

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Довгань А.П., Поветкин С.Н., Батищева Г.А., Должиков А.А.,
Покровский М.В., Урожевская Ж.С., 2018
DOI:10.23888/PAVLOVJ201821-35

**ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ
ИШЕМИЧЕСКИХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ПЕЧЕНИ
С ПОМОЩЬЮ АГОНИСТА ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ
ИМИДАЗОЛИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ С7070**

*А.П. Довгань¹, С.Н. Поветкин², Г.А. Батищева³, А.А. Должиков¹,
М.В. Покровский¹, Ж.С. Урожевская¹*

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Белгородский государственный национальный
исследовательский университет»,

ул. Победы, 85, 308015, Белгород, Российская Федерация (1)

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Курский государственный медицинский университет»,

ул. К. Маркса, 3, 305021, Курск, Российская Федерация (2)

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Воронежский государственный медицинский
университет им. Н.Н. Бурденко»,

ул. Студенческая 10, 394036, Воронеж, Российская Федерация (3)

Как при сахарном диабете, так и при метаболическом синдроме в виде коморбидного состояния развивается жировая дистрофия печени, переходящая далее в некроз печени. В статье предложены варианты фармакологической коррекции ишемии-реперфузии печени агонистами имидазолиновых рецепторов. *Материалы и методы.* Эксперимент проводился на 70 крысах обоего пола, разделённых на 7 групп (n=10): интактная группа; ложнооперированные животные (вскрытие брюшной стенки без лигирования печёночных сосудов); группа ишемии / реперфузии без коррекции препаратами; животные, подвергшиеся ишемии / реперфузии печени + метформин (50 мг/кг); животные, подвергшиеся ишемии / реперфузии печени + моксонидин (1 мкг/кг); животные, подвергшиеся ишемии / реперфузии печени + С7070 (10 мг/кг). Для оценки использовали коэффициенты, исчисляемые из уровня печеночных трансаминаз: аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ), – а также морфометрических отношений площади некроза и глубокой ишемии печени по данным гистологического исследования. *Результаты.* Агонист периферических имидазолиновых рецепторов С7070 в значительно большей степени снижает ишемически-реперфузионные поражения печени, в сравнении с препаратами моксонидин и метформин. Гепатопротекторный эффект С7070 снимался предварительным введением блокатора периферических имидазолиновых рецепторов. Коэффициенты АЛТ/АСТ для С7070, моксонидина и метформина составили соответственно 72,8/62,13; 44,99/34,20 и 36,88/21,02. Коэффициенты морфологической гепатопротекторной активности препаратов составили: С7070 – 82,61, моксонидин – 72,33, метформин – 38,96. *Вывод.* Агонисты имидазолиновых рецепторов достоверно и значимо снижают функциональные и морфологические проявления ишемии / реперфузии печени.

Ключевые слова: ишемия печени, реперфузия печени, сахарный диабет, С7070, моксонидин, метформин, агонисты имидазолиновых рецепторов.

Ишемия является как пусковым моментом, так и этапом патогенеза многих патологических состояний [1]. Как при сахарном диабете, так и при метаболическом синдроме в виде коморбидного состояния развивается жировая дистрофия печени, переходящая далее в некроз печени [2]. Препараты терапии метаболического синдрома и сахарного диабета не оказывают достаточного протекторного влияния на поражённую печень. В этой связи несомненный интерес представляет изучение возможности дополнительной фармакологической коррекции стандартной терапии бигуанидами [3].

В связи с этим изучение плейотропных гепатопротекторных свойств агониста периферических имидазолиновых рецепторов C7070 видится интересным с прикладной точки зрения.

Материалы и методы

Исследование гепатотропной противоишемической активности проводилось с использованием методики, описанной Д.А. Лопатыным [4]. Эксперимент проводился на 70 крысах обоего пола, разделённых на 7 групп: интактная группа, ложнооперированные животные (вскрытие брюшной стенки без лигирования печёночных сосудов); животные с моделированной ишемией/реперфузией, не получающие терапию каким-либо препаратом; животные с моделированной ишемией / реперфузией, получающие терапию препаратом метформин (50 мг/кг); животные с моделированной ишемией/реперфузией, получающие терапию препаратом моксонидин (1 мкг/кг); животные с моделированной ишемией / реперфузией, получающие терапию препаратом C7070 (10 мг/кг); животные с моделированной ишемией / реперфузией, получающие терапию препаратом C7070 (10 мг/кг) с одновременным введением антагониста периферических имидазолиновых рецепторов BU224 (BU224 hydrochloridesolid, Sigma-Aldrich, Switzerland).

Все указанные дозировки соответствовали минимальной терапевтической дозе выбранного препарата с пересчётом на крыс, согласно общеупотребительным формулам. Дозировка C7070 была выбрана исходя из

минимальной терапевтической дозировки ближайшего аналога – Диакамфа (Украина).

Перед наложением модели животным однократно вводились препараты и физиологический раствор per os. Животных наркотизировали путём внутривентрального введения раствора хлоралгидрата в дозе 300 мг/кг. Наркотизированному животному выполнялась срединная лапаротомия по белой линии живота. Тупым способом выделялась большая печёночная связка, в которой проходят основные сосуды, кровоснабжающие печень. Указанная связка пережималась атравматичным зажимом на 15 минут. После этого, содержимое брюшной полости укладывалось на место, а операционная рана послойно ушивалась. Животным в течение 3 суток вводились исследуемые препараты и физиологический раствор per os.

По окончании 3 суток после эксперимента животных подвергали эвтаназии посредством передозировки ингаляционного эфирного наркоза (диэтиловый эфир) с последующим забором крови из сердца для биохимических исследований и выделением всей печени для проведения морфологического анализа.

Смертности животных во время эксперимента не отмечалось.

Для оценки функции печени были выбраны биохимические маркёры повреждения гепатоцитов: аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ), в крови, взятой внутрисердечно у подопытных крыс непосредственно перед эвтаназией (по окончании 3 суток эксперимента) [5]. Биохимические параметры оценивались на биохимическом анализаторе Olympus AU 640. Указанные параметры определяли с использованием наборов реактивов Olympus: «AST/GOT (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE)», «ALT/GPT (ALANINE AMINOTRANSFERASE)» соответственно.

