

ФАРМАКО КИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№ 1.2019



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

член-корр. РАН, д.б.н., профессор, Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

**Белопищевская
Вера Геннадиевна**
к.б.н., Москва

**Бондарева
Ирина Борисовна**
д.б.н., Москва

**Воронина
Татьяна Александровна**
заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна
д.м.н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Москва

Казей Василий Игоревич
к.б.н., Москва

Ковалёв Георгий Иванович
д.м.н., профессор, Москва

**Колыванов Геннадий
Борисович**, д.б.н., Москва

Мирзоян Рубен Симонович
заслуженный деятель науки
РФ, д.м.н., профессор, Москва

**Раменская
Галина Владиславовна**
д.ф.н., профессор, Москва

**Сариев Абрек
Куангалиевич**
д.м.н., профессор, Москва

Спасов Александр Алексеевич
академик РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

**Смирнов Валерий
Валерьевич**, к.ф.н., Москва

**Стародубцев
Алексей Константинович**
д.м.н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Александрович
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Москва

Тюрников Иван Николаевич
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

Чистяков Виктор Владимирович
д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

**Белоусов
Дмитрий Юрьевич**
Ответственный за выпуск
журнала
+ 7 (916) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

**Афанасьева
Елена Владимировна**
Генеральный директор
ООО «Издательство ОКИ»
подписка
+ 7 (916) 986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна
Дизайн и верстка
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 30.03.2019 г. Тираж 400 экз.
Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова» РАН Тел./Факс: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Журнал «Фармакокинетика и Фармакодинамика» является приложением к журналу «Ка-
чественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» заре-
гистрирован Комитетом РФ по печати 28.05.2001 г. Свидетельство о регистрации средства
массовой информации ПИ № 77-9142. Авторские материалы не обязательно отражают
точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации,
содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Клиническая фармация
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.izdat-OkI

Центр Фармакоэкономических Исследований
Market Access Solutions
Издательство ОКИ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Влияние сукцинатсодержащих препаратов на физическую
работоспособность и восстановление после нагрузок
Радько С.В., Дулепов А.Д. 3

Исследование влияния положения метокси-группы
на кардиотропную активность соединения АЛМ-802
*Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В.,
Столярук В.Н., Цорин И.Б., Вититнова М.Б.,
Крыжановский С.А., Гудашева Т.А.* 6

Влияние мексидола на физическую и умственную
работоспособность при стрессогенных воздействиях
в эксперименте
Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А. 12

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Исследование протекторных свойств агониста TrkA-
рецептора ГК-2 на модели окислительного стресса
в культуре клеток сосудистого эндотелия
человека (HUVES)
*Антипова Т.А., Николаев С.В., Крыжановский С.А.,
Пекельдина Е.С.* 18

Подходы к прогнозированию аффинности лигандов
18 кДа транслокаторного белка TSPO
с целью создания молекул с нейрорепрогенеративной
активностью человека (HUVES)
Барбошкин Н.М., Пантеев А.С., Мокров Г.В. 22

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Изучение особенностей проницаемости гемато-
энцефалического барьера для новых нейротропных
пептидных лекарственных препаратов
Жердев В.П., Бойко С.С., Шевченко Р.В. 31

Фармакокинетика дипептидного миметика
BDNF ГСБ-106 у крыс
*Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.,
Бочков П.О., Грибакина О.Г., Шевченко Р.В.,
Тарасюк А.В., Гудашева Т.А.* 37

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование хронической токсичности
потенциального анксиолитика ГМЛ-1
*Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Волкова А.В.,
Качалов К.С., Алексеев И.В., Захаров А.Д.,
Алексеева С.В., Дурнев А.Д.* 44



Chief editor

Zherdev Vladimir

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Firsov Alexander

Corresponding Member RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Belolipetskaia Vera

Ph.D., Moscow

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Kazey Vasily

Ph.D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Kolyvanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Smirnov Valery

Ph.D., Moscow

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

Corresponding Member PAS,
Ph.D., Professor, Volgograd

Chistyakov Viktor

Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

Responsible for this issue
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

Afanasyeva Elena

CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription
+7(916)986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
site:www.izdat-ok.ru

Zhuk Elena

Design and layout
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 30.03.2019 r. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

115093, Moscow, Partiyinyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiyskay, 8

FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»

Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Journal «Pharmacokinetics and Pharmacodynamics» is a supplement to the journal «Good Clinical Practice». Journal «Good Clinical Practice» registered by Russian Committee for Press 28.05.2001 Certificate of registration of mass media PI №77-9142. Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Clinical Pharmacy
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.izdat-Ok.ru

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OKI

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

The influence of succinate-containing drugs on physical
performance and recovery after exercise

Radko S.V., Dulepov A.D. 3

Study of methoxy-group position influence
on compound alm-802 cardiotropic activity

*Mokrov G.V., Likhoshesterov A.M., Barchukov V.V.,
Stolyaruk V.N., Tsorin I.B., Vititnova M.B.,
Kryzhanovskiy S.A., Gudasheva T.A.* 6

Effect of mexidol on physical and mental
performance under stressogenic conditions
in experiment

Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A. 12

MODE OF ACTION

Research of neuroprotective properties
of TrkA-receptor agonist GK-2 on model
of oxidative stress in human vascular
endothelial cells (HUVEC)

