоянного давления. Субстанции вводили внутрь за 30 минут до индукции воспаления. Противовоспалительный эффект соединений оценивали по индексам ингибирования различных фаз острой воспалительной реакции в сравнении с плацебо.

Острый асептический перитонит у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 0,2% раствора азотнокислого серебра (1 мл на 100 г массы тела). Тестируемые субстанции назначали интрагастрально за 30 минут до индукции воспаления. Интенсивность перитонита оценивали по объему серозной жидкости, собранной из брюшной полости через 6 часов после инъекции ирританта. Перед вскрытием животных забивали эфирным наркозом.

Болеутоляющие свойства АЦП исследовали по тестам термоболовой чувствительности, уксуснокислых корчей и на модели экспериментальной воспалительной гипералгезии. Анальгетическую активность АЦП при термоболовом раздражении изучали в опытах на мышах в тесте «отдергивания хвоста». Хвост животных погружали в горячую воду температуры $48 \pm 0,1^\circ\text{C}$. Болевую чувствительность оценивали по латентному периоду отдергивания хвоста в секундах. Субстанции назначали за 30-40 минут до проведения теста. Болевую реакцию уксуснокислых корчей у мышей вызывали путем интраперитонеального введения 0,25 мл раствора уксусной кислоты в различных разведениях. Порог болевой чувствительности оценивали по величине среднеэффективной альгогенной концентрации уксусной кислоты (EC50), определяемой методом «вверх-вниз» по Dixon J.W. и Mood A.M. (1948). Критерием болевой реакции служило появление не менее 3 «корчей» (спастических сокращений мышц живота) за 5 минут наблюдения после инъекции ирританта. Субстанции назначали внутрь за 30-40 минут до воздействия ирританта. Воспалительную гипералгезию у крыс вызывали субплантарным введением 0,1 мл 0,1% раствора трипсина (Randall L., 1957). Анальгезирующий эффект оценивали по увеличению относительно фона болевого порога, определяемого по реакции вокализации при дозированном сдавлении лапы.

Влияние АЦП на проницаемость капилляров изучали на морских свинках. Препараты вводили интрагастрально за 30 минут до начала эксперимента. Животным внутривенно инъецировали синий Эванса (20 мг/кг), через 5 минут после этого на депилированную кожу микрошприцем наносили по 0,04 мл ксилола. Реакцию капилляров на ирритантное воздействие оценивали по латентному периоду появления синего окрашивания кожи на месте аппликации ксилола. Воздействие АЦП на резистентность капилляров изучали на морских свинках с помощью вакуумной пробы. Препараты вводили ежедневно в течение 7 дней. Резистентность капилляров определяли по времени появления внутрикожных петехий в зоне воздействия отрицательного давления.

Антипиретическое действие АЦП изучено в сравнении с АСК на модели гипертермической реакции у крыс, вызванной внутрибрюшинным введением 10 мкг/кг пирогенала. Течение лихорадки оценивали по температуре ядра тела животных, измеряемой ректально с точностью до $0,1^\circ\text{C}$ через 2 и 3,5 часа после введения пирогена. Субстанции вводили внутрь в восходящей фазе лихорадки (через 2 часа после инъекции пирогена).

Ульцерогенный потенциал АЦП изучали в сравнении с АСК в экспериментах на крысах-самцах линии Wistar. Субстанции вводили в желудок голодающим в течение 24 часов животным, которых выводили из эксперимента спустя 3 часа летальным наркозом (этилкарбамат внутрибрюшинно, 3 г/кг).

По разработанной нами методике компьютерной морфометрии (Волчек А.В., Жданов А.А., 2004) определяли площадь повреждения слизистой желудка. Для оценки ulcerогенного действия производился подсчёт единичных язв и эрозий и вычислялся индекс Паулса – (общее количество язв в группе животных) × (% животных с язвами в группе)/100.

Аллергенные свойства изучали на белошерстных морских свинках в эпикутанном тесте после внутрибрюшинного введения АЦП. Иммунотоксичность АЦП оценивали в тестах генерации антителообразующих клеток в селезенке мышей линии СВА (Cunningham A.G., 1965), индукции гиперчувствительности замедленного типа и реакции «трансплантат против хозяина» (Ford, 1970). Определяли фагоцитарную активность лейкоцитов в отношении *S.aureus* 209p (Лабинская Н.С., 1978). Влияние АЦП на состояние Т-клеточного иммунитета исследовали в тесте индукции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у мышей линии СВА (Лефтковитс И., 1988) и реакции трансплантат против хозяина у гибридов (СВА×С57BL/6)F1 (Ford W.L., 1970).

Острую токсичность и переносимость АЦП изучали на белых нелинейных мышцах и крысах при 2-х недельном наблюдении, хроническую токсичность – в опытах на мышцах-гибридах СВА×С57BL/6 и нелинейных белых крысах при 3-х месячном интрагастральном введении. Оценивали интегральные показатели общего состояния и психофизиологических функций животных, а именно: выживаемость, прирост массы тела, потребление пищи, неврологический статус, двигательную активность, поведение в «открытом поле» (Буреш Я.И., 1991), проводили стандартный гематологический анализ и биохимические исследования плазмы крови. По окончании эксперимента животных забивали мгновенной декапитацией и проводили патоморфологические исследования.

Полученные экспериментальные данные обрабатывали методами параметрического и непараметрического анализа (Statistica 8.0, Stat Soft Inc., США). Различия между группами признавали достоверными при $p < 0,05$.