Для оценки структурных изменений были сделаны гистологические срезы препаратов печени экспериментальных крыс с их последующей морфологической оценкой [6]. Морфологическая оценка структурных

повреждений печени производилась на базе ОБУЗ «Областное патологоанатомическое бюро» комитета здравоохранения Курской области согласно внутренним стандартам бюро. Препараты окрашивались стандартной смесью гематоксилина и эозина с последующей цифровой микроскопией и планиметрическим расчётом обнаруженных площадей с помощью компьютерного ПО Adobe Photoshop CC (2015.2).

Для статистического анализа полученных данных применялось попарное сравнение групп с использованием Т-критерия Стьюдента (для параметрических множеств) и U-критерия Манна-Уитни (для непараметрических множеств). Предварительно, были посчитаны средняя (M) и ошибка средней (m). Все расчёты

проводились с использованием компьютерного ПО Statistica 10.0. Все различия, полученные в ходе сравнения параметров, полученных у разных групп животных, а также все изменения принимались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Моделирование 15-ти минутной ишемии печени с последующей реперфузией приводило к увеличению уровней АЛТ и АСТ на 3-и сутки эксперимента, соответственно, в 5 раз (табл. 1). Показатели ложнооперированных животных достоверно не отличались от интактных. Одновременно, морфометрические измерения площадей зоны ишемических повреждений и некроза составили $0,387 \pm 0,014$ и $0,207 \pm 0,021$ мм² соответственно (табл. 2).

Таблица 1

Влияние агонистов имидазолиновых рецепторов на уровень печеночных трансаминаз (АЛТ, АСТ) при моделировании ишемии / реперфузии печени ($M \pm m$, $n=10$)

Группа животных	АЛТ(Ед/мл)	АСТ(Ед/мл)
Интактные	102,89±8,82	284,14±19,36
Ложнооперированные	110,27±21,96*	289,80±16,29*
Ишемия/реперфузия (И/Р)	526,90±17,97**	1045,16±80,02**
И/Р+С7070 (10 мг/кг)	143,27±16,93 ¹	395,85±33,31 ¹
И/Р+Моксонидин (1 мкг/кг)	289,86±15,27 ¹	687,71±28,37 ¹
И/Р+Метформин (50 мг/кг)	332,56±22,05 ¹	825,49±22,46 ¹
И/Р+С7070 (10 мг/кг)+BU224 (10 мг/кг)	300,45±19,44 ¹	798,59±21,34 ¹

Примечание: *– $p > 0,05$ в сравнении с группой интактных животных;

**– $p < 0,05$ в сравнении с группой ложнооперированных;

¹ – $p < 0,05$ в сравнении с группой ишемии/реперфузии

Таблица 2

Влияние агонистов имидазолиновых рецепторов на площадь зоны ишемических повреждений печени и площадь зоны некроза печёночной ткани при моделировании ишемии / реперфузии печени ($M \pm m$, $n=10$)

Группы животных	Площадь зоны ишемических повреждений, мм ²	Площадь зоны некроза, мм ²
Интактные	н/д	н/д
Ложнооперированные	н/д	н/д
Ишемия/реперфузия (И/Р)	0,387±0,014	0,207±0,021
И/Р+С7070 (10 мг/кг)	0,058±0,029*	0,046±0,013*
И/Р+Моксонидин (1 мкг/кг)	0,090±0,025*	0,075±0,015*
И/Р+Метформин (50 мг/кг)	0,238±0,052*	0,125±0,020*
И/Р+С7070 (10 мг/кг)+BU224 (10 мг/кг)	0,159±0,031*	0,104±0,008*

Примечание: *– $p < 0,05$ в сравнении с группой ишемии/реперфузии

Применение исследуемых препаратов статистически значимо снижает уровень ферментов в крови подопытных животных. Наибольшей активностью из представленных препаратов обладал С7070 (10 мг/кг), где уровень АЛТ и АСТ составил, соответственно 143,27±16,93 и 395,85±33,31 (табл. 1). Параллельно, С7070 значительно и достоверно снижал площадь ишемических повреждений и некроза до значений 0,058±0,029 и 0,046±0,013. Вместе с этим, моксонидин и метформин также снижали биохимические маркеры и показатели морфометрии, но уступали С7070 (табл. 1-2).

Для удобства оценки, целесообразно сравнить степень снижения уровня печёночных трансаминаз у разных групп жи-

вотных. С этой целью возможно применение простой математической формулы:

$$K_{АЛТ} = 100 - \frac{АЛТ (эксп.)}{АЛТ (к-ль)} * 100\%,$$

где АЛТ (эксп.) – уровень АЛТ в крови животных экспериментальных групп, АЛТ (к-ль) – уровень АЛТ в крови животных контрольной группы.

Та же формула применима и для исследования уровня АСТ:

$$K_{АСТ} = 100 - \frac{АСТ (эксп.)}{АСТ (к-ль)} * 100\%,$$

где АСТ (эксп.) – уровень АСТ в крови животных экспериментальных групп, АСТ (к-ль) – уровень АСТ в крови животных контрольной группы.

Используя описанную выше формулу, получаем следующие данные функциональной протекции препаратов (табл. 3).

Таблица 3

Гепатопротекторная активность С7070, моксонидина и метформина при моделировании ишемии/реперфузии печени по данным биохимических исследований (M±m; n=10)

Коэффициент гепатопротекторной активности, Ед.	С7070 (10 мг/кг)	Моксонидин (1 мг/кг)	Метформин (50 мг/кг)
K _{АЛТ}	72,81±1,71*	44,99±1,23	36,88±1,02
K _{АСТ}	62,13±1,34*	34,20±1,21	21,02±1,49

Примечание: * – p<0,05 в сравнении с коэффициентами, полученными при терапии моксонидином и метоформином

Исходя из приведённых данных, становится понятным, что агонист периферических имидазолиновых рецепторов (IR₂) С7070 обладает наибольшей противоишемической активностью среди изученных в рамках данной работы препаратов.

Для полной оценки противоишемической активности препаратов оценки аминотрансфераз недостаточно. Для оценки гепатопротекторной активности препаратов был выведен коэффициент, характеризующий степень защиты печёночной ткани от повреждений, полученных в результате ишемии и последующей реперфузии печени. Данный коэффициент учитывает, как зоны ишемического повреждения, так и зоны некроза.