*Antipova T.A., Nikolaev S.V., Kryzhanovskiy S.A.,
Pekeldina E.S.* 18

Approaches to predict ligands affinity
towards translocator protein TSPO 18 kDa
in order to create molecules possessing
neuropsychotropic activity

Baraboshkin N.M., Pantileev A.S., Mokrov G.V. 22

EXPERIMENTAL PHARMACOKINETIC

The study of the permeability
of the blood-brain barrier
for new neurotropic peptide drugs

Zherdev V.P., Boyko S.S., Shevchenko R.V. 31

Pharmacokinetics of dipeptide mimetic
BDNF GSB-106 in rats

*Zherdev V.P., Kolyvanov G.B., Litvin A.A.,
Bochkov P.O., Gribakina O.G., Shevchenko R.V.,
Tarasyuk A.V., Gudasheva T.A.* 37

TOXICOLOGICAL STUDIES

Study of acute toxicity of potential anxiolytic GML-1

*Miroshkina I.A., Sorokina A.V., Volkova A.V.,
Kachalov K.S., Alekseev I.V., Zaharov A.D.,
Alekseeva S.V., Durnev A.D.* 44

Влияние сукцинатсодержащих препаратов на физическую работоспособность и восстановление после нагрузок

Радько С.В., Дулепов А.Д.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

Резюме. Проведена оценка влияния 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (Мексидол) на физическую работоспособность мелких лабораторных животных и восстановление после нагрузки. В результате установлено, что однократное применение препарата повышает выносливость животных, оцениваемую как максимально время плавания, в 1,57 раза. При курсовом применении препарата наблюдалась тенденция к повышению работоспособности с выходом на плато после 3-й недели, аналогично препарату сравнения.

Ключевые слова: работоспособность; этилметилгидроксипиридина сукцинат; вынужденное плавание

Для цитирования:

Радько С.В., Дулепов А.Д. Влияние сукцинатсодержащих препаратов на физическую работоспособность и восстановление после нагрузок // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2019. – № 1. – С. 3–5. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10032.

The influence of succinate-containing drugs on physical performance and recovery after exercise

Radko S.V., Dulepov A.D.

Saint Petersburg State Chemical Pharmaceutical University (SPCPU)

Resume. An assessment of the influence of 2-ethyl-6-methyl-3-hydroxypyridine succinate (Mexidol) on the physical performance of small laboratory animals and recovery after exercise was made. As a result, it was found that a single application of Mexidol increases the endurance of animals, estimated as maximum swimming time, 1.57 times. With the course of the drug, there was a tendency to improve performance with access to the plateau after the 3rd week, similar to the comparative drug - bis [2 - [(2E) -4-hydroxy-4-oxobut-2-en-1-yl] -N, N-diethylethanaminium] butanedioate.

Keywords: physical efficiency; succinate; ethylmethylhydroxypyridine succinate; forced swimmin

For citations:

Radko SV, Dulepov AD. The influence of succinate-containing drugs on physical performance and recovery after exercise. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:3–5. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10032.

Введение

Физическая активность является одним из основных показателей качества жизни человека. Её снижение характерно для ряда патологий, таких как заболевания сердечно-сосудистой и дыхательной систем, поражений печени и травм ЦНС. Одной из основных целей в лечении данных заболеваний является восстановление работоспособности и её поддержание на определенном уровне.

Кроме того, поддержание высокой работоспособности и быстрое восстановление после нагрузок актуально для людей, чья работа и жизнь связана с повышенными физическими нагрузками — профессиональных спортсменов, спасателей, военнослужащих.

Одним из факторов, лимитирующих работоспособность в условиях патологии или высокой интенсивности, является недостаточное образование АТФ, не покрывающее энергопотребности организма. Таким образом, подобное несоответствие между максимально возможной энергопродукцией энергопотреблению организма при физической нагрузке может рассматриваться как гипоксическое состояние, учитывая, что в основе характерных для всех форм гипоксии нарушений лежит недостаточность ведущей клеточной энергопродуцирующей системы — митохондриального окислительного фосфорилирования [2, 4].

Возможным путём фармакологической коррекции такой гипоксии физической нагрузки может быть использование сукцинатсодержащих препаратов [6]. При этом вводимый извне сукцинат может оказывать не только субстрат-зависимое антигипоксическое действие, но и реализует свои эффекты как агонист специфических (SUCNR1, GPR91) рецепторов [5].

Антигипоксический эффект сукцината может быть увеличен за счёт его комбинации с соединениями, обладающими антиоксидантной и энхансерной активностью [3]. Классическим представителем таких препаратов является 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат (Мексидол). Целью данного эксперимента была оценка его влияния на некоторые параметры физической работоспособности при однократном и курсовом применении.

Материалы и методы

Исследования проводились на беспородных мышах — самцах массой 22–24 г. Исследование выполняли в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказом Минздрава России от 01.04.2016 г. № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабо-

раторной практики», согласно утверждённому письменному протоколу. Животные были получены из питомника ФГУП «ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде.