В **третьей главе** изложены результаты скрининга антифлогогенных агентов в ряду производных L-пролина. Исследования проводили на модели карагенинового отека лапы у мышей и крыс.

Противовоспалительные свойства

В опытах на мышцах и крысах при моделировании воспаления субплантарным введением 1% раствора карагенина было показано, что антифлогогенной активностью обладают как ацетил, так и гидроксил содержащие производные L-пролина, причем на обоих видах животных наибольшую эффективность по степени подавления воспалительного отека проявляет АЦП (таблица 1). При трехкратном воспроизведении результатов было показано, что АЦП сравним по противовоспалительной эффективности

(индексу ингибирования) с АСК – эталоном среди НПВС. Максимальный антифлогогенный эффект АЦП и АСК проявляется на пике воспалительной реакции (2-5 ч от момента введения флоггена). Действие обоих агентов сохраняется на протяжении суток. Другие параллельно испытанные производные пролина (АГП и ГП) проявляли, в целом, более низкий и менее продолжительный антифлогогенный эффект на данной модели.

Таблица 1 – Эффективность ингибирования различных фаз карагенинового воспаления у мышей-самцов при введении внутрь производных пролина и ацетилсалициловой кислоты в дозе 400 мг/кг

Вещество	Индексы ингибирования воспалительной реакции, % $M \pm m$, n=6			
	0-2 ч	2-5 ч	5-24 ч	0-24 ч
АСК	43,1±12,5*	49,2±9,1*	39,3±14,1*	45,5±10,7*
АЦП	44,2±13,3*	33,9±10,1*	42,6±14,9*	37,7±12,1*
ГП	22,2±16,8	9,2±14,7	5,3±20,8	12,7±16,3
АГП	34,9±14,1*	28,8±10,5*	6,2±17,6	26,9±12,3

Примечание – * $p < 0,05$; АЦП – N-ацетил L-пролин; АГП – N-ацетил-L-гидроксипролин; ГП – L-гидроксипролин; АСК – ацетилсалициловая кислота.

Полученные результаты показывают, что в ряду изученных производных пролина АЦП является перспективным противовоспалительным агентом, поэтому он был подвергнут расширенному изучению в качестве потенциального противовоспалительного средства.

С целью изучения дозовой зависимости и предельной антифлогогенной эффективности, АЦП испытан на модели карагенинового отека лапы у крыс в интервале токсикологически приемлемых доз – от 50 мг/кг ($\approx 1/100$ ЛД₅₀) до 400 мг/кг ($\approx 1/15$ ЛД₅₀). При параллельных испытаниях с АСК было показано, что АЦП и АСК в дозах 200-400 мг/кг обеспечивают максимальную и равную по выраженности степень подавления карагенинового отека. Типичной иллюстрацией сравнительной эффективности агентов является рисунок 1А, из которого видно, что индексы ингибирования в обоих случаях достигают 40-50% в фазу разгара острой воспалительной реакции, т.е. предельного эффекта, свойственного НПВС на данной модели. В дозах 100 и 50 мг/кг антифлогогенное действие АЦП, как и АСК, проявляется слабее или отсутствует. Как свидетельствует фазная и интегральная оценка эффективности сравниваемых веществ, АЦП существенно не отличается от эталона по степени ингибиции начальной фазы воспаления, и не различается с последним по влиянию на фазу плато.

Вместе с тем, оценка эффекта препаратов при карагениновом отеке лапы у мышей показала, что АЦП в дозе 400 мг/кг несколько слабее АСК по торможению терминальной фазы воспаления, но фактически не отличается от

последнего по влиянию на фазу плато (рисунок 1Б). В целом, эффективность АЦП по интегральному индексу ингибирования острой воспалительной реакции у мышей и крыс равна эффективности АСК ($P>0,05$).

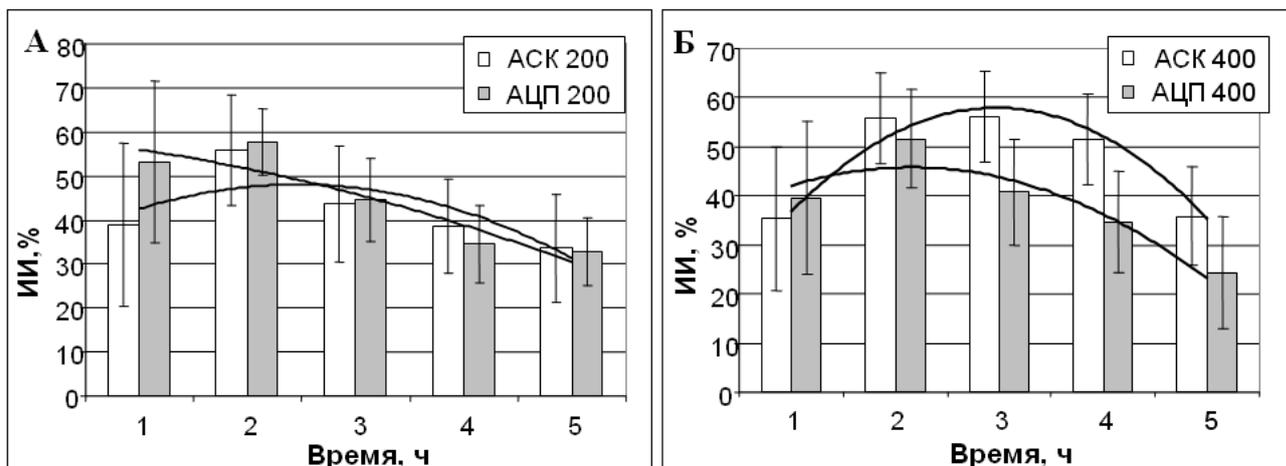


Рисунок 1 – Индексы ингибирования (ИИ) острого карагенинового воспаления лапы у крыс (А) и мышей (Б) при введении N-ацетил-L-пролина (АЦП) и ацетилсалициловой кислоты (АСК) в дозах 200 мг/кг крысам и 400 мг/кг мышам ($M\pm m$, $n=6$, кривыми показаны тренды)

