Исследование хронической токсичности готовой лекарственной формы ГБ-115

Сорокина А. В., Алексеева С. В., Мирошкина И. А., Забродина В. В.,
Колик Л. Г., Дурнев А. Д.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Аннотация. Представлены результаты исследования хронической токсичности пептидного анксиолитика ГБ-115 в готовой лекарственной форме. Препарат в виде таблетированной массы вводили ежедневно перорально в течение 6 мес. аутбредным крысам и кроликам породы шиншилла в дозе 1 мг/кг, соответствующей терапевтической, и 50 мг/кг, превышающей терапевтическую дозу в 50 раз. Клинико-лабораторные и патогистологические исследования, выполненные в соответствии с общим протоколом, продемонстрировали отсутствие токсических эффектов готовой лекарственной формы ГБ-115. Исключение составили обратимые изменения показателей коагуляционной активности у крыс и кроликов, которые не были связаны с дозой готовой лекарственной формы ГБ-115.

Ключевые слова: ГБ-115; готовая лекарственная форма; хроническая токсичность; крысы; кролики

Для цитирования:

Сорокина А.В., Алексеева С.В., Мирошкина И.А., Забродина В.В., Колик Л.Г., Дурнев А.Д. Исследование хронической токсичности готовой лекарственной формы ГБ-115 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 4. – С. 37–44. DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-37-44

Study of chronic toxicity of the GB-115 drug formulation

Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Zabrodina VV, Kolik LG, Durnev AD
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The results of the study of chronic toxicity of the drug formulation of anxiolytic GB-115 are presented. The novel dipeptide in the form of a tablet mass was administered daily orally for 6 months to outbred rats and rabbits of the chinchilla breed at a dose of 1 mg/kg corresponding to the therapeutic and 50 mg/kg exceeding the therapeutic dose by 50 times. Clinical, laboratory and pathohistological studies performed in accordance with the General Protocol demonstrated the absence of toxic effects of the GB-115 drug formulation. The exception was the reversible changes in the coagulation activity in rats and rabbits, which were not associated with the dose of the GB-115 solid dosage form.

Keywords: GB-115; solid dosage form (tablets); chronic toxicity; rats; rabbits

For citations:

Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Zabrodina VV, Kolik LG, Durnev AD. Study of chronic toxicity of the GB-115 drug formulation. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;4:37–44. (In Russ). DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-37-44

Введение

Анксиолитики — одна из распространённых групп нейротропных препаратов, которые применяются в условиях как стационарного, так и амбулаторного лечения. В этих условиях большое значение приобретают вопросы безопасного использования лекарственных препаратов данной группы.

В последние годы активно ведутся исследования, направленные на разработку эффективных и безопасных анксиолитиков. Разработанное на основе эндогенного тетрапептида холецистокинина и фармакологически изученное в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» дипептидное соединение ГБ-115 (амид N-фенилгексаноил-глицил-L-триптофана) обладает выраженным анксиолитическим действием и проявляет антагонистические свойства по отношению к центральным холецистокининовым рецепторам в опытах *in vitro* и *in vivo* [1–3].

Исследование хронической токсичности является обязательной ступенью в доклинической оценке безопасности нового лекарственного средства [4]. Ранее, в соответствии с требованиями нормативных документов, было проведено доклиническое изучение безопасности фармакологической субстанции ГБ-115 [5]. С разработкой таблетированной формы ГБ-115

возникла необходимость доклинического изучения её безопасности.

Исследование хронической токсичности готовой лекарственной формы (ГЛФ) нового дипептидного соединения ГБ-115 явилось целью настоящей работы.

Цель исследования

Целью данной работы стало изучение хронической токсичности ГЛФ ГБ-115.

Задачами работы стали выявление токсических эффектов ГЛФ ГБ-115 при ежедневном пероральном введении течение 6 мес. аутбредным крысам и кроликам породы шиншилла в дозе 1 мг/кг (соответствует терапевтической дозе) и 50 мг/кг (превышает терапевтическую дозу в 50 раз). Важно также было установить возможные органы-мишени токсического действия, оценить степень местнораздражающего действия при пероральном введении таблеточной массы, а также выявить возможность обратимости искомых токсических эффектов ГЛФ ГБ-115.