Плавательные тесты по оценке физической работоспособности осуществляли в плавательной установке, представляющей собой 200-литровый бассейн высотой 40 см, шириной 35 см и длиной 80 см, заполняемый водой до половины. Внутри него располагался внутренний контур из оргстекла высотой 30 см, шириной 30 см и длиной 75 см, разделенный на 10 отсеков (15×15 см каждый). Установку заполняли до половины десатурированной водой температуры 22–24 °С. Десатурацию воды проводили путём предварительного отстаивания воды в течение суток. Во время теста мышей помещали в соответствующий отсек бассейна и сразу включали секундомер. Критерием окончания тест являлось погружение животного с носом под воду при неудачной попытке всплыть более трёх секунд, после чего его извлекали из бассейна, обсушивали мягкой тканью и помещали в стандартную клетку. Утяжеляющий груз фиксировали в области подреберья с помощью специального приспособления [7].

Влияние на физическую работоспособность (ФРС) при однократном введении оценивали, определяя максимальное время вынужденного плавания животных с грузом (10 % массы тела). Все животные были разделены на 3 группы по 8 мышей в каждой: первая (контрольная), получала 0,9 % раствор NaCl, вторая — 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцината (Мексидол, Фармасофт, РФ) в дозе 50 мг/кг, третья — препарат сравнения, обладающий выраженными актопротекторными свойствами — бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанамина} бутандиоат (ФДЭС) в дозе 75 мг/кг. Препараты вводили внутривенно за 30 минут до теста.

Для оценки влияния Мексидола на ФРС при курсовом введении перед рандомизацией проводили оценку максимального времени вынужденного плавания животных с грузом (10 % массы тела), для исключения мышей с крайними значениями показателя.

После проведения рандомизационного теста все животные были разделены на 3 группы по 8 животных в каждой: первая (контрольная) получала 0,9 % раствор NaCl, вторая — Мексидол в дозе 50 мг/кг, третья — препарат сравнения (ФДЭС) в дозе 75 мг/кг. Все препараты вводились в течение 5 дней в неделю в течение 4 недель. Введение препаратов осуществляли внутривенно с помощью зонда. Оценочный тест вынужденного плавания с грузом проводили каждую неделю.

Все эксперименты выполняли в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р-53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Приказом Минздрава РФ от

01.04.16 г. №199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики».

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью *t*-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при ненормальном распределении — с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов). Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: среднее арифметическое (M) ± ошибка среднего. Уровень доверительной вероятности был задан равным 95 %.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования влияния исследуемых веществ при однократном введении было установлено, что в контрольной группе не произошло изменений времени плавания. В группе, получавшей Мексидол за 30 минут до нагрузки, максимальное время плавания достоверно возросло в 1,44 раза относительно значений контрольной группы и в 1,57 раза относительно исходных значений (табл. 1). В группе препарата сравнения отмечалась тенденция по повышению работоспособности в 1,14 раза, однако значения не достигали статистической достоверности.

Таблица 1

Влияние Мексидола на время плавания экспериментальных животных при однократном введении

Группа	Время плавания исходно, сек	Время плавания после однократного введения, сек
Контрольная	282,25 ± 16,12	301,0 ± 28,63
Мексидол	277,33 ± 15,90	435,0 ± 40,4 ^{1,2}
ФДЭС	286,81 ± 25,66	328 ± 77,87
Примечание: ¹ — достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ($p < 0,05$); ² — достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$).		

При оценке влияния курсового применения на протяжении 4 недель в контрольной группе отсутствовали изменения в работоспособности. В группе, получавшей Мексидол, после 1-й недели максимальное время плавания возросло в 1,22 раза относительно исходных значений. В конце второй недели показатель достиг плато, превысив в 1,52 раза исходные значения, и оставался в 1,65 раза выше на 3-й и 4-й неделях

Таблица 2

Влияние изучаемых препаратов на время плавания
экспериментальных животных при курсовом введении

Тренировоч- ные точки	Общее время плавания, сек		
	Контроль	Мексидол	ФДЭС
Исходно	283,62 ± 17,04	282,75 ± 14,93	280,62 ± 16,00
1-я неделя	279,3 ± 18,78	345,75 ± 57,0	372,66 ± 47,69
2-я неделя	292 ± 30,61	431,83 ± 55,54 ^{1,2}	411,16 ± 42,58 ^{1,2}
3-я неделя	271,25 ± 80,70	467,5 ± 103,19 ^{1,2}	454,28 ± 48,87 ^{1,2}
4-я неделя	268,25 ± 65,25	466,7 ± 122,38 ^{1,2}	467,83 ± 54,01 ^{1,2}
Примечание: ¹ — достоверные отличия от соответствующего исходного показателя ($p < 0,05$); ² — достоверные отличия от соответствующего показателя контрольной группы ($p < 0,05$).			

($p < 0,05$). Повышение работоспособности Мексидолом оказалось сопоставимо с таковым в группе препарата сравнения (табл. 2).

Способность Мексидола повышать работоспособность может быть обусловлена, в первую очередь, его антигипоксической, а также антиоксидантной активностью. Так, известно, что Мексидол активирует энергосинтезирующие функции митохондрий за счёт восстановления митохондриальных окислительно-восстановительных процессов [3]. Уменьшение угнетения

окислительных процессов в цикле Кребса приводит к повышению содержания АТФ и креатинфосфата за счёт сохранения и восстановления уровней адениловых нуклеотидов, фосфодиэстеразы, а также стимуляции активности ферментов, обеспечивающих энергетический обмен [2]. АТФ и креатинфосфат являются основными источниками энергообеспечения во время высокоинтенсивных кратковременных нагрузок [1], которые были использованы в нашем эксперименте для скрининговой оценки актопротекторных свойств препарата. Кроме того, в условиях гипоксии Мексидол вызывает компенсаторную активацию анаэробного гликолиза, стабилизирует клеточные мембраны за счёт нормализации соотношения холестерина/липопротеинов высокой плотности в мембранных структурах [2]. Эти компоненты механизма действия препарата могут обеспечивать его актопротекторное действие.