Коэффициент высчитывался по формуле:

$$K = 100\% - \left(\frac{Mи(преп.) + Mн(преп.)}{Mи(к-ль) + Mн(к-ль)} * 100\% \right),$$

где Ми(преп.) – средняя площадь ишемических повреждений печени у крыс экспериментальных групп, Mн(преп.) – средняя площадь некроза печени у крыс экспериментальных групп, Ми(к-ль) – средняя площадь ишемических повреждений печени у крыс контрольной группы, Mн(к-ль) – средняя площадь некроза печени у крыс контрольной группы.

Таким образом, мы получаем данные противоишемической и гепатопротекторной активности исследуемых препаратов (табл. 4).

Гепатопротекторная активность С7070, моксонидина и метформина при моделировании ишемии/реперфузии печени по данным морфометрических исследований ($M \pm m$; $n=10$)

№ п/п	Группа животных	Коэффициент гепатопротекторной активности, Ед.
1.	И/Р+С7070 (10 мг/кг)	82,61±3,22*
2.	И/Р+моксонидин (1 мкг/кг)	72,33±1,04
3.	И/Р+метформин (50 мг/кг)	38,96±5,69

Примечание: * – $p < 0,05$ в сравнении с пп. 2 и 3.

Таким образом, среди всех изученных в рамках данного исследования препаратов, агонист периферических имидазолиновых рецепторов С7070 обладает наивысшей гепатопротекторной активностью в условиях ишемии/реперфузии печени.

Полученные данные можно объяснить различием в механизмах действия препаратов. Основным в механизме действия метформина является уменьшение продукции глюкозы печенью, что, по данным многочисленных исследований, коррелирует со снижением уровня гликемии. Метформин играет роль в улучшении периферических эффектов инсулина, снижении глюконеогенеза и окислении свободных жирных кислот в печени, повышении активности анаэробного пути метаболизма глюкозы с образованием лактата, подавлением липолиза. В ряде исследований, проводимых *in vivo* и *in vitro* выявлено активирующее влияние метформина на клеточный фермент АМФ-киназу, которая играет роль в переносе глюкозы через мембрану посредством GLUT4 и окислении свободных жирных кислот. Вероятно, улучшение гликемического профиля на фоне терапии данным препаратом также связано с подобными клеточными аспектами механизма его действия. Кроме того, диметилбигуанид продемонстрировал способность уменьшать жесткость клеточных мембран, которая часто наблюдается у пациентов с сахарным диабетом и может вносить вклад в развитие его осложнений [7].

Метформин активизирует АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК) – печёночный фермент, играющий немаловажную роль в инсулиновой сигнализации,

а также во всём энергетическом балансе организма и метаболизме глюкозы и жиров, в том числе и в печени. Активация АМФК необходима для ингибирующего эффекта метформина на печёночный глюконеогенез [8].

Резюмируя вышесказанное, можно утверждать, что противоишемическое действие метформина основано на кумулировании энергетических запасов гепатоцитов и замедлении расходования текущих сформированных запасов питательных веществ.

Моксонидин, являясь агонистом центральных имидазолиновых рецепторов (IR_1), участвует в перераспределении печёночного кровотока за счёт раскрытия коллатералей, исходящих из *a. Gastrica sinistra*, оставшихся свободными от пережатия. Также, дополнительная активность может быть обусловлена центральным влиянием моксонидина на раскрытие печёночных сосудов в момент реперфузии печени. Нельзя исключать и определённого влияния моксонидина на периферические имидазолиновые рецепторы [9].

Агонист периферических имидазолиновых рецепторов (IR_2) С7070 реализует своё гепатопротекторное действие при ишемии/реперфузии печени по механизмам, аналогичным при ишемизации кожного лоскута. Очевидно, что его влияние на сохранность митохондрий реализуется, в том числе, через АТФазные каналы, представленные на внешней и внутренней мембранах митохондрий. Замедление и блокирование лавинообразного тока ионов железа, в свою очередь, снижает оксидативный стресс со всеми его проявлениями при реперфузии печени [10].

Активация имидазолиновых рецепторов приводит к увеличению синтеза арахидоновой кислоты и ингибированию Na^+/H^+ ионообменных каналов. Есть основания предполагать, что имидазолиновые рецепторы относятся к семейству нейроциткиновых рецепторов [11]. Активация центральных I_1 -рецепторов снижает артериальное давление и уменьшает частоту сердечных сокращений. Все это является следствием воздействия на периферическую симпатическую нервную систему, заключающегося в её центральном торможении.

За время известности нового поколения имидазолиновых агонистов было проведено множество доклинических и клинических исследований эффективности этих лекарственных препаратов.

Так, например, есть данные, что внутривенное применение моксонидина вызывает у крыс увеличение диуреза, экскреции натрия и калия. Этот эффект полностью блокировался селективным антагонистом имидазолиновых рецепторов эфароксаном и ослаблялся под влиянием блокатора α -адренорецепторов йохимбина [12].

Центральные I_1 -рецепторы гипоталамической области вовлечены в регуляцию уровня гликемии крови, что показано в эксперименте с селективным агонистом I_1 -рецепторов агматинном, вызывающим снижение уровня глюкозы в крови. Аналогичным действием обладает и моксонидин. Кроме того, предполагается, что имидазолиновые рецепторы локализуются в поджелудочной железе и их активация приводит к увеличению секреции инсулина [13].

Применение моксонидина у крыс линии *Zucker* (модель ожирения) вызывало снижение уровня гипоталамического нейропептида Y, что может быть одним из механизмов, объясняющих снижение массы тела на фоне терапии этим препаратом [14].

Следует отметить, что не все перечисленные эффекты можно объяснить за счет активации центральных I_1 -рецепторов. По-видимому, некоторые из них, все же опосредуются α_2 -адренорецепторами. Кроме того, определенный вклад вносит и периферическое действие лекарств.

Представители харьковской фармакологической школы, напротив, обратили внимание на способность агонистов периферических имидазолиновых рецепторов влиять на гликемический контроль [15]. Согласно их исследованиям, препараты этой группы по своему гипогликемическому действию не уступают метформину. А вот нежелательных побочных явлений у них гораздо меньше. Кроме того, в отличие от метформина, агонисты периферических имидазолиновых рецепторов не вызывают гипопроотеинемию и гиперлактацедемию.