Материалы и методы

При проведении исследования использовали таблеточную массу ГБ-115 серии № 010614, произве-

дённую Опытно-технологическим Отделом ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» 25.06.2014. Состав на одну таблетку: ГБ-115 — 0,001 г; лактозы — 0,067 г; микрокристаллической целлюлозы 102 — 0,029 г; гидроксипропилметилцеллюлозы 6 — 0,0015 г; магния стеарата — 0,0015 г. Расчёт дозы препарата вели по активному веществу [6].

Хроническую токсичность ГЛФ ГБ-115 оценивали на беспородных белых крысах обоего пола начальной массой 180–200 г и кроликах породы шиншилла обоего пола начальной массой 1,5–2 кг.

Все экспериментальные животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в условиях вивария ФГБНУ НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с крысами и кроликами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [7] на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123.

В исследование введено 64 крысы и 36 кроликов. ГЛФ ГБ-115 вводили крысам и кроликам перорально ежедневно в течение 6 мес. в дозе, соответствующей терапевтической — 1 мг/кг (2-я группа крыс и кроликов), а также в дозе, превышающей её в 50 раз — 50 мг/кг (3-я группа крыс и кроликов и 4-я «отставленная» группа крыс). Животным контрольных групп (1-я группа крыс и кроликов) перорально вводили 1 % раствор крахмала в тех же объёмах, что и при изучении субтоксической дозы.

Объём и продолжительность исследования, набор использованных методов, регистрируемых параметров и другие условия проведения исследования регламентировались соответствующими Руководствами [4, 8–10]. Забор биоматериала и его исследование выполнялось до начала эксперимента, через 3 мес. и 6 мес., не позже 24 ч после заключительного введения препарата. Исключение составили крысы «отставленной» группы, в которой забор материала и измерения выполняли также спустя 30 дней после заключительного введения ГЛФ ГБ-115.

Массу экспериментальных животных определяли еженедельно с помощью электронных весов SPU 601 (OHAUS Corp., США).

Изучение поведенческих реакций у крыс проводили по тесту «Открытое поле». Оценивали следующие характеристики: ориентировочно-исследовательские реакции (локомоторная или горизонтально-двигательная активность), количество пересечённых периферических секторов, вертикальная двигательная активность (количество вертикальных стоек), исследовательская активность «норковый рефлекс», а также эмоциональное состояние животных (количество фекальных болюсов, числа уринаций, груминговой активности, выходов в центр, время замирания).

Электрокардиографическое исследование проводили у крыс с использованием беспроводной системы Физиобелт (Нейроботикс, Россия) во втором стандартном отведении. Данные анализировали с использованием программного обеспечения LabChart (Австралия). На нефиксированное животное надевали жилетку с беспроводным усилителем и электродами.

Измерения ректальной температуры у крыс осуществляли с использованием ректального датчика на оборудовании производства компании ADInstrumentsLtd (Австралия).

Клиническое исследование крови у крыс и кроликов осуществляли с помощью автоматического гематологического анализатора «AbacusUniorvet», Австрия (крысы), автоматического гематологического анализатора «MINDRAY», Германия (кролики), компьютеризированной микроскопической системы «МЕКОС-Ц1». Определяли следующие гематологические показатели периферической крови: количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрит, тромбокрит, средний объём эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах, средняя концентрация гемоглобина в эритроците [11].

Исследование гемостаза у крыс и кроликов проводили с использованием коагулометра TS 4000 (США). Определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ), количество фибриногена.

Биохимические исследования крови у крыс и кроликов осуществляли с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «ChemWell 2910 Combi» (США). Определяли содержание глюкозы, общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, активность аланин- и аспартатамино-трансферазы.

Биохимические исследования мочи у крыс проводили с помощью анализатора мочи «HandUReader» (Венгрия) и автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «ChemWell 2910 Combi», США, используя наборы реагентов для диагностики «*in vitro*» производства компании «SPINREACTS.A.» (Испания). Определяли удельный вес, кислотность, содержание глюкозы, белка.