Выводы

1. Мексидол достоверно повышает работоспособность экспериментальных животных при однократном введении.

2. При курсовом введении Мексидола отмечается повышение физической работоспособности с выходом на плато после 2 недель применения.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Радко Степан Владимирович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: Stepan.radko@pharminnotech.com

SPIN-код: 2858-9770

Ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Дулепов Александр Дмитриевич

SPIN-код: 9777-8341

Студент 4-го курса фармацевтического факультета, ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России

Radko Stepan

Corresponding author

e-mail: Stepan.radko@pharminnotech.com

SPIN-code: 2858-9770

Assistant of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology, SPCPU

Dulepov Alexander

SPIN-code: 9777-8341

4th year student of the Pharmacy Faculty, SPCPU

Литература / References

1. Волков Н.И., Несен Э.Н., Осипенко А.А., Корсун С.Н. Биохимия мышечной деятельности. — Олимпийская литература; 2000. [Volkov NI, Nesen EH, Osipenko AA, Korsun SN. *Biohimiya myshechnoy deyatel'nosti*. Olimpiyskaya literature; 2000. (In Russ).]
2. Каркищенко Н.Н., Уйба В.В., Каркищенко В.Н., и др. Очерки спортивной фармакологии. Том 2. Векторы фармакопротекции / под редакцией Н.Н. Каркищенко и В.В. Уйба. — М., СПб.: Айсинг, 2014; — С. 7. [Karkishchenko NN, Ujba VV, Karkishchenko VN, et al. *Ocherki sportivnoy farmakologii*. Tom 2. *Vektory farmakoprotektsii* / pod redaktsiej NN Karkishchenko i VV Ujba. — M., SPb.: Ajsing, 2014; S. 7. (In Russ).]
3. Лукьянова Л.Д., Германова Э.Л., Цыбина Т.А., Чернобаева Г.Н. Энерготропное действие сукцинатсодержащих производных 3-оксипиридина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2009. — Т. 148. — № 10. — С. 388—392. [Luk'yanova LD, Germanova EL, Cybina TA, Chernobaeva GN. *Ehnergotropnoe dejstvie suksinatsoderzhashchih proizvodnyh 3-okspiridina*. Bulletin of Experimental Biology and Medicine. 2009; 48(10):388—392. (In Russ).]
4. Оковитый С.В., Суханов Д.С., Заплутанов В.А., Смагина А.Н. Антигипоксанты в современной клинической практике // Клиническая

медицина. — 2012. — № 9. — С. 63—68. [Okovityj SV, Suhanov DS, Zaplutanov VA, Smagina AN. *Antigipoksanty v sovremennoj klinicheskoy praktike*. *Klinicheskaya medicina*. 2012;9:63—68. (In Russ).]

5. Оковитый С.В., Радко С.В., Шустов Е.Б. Сукцинатные рецепторы (SUCNR1) как перспективная мишень фармакотерапии // Химико-фармацевтический журнал. — 2015. — Т. 49. — № 9. — С. 24—28. [Okovityi SV, Rad'ko SV, Shustov EB. *Succinate receptors (sucnr1) as a promising target for pharmacotherapy*. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal*. 2015;49(9):24—28. (In Russ).]

6. Оковитый С.В., Радко С.В. Применение сукцинатов в спорте // Вопросы курортологии, физиотерапии и лечебной физической культуры. — 2015. — Т. 92. — № 6. — С. 59—65. [The application of succinate in sports. Okovityi SV, Rad'ko SV. *Voprosy kurortologii, fizioterapii i lechebnoj fizicheskoj kul'tury*. 2015;92(6):59—65. (In Russ).] DOI: 10.17116/kurort2015659-6.

7. Радко С.В., Гусев К.А., Краснова М.В., Оковитый С.В. Патент № 172475 Устройство для крепления грузов к мелким лабораторным животным. [Rad'ko SV, Gusev KA, Krasnova MV, Okovityi SV. Patent № 172475 *Ustrojstvo dlya krepleniya gruzov k melkim laboratornym zhivotnym*. (In Russ).] URL: <https://patents.google.com/patent/RU172475U1/ru>. Ссылка активна на 18.04.2019.

Исследование влияния положения метокси-группы на кардиотропную активность соединения АЛМ-802

Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В., Столярук В.Н., Цорин И.Б.,
Вититнова М.Б., Крыжановский С.А., Гудашева Т.А.

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

Резюме. Синтезировано новое соединение АЛМ-803 (тригидрохлорид N¹–(3,4,5-триметоксибензил)-N²–[2-[(3,4,5-триметоксибензил)амино]этил]-1,2-этандиамина) — аналог АЛМ-802, отличающийся от него положением метокси-групп в фенильных кольцах. Установлено, что это структурное изменение приводит к исчезновению антиишемической активности и антиаритмической активности на модели аконитиновой аритмии у крыс, но при этом антиаритмическая активность на моделях хлоридкальциевой аритмии и электрической фибрилляции желудочков сердца крыс сохраняется (1 мг/кг, внутривенно).