Помимо прочих локализаций, имидазолиновые рецепторы расположены и на мембранах адипоцитов – клеток жировой ткани. Стимуляция этих рецепторов приводит к усилению метаболизма липидов.

При лечении моксонидином (0,4 мг/сут) в течение 8 недель 20 пациентов с АГ наблюдалось достоверное снижение АД, но уровни общих липидов, окисленных липопротеидов низкой плотности и соотношение различными подтипов липопротеидов низкой плотности достоверно не изменялись [16].

Ввиду вышесказанного, становится очевидным преимущество агонистов периферических имидазолиновых рецепторов (IR_2) как препаратов, влияющих на снижение структурных и функциональных повреждений печени в условиях её ишемии/реперфузии.

Выводы

1. Агонист имидазолиновых рецепторов II типа C7070 в дозе 10 мг/кг в 4,5 раза предотвращает повышение уровней АЛТ и АСТ и в 2,5 раза уменьшает площади ишемических повреждений и некроза при моделировании 15-ти минутной ишемии печени. Гепатопротекторный эффект C7070 на 50% снимался антагонистом периферических имидазолиновых рецепторов BU224 (10 мг/кг).

2. Моксонидин обладает менее выраженным гепатопротекторным действием, и снижает площади ишемических повреждений и некроза до 3,9-4,5 раз. Коэффициенты гепатопротекторной активности моксонидина по данным лабораторных

исследований составили соответственно 44,99 и 36,88 для АЛТ и АСТ. Коэффициент гистологической гепатопротекторной активности моксонидина составляет 72,33.

3. Метформин на треть снижает площади ишемических повреждений и некроза по данным морфометрических коэффициентов и, лишь, на 50% восстанавливает уровни АЛТ и АСТ после предшествующей ишемии/реперфузии печени. Коэффициен-

ты гепатопротекторной активности метформина для АЛТ и АСТ составили соответственно 34,20 и 21,02. Коэффициент гистологической гепатопротекторной активности метформина составил 38,96.

4. По гепатопротекторной активности изученные препараты уступали С7070 (72,81/62,13/82,61 АЛТ/АСТ/гистология соответственно).

Конфликт интересов отсутствует.

Исследование произведено в рамках совместной работы по государственному контракту от «10» декабря 2014 г. №14411.2049999.19.109 "Доклинические исследования антидиабетического лекарственного средства – агониста имидазолиновых рецепторов".

Авторы благодарят ОБУЗ «Областное патологоанатомическое бюро» комитета здравоохранения Курской области за проведение морфологического исследования препаратов печени крыс.

Литература

1. Kolmykov D.I., Alehin S.A. Ischemia / reperfusion effect on pancreatic volumetrical blood flow velocity // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2015. Vol. 1, №1. P. 42-46. doi: 10.18413/2500-235X-2015-1-4-51-56.

2. Chigunadze A.L., Artyushkova E.B., Mishustin V.N., et al. Experimental justification of new way of pharmacological correction for contact frostbite using DSLET opioid peptide and serotonin adipinate to enhance surgical treatment // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2016. Vol. 2, №2. P. 3-19.

3. Ragulina V.A., Kostina D.A., Dovgan A.P., et al. Nuclear factor kappa B as a potential target for pharmacological correction endothelium-associated pathology // Research result: pharmacology and clinical pharmacology. 2017. Vol. 3, №1. P. 114-124. doi:10.18413/2500-235X-2017-3-1-114-124.

4. Алехин С.А., Лопатин Д.В., Покровский М.В., и др. Влияние дистантного ишемического прекондиционирования на морфофункциональные показатели и экспрессию фактора антиапоптоза в печени после перенесенного эпизода ишемии/реперфузии // Научные ведомости Белгородского государственного университета. 2012. Т. 141, №22. С. 84-88.

5. Абрашова Т.В., Гуцин Я.А., Ковалева М.А., и др. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. СПб.: ЛЕМА, 2013.

6. Бивалькевич Н.В. Закономерности структурно-функциональной реорганизации печени при формировании диетиндуцированной неалкогольной жировой болезни печени у крыс: дис. ... канд. биол. наук. Владивосток, 2015.

7. Зилов А.В., Терехова А.Л. Метформин – 50 лет в клинической практике // Лечащий врач. 2008. №3. С. 16-19.

8. Kirpichnikov D.I., McFarlane S.I., Sowers J.R. Metformin: an update // Ann. Intern. Med. 2002. Vol. 137, №1. P. 25-33.

9. Chan C.K., Head G.A. Relative importance of central imidazoline receptors for antihypertensive effects of moxonidine and rilmenidine // J. Hypertens. 1996. №14. P. 855-864.

10. Свободные радикалы и антиоксиданты в химии, биологии и медицине: материалы Международной научно-практической конференции 1-4 октября 2013 г. Ч. 2. Новосибирск: НГПУ, 2013.

11. Ernsberger P. The II-Imidazoline Receptor and Its Cellular Signaling Pathways // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1999. №881. P. 35-53.

12. Amann K., Nichols C., Tornig J., et al. Effect of ramipril, nifedipine, and moxonidine on glomerular morphology and

podocyte structure in experimental renal failure // *Nephrol. Dial Transplant.* 1996. №11. P. 1003-1011.

13. Bing C., King P., Pickavance L., et al. The effect of moxonidine of feeding and body fat in obese Zucker rats; role of hypothalamic NPY neurons // *Br. J. Pharmacol.* 1999. №127. P. 35-42.

14. Bauduceau B., Mayaudon H., Dupuy O. Rilmenidine in hypertensive type 2 diabetic:

a controlled pilot study versus captopril // *J. Cardiovasc. Risk.* 2000. №7. P. 57-61.

15. Калинкина Н.В. Дисфункция эндотелия как один из возможных патогенетических механизмов повреждения сердца антрациклинами // *Украинский кардиологический журнал.* 2000. №5-6. С. 69-71.

16. Кондратьева Л.В. Метформин – испытание временем // *РМЖ.* 2007. №27. С. 2098.

Довгань А.П. – ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ», г. Белгород, Российская Федерация. SPIN 9406-8460, ORCID ID 0000-0002-6941-4020, Researcher ID B-9604-2018.
E-mail: dr.dovgan@mail.ru

Поветкин С.В. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО КГМУ, г. Курск, Российская Федерация. SPIN 5412-3120, ORCID ID 0000-0002-1302-9326, Researcher ID G-2959-2013.