По завершении эксперимента всех животных вскрывали. В ходе патологоанатомического вскрытия, макроскопической оценки состояния важнейших органов и систем организма, а также после определения массовых коэффициентов наиболее реактивных внутренних органов были отобраны и зафиксированы в 10 % забуференном растворе формалина фрагменты внутренних органов (сердца, лёгких, трахеи, пищевода, желудка, тонкого и толстого кишечника, печени, поджелудочной железы, почек, мочевого пузыря, надпочечников, щитовидной железы, парашитовидной железы, тимуса, селезёнки, семенников и придатков семенников самцов, яичников и маточных труб самок крыс и кроликов). Головной мозг крыс фиксировали в

96 % этаноле. После окончания фиксации и стандартной гистологической проводки (автоматизированный тканевой процессор Leica TP1020, Германия) образцы заливали в парафиновые блоки (система заливки тканей с графическим дисплеем Tissue-Tek®ТЕК™, США). Готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм (микротом ротационный Accu-Cut®SPM™, США), которые помещали на стекло с полилизинным покрытием (Menzel). Окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской 1 % водным раствором эозина [12–14]. Срезы микроскопировали (микроскоп Nikon eclipse 55i,) в проходящем свете.

Возможное местное раздражающее действие ГЛФ ГБ-115 при пероральном введении оценивали клинически, затем макроскопически при проведении патологоанатомического вскрытия и микроскопически при исследовании гистологических срезов пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки.

Статистический анализ полученных данных проводили следующим образом. Нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. В случае нормального или близкого к нему распределения для определения значимости изменений использовали *t*-критерий Стьюдента, однофакторный дисперсионный анализ (в случае множественных сравнений) с последующей обработкой с помощью критерия Даннета. Полученные результаты описывали с помощью средних арифметических и их стандартных ошибок. В случае значительного отклонения распределения от нормального использовали непараметрические методы статистики: критерий Манна–Уитни, аналог дисперсионного анализа по Краскеллу–Уоллису с последующей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Полученные результаты описывали с помощью медиан, нижнего и верхнего квартилей.

Статистическую значимость различий качественных признаков определяли с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественных сравнений.

Результаты считались статистически значимыми, если значение *p* оказывалось меньшим или равным 0,05 [15, 16].

Результаты и обсуждение

В результате проведённого исследования установлено, что длительное пероральное введение ГЛФ ГБ-115 крысам и кроликам обоего пола в дозах 1 и 50 мг/кг не вызывает изменений общего состояния и внешнего вида. В ходе эксперимента не погибло ни одно животное.

При наблюдении за динамикой массы тела экспериментальных крыс и кроликов, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 1 мг/кг, установлено, что она не отличалась от таковой у контрольных животных. При введении

ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг у крыс 3-й и 4-й групп не выявлено значимых различий в динамике массы и её прироста с животными контрольной группы, за исключением более низких (на 31 %) показателей прироста у самок 3-й группы на 4- и 5-м месяцах эксперимента. К окончанию эксперимента прирост массы тела крыс этой группы восстанавливался, а через месяц после отмены ГБ-115 (4-я группа) фиксировали значительное увеличение прироста массы в среднем на 62 % у самок, и на 97 % у самцов по сравнению с исходными данными. Наблюдение в течение 6 мес. за динамикой массы тела кроликов, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, не выявило значимых различий в массе тела и её приросте с контрольными животными.

Длительное пероральное введение ГЛФ ГБ-115 снижает потребление корма опытными крысами самками и, напротив, вызывает полифагию у опытных самцов. Препарат ГБ-115 не влияет на потребление воды опытными крысами.

ГБ-115 при ежедневном введении крысам в дозах 1 и 50 мг/кг не вызывает выраженных изменений поведения экспериментальных животных в тесте «открытое поле». Отмечалось повышение исследовательской активности у опытных крыс, ежедневно получавших готовую лекарственную форму препарата ГБ-115 в дозе 1 мг/кг через три месяца введения препарата, и угнетение вертикальной двигательной активности у животных после шестимесячного введения ГБ-115 в дозе 50 мг/кг. Через месяц после отмены препарата в дозе 50 мг/кг поведенческие реакции крыс отставленной группы не имели значимых различий с поведением контрольных животных.

Исследование фонового ЭКГ во втором стандартном отведении показало, что у всех крыс в начале эксперимента наблюдался нормальный синусовый ритм сокращений сердца (500–550 ударов/мин.). Изучение ЭКГ крыс экспериментальных групп, проведённое через 3,6 мес. от начала эксперимента, а также 7 мес. (только «отставленная» группа), позволило заключить, что ГЛФ ГБ-115 в обеих исследуемых дозах не вызывает значительных изменений электрокардиограмм. Установленные показатели не отличались от таковых у крыс контрольной группы.