Ключевые слова: ингибиторы окисления свободных жирных кислот; антиишемическая и антиаритмическая активности; линейные метоксифенилтриаалканы; АЛМ-802

Для цитирования:

Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В., Столярук В.Н., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А., Гудашева Т.А. Исследование влияния положения метокси-группы на кардиотропную активность соединения АЛМ-802 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019 – № 1. – С. 6–11. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10033.

Study of methoxy-group position influence on compound alm-802 cardiotropic activity

Mokrov G.V., Likhosherstov A.M., Barchukov V.V., Stolyaruk V.N., Tsorin I.B., Vititnova M.B., Kryzhanovskiy S.A., Gudasheva T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. A new compound ALM-803 (trihydrochloride N¹–(3,4,5-trimethoxybenzyl)-N²–[2-[(3,4,5-trimethoxybenzyl)amino]ethyl]-1,2-ethanediamine) was synthesized as analog of ALM 802, differing from it by the position of the methoxy groups in the phenyl rings. It is established that this structural change leads to the disappearance of anti-ischemic activity and antiarrhythmic activity on the model of aconitine arrhythmia in rats, but the antiarrhythmic activity on models of chloride-calcium arrhythmia and electrical fibrillation of the heart of rats remained (1 mg/kg, intravenously).

Keywords: free fatty acid oxidation inhibitors; anti-ischemic and antiarrhythmic activities; linear methoxyphenyltriaalkanes; ALM-802

For citations:

Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, Stolyaruk VN, Tsorin IB, Vititnova MB, Kryzhanovskiy SA, Gudasheva TA. Study of methoxy-group position influence on compound alm-802 cardiotropic activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:6–11. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-0519-2019-10033.

Введение

Поиск и создание новых оригинальных лекарственных средств, обладающих антиаритмическим действием и способных при этом оптимизировать метаболические процессы в ишемизированном миокарде, представляется актуальной задачей. В настоящее время в клинической практике активно используются препараты триметазидин [1]

и ранолазин [2], обладающие свойствами ингибиторов окисления свободных жирных кислот (рис. 1). Эти лекарственные средства обладают высокой антиишемической и антиаритмической активностями, и они успешно применяются при лечении ишемической болезни сердца, хронической сердечной недостаточности, метаболического синдрома, алкогольной кардиомиопатии и других заболеваний сердца [3–6].

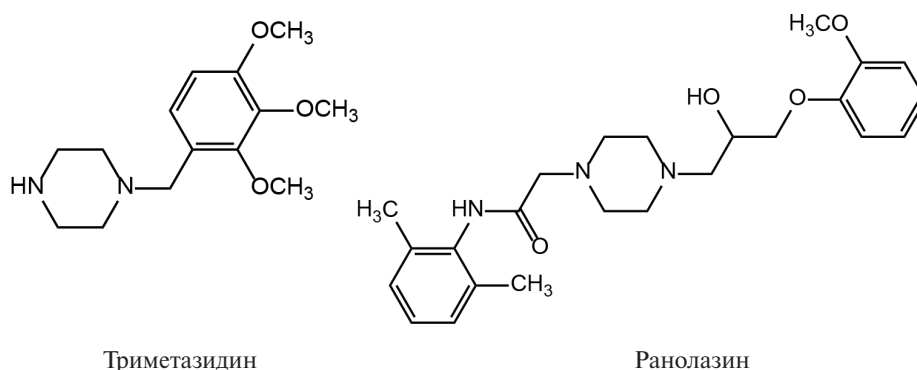


Рис. 1. Структурные формулы триметазидина и ранолазина

Дизайн и синтез

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» ранее на основе фармакофорной модели, комбинирующей структурные элементы триметазидина и ранолазина, было сконструировано соединение АЛМ-802 (тригидрохлорид N^1 —(2,3,4-триметоксибензил)- N^2 —{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина) (рис. 2). Данная молекула содержит два ароматических фармакофора (выделено красным) и связывающий их триаза-алкановый линкер (выделено синим).

Исследование кардиотропной активности соединения АЛМ-802 продемонстрировало высокую перспективность этого соединения. В условиях модели субэндокардиальной ишемии у крыс вещество АЛМ-802 (1,0 мг/кг в/в) продемонстрировало выраженную антиишемическую активность, что выражалось в отсутствии депрессии сегмента ST на электрокардиограмме крыс по сравнению с контрольной группой. В этой же дозе (в/в) АЛМ-802 проявило антиаритмическую активность на моделях аконитиновой аритмии, хлоридкальциевой аритмии и электрической фибрилляции.