Батищева Г.А. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой клинической фармакологии ФГБОУ ВО ВГМУ им. Бурденко, г. Воронеж, Российская Федерация. SPIN 2285-1917, ORCID ID 0000-0003-4771-7466, Researcher ID: N-5230-2016.

Должиков А.А. – д.м.н., профессор кафедры анатомии и гистологии НИУ «БелГУ», г. Белгород, Российская Федерация. SPIN 7584-3080, ORCID ID 0000-0001-8866-8993, Researcher ID A-6579-2017.

Покровский М.В. – д.м.н., профессор, зав. кафедрой фармакологии НИУ «БелГУ», Россия, г. Белгород. SPIN 9201-3580, ORCID ID 0000-0002-1493-3376, Researcher ID A-4427-2017.

Урожевская Ж.С. – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии НИУ «БелГУ», г. Белгород, Российская Федерация. SPIN 3360-1887, ORCID ID 0000-0002-5874-1763, Researcher ID C-5466-2018.

© Dovgan A.P., Povetkin S.V., Batishcheva G.A., Dolzhikov A.A., Pokrovsky M.V., Urozhevskaya Z.S., 2018

POSSIBLE WAYS OF PHARMACOLOGICAL CORRECTION OF ISCHEMIC LIVER DAMAGES USING AGONIST OF PERIPHERAL IMIDAZOLINE RECEPTORS C7070

*A.P. Dovgan¹, S.V. Povetkin², G.A. Batishcheva³, A.A. Dolzhikov¹,
M.V. Pokrovsky¹, Z.S. Urozhevskaya¹*

Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education
"Belgorod State National Research University",

Pobeda str., 85, 308015, Belgorod, Russian Federation (1)

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
"Kursk State Medical University", Karl Marx str., 3, 305021, Kursk, Russian Federation (2)

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education
"Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko",
Studencheskaya str., 10, 394036, Voronezh, Russian Federation (3)

A comorbid condition both in diabetes mellitus and in metabolic syndrome is fatty dystrophy of the liver that further progresses to hepatic necrosis. In the article variants of pharmacological correction of ischemia-reperfusion of the liver with agonists of imidazoline receptor are proposed. **Materials and Methods.** The experiment was conducted on 70 rats of both sexes divided into 7 groups (n=10): intact group; pseudo-operated animals (incision of the abdominal wall without ligation of hepatic vessels); animals subject to ischemia/reperfusion without drug correction; animals subject to ischemia/reperfusion of the liver + metformin (50 mg/kg); animals subject to ischemia/reperfusion of the liver + moxonidine (1 µg/kg); animals subject to ischemia/reperfusion of the liver+C7070 (10 mg/kg). For evaluation coefficients were used calculated from the level of hepatic transaminases: alaninaminotransferase (ALT), aspartataminotransferase (AST), – and also from morphometric ratios of the areas of necrosis and deep ischemia of the liver on the basis of histological examination. **Results.** Agonist of peripheral imidazoline receptors C7070 reduces ischemic-reperfusion damages to the liver to a significantly larger extent than moxonidine and metformin. Hepatoprotective effect of C7070 was removed by preliminary introduction of peripheral imidazoline receptor blocker. ALT/AST coefficients for C7070, moxonidine and metformin were 72.8/62.13; 44.99/34.20 and 36.88/21.02, respectively. Coefficients of morphological hepatoprotective activity of the drugs were: C7070 – 82.61, moxonidine – 72.33, metformin – 38.96. **Conclusion.** Agonists of imidazoline receptors reliably and significantly reduce functional and morphological manifestations of ischemia/reperfusion of the liver.

Keywords: hepatic ischemia, hepatic reperfusion, diabetes mellitus, C7070, moxonidine, metformin, imidazoline receptor agonists.

Ischemia is both a triggering point and a stage of pathogenesis of many pathologic conditions [1]. Both in diabetes mellitus and in metabolic syndrome fatty dystrophy of the liver develops as a comorbid condition that further progresses to hepatic necrosis [2]. The drugs used in treatment for the metabolic syndrome and diabetes mellitus do not produce a sufficient protective effect on the damaged liver. In this context of doubtless interest is a study of a possibility of using biguanides for additional pharmacological correction of standard therapy [3].

Thus, a study of pleiotropic hepatoprotective properties of agonist of peripheral imidazoline receptors C7070 seems interesting from the point of view of its practical application in medicine.

Materials and Methods

Hepatotropic anti-ischemic activity was studied using the method described by D.A. Lopatin [4]. The experiment was conducted on 70 rats of both sexes divided into 7 groups: intact group; pseudo-operated animals (incision of the abdominal wall without ligation of hepatic vessels); animals with modeled ischemia/reperfusion not given any medicinal treatment; animals with modeled

ischemia/reperfusion given treatment with Metformin (50 mg/kg); animals with modeled ischemia/reperfusion given treatment with Moxonidine (1µg/kg); animals with modeled ischemia/reperfusion given treatment with C7070 preparation (10 mg/kg); animals with modeled ischemia/reperfusion given treatment with C7070 preparation (10 mg/kg) with simultaneous introduction of peripheral imidazoline receptor antagonist BU224 (BU224 hydrochloride solid, Sigma-Aldrich, Switzerland).

All selected doses corresponded to minimal therapeutic doses of the drugs recalculated for rats using common formulas. Dose of C7070 was selected on the basis of the minimal therapeutic dose of the closest analog – Diacamph (Ukraine).

Before modeling, the animals were introduced the drugs in single dose and saline per os. The animals were narcotized by intraperitoneal introduction of chloral hydrate solution in the dose of 300 mg/kg. A narcotized animal was made the midline laparotomy along the white line. Using a blunt method, the major hepatic ligament was isolated that carries vessels supplying blood to the liver. This ligament was clamped with an atraugrip for 15

minutes. After that the contents of the abdominal cavity were placed back, and the surgical wound was sutured layer-by-layer.

Within 3 days the animals were introduced the studied drugs and saline per os. In 3 days after the experiment the animals were subject to euthanasia through overdose of inhalation diethyl ether narcosis after which blood was taken from the heart for biochemical examination, and the liver was isolated for morphological analysis. No mortality of animals was noted in experiments.