Результаты проведенных испытаний позволяют заключить, что на модели острого карагенинового отека лапы у мышей и крыс АЦП обладает существенным противовоспалительным эффектом, приближающимся к максимальному эффекту АСК.

При экспериментальном серозите АЦП и АСК в дозах 200 мг/кг обладают достоверным (по критерию U) противовоспалительным эффектом с индексами ингибирования соответственно 25,5% и 22,4%. Различия АЦП с АСК по степени торможения серозита статистически недостоверны ($p>0,1$).

Анальгетические свойства

Учитывая, что противовоспалительный и болеутоляющий эффекты НПВС являются, как правило, сопряженными в силу общности их биологической природы, представлялось целесообразным исследовать болеутоляющую активность АЦП на экспериментальных моделях, используемых в фармакологии при оценке эффективности анальгетиков.

Эффективность АЦП при термическом болевом раздражении. Установлено, что АЦП обладает выраженным анальгетическим действием по тесту термоболевого раздражения, сравнимым с эффектом эквивалентной дозы АСК. Повышение порога термоболевого раздражения у мышей наступает в интервале доз АЦП 100-200 мг/кг, пик анальгезии (2-3-кратное повышение болевого порога) достигается в области дозы 400 мг/кг. Анальгетический эффект носит насыщающий характер, так как удвоение дозы не вызывает дальнейшего повышения болевого порога. Аналогичная зависимость доза-

эффект примерно такого же, как у АЦП количественного порядка характерна и для АСК (рисунок 2).

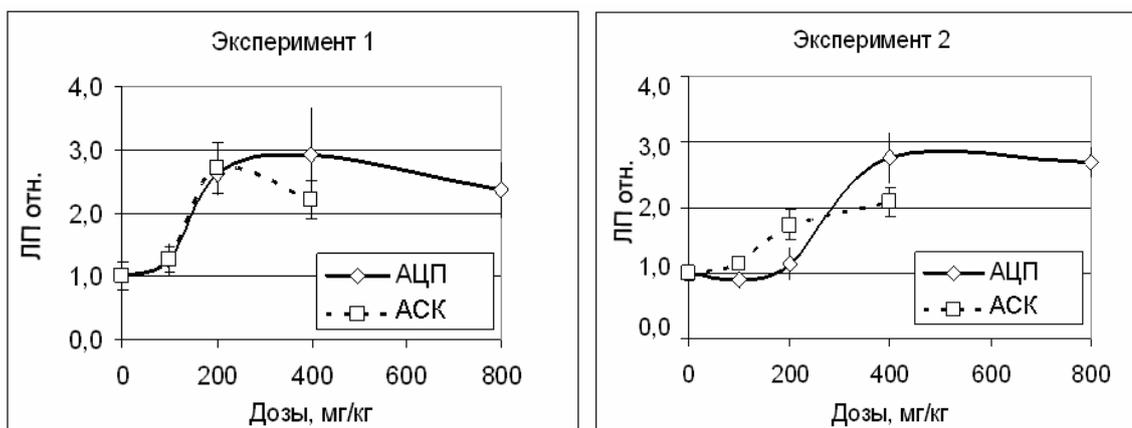


Рисунок 2 – Кривые зависимости доза-эффект для анальгетического действия N-ацетил-L-пролина (АЦП) и ацетилсалициловой кислоты (АСК) по критерию относительного увеличения латентного времени термоболовой реакции «отдергивания хвоста» (ЛП отн, $M \pm m$, $n=10$), полученные в двух независимых экспериментах на мышах

Значения ED50 для АЦП и АСК, рассчитанные регрессионным анализом по альтернативному критерию удвоения порога термоболовой чувствительности, составили 215 и 205 мг/кг соответственно.

Таким образом, АЦП на модели термоболового раздражения равен АСК по критерию ED50 и равноэффективен АСК по силе максимального анальгетического эффекта, который проявляется 2-3-кратным возрастанием порога болевой чувствительности.

Эффективность АЦП при воспалительной гипералгезии. На фоне воспаления порог болевой чувствительности лапы к сдавлению под влиянием АСК и АЦП у крыс возрастает во много раз больше, чем здоровой конечности. Так, если препараты приводят к увеличению порога боли для здоровой лапы примерно в 1,5 раза, то для воспаленной конечности этот прирост составил 293(± 37)% на фоне АСК и 248(± 52)% после введения АЦП, при этом степень ингибирования трипсинового отека составила 26% и 21% соответственно. Различие АЦП с АСК по болеутоляющему эффекту на воспаленной ткани является статистически незначимым ($P > 0,05$).