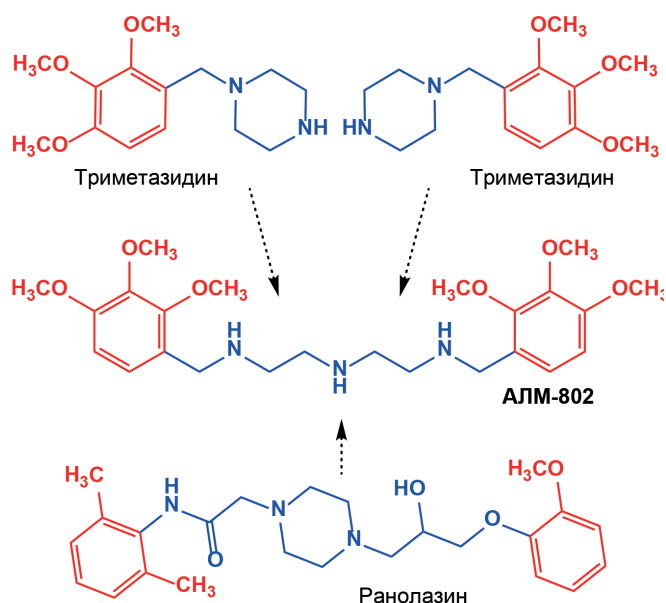


Рис. 2. Конструирование молекулы АЛМ-802 на основании структур триметазидина и ранолазина

С целью оценки влияния строения молекулы АЛМ-802 на его биологическую активность в настоящей работе нами было синтезировано соединение АЛМ-803 (тригидрохлорид N^1 —(3,4,5-триметоксибензил)- N^2 —{2-[(3,4,5-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина), отличающееся от АЛМ-802 перемещением орто-метокси-групп во вторые мета-положения (рис. 3).

Синтез соединения АЛМ-803 осуществлялся путём восстановительного аминирования 3,4,5-триметоксибензальдегида с диэтилентриамином в соотношении 2:1, соответственно, в этаноле. Восстановление осуществляли путём каталитического гидрирования на палладиевом ката-

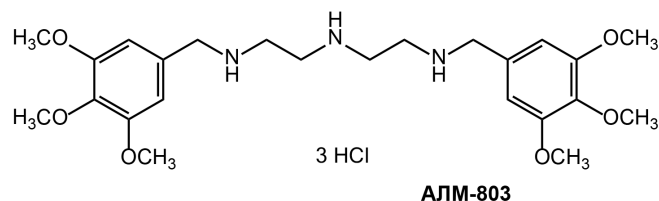


Рис. 3. Соединение АЛМ-803

лизаторе. Выход продукта составил 48 %. Тпл. 192–195 °С (с разл.). Данные элементного анализа соответствовали расчетной брутто формуле $C_{24}H_{40}Cl_3N_3O_6H_2O$. Спектр ЯМР 1H (DMSO, δ , м.д.): 3.24–3.47 (м, 8 H, $((CH_2)_2)_2N$); 3.56, 3.80 (два с, 6 H и 12 H, 6 OMe); 4.15 (с, 4 H, 2 CH_2Ar); 7.00 (с, 4 H, 4 ArH); 9.82 (уш.с, 3 H, 3 NH).

Материалы и методы

Животные. В экспериментах по оценке острой токсичности соединений использовали беспородных мышей-самцов с массой тела 21–24 г. В экспериментах по оценке антиишемической и антиаритмической активности соединений использовали белых беспородных крыс-самцов массой 160–420 г. Все животные были получены из ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Определение LD_{50} . Значения LD_{50} соединений изучали на беспородных мышах-самцах при внутрибрюшинном введении. В качестве растворителя использовали апи-рогенную воду для инъекций. LD_{50} определяли в пяти различных дозах, количество животных в каждой серии 6. Летальность животных оценивали через 24 часа после введения соединений. Значения LD_{16} , LD_{50} и LD_{84} с их доверительными 95 % интервалами рассчитывали по методу Литчфилда-Вилкоксона.

Модель субэндокардиальной ишемии у крыс, вызываемой изопроterenолом

Антиишемическую активность соединений изучали на белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, наркотизированных уретаном (1 300 мг/кг, в/б). Острую субэндокардиальную ишемию миокарда вызывали по

методу, описанному Yamamoto S, et al. [7]. Для этой цели животным с помощью инъектора «Линеомат» (Россия) внутривенно со скоростью 20 мкг/кг/мин вводили неселективный агонист β -адренорецепторов изопроterenол. Об интенсивности ишемического повреждения судили по величине депрессии сегмента ST на ЭКГ (II стандартное отведение) через 5 минут от момента начала инфузии изопроterenола. В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Полиспектр 8/EX» (Нейрософт, Россия).

Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я — контроль ($n = 16$); 2-я — соединение АЛМ-802 ($n = 7$); 3-я — соединение АЛМ-803 ($n = 6$). Животным контрольной группы за 2 минуты до начала инфузии изопроterenола внутривенно вводили эквивалентный объём (0,2 мл) физиологического раствора, а животные основных групп по аналогичной схеме получали исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в).

Модель аконитиновой аритмии [8, 9]

Опыты проводили на беспородных наркотизированных (уретан 1 300 мг/кг, в/б) крысах-самцах массой тела 160–180 г. Животных переводили на искусственное дыхание. Регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении. В качестве регистратора использовали Mingograf-82 фирмы Elema-Siemens (Швеция). Визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента производили при помощи 8-канального осциллоскопа фирмы Nihon Konden (Япония). Животных рандомизировали на 3 группы: 1-я — контроль ($n = 11$); 2-я — соединение АЛМ-802 ($n = 8$); 3-я — соединение АЛМ-803 ($n = 6$). В контрольной серии экспериментов определяли минимальную дозу аконитина, вызывающую фатальные нарушения ритма сердца в первые 5 минут от момента его внутривенного введения. Животным опытных групп за 2 минуты до инъекции аконитина вводили исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в). В каждой опытной группе оценивали количество погибших животных в первые 5 минут после введения аконитина.