Function of the liver was evaluated by biochemical markers of hepatocyte damage – AST and ALT in blood taken from the heart of experimental animals immediately before euthanasia (after 3 days of the experiment) [5]. Biochemical parameters were evaluated on the biochemical analyzer Olympus AU 640. The parameters were determined using sets of Olympus reagents: «AST/GOT (ASPARTATE AMINOTRANSFERASE)», «ALT/GPT (ALANINE AMINOTRANSFERASE)».

For evaluation of structural changes histological sections of the liver of experimental animals were obtained with their subsequent morphological analysis [6].

Morphological evaluation of structural changes was carried out on the base of Regional Pathanatomical Bureau of Healthcare Committee of Kursk Region according to the internal standards. The preparations were stained with a standard mixture of hematoxylin and eosin with subsequent digital microscopy and planimetric calculation of

the detected areas using Adobe Photoshop CC computer software (2015.2).

Statistical analysis of the obtained data was carried out using pair-wise Student-test (for parametric set) and Mann-Whitney U-test (for nonparametric set). The mean (M) and error of the mean (m) were preliminarily calculated. All calculations were carried out using Statistica 10.0 software. All differences obtained from comparison of parameters of different groups of animals as well as all changes were considered statistically reliable at $p < 0.05$.

Results and Discussion

Modeling of 15-min ischemia of the liver followed by reperfusion led to 5-fold increase in the levels of ALT and AST on the 3^d day of the experiment (Tab. 1). The parameters of the pseudo-operated animals did not show any reliable differences from those of intact animals. At the same time, morphometric measurements of the areas of ischemic and necrotic zones were 0.387 ± 0.014 and $0.207 \pm 0.021 \text{ mm}^2$, respectively (Tab. 2).

Application of the studied preparations shows a statistically significant reduction of the level of enzymes in blood of experimental animals. Of all used preparations, the highest activity was seen in C7070 (10 mg/kg), with levels of ALT and AST 143.27 ± 16.931 and 395.85 ± 33.311 , respectively (Table 1). In parallel with this, C7070 significantly and reliably reduced the areas of ischemic lesion and of necrosis to 0.058 ± 0.029 and 0.046 ± 0.013 , respectively. Moxonidine and metformin also reduced biochemical markers and morphometric parameters, but to a lesser extent than C7070 (Tab. 1-2).

Table 1
Influence of Agonists of Imidazoline Receptors on Level of Hepatic Transaminases (ALT, AST) in Modeling of Ischemia/Reperfusion of Liver ($M \pm m$, $n=10$)

Group of Animals	ALT (Un/ml)	AST (Un/ml)
Intact	102.89±8.82	284.14±19.36
Pseudo-operated	110.27±21.96*	289.80±16.29*
Ischemia/reperfusion (I/R)	526.90±17.97**	1045.16±80.02**
I/R+C7070 (10 mg/kg)	143.27±16.93 ¹	395.85±33.31 ¹
I/R+moxonidine (1 µg/kg)	289.86±15.27 ¹	687.71±28.37 ¹
I/R+metformin (50 mg/kg)	332.56±22.05 ¹	825.49±22.46 ¹
I/R+C7070 (10 mg/kg)+BU224 (10 mg/kg)	300.45±19.44 ¹	798.59±21.34 ¹

Note: * $p > 0.05$ in comparison with the group of intact animals;

** $p < 0.05$ in comparison with the group of pseudo-operated animals;

¹ $p < 0.05$ in comparison with Ischemia/Reperfusion group

Table 2

Influence of Agonists of Imidazoline Receptors on Area of Ischemic Damage Zone of Liver and Area of Necrotic Zone of Hepatic Tissue in Modeling of Ischemia/Reperfusion of Liver (M±m, n=10)

Group of Animals	Area of Ischemic Damage Zone, mm ²	Area of Necrotic Zone, mm ²
Intact	-	-
Pseudo-operated	-	-
Ischemia/reperfusion (I/R)	0.387±0.014	0.207±0.021
I/R+C7070 (10 mg/kg)	0.058±0.029*	0.046±0.013*
I/R+moxonidine (1 µg/kg)	0.090±0.025*	0.075±0.015*
I/R+metformin (50 mg/kg)	0.238±0.052*	0.125±0.020*
I/R+C7070 (10 mg/kg) +BU224 (10 mg/kg)	0.159±0.031*	0.104±0.008*

Note: *- p<0.05 in comparison with the group Ischemia/Reperfusion

For convenience of evaluation it is reasonable to compare the extent of reduction of the level of hepatic transaminases in different groups of animals using a simple mathematical formula:

$$K_{ALT} = 100 - \frac{ALT (exp)}{ALT (contr)} * 100\%$$

where ALT (exp) is ALT level in blood of animals of experimental groups, ALT (contr) is ALT level in blood of animals of control group.

The same formula is applicable to study the level of AST:

$$K_{AST} = 100 - \frac{AST (exp)}{AST (contr)} * 100\%$$

where AST (exp) is AST level in blood of animals of experimental groups, AST (contr) is AST level in blood of animals of the control group.

Using the given formula, we obtained the following data about functional protection of the drugs (Tab. 3).

Table 3

Hepatoprotective Activity of C7070, Moxonidine and Metformin in Modeling of Ischemia/Reperfusion of Liver according to Data of Biochemical Examination (M±m; n=10)

Coefficient of Hepatoprotective Activity, Unit	C7070 (10 mg/kg)	Moxonidine (1 µg/kg)	Metformin (50 mg/kg)
K _{ALT}	72.81±1.71*	44.99±1.23	36.88±1.02
K _{AST}	62.13±1.34*	34.20±1.21	21.02±1.49

Note: * – p<0.05 in comparison with coefficients obtained in treatment with moxonidine and metformin

It follows from the given data that agonist of peripheral imidazoline receptors (IR₂) C7070 possesses the highest anti-ischemic activity among the drugs studied within the frames of the given work.

For complete evaluation of anti-ischemic activity of the drugs, evaluation of only aminotranferases is insufficient.

For evaluation of hepatoprotective activity of the drugs a coefficient was calculated that characterizes the extent of protection of hepatic tissue from damages induced by ischemia and the subsequent reperfusion of the liver. This

coefficient takes into account both zones of ischemic lesion, and zones of necrosis.