Исследование ректальной температуры в начале эксперимента показало, что у всех крыс контрольной и экспериментальных групп, которым впоследствии вводили ГЛФ ГБ-115 в дозах 1 и 50 мг/кг, исследуемый показатель находился в пределах физиологической нормы, характерной для данного вида животных. В течение шести месяцев введения ГЛФ ГБ-115 у крыс экспериментальных групп не выявлено значимых различий по сравнению с таковыми показателями контрольных животных.

При изучении периферической крови крыс, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 1 мг/кг, у самцов через три месяца, а также у крыс обоего пола через 6 мес., регистрировали более высокий уровень гемоглоби-

на по сравнению с контрольными данными. Также у самцов этой группы, через три месяца введения ГБ-115, количество эритроцитов и, соответственно, гематокритное число (отношение общего уровня эритроцитов к показателю объёма плазмы) были значимо выше аналогичных показателей в контрольной группе. К окончанию эксперимента содержание тромбоцитов было выше контрольных значений: у самок — на 31 %, у самцов — на 20 %. Следует отметить, что все исследованные показатели не выходили за границы референтных значений для данного вида животных [17, 18]. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов к окончанию эксперимента не выявлено значительных различий с контролем. Через три месяца число анизохромных форм эритроцитов у самок и количество полихроматофилов у самцов были значимо ниже контрольных значений на 18 % и в 2 раза, соответственно. По сравнению с первоначальными данными у самцов крыс этой группы отмечено снижение числа полихроматофилов и анизохромных эритроцитов. Эти изменения хотя и были статистически значимыми, но не выходили за границы пределов физиологической нормы.

При изучении периферической крови крыс, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, установлено, что у крыс 3-й и 4-й групп регистрировалось увеличение количества тромбоцитов: у самок — в среднем на 34 %, у самцов — на 54 %. К окончанию эксперимента не наблюдалось статистически значимых различий между гематологическими показателями опытной и контрольной групп. За исключением более низкого, чем в контроле, содержания числа лейкоцитов и средней концентрации гемоглобина в эритроците у самок. Показатели периферической крови и морфометрические показатели эритроцитов у крыс «отставленной» 4-й группы, исследованных через месяц после отмены препарата, не имели различий с контролем.

До начала эксперимента показатели периферической крови кроликов, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 1 мг/кг, не отличались значимо по сравнению с контролем. За исключением показателя гемоглобина у самок, который был несколько выше, чем в контроле. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов у кроликов этой группы не наблюдалось различий с контролем. За исключением более низкого показателя количества дискоидных (нормальных) форм эритроцитов и, соответственно, увеличение числа пойкилоцитов. Установлено, что через три месяца введения препарата у кроликов этой группы не отмечено значимых различий с контрольной группой. К окончанию эксперимента большинство показателей периферической крови были на уровне контроля.

Установлено, что у кроликов, которым перорально вводили ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, большинство показателей периферической крови не имели значимых различий с контролем. За исключением самок, у которых через три месяца среднее содержание гемоглобина

в эритроците было выше, а количество тромбоцитов ниже аналогичных показателей периферической крови контрольных самок. Через шесть месяцев уровень гемоглобина у кроликов был выше контрольного, в лейкоцитарной формуле у самок, как и у животных 2 группы, содержание лимфоцитов было выше, а количество сегментоядерных нейтрофилов ниже аналогичных показателей в контроле. По сравнению с первоначальными данными через три месяца у самцов фиксировали уменьшение количества эритроцитов (10 %), содержания гемоглобина (11 %) и объёма эритроцитарной крови на 8 %. К окончанию эксперимента содержание гемоглобина у самцов увеличилось до первоначального уровня. У самок, в течение всего эксперимента, показатель количества тромбоцитов был ниже данного, полученного до введения препарата. Следует отметить, что различия в этих показателях, хотя и были статистически значимыми, находились в пределах колебаний, обычно наблюдаемых у лабораторных кроликов [17, 18]. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через 3 и 6 мес. перорального введения препарата ГБ-115 в дозе 50 мг/кг по сравнению с контролем и фоновыми данными у кроликов этой группы отмечено уменьшение количества анизохромных эритроцитов. Так же как и у животных 2 группы, диаметр эритроцитов у них был ниже контрольного показателя.

Обобщённый анализ данных проведённых гематологических исследований не выявил эффектов, которые могли бы быть обусловлены токсическим действием препарата ГБ-115.

Исследование системы гемостаза было выполнено на крысах и кроликах обоего пола. В результате проведённых исследований установлено, что у экспериментальных животных, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозах 1 и 50 мг/кг, наблюдался сходный характер изменения коагуляционной активности крови, связанный с укорочением значений тромбинового времени свёртывания крови.

У самок крыс, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 1 мг/кг, было установлено значимое укорочение тромбинового времени на 18,6 %, по сравнению с аналогичным показателем в группе контрольных крыс. У самок крыс, получавших препарат в дозе 50 мг/кг, также наблюдалось значимое сокращение тромбинового времени на 21,0 %, по сравнению со значением, зарегистрированным в группе контроля. При исследовании крови самок крыс «отставленной» группы было зарегистрировано значимое удлинение протромбинового времени на 21,8 %, по сравнению с контролем и тромбинового времени на 21,8 % по сравнению с крысами, получавшими препарат в дозе 50 мг/кг и обследованными через 24 ч после заключительного его введения (табл. 1). В отличие от самок крыс у самцов не было установлено значимых различий при сравнении показателей свёртывания крови. Следует отметить, что наблюдаемая вариабельность

Таблица 1

Влияние ГЛФ ГБ-115 (при пероральном введении в течение шести месяцев в дозах 1 и 50 мг/кг) на показатели гемостаза крыс

Показатели	Контроль Ме (25–75 %)	ГБ-115 1 мг/кг Ме (25–75 %)	ГБ-115 50 мг/кг Ме (25–75 %)	ГБ-115 50 мг/кг «отставленная группа» Ме (25–75 %)
ПВ, сек ♀	14,7 (12,8÷18,1)	14,3 (13,2÷16,1)	14,5 (12,3÷18,2)	17,9* (16,1÷18,1)
ПВ, сек ♂	15,6 (14,6÷17,4)	16,7 (15,3÷18,1)	14,5 (11,9÷19,3)	19,0 (17,1÷22,2)
АЧТВ, сек ♀	17,0 (15,9÷18,2)	15,2 (15,0÷16,4)	16,9 (16,3÷18,6)	20,4 (17,0÷29,1)
АЧТВ, сек ♂	16,5 (15,2÷17,3)	16,5 (15,3÷17,5)	14,0 (11,8÷17,3)	18,2 (16,1÷21,2)
ТВ (У 6), сек ♀	29,1 (25,9÷31,4)	23,7* (21,0÷27,6)	23,0* (21,4÷25,0)	28,0* (26,4÷31,1)
ТВ (У 6), сек ♂	26,4 (23,6÷30,8)	23,9 (17,2÷28,0)	24,4 (23,0÷25,1)	28,8 (25,6÷35,7)
Фибриноген, г/л ♀	2,7 (2,2÷3,3)	3,2 (2,6÷3,7)	3,3 (2,6÷3,7)	2,2 (2,0÷3,0)
Фибриноген, г/л ♂	2,5 (2,1÷3,0)	2,6 (2,2÷3,0)	3,8 (2,7÷4,2)	2,3 (1,5÷3,3)

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп 25 и 75 % квартилей; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с 3-й группой животных.

показателей гемостаза находились в пределах референтных значений [17, 18].

У самок кроликов, получавших препарат в дозе 1 и 50 мг/кг, было отмечено значимое укорочение тромбинового времени свёртывания крови на 7,6 и 22,9 %, соответственно, по сравнению с аналогичными показателями в группе контрольных животных (табл. 2). Следует отметить, что при исследовании плазмы крови кроликов контрольной группы все показатели свёртываемости крови находились в пределах обычно наблюдаемых значений [17, 18].

При биохимическом исследовании сыворотки крови крыс контрольной и опытных групп животных было показано, что все изученные показатели находились в пределах референтных значений. У самцов крыс, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 1 мг/кг, наблюдалось значимое повышение активности аланинаминотрансферазы (37,6 %). У самок этой группы было отмечено значимое снижение содержания мочевины на 35,1 % по сравнению с контрольными крысами. У самцов крыс, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, было отмечено значимое снижение содержания общего белка (45,9 %) и повышение активности аланинаминотрансферазы (32,8 %) по сравнению с аналогичными показателями в группе контроля. Значимое повышение уровня мочевины у самцов и самок этой группы составило 57,3 и 23,9 %, соответственно. Исследование крови крыс «отставленной» группы, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, показало, что через месяц после отмены препарата у самцов сохраняется значимо

повышенное содержание общего белка (на 38,9 %) по сравнению с контролем. Было зарегистрировано значимое снижение концентрации креатинина у животных обоего пола. По сравнению с контрольными значениями снижение уровня креатинина у самцов составило 28,1 %, а по сравнению с аналогичным показателем у крыс 3 группы – 31,8 %.

При биохимическом исследовании сыворотки крови кроликов, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, были зарегистрированы значимые различия с контролем по содержанию в крови глюкозы у самок, общего белка и креатинина — у самцов. Значимое снижение глюкозы в крови у самок составило 16,9 %. У самцов значимое повышение общего белка составило 53,6 %, а креатинина — 28,0 %. Следует отметить, что все наблюдаемые изменения биохимических показателей крови опытных кроликов не выходили за границы физиологической нормы.

Исследование физико-химических свойств мочи контрольных и опытных крыс в начале эксперимента, не выявило отклонений биохимических показателей от референтных значений. Через 3 и 6 мес. у крыс контрольной группы не выявлено значимых различий в биохимическом составе мочи по сравнению с первоначальными данными. Исследование биохимического состава мочи опытных крыс, получавших препарат ГЛФ ГБ-115 в дозе 1 мг/кг, в начале эксперимента выявило значимое повышенное содержание креатинина у самцов на 4,9 % по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе животных. Через 3

Таблица 2

**Влияние ГЛФ ГБ-115 (при пероральном введении в течение шести месяцев в дозах 1 и 50 мг/кг)
на показатели гемостаза кроликов**

Показатели	Контроль Ме (25–75 %)	ГБ-115 1 мг/кг Ме (25–75 %)	ГБ-115 50 мг/кг Ме (25–75 %)
ПВ, сек ♀	10,3 (7,3÷10,7)	9,7 (9,4÷9,8)	8,7 (7,5÷9,4)
ПВ, сек ♂	10,2 (7,8÷10,4)	9,7 (9,3÷10,2)	8,4 (7,7÷9,8)
АЧТВ, сек ♀	13,9 (13,6÷16,2)	15,4 (13,3÷16,6)	16,7 (13,2÷18,3)
АЧТВ, сек ♂	14,4 (13,3÷16,2)	14,8 (14,4÷17,3)	14,6 (13,9÷15,0)
ТВ (У 6), сек ♀	13,1 (12,6÷14,5)	12,1* (11,8÷12,4)	10,1* (8,7÷11,1)
ТВ (У 6), сек ♂	15,6 (10,6÷19,5)	12,2 (11,1÷13,0)	10,0 (9,7÷10,4)
Фибриноген, г/л ♀	2,5 (2,3÷2,9)	3,4 (2,8÷3,9)	3,3 (3,0÷3,6)
Фибриноген, г/л ♂	2,3 (1,9÷2,7)	2,9 (2,1÷3,9)	3,5 (2,4÷3,7)

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп 25 и 75% квартилей; * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных.

и 6 мес. (окончание эксперимента) у крыс этой группы не выявлено значимых различий по сравнению с исходными данными и контролем.

Первоначальное исследование мочи крыс, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, показало, что все биохимические показатели находились в пределах обычно наблюдаемых значений. Через 3 мес. у самок и самцов, получавших ГБ-115 в дозе 50 мг/кг, было зарегистрировано значимое повышение уровня креатинина на 29,0 и 20,8 %, соответственно, по сравнению с первоначальными данными. По сравнению с контролем значимое повышение концентрации креатинина у самцов составило 37,9 %. Через 6 мес. (окончание эксперимента) у самок и самцов этой группы было отмечено значимое повышение содержания креатинина и снижение мочевины в моче по сравнению с исходными данными. По сравнению с исходными данными значимое повышение концентрации креатинина в моче самок составило 83,1 %, а у самцов – 31,7 %. По сравнению с контрольными животными содержание креатинина повысилось на 38,2 % у самок и на 24,5 % – у самцов. Значимое снижение концентрации мочевины по сравнению с исходными данными у самок составило 31,0 %, а у самцов – 50,0 %. Следует отметить, что у самцов и самок 3 группы через 6 мес. введения препарата было зарегистрировано снижение концентрации мочевины до нижней границы физиологической нормы для крыс.

Через месяц после отмены препарата («отставленная» группа) у самцов и самок, получавших препарат

в дозе 50 мг/кг, было отмечено значимое повышение уровня мочевины. По сравнению с результатами, наблюдаемыми при первоначальном исследовании мочи, у самок было зарегистрировано значимое повышение уровня мочевины на 34,5 %. Повышение содержания этого показателя в моче крыс через месяц после отмены препарата не превышало физиологических значений, характерных для данного вида животных.

В результате проведенного после эвтаназии патологоанатомического вскрытия экспериментальных крыс и кроликов, оценки массовых коэффициентов наиболее реактивных внутренних органов, последующего макроскопического и микроскопического исследования установлено следующее. ГЛФ ГБ-115 не вызывает изменений строения органов нервной системы (головной мозг) крыс. Препарат не приводит к закономерным изменениям строения таких органов и систем организма экспериментальных крыс и кроликов, как сердечно-сосудистая (сердце, магистральные сосуды), дыхательная (лёгкие, трахея), пищеварительная (пищевод, желудок, тонкий и толстый отделы кишечника, печень, поджелудочная железа), мочевыводящая (почки, мочевой пузырь), эндокринная (надпочечники, щитовидная железа, парашитовидная железа, островки Лангерганса поджелудочной железы), репродуктивная (семенники и придатки семенников самцов, яичники и маточные трубы самок) а также органов кроветворения и иммуногенеза (селезёнка, тимус, лимфатические узлы кишечника и лёгких).

Исследования местнораздражающего действия ГЛФ ГБ-115 показало отсутствие болевой реакции животных при введении препарата, отсутствие раздражения слизистой оболочки ротовой полости при ежедневных клинических осмотрах экспериментальных крыс и кроликов. Патоморфологическое вскрытие не выявило макроскопических изменений ротовой полости, языка, глотки, пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника крыс и кроликов. Микроскопическая картина пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника крыс и кроликов экспериментальных групп, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозах 1 и 50 мг/кг, была идентичной таковой, наблюдаемой у контрольных крыс и кроликов, получавших 1 % раствор крахмала.

Заключение

Изучение анксиолитика ГБ-115, проведенное согласно стандартному для доклинических исследований хронической токсичности протоколу [4, 8], не выявило закономерных токсических эффектов.

Обнаруженные у самок кроликов и крыс, получавших ГЛФ ГБ-115 в дозах 1 и 50 мг/кг, изменения коагуляционной активности крови, связанные с укорочением значений тромбинового времени свертывания крови, находились в пределах референтных значений.

При клинических испытаниях препарата стоит учитывать потенциальные риски, связанные с применением ГБ-115 у лиц, страдающих нарушениями свёртываемости крови.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сорокина Александра Валериановна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: alex-mike5475@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Sorokina Aleksandra

Corresponding author

e-mail: alex-mike5475@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

Candidate of Biological Sciences, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Алексеева Светлана Витальевна

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN-код: 8985-3418

с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Alekseeva Svetlana

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN code: 8985-3418

Senior Research Officer of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Мирошкина Ирина Александровна

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Miroshkina Irina

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Забродина Виктория Владимировна

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN-код: 8473-6920

к. б. н., н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zabrodina Victoria

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN code: 8473-6920

Candidate of Biological Sciences, Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Колик Лариса Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolik Larisa

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

Doctor of Biological Sciences, prof. RAS, Head Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

член-корр. РАН, д. м. н. профессор, зав. лабораторией лекарственной токсикологии, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Durnev Andrei

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

RAS corresponding member, Doctor of Biological Sciences., Head of the laboratory of drug toxicology, Professor, Director FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2007. — Т. 70. — № 2. — С. 8–11. [Kolik LG, Zhukov VN, Seredenin SB. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2007;70(2):8–11. (In Russ).]

2. Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Фармакогенетическое исследование анксиолитических свойств новых антагонистов холинэргических рецепторов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2003. — Т. 135. — № 5. — С. 519–523. [Kolik LG, Gudasheva TA, Seredenin SB. Pharmacogenetic study of anxiolytic effects of new cholinergic receptor antagonists in animals with different levels of emotionality. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2003;135(5):440–444. (In Russ).]

3. Kolik LG, Gudasheva TA, Seredenin SB. Dipeptide anxiolytic GB-115: new receptor targets. *European Neuropsychopharmacology*. 2011;21(s2):S146.

4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение хронической токсичности. — М.: Гриф и К; 2012. 17–24 с. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie khronicheskoi toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012. p. 17–24 (In Russ).]

5. Сорокина А.В., Алексеева С.В., Немова Е.П., и др. Доклиническое исследование безопасности дипептидного соединения ГБ-115 // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2010. — Т. 73. — № 6. — С. 29–32. [Sorokina AV, Alekseeva SV, Nemova EP, et al. Doklinicheskoe issledovanie bezopasnosti dipeptidnogo soedineniya GB-115. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2010;73(6):29–32. (In Russ).]

6. Клумова В.С., Грушевская Л.Н., Авдюнина Н.И., и др. Методы синтеза лекарственных средств и технология их производства: разработка аналитических методов определения ГБ-115 в твердой лекарственной форме (таблетках) // *Химико-фармацевтический журнал*. — 2012. — Т. 45. — № 12. — С. 736–740. [Klumova VS, Grushevskaya LN, Avdyunina NI, et al. Drug synthesis methods and manufacturing technology: developing analytical techniques for GB-115 determination in solid dosage form (tablets). *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2012;45(12):736–740 (In Russ).]

7. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910

8. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К; 2013. 328 с. [Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Tom I. Moscow: Grif i K; 2013. (In Russ).]

9. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «хронической» токсичности. — М.: Медицина; 2005. 47–54 с. [Guideline for Experimental (Preclinical) Studying of New Pharmacological Substances. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya farmakologicheskikh veshchestv. Izuchenie «khronicheskoi» toksichnosti. Moscow: Medicine; 2005. P41-47 (In Russ).]

10. Diehl KH, Hull R, Morton D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *Journal of Applied Toxicology*. 2001;21:15–23.

11. Исследование системы крови в клинической практике. / Под ред. Г.И. Козинца, В.А. Макарова. — М.: Триада-Х; 1997. [Studies of Blood System in Clinical Practice. Ed by Kozinets GI, Makarov VA. Moscow: Triada-X; 1997 (In Russ).]

12. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов. / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова. — М.: Медицина; 1996 [Mikroskopicheskaya tekhnika. Rukovodstvo dlya vrachei i laborantov. Ed by Sarkisov DS, Perov YuL. Moscow: Medicine; 1996. (In Russ).]

13. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. — Смоленск: САУ; 2000. [Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo. Smolensk: SAU; 2000. (In Russ).]

14. Меркулов Г.А. Курс патологистологической техники. 5-е изд., испр. и доп. — Ленинград: Медицина; Ленингр. отд-ние, 1969. [Merkulov GA. Kurs patologistologicheskoi tekhniki. Leningrad: Medicine; 1969. (In Russ).]

15. Гланс С. Медико-биологическая статистика. — М.: Практика; 1998. 359 с. [Glanc S. Mediko-biologicheskaya statistika. Moscow: Praktika; 1998. 359 s. (In Russ).]

16. Бельский М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — М.: Изд. Мед. Литература; 1963. [Belen'kii M.B. Elementy kolichestvennoi otsenki farmakologicheskogo efekta. Leningrad: Medgiz; 1963. (In Russ).]

17. Проблемы нормы в токсикологии / под ред. проф. И.М. Трахтенберга. — М.: «Медицина»; 1991. 203 с. [Problemy normy v toksikologii. Ed by prof. IM Trahtenberga. Moscow: «Medicina»; 1991. (In Russ).]

18. Справочник Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных / под ред. Макарова В.Г., Макаровой М.Н. — СПб.: «Лемма»; 2013. 116 с. [Spravochnik Fiziologicheskie, biohimicheskie i biometricheskie pokazateli normy eksperimental'nykh zhivotnykh. Ed by Makarova VG, Makarovo MN. S-Peterburg: «Lemma»; 2013. (In Russ).]