Модель хлоридкальциевой аритмии [8, 9]

Опыты проводили на беспородных наркотизированных (уретан 1300 мг/кг, в/б) крысах-самцах массой тела 250–300 г. Животных переводили на искусственное дыхание. Регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении. В качестве регистратора использовали Mingograf-82 фирмы Elema-Siemens (Швеция). Визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента производили при помощи 8-канального осциллоскопа фирмы Nihon Konden (Япония). Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я — контроль ($n = 10$); 2-я — соединение АЛМ-802 ($n = 6$); 3-я — соединение АЛМ-803 ($n = 6$). В контрольной серии экспериментов определяли минимальную дозу кальция хлорида, вызывающую фатальные нарушения ритма сердца в

первые 5 минут от момента его внутривенного введения. Животным опытных групп за 2 минуты до инъекции кальция хлорида вводили исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в). В каждой опытной группе оценивали количество погибших животных в первые 5 минут после введения кальция хлорида.

Модель электрической фибрилляции желудочков сердца [8]

Опыты проводили на анестезированных (уретан, 1300 мг/кг, в/б) беспородных крысах-самцах массой тела 380–420 г. Животных переводили на искусственное дыхание; проводили стернэктомию и перикардотомию. В миокард левого желудочка сердца на расстоянии 3–5 мм друг от друга имплантировали два позолоченных электрода. Порог электрической фибрилляции сердца определяли сканированием уязвимого периода серий из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся интенсивности (длительность импульса 4 мс, частота 50 имп/с) до возникновения фибрилляции. За порог фибрилляции принимали минимальную силу тока, стабильно вызывающую фибрилляцию желудочков при повторной стимуляции. В опыт отбирали только тех животных, у которых фибрилляция желудочков наступала при силе тока не более 6 мА.

В работе использовали электростимулятор HSE Stimulator II (Hugo Sach Electronik, Германия). В течение всего эксперимента регистрировали ЭКГ (II стандартное отведение). В качестве регистратора использовали электрокардиограф ЭК 4Т-02 (Россия). Визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента производили при помощи 4-канального осциллоскопа фирмы Elema-Siemens (Швеция). Животных рандомизировали на 3 группы: 1-я — контроль ($n = 6$); 2-я — соединение АЛМ-802 ($n = 6$); 3-я — соединение АЛМ-803 ($n = 6$). Исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в) вводили за 5 минут до определения порога электрической фибрилляции желудочков сердца.

Статистика

При анализе данных, полученных при исследовании антиишемической активности соединений, нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро-Уилка. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия считали значимыми при $P \leq 0,05$, критерий двухсторонний. Полученные результаты выражали в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки. При анализе антиаритмической активности статистическую обработку проводили по методу точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений, а при анализе антифибрилляторной активности — с использованием знаково-рангового критерия Вилкоксона.

Результаты и их обсуждение

Исследование острой токсичности соединения АЛМ-803 показало, что значение LD50 для него составило 131,1 мг/кг, что близко по значению к данному показателю для АЛМ-802 (118,8 мг/кг) (табл. 1).

Таблица 1

Острая токсичность соединений АЛМ-802 и АЛМ-803 (беспородные мыши-самцы, внутрибрюшинное введение)

Соединения	LD16 мг/кг, в/б	LD50 мг/кг, в/б	LD84 мг/кг, в/б
АЛМ-802	98,6 (98,2 99,0)	118,8 (103,0 121,4)	126,9 (126,4 127,4)
АЛМ-803	81 (76 86)	131,1 (99,8 172,0)	212 (199,0 226,0)

Исходя из данных по токсичности в качестве дозы для изучения кардиотропной активности соединения АЛМ-803 была выбрана такая же, в которой ранее изучали АЛМ-802, а именно, 1 мг/кг.

В модели субэндокардиальной ишемии у крыс, вызываемой изопротеренолом, соединение АЛМ-803, в отличие от АЛМ-802, не проявило статистически значимого антиишемического эффекта, что свидетельствует о том, что наличие метокси-группы в орто-положении ароматических фрагментов молекулы является критически важным для этого вида активности (табл. 2).

При исследовании антиаритмической активности было установлено, что на модели аконитиновой аритмии соединение АЛМ-803, в отличие от соединения АЛМ-802, не обладает антиаритмическим эффектом (см. табл. 2). В то же время, на модели хлоридкальциевой аритмии оба соединения обладали равной и выраженной антиаритмической активностью. Также оба вещества обладали высокой антифибрилляторной активностью, увеличивая порог электрической фибрилляции желудочков сердца у крыс до значений выше 10 мА (см. табл. 2).

Таким образом, перенос метокси-групп из орто-положения фенильных колец молекулы АЛМ-802 в мета-положения соединения АЛМ-803 приводит к исчезновению антиишемической активности и антиаритмической активности в модели аконитиновой аритмии, при этом антиаритмическая активность в моделях хлоридкальциевой аритмии и электрической фибрилляции желудочков сердца сохраняется. Данное наблюдение можно предположительно объяснить следующим образом. Молекула АЛМ-802 может рассматриваться как соединение с многокомпонентным механизмом действия: антиангинальный компонент от прототипа триметазидина и ранолазина и антиаритмический компонент от ранолазина и антиаритмиков IV класса, например, верапамила [10]. Действительно, соединение АЛМ-802 имеет структурное сходство с молекулой верапамила, в которой имеется два 3,4-диметоксифенильных фармакофора, соединенных линейным линкером (рис. 4).