The coefficient was calculated from the formula:

$$K = 100\% - \left(\frac{Mi (prep) + Mn (prep)}{Mi (contr) + Mn (contr)} * 100\% \right),$$

where Mi (prep) is the average area of ischemic lesions of liver in rats of experimental groups, Mn (prep) is the average area of necrosis of liver in rats of experimental groups, Mi (contr) is the average area of ischemic lesions of liver in rats of control group, Mn (contr) is the average area of necrosis of liver in rats of control group.

Thus, we obtain data of anti-ischemic hepatoprotective activity of the studied preparations (Table 4).

Thus, among all preparations studied

within the frames of the given work, agonist of peripheral imidazoline receptors C7070 possesses the highest hepatoprotective activity in ischemia/reperfusion of the liver.

Table 4

Hepatoprotective Activity of C7070, Moxonidine and Metformin in Modeling of Ischemia/Reperfusion of Liver according to Data of Morphometric Examinations (M±m; n=10)

№	Group of Animals	Coefficient of Hepatoprotective Activity, units.
1.	I/R+C7070 (10 mg/kg)	82.61±3.22*
2.	I/R+moxonidine (1 µg/kg)	72.33±1.04
3.	I/R+metformin (50 mg/kg)	38.96±5.69

Note: * – p<0.05 in comparison with pp. 2 and 3.

The obtained data can be explained by differences in mechanisms of actions of the drugs. The main component of the mechanism of metformin is reduction in production of glucose by the liver which, according to the data of numerous research, correlates with reduction in glycemia. Metformin plays a role in improvement of peripheral effects of insulin, in reduction of gluconeogenesis and oxidation of free fatty acids in the liver, in increase in the activity of anaerobic pathway of glucose metabolism with production of lactate, and in suppression of lipolysis. A number of studies conducted *in vivo* and *in vitro* showed activating influence of metformin on cellular enzyme AMP-kinase that plays a role in transmission of glucose across cell membrane with the help of GLUT4 and in oxidation of free fatty acids. The improvement of glycemic profile in treatment with this drug is probably as well associated with similar cellular aspects of its mechanism of action. Besides, dimethyl biguanide demonstrated an ability to reduce hardness of cell membranes which is commonly observed in patients with diabetes mellitus and may contribute to its complications [7].

Metformin activates AMP-activated protein kinase (AMPK) – a hepatic enzyme that plays an important role in insulin signaling, as well as in the total energetic balance of the body, and in metabolism of glucose and fats, including that occurring in the liver. Activation of AMPK is required for inhibitory effect of metformin on hepatic gluconeogenesis [8].

Summarizing the above, it may be said that anti-ischemic action of metformin is based on accumulation of energetic resources of

hepatocytes and retardation of consumption of the currently existing resources of nutrients.

Moxonidine being an agonist of central imidazoline receptors (IP₁) participates in redistribution of hepatic blood flow through opening of collaterals originating from *a. gastrica sinistra* that remained free from compression. Besides, the additional activity may be due to central influence of moxonidine on the opening of hepatic vessels at the moment of reperfusion of the liver. A certain influence of moxonidine on peripheral imidazoline receptors should not be excluded either [9].

Agonist of peripheral imidazoline receptors (IR₂) C7070 realizes its hepatoprotective effect by mechanisms analogous to those occurring in ischemization of a skin graft. It is evident that its influence on preservation of mitochondria is realized through ATPase channels present in the outer and inner membranes of mitochondria. Retardation and block of the avalanche flow of iron ions, in its turn, reduces oxidative stress with all its manifestations in reperfusion of the liver [10].

Activation of imidazoline receptors leads to enhanced synthesis of arachidonic acid and to inhibition of Na⁺/H⁺ ionic channels. There are grounds to think that imidazoline receptors belong to the family of neurocytokine receptors [11]. Activation of central I₁-receptors decreases arterial pressure and the heart rate. All these are results of the influence on the peripheral sympathetic nervous system through its central inhibition.

Throughout the period of existence of a new generation of imidazoline receptors nu-

merous preclinical and clinical studies of effectiveness of these pharmaceutical drugs were conducted.

Thus, for example, it has been demonstrated that intravenous application of moxonidine increased diuresis, excretion of sodium and potassium in rats. This effect was completely blocked by a selective antagonist of imidazoline receptors efaroxan and was weakened by α -adrenoreceptor blocker yohimbine [12].

The central I₁-receptors of hypothalamic region are involved into regulation of the level of glycemia that was shown in the experiment with selective agonist of I₁-receptors agmatine that causes reduction in the blood glucose level. A similar effect is seen in moxonidine. Besides, imidazoline receptors are supposedly located in the pancreas, and their activation leads to increase in insulin secretion [13].

Application of moxonidine in rats of *Zucker* line (obesity model) reduced the level of hypothalamic neuropeptide Y which may be one of mechanisms that can explain reduction in body mass in treatment with this drug [14].

It should be noted that not all the mentioned effects can be attributed to activation of central I₁-receptors. It is likely that some of them are nevertheless mediated by α_2 -adrenoreceptors. Besides, a certain contribution is made by peripheral effect of drugs.

On the contrary, representatives of Kharkov pharmacological school paid attention to an ability of agonists of peripheral imidazoline receptors to produce influence on blood glucose level [15]. According to their research, preparations of this group are not inferior to metformin in the hypoglycemic effect, but have much less side effects. Besides, unlike metformin, agonists of peripheral imidazoline receptors do not cause hypoproteinemia and hyperlactacidemia.

Besides other localizations, imidazoline receptors are also found on the membranes of adipocytes – fat tissue cells. Stimulation of these receptors leads to enhancement of lipid

metabolism.

In treatment of patients with arterial hypertension with moxonidine (0.4 mg/day) within 8 weeks, a reliable decrease in the arterial pressure was noted, while the levels of total lipids, of oxidized low density lipoproteins and the ratio of different subtypes of low density lipoproteins did not show any reliable changes [16].

All the above evidences the advantage of application of agonists of peripheral imidazoline receptors (IR₂) as medical drugs reducing structural and functional damages to the liver in its ischemia/reperfusion.

Conclusions

1. Agonist of II type imidazoline receptors C7070 in the dose of 10 mg/kg 4.5 times prevents increase in the levels of ALT and AST and 2.5 times reduces the areas of ischemic lesions and necrosis in modeling of 15-minute ischemia of the liver. Hepatoprotective effect of C7070 was 50% reduced by antagonist of peripheral imidazoline receptors BU224 (10 mg/kg).