Эффективность АЦП при химическом раздражении брюшины. В опытах на мышах установлено, что АЦП и АСК на экспериментальной модели соматической боли оказывают достоверное анальгезирующее действие, вызывая повышение порога болевой чувствительности мышей примерно в 2 раза по критерию средней эффективной концентрации ирританта (таблица 2). Различия между АЦП и АСК в данном тесте статистически не достоверны.

Таблица 2 – Влияние N-ацетил L-пролина (АЦП) и ацетилсалициловой кислоты (АСК) на порог болевой реакции у мышей при химическом раздражении брюшины (n=6)

Препараты	Доза, мг/кг	ЕС50 ирританта, %	P ¹⁾
Плацебо	–	0,43 (0,39 – 0,48)	–
АСК	300	0,75 (0,52 – 1,08)	<0,05
АЦП	300	0,80 (0,64 – 0,96)	<0,05

Примечание – ¹⁾ в сравнении с плацебо, различия между АЦП и АСК статистически не значимы.

Противоотечные свойства

Установлено, что субплантарное введение декстрана крысам вызывает интенсивный отек лапы с пиком развития через 30 минут и последующим быстрым спадом отека. Противоотечное действие АЦП на данной модели равно эффективности АСК.

Влияние АЦП на проницаемость и резистентность капилляров

На модели ксилоловой кожной эритемы у морских свинок АЦП и АСК одинаково эффективно ингибируют сосудистую проницаемость, вызванную аппликацией ирританта. Индексы ингибирования составляют 66,1% для АЦП 200 мг/кг и 58,2% для АСК 200 мг/кг (n=6). При вакуумной пробе время появления петехий у морских свинок составляет около 60 секунд. Введение рутина оказывает достоверное капилляропротекторное действие, удлиняется время появления петехий в среднем на 41,4% (P<0,05). В тех же условиях АЦП в дозе 200 мг/кг не оказывает стабилизирующего действия на капилляры.

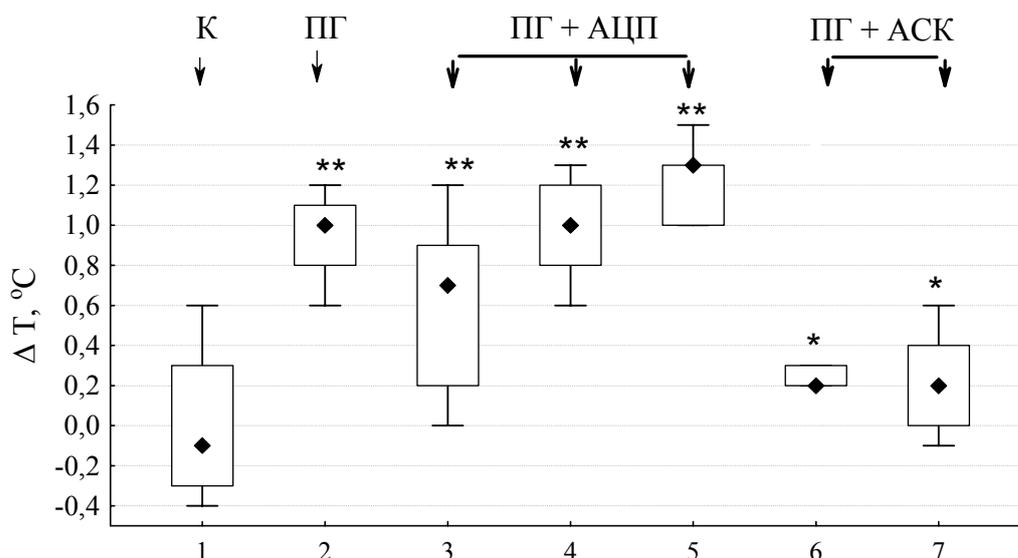
Антипиретические свойства

С целью расширения фармакологической характеристики АЦП исследована его антипиретическая активность, отражающая возможность реализации антициклооксигеназного механизма биологического действия.

Введение препарата сравнения АСК в противовоспалительных дозах (100 и 200 мг/кг) на фоне развившейся пирогеновой лихорадки оказывает выраженное жаропонижающее действие: температура тела у крыс падает в среднем на 0,52-0,56°C (p<0,05; критерий Ньюмена-Кейлса), достигая примерно исходного уровня (p>0,05). Антипиретический эффект АСК существенно не меняется при удвоении дозы, что указывает на насыщающий характер жаропонижающего действия АСК в исследованном дозовом интервале.

АЦП в дозах 100, 200 и 400 мг/кг, оказывающих противовоспалительное и болеутоляющее действие, сравнимое с аналогичными эффектами АСК, не оказывает существенного влияния на динамику температуры тела при пирогеновой лихорадке у крыс. По данным однофакторного дисперсионного

анализа через 1,5 часа после введения АЦП выборки, характеризующие прирост температуры тела подопытных и контрольных крыс, получивших пироген, составляют одну совокупность ($F=1,25$ при F -критическом = 3,19; $p=0,32$), и, следовательно, эффект АЦП в дозах 100-400 мг/кг не отличается от эффекта плацебо (рисунок 3). Различия в действии АЦП в дозах 200 и 400 мг/кг и АСК в дозах 100 и 200 мг/кг также статистически значимы по критерию Ньюмена-Кейлса ($p<0,05$) при парном сравнении выборок.



По оси абсцисс: 1 – контроль (физ. раствор внутрибрюшинно, плацебо внутрь); 2 – плацебо (пирогенал (ПГ) внутрибрюшинно (в/бр) и плацебо внутрь); 3-5 – ПГ в/бр + АЦП внутрь (100, 200 и 400 мг/кг соответственно); 6, 7 – ПГ в/бр + АСК внутрь (100 и 200 мг/кг соответственно). * – $p<0,05$ в сравнении с группой 2 (пирогенал + плацебо), по критерию Дункана; ** – то же в сравнении с контролем

Рисунок 3 – Влияние N-ацетил-L-пролина (АЦП) и ацетилсалициловой кислоты (АСК) на прирост температуры тела при пирогеналовой лихорадке у крыс (n=6, медиана, квадрили, разброс)

Таким образом, АЦП в противовоспалительных и анальгезирующих дозах не снижает температуру тела животных при пирогеналовой лихорадке, и в данном тесте не отличается от плацебо. В аналогичных условиях АСК обладает выраженным антипиретическим действием. Полученные данные свидетельствуют, вероятно, об отсутствии ЦОГ2-зависимого механизма противовоспалительного и анальгетического действия АЦП.

Учитывая, что антипиретическое действие НПВС обусловлено их избирательным ингибирующим действием на ЦОГ2 и образование простагландинов, обнаружение в данных экспериментах явления диссоциации между противовоспалительными и анальгетическими свойствами АЦП с одной стороны, и антипиретической активностью – с другой, является свидетельством

атипичности АЦП как НПВС. Среди известных ингибиторов ЦОГ диссоциация триады классических эффектов (противовоспалительного, анальгетического и антипиретического) отмечена только у парацетамола, который практически полностью лишен противовоспалительного действия в силу низкой активности в отношении периферической ЦОГ². Диссоциация триады свойств НПВС в случае АЦП иная: присутствуют как периферическое (противовоспалительное) так и центральное (анальгетическое) действие. Следовательно, эффективность АЦП в качестве противовоспалительного и анальгетического агента имеет, вероятно, иную, не антипростагландиновую природу.

Иммунотоксичность

Эксперименты на мышах показали, что АЦП в дозе 300 мг/кг не оказывает существенного влияния на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов и показатели активности системы комплемента в сыворотке крови, не влияет на массу селезенки (отсутствие митогенных эффектов), генерацию В-лимфоцитов и специфическую иммунореактивность, оцениваемую по продукции гемагглютининов. Препарат не обладает иммунотоксическими свойствами по критериям, характеризующим состояние специфического и неспецифического иммунитета и не оказывает влияния на Т-зависимый гуморальный ответ у мышей.

Ульцерогенная опасность

Поскольку гастротоксичность имеет большое значение в спектре побочных эффектов классических НПВС, была проведена оценка ульцерогенной активности АЦП. Установлено, что АЦП в дозах 450, 900 и 1800 мг/кг, превышающих среднеэффективные антифлогогенные дозы от 2 до 8 раз, не обладает ульцерогенной активностью и существенно не влияет на степень кровенаполнения слизистой желудка. Референтный препарат АСК вызывал выраженные язвенные поражения желудка и другие морфологические проявления гастропатии в виде обширных зон снижения кровенаполнения, гиперемии слизистой или эрозий, выявляемых при цифровой обработке изображений. Гастропатический эффект АСК коррелирует с дозой ($p < 0,05$).

Таким образом, проведенные исследования показывают, что АЦП в терапевтических и супратерапевтических дозах не обладает ульцерогенным действием на слизистую желудка у крыс. АСК в аналогичных условиях проявляет выраженный ульцерогенный эффект при однократном пероральном введении в дозах, превышающих среднеэффективные.

Токсикологическая и биологическая безопасность АЦП

Аллергенная опасность. Результаты оценки гиперчувствительности в эпикутанном тесте на морских свинках после внутрибрюшинного введения АЦП в дозе 300 мг/кг свидетельствуют, что препарат не обладает аллергизирующими свойствами.

Острая токсичность. В опытах на мышах установлено, что АЦП при однократном введении внутрь в дозах до 2400 мг/кг не оказывал обнаружимых токсических эффектов. В дозах 3200 и 4800 мг/кг гибель животных наступала на 2-5 сутки при явлениях общего угнетения ЦНС. В дозе 9600 мг/кг летальность наступала в ранние сроки на фоне вегетативной симптоматики. Рассчитанная по Литчфильду–Уилкоксону LD50 для мышей составила 6490 мг/кг, что позволяет отнести АЦП к практически нетоксичным веществам.

В опытах на крысах показано, что при энтеральном введении АЦП в дозе 300 мг/кг не оказывает заметного влияния на поведение, неврологический статус и состояние вегетативных функций. В дозе 1000 мг/кг препарат вызывал снижение спонтанной двигательной активности животных, которое наблюдалось около 2-3 часов. В дозе 3000 мг/кг отмечена заметная общая поведенческая депрессия, сохраняющаяся до 8 часов. В последующем состоянии и поведение крыс не отличалось от нормы по всему комплексу поведенческих тестов. Двухнедельное наблюдение за выжившими животными показало, что препарат не оказывал отрицательного последствия у мышей и крыс. Специфические признаки острой интоксикации АЦП отсутствуют.

Учитывая, что рекомендуемая для человека терапевтическая доза составляет 10-20 мг/кг, т.е. ниже испытанных на грызунах по меньшей мере в 100 раз и не оказавших токсического действия, реального риска острого отравления АЦП при приеме внутрь не существует.

Хроническая токсичность. В опытах на мышах и крысах показано, что АЦП при ежедневном внутрибрюшинном введении в дозах 100, 300 и 900 мг/кг мышам и 100, 300 и 600 мг/кг крысам не вызывал существенных изменений общего состояния животных: не было выявлено неврологических расстройств, вегетативных дисфункций, нарушений эмоционального статуса. В течение курса введения препарата подопытные животные не отличались от контрольных по приросту массы тела за исключением 3-х последних недель введения АЦП крысам в дозе 600 мг/кг, сопровождавшихся стабилизацией или некоторым снижением веса. Исследования возможного кумулятивного нейротропного действия препарата по тесту скоростной выносливости животных при беге по вращающемуся барабану тредбана у мышей при хроническом введении в максимальных испытанных дозах (300 и 900 мг/кг), показали, что в указанных дозах АЦП не изменял скоростную выносливость животных. Препарат не оказывал существенного влияния на содержание гемоглобина, клеточный состав периферической крови и костного мозга у мышей. Результаты патоморфологического исследования свидетельствуют, что АЦП не вызывает общепатологических и специфических деструктивных изменений в органах и тканях животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено системное целенаправленное фармако-токсикологическое исследование N-ацетил-L-пролина в качестве биологически активного вещества и потенциального лекарственного средства.

Установлено, что N-ацетил-L-пролин – эффективный фармакологический агент, сочетающий противовоспалительную и болеутоляющую активность с низкой токсичностью и отсутствием побочного действия на ЖКТ и другие функциональные системы организма в эффективном диапазоне доз. Совокупность полученных данных послужила основанием для внедрения N-ацетил-L-пролина в медицинскую практику в качестве нового нестероидного противовоспалительного и болеутоляющего лекарственного средства с атипичным профилем действия.

Основные научные результаты настоящей работы можно сформулировать в следующих положениях:

1. Установлено, что в ряду гидрокси- и ацетилпроизводных пролина (N-ацетил-L-пролин, N-ацетил-4-гидрокси-L-пролин, 4-гидрокси-L-пролин) N-ацетил-L-пролин обладает наибольшей противовоспалительной активностью при введении внутрь на классической модели острой воспалительной реакции, индуцируемой у грызунов субплантарной инъекцией 1% карагенина [4, 7].

2. Противовоспалительное действие N-ацетил-L-пролина типично для НПВС – характеризуется эффектом насыщения в области 40-50% степени подавления максимума острой воспалительной реакции на карагенин. По силе проявления антифлогогенного эффекта (E_{max}) и антифлогогенной активности (ED_{50}) на моделях острого карагенинового воспаления стопы и экспериментального ирритантного перитонита N-ацетил-L-пролин равен ацетилсалициловой кислоте (классическому стандарту НПВС) [1, 4, 7, 8, 11, 12].

3. N-ацетил-L-пролин – эффективное болеутоляющее средство. По анальгетической активности и эффективности в интервале доз 100-800 мг/кг при введении внутрь он эквивалентен ацетилсалициловой кислоте на моделях термической, висцеральной и воспалительной боли, обеспечивая более чем двукратное повышение болевого порога. При термической боли по критерию удвоения болевого порога N-ацетил-L-пролин и ацетилсалициловая кислота существенно не различаются ($ED_{50} = 215$ и 205 мг/кг соответственно) [2, 10, 11].

4. В отличие от ацетилсалициловой кислоты и типичных НПВС – неселективных ингибиторов циклооксигеназы – N-ацетил-L-пролин в эффективных противовоспалительных и болеутоляющих дозах не обладает антипиретической активностью на классической модели пирогеналовой гипертермии у крыс. Симбатно с отсутствием антипирогенной активности N-ацетил-L-пролин не обладает и ульцерогенным действием. В дозах до

1800 мг/кг N-ацетил-L-пролин, в отличие от ацетилсалициловой кислоты, не проявляет гастропатических и энтеропатических свойств, не вызывает эрозивно-язвенного поражения слизистой желудка [3, 5, 11, 12].

5. Противовоспалительное и болеутоляющее действие N-ацетил-L-пролина проявляется селективно. В интервале противовоспалительных и болеутоляющих доз N-ацетил-L-пролин не модулирует отечное действие гистамина, капиллярную и мембранную резистентность, не проявляет иммуносупрессивных, иммунотоксических или антикомплементарных свойств, однако в фармакологически активных концентрациях подавляет процессы генерации активных форм кислорода НАДФ-оксидазной системой макрофагальных клеток, что может указывать на причинную связь антифлогогенной активности N-ацетил-L-пролина с данным явлением [12,15].

6. N-ацетил-L-пролин – малотоксичное и безопасное вещество: при введении внутрь мышам и крысам в интервале доз от 100 до 3000 мг/кг не вызывает нарушений функционального состояния ЦНС, желудочно-кишечного тракта и сердечно-сосудистой системы; не обладает алергизирующим и местно-раздражающим действием. Он не токсичен для животных и не вызывает побочных эффектов при однократном введении в дозах до 3000 мг/кг. При хроническом 3-х месячном ежедневном интрагастральном введении в дозах до 600 мг/кг N-ацетил-L-пролин не влияет на функциональное состояние жизненно-важных систем организма и гистоморфологическую структуру внутренних органов, является нетоксичным, потенциально безвредным и удовлетворяет требованиям токсикологической безопасности [9, 11, 12, 13, 14].

7. Полученные данные о спектре действия и токсико-биологических характеристиках N-ацетил-L-пролина позволили рекомендовать его в качестве противовоспалительного и болеутоляющего НПВС [1, 2, 3].

Рекомендации по практическому использованию результатов

Результаты выполненных исследований использованы при разработке противовоспалительного и болеутоляющего лекарственного средства на основе N-ацетил-L-пролина, который прошел клинические испытания и под названием «Гроцепрол» зарегистрирован Министерством здравоохранения Республики Беларусь 30.12.2010 года (рег. № 10/12/1830).

Разработанный в диссертации метод компьютерной морфометрии для количественной оценки повреждения слизистых оболочек предложен для широкого использования в экспериментальной медицине [5].

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в научных журналах

1. Волчек, А.В. Противовоспалительные свойства N-ацетил-L-пролина / А.В. Волчек, М.Б. Бокова, Д.И. Романовский, Б.В. Дубовик // Рецепт (Recipe). – 2007. – №5. – С. 25-34.
2. Волчек, А.В. Анальгетические свойства N-ацетил-L-пролина / А.В. Волчек, Д.И. Романовский, Б.В. Дубовик // Рецепт (Recipe). – 2007. – №6. – С. 33-38.
3. Волчек, А.В. Влияние атипичного НПВС N-ацетил L-пролина на пирогеналовую лихорадку / А.В. Волчек, Б.В. Дубовик // Рецепт (Recipe). – 2008. – №2. – С. 49-55.

Статьи в сборниках научных работ

4. Волчек, А.В. Изыскание противовоспалительных агентов среди производных пролина / А.В. Волчек, М.Б. Бокова, Н.А. Бизунок // Труды молодых ученых. Юбилейное издание: Сб. науч. работ; под общ. ред. С.Л.Кабака. – Минск: БГМУ, 2001. – С. 37 – 39.
5. Волчек, А.В. Использование графического редактора Adobe Photoshop для градуальной оценки фармакологических эффектов / А.В. Волчек, А.А. Жданов // Труды молодых ученых 2004: Сб. науч. работ; под общ. ред. С.Л.Кабака. – Минск: БГМУ, 2004. – С. 10 – 13.
6. Дорохович, И.В. Влияние ацетилкарнитина на поведение мышей в тесте открытое поле / И. В. Дорохович, А. В. Волчек // Труды молодых ученых. Сб. науч. работ; под общ. ред. С.Л.Кабака. – Минск: БГМУ, 2008. – С. 49-51.

Материалы конференций, тезисы докладов

7. Волчек, А.В. Влияние производных пролина на динамику карагениновой воспалительной реакции / А.В. Волчек // Актуальные проблемы медицины: Сб. материалов международной конференции студентов и молодых ученых; под ред. С.Л.Кабака и А.С.Леонтьюка. – Минск: БГМУ, 2002. – С. 40 – 42.
8. Волчек, А.В. Противовоспалительные свойства Ацепрола / А.В. Волчек // Вестник РГМУ: материалы Пироговской студенческой науч. конф. / Российский гос. мед. ун-т; редкол.: В.Н. Ярыгин [и др.]. – Москва, 2004. – № 3 (34). – С. 150 – 151.
9. Волчек, А.В. Острая токсичность нового нестероидного противовоспалительного средства «Ацепрол» / А.В. Волчек, А.С. Урбан // Вестник РГМУ: материалы Пироговской студенческой науч. конф. / Российский гос. мед. ун-т; редкол.: В.Н. Ярыгин [и др.]. – Москва, 2004. – № 3 (34). – С. 150.

10. Волчек, А.В. Влияние N-ацетил L-пролина на болевую чувствительность у мышей / А.В. Волчек // Актуальные вопросы современной медицины и фармации : материалы 58 итог. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 26-27 апр. 2006 г. – Витебск, 2006. – С. 176-178.
11. Волчек, А.В. Фармакологические свойства N-ацетил L-пролина / А.В. Волчек, Н.А. Бизунок // Вестник РГМУ: материалы Пироговской студенческой науч. конф. / Российский гос. мед. ун-т; редкол.: В.Н. Ярыгин [и др.]. – Москва, 2006. – № 2 (49). – С. –352.
12. Волчек, А.В. N-ацетил L-пролин – атипичное нестероидное противовоспалительное средство / А.В. Волчек // Санкт-Петербургские научные чтения – 2007 : тез. докл. II Междунар. молодеж. мед. Конгр., Санкт-Петербург, 5-7 дек. 2007 г. – СПб., 2007. – С. 178.
13. Волчек, А.В. Острая токсичность N-ацетил L-пролина – нового нестероидного противовоспалительного средства / А.В. Волчек, Д.И. Романовский, Б.В. Дубовик // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 29-30 сент. 2011 г. – Гродно, 2011. – С. 40-42.
14. Хроническая токсичность N-ацетил L-пролина / А.В. Волчек [и др.]. // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 29-30 сент. 2011 г. – Гродно, 2011. – С. 39-40.
15. Волчек, А.В. Иммунотоксические свойства N-ацетил L-пролина / А.В. Волчек, М.Б. Бокова М.Б, А.С. Шевчук // Экспериментальная и клиническая фармакология: материалы междунар. науч.-практ. конф., Гродно, 29-30 сент. 2011 г. – Гродно, 2011. – С. 37-39.



РЭЗІЮМЭ

Ваўчок Аляксандр Уладзіміравіч Фармакалагічныя ўласцівасці N-ацэтыл-L-праліна

Ключавыя словы: амінакіслата, пралін, ацэтылпралін, супрацьзапаленчы сродак, запаленне, анальгетык, антыпірэтык, гастратаксічнасць.

Аб'ект даследавання: N-ацэтыл-L-пралін, N-ацэтыл-4-гідроксі-L-пралін, 4-гідроксі-L-пралін, ацэтылсаліцылавая кіслата.

Прадмет даследавання: супрацьзапаленчыя, болесуцішальныя, антыпірэтычныя і іншыя фармакалагічныя ўласцівасці, таксікалагічная і біялагічная бяспечнасць N-ацэтыл-L-праліну.

Мэта працы: распрацоўка ў рамках даклінічнага вывучэння новага супрацьзапаленчага і болесуцішальнага сродку на аснове N-ацэтыл-L-праліну.

Метады даследавання: фармакалагічныя, таксікалагічныя, імуналагічныя, біяхімічныя, патамарфалагічныя.

Атрыманыя вынікі і іх навізна.

Упершыню праведзена сістэмнае мэтанакіраванае фармака-таксікалагічнае даследаванне N-ацэтыл-L-праліну ў якасці біялагічна актыўнага рэчыва і патэнцыйнага лекавага сродку.

Устаноўлена, што N-ацэтыл-L-пралін – эфектыўны фармакалагічны агент, які спалучае супрацьзапаленчую і болесуцішальную актыўнасць з нізкай таксічнасцю і адсутнасцю пабочнага дзеяння на СКТ і іншыя функцыянальныя сістэмы арганізма ў эфектыўным дыяпазоне доз. Сукупнасць атрыманых даных паслужыла падставай для ўвядзення N-ацэтыл-L-праліну ў медыцынскую практыку ў якасці новага нестэроіднага супрацьзапаленчага і болесуцішальнага лекавага сродку з атыповым профілем дзеяння.

Вобласць прымянення: фармакалогія, клінічная фармакалогія, эксперыментальная медыцына, тэрапія.

РЕЗЮМЕ

Волчек Александр Владимирович Фармакологические свойства N-ацетил-L-пролина

Ключевые слова: аминокислота, пролин, ацетилпролин, противовоспалительное средство, воспаление, анальгетик, антипиретик, гастротоксичность.

Объект исследования: N-ацетил-L-пролин, N-ацетил-4-гидрокси-L-пролин, 4-гидрокси-L-пролин, ацетилсалициловая кислота.

Предмет исследования: противовоспалительные, болеутоляющие, антипиретические и другие фармакологические свойства, токсикологическая и биологическая безопасность N-ацетил-L-пролина.

Цель работы: разработка в рамках доклинического изучения нового противовоспалительного и болеутоляющего средства на основе N-ацетил-L-пролина.

Методы исследования: фармакологические, токсикологические, иммунологические, биохимические, патоморфологические.

Полученные результаты и их новизна. Впервые проведено системное целенаправленное фармако-токсикологическое исследование N-ацетил-L-пролина в качестве биологически активного вещества и потенциального лекарственного средства.

Установлено, что N-ацетил-L-пролин – эффективный фармакологический агент, сочетающий противовоспалительную и болеутоляющую активность с низкой токсичностью и отсутствием побочного действия на ЖКТ и другие функциональные системы организма в эффективном диапазоне доз. Совокупность полученных данных послужила основанием для внедрения N-ацетил-L-пролина в медицинскую практику в качестве нового нестероидного противовоспалительного и болеутоляющего лекарственного средства с атипичным профилем действия.

Область применения: фармакология, клиническая фармакология, экспериментальная медицина, терапия.

SUMMARY

Vauchok Aliaksandr U.

Pharmacological properties of N-acetyl-L-proline

Key-words: amino acid, proline, acetylproline, antiinflammatory, inflammation, analgesic, antipyretic, gastrotoxicity.

Subject of investigations: N-acetyl-L-proline, N-acetyl-4-hydroxy-L-proline, 4-hydroxy-L-proline, acetylsalicylic acid.

Objective of investigations: anti-inflammatory, analgesic, antipyretic, and other pharmacological properties, toxicological and biological safety of N-acetyl-L-proline.

Aim of investigations: development in the pre-clinical study of a new anti-inflammatory and analgesic drug based on N-acetyl-L-proline.

Methods of investigations: pharmacological, toxicological, immunological, biochemical, pathomorphological.

Findings and their novelty. N-acetyl-L-proline - an effective pharmacological agent, which combines anti-inflammatory and analgesic activity with low toxicity and lack of side effects on the gastrointestinal tract and other functional systems of the body in the effective dose range. The data obtained served as the basis for the introduction of N-acetyl-L-proline in the practice of medicine as a new non-steroidal anti-inflammatory and analgesic drug with an atypical profile of action.

Field of application: pharmacology, clinical pharmacology, experimental medicine, therapy.

Подписано в печать 14.11.12. Формат 60×84/16. Бумага писчая «Zoom».

Печать ризографическая. Гарнитура «Times».

Усл. печ. л. 1,16. Уч.-изд. л. 1,25. Тираж 60 экз. Заказ 755.

Издатель и полиграфическое исполнение:

Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет».

ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.

Ул. Ленинградская, 6, 220006, Минск.