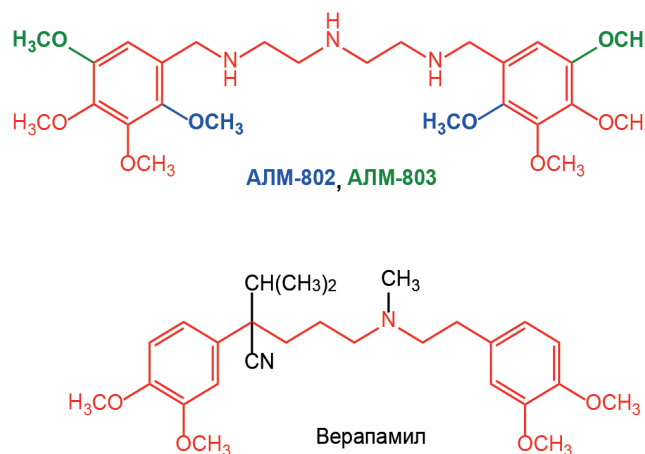


Рис. 4. Структурное сравнение соединений АЛМ-802 и АЛМ-803 с препаратом верапамил

Таблица 2

Антиишемическая и антиаритмическая активность соединений АЛМ802 и АЛМ-803 в дозе 1 мг/кг у беспородных белых крыс-самцов (внутривенное введение)

Соединение	Депрессия сегмента ST после 5 мин инфузии изопротеренола ^а , мВ	Антиаритмическая активность на модели аконитиновой аритмии ^б	Антиаритмическая активность на модели хлоридкальциевой аритмии ^б	Влияние на порог электрической фибрилляции желудочков сердца ^в
Контроль	0,20 ± 0,02 (n = 16)	0/11	0/11	—
АЛМ-802	0,01 ± 0,01 (n = 7) p = 0,001	8/8 p < 0,001	4/6 p = 0,008	2/>10 p = 0,018
АЛМ-803	0,17 ± 0,03 (n = 6) p = 0,999	неактивен	4/6 p = 0,008	2/>10 p = 0,018

Примечания: ^а — на ЭКГ во II стандартном отведении (20 мкг/кг/мин изопротеренола в/в в течение 5 минут). p — указано по отношению к контролю; ^б — В числителе указано количество выживших животных, в знаменателе — объем выборки. p — указано по отношению к контролю; ^в — числителе указан исходный уровень, в знаменателе — порог фибрилляции после введения вещества (показаны медианы) (в мА). p — указано по отношению к исходному уровню.

В молекуле АЛМ-803 сохраняется ключевой структурный компонент верапамила, однако в ней отсутствуют, вероятно, критические для наличия антиишемической активности орто-метокси группы, которые имеются как в триметазидине, так и в ранолазине. В результате АЛМ-803 проявляет антиаритмическую активность в моделях хлоридкальциевой аритмии и электрической фибрилляции, что характерно для антиаритмиков IV класса, к которым относится верапамил.

Выводы

Синтезировано новое соединение АЛМ-803 (тригидрохлорид N¹—(3,4,5-триметоксибензил)-N²—{2-[(3,4,5-триметоксибензил)амино]-этил}-1,2-

этандиамина) — аналог АЛМ-802, отличающийся от него положением метокси-групп в фенильных кольцах. Установлено, что это структурное изменение приводит к исчезновению антиишемической активности и антиаритмической активности на модели аконитиновой аритмии у крыс, но при этом антиаритмическая активность на моделях хлоридкальциевой аритмии и электрической фибрилляции желудочков сердца крыс сохраняется (1 мг/кг, внутривенно). Сделано предположение о том, что наблюдаемое изменение спектра кардиотропной активности при переходе от АЛМ-802 к АЛМ-803 обусловлено критичностью наличия орто-метокси групп для антиишемической активности веществ и присутствием ключевого структурного компонента антиаритмика IV класса верапамила в обеих молекулах.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мокров Григорий Владимирович
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: g.mokrov@gmail.com
 ORCID ID: 0000-0003-2617-0334
 SPIN-код: 8755-7666
 к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Лихошерстов Аркадий Михайлович
 ORCID ID: 0000-0001-5935-5146
 SPIN-код: 1980-7331
 к. х. н., консультант отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Барчуков Владимир Валерьевич
 ORCID ID: 0000-0003-4229-3107
 SPIN-код: 6743-4280
 н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Столярук Валерий Николаевич
 ORCID ID: 0000-0002-4779-427X
 SPIN-код: 3405-8229
 к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Цорин Иосиф Борисович
 ORCID ID: 0000-0002-3988-7724
 SPIN-код: 4015-3025
 д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Mokrov Grigory
Corresponding author
 e-mail: g.mokrov@gmail.com
 ORCID ID: 0000-0003-2617-0334
 SPIN-code: 8755-7666
 Candidate of Chemical Sciences, leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Likhosherstov Arkady
 ORCID ID: 0000-0001-5935-5146
 SPIN-code: 1980-7331
 PhD, consultant of drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Barchukov Vladimir
 ORCID ID: 0000-0003-4229-3107
 SPIN-code: 6743-4280
 Research scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Stolyaruk Valeriy
 ORCID ID