2. Moxonidine possesses a less pronounced hepatoprotective effect and reduces areas of ischemic lesion and of necrosis 3.9-4.5 times. According to the data of laboratory studies, coefficients of hepatoprotective activity of moxonidine for ALT and AST were 44.99 and 36.88, respectively. Coefficient of histologic histoprotective activity of moxonidine is 72.33.

3. According to morphometric coefficients, metformin decreases areas of ischemic lesions and necrosis by one third and recovers the levels of ALT and AST after preceding ischemia/reperfusion of the liver only by 50%. Coefficients of hepatoprotective activity of metformin for ALT and AST were 34.20 и 21.02, respectively. Coefficient of histological hepatoprotective activity of metformin was 38.96.

4. In terms of hepatoprotective activity the studied preparations were inferior to C7070 (72.81/62.13/82.61 ALT/AST/ histology, respectively).

Authors have no conflict of interest to declare.

The study was conducted within the frames of a joint work under Contract №14411.2049999.19.109 "Preclinical Study of Anti-diabetic Pharmaceutical Drug – Agonist of Imidazoline Receptors" of December 10, 2014. The authors appreciate Regional Pathologoanatomical Bureau of Healthcare Committee of Kursk region for assistance in morphological analysis of preparations of rats' livers.

References

1. Kolmykov DI, Alehin SA. Ischemia / reperfusion effect on pancreatic volumetrical blood flow velocity. *Research result: pharmacology and clinical pharmacology*. 2015; 1(1): 42-6. doi:10.18413/2500-235X-2015-1-4-51-56.
2. Chigunadze AL, Artyushkova EB, Mishustin VN, et al. Experimental justification of new way of pharmacological correction for contact frostbite using DSLET opioid peptide and serotonin adipinate to enhance surgical treatment. *Research result: pharmacology and clinical pharmacology*. 2016; 2(2):3-19.
3. Ragulina VA, Kostina DA, Dovgan AP, et al. Nuclear factor kappa B as a potential target for pharmacological correction endothelium-associated pathology. *Research result: pharmacology and clinical pharmacology*. 2017;3(1):114-24. doi:10.18413/2500-235X-2017-3-1-114-124.
4. Alyokhin SA, Lopatin DV, Pokrovsky MV, et al. The Influence of distant ischemic preconditioning on the morphological and functional indicators and the expression of factor antiapoptosis in the liver after an episode of ischemia/reperfusion injury. *Bulletin of Belgorod State University*. 2012; 141(22):84-8. (In Russ).
5. Abrasheva TV, Gushchin YA, Kovaleva MA, et al. *Physiological ecological, biochemical and biometric indices of the norms of experimental animals*. Saint-Petersburg: LEMA; 2013. (In Russ).
6. Bivalkevich NV. *Zakonomernosti strukturno-funkcional'noi reorganizacii pecheni krys pri formirovanii diet-inducirovannoi nealcol'noi zhirovoi bolezni pecheni u krys* [dissertation]. Vladivostok; 2015. (In Russ).
7. Zilov AV, Terechova AL. Metformin – 50 let v klinicheskoi praktike. *Lechashchii vrach*. 2008;3:25-33. (In Russ).
8. Kirpichnikov DI, McFarlane SI, Sowers JR. Metformin: an update. *Ann Intern Med*. 2002;137(1):25-33.
9. Chan CK, Head GA. Relative importance of central imidazoline receptors for antihypertensive effects of moxonidine and rilmenidine. *J Hypertens*. 1996;14:855-64.
10. *Svobodnye radicaly i antioksidanty v khimii, biologii i medicine: materialy Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoy konferencii 1.10.2013-4.10.2013*. Novosibirsk; 2013. (In Russ).
11. Ernsberger P. The II-Imidazoline Receptor and Its Cellular Signaling Pathways. *Ann NY Acad Sci*. 1999;881:35-53.
12. Amann K, Nichols C, Tornig J, et al. Effect of ramipril, nifedipine, and moxonidine on glomerular morphology and podocyte structure in experimental renal failure. *Nephrol Dial Transplant*. 1996;11:1003-11.
13. Bing C, King P, Pickavance L, et al. The effect of moxonidine of feeding and body fat in obese Zucker rats; role of hypothalamic NPY neurons. *Br J Pharmacol*. 1999;127:35-42.
14. Bauduceau B, Mayaudon H, Dupuy O. Rilmenidine in hypertensive type 2 diabetic: a controlled pilot study versus captopril. *J Cardiovasc Risk*. 2000; 7:57-61.
15. Kalinkina NV. Disfunkcija endotelija kak odin iz vozmozhnykh mekhanizmov povrezhdenija serdca. *Ukrainskij kardiologicheskij zhurnal*. 2000; 5-6:69-71. (In Ukrainian).
16. Kondratijeva LV. Metformin – ispytanie vremenem. *Russkij medicinskij zhurnal*. 2007;27:2098. (In Russ).

Dovgan A.P. – Assistant of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation. SPIN 9406-8460, ORCID ID 0000-0002-6941-4020, Researcher ID B-9604-2018.

E-mail: dr.dovgan@mail.ru

Povetkin S.V. – MD, Grand PhD, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation. SPIN 5412-3120, ORCID ID 0000-0002-1302-9326, Researcher ID G-2959-2013.

Batishcheva G.A. – MD, Grand PhD, Professor, Head of the Department of Clinical Pharmacology, Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko, Voronezh, Russian Federation. SPIN 2285-1917, ORCID ID 0000-0003-4771-7466, Researcher ID: N-5230-2016.

Dolzhikov A.A. – MD, Grand PhD, Professor of the Department of Anatomy and Histology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation. SPIN 7584-3080, ORCID ID 0000-0001-8866-8993, Researcher ID A-6579-2017.

Pokrovsky M.V. – MD, Grand PhD, Professor, Head of the Department of Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation. SPIN 9201-3580, ORCID ID 0000-0002-1493-3376, Researcher ID A-4427-2017.

Urozhevskaya Z.S. – Postgraduate student of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation. SPIN 3360-1887, ORCID ID 0000-0002-5874-1763, Researcher ID C-5466-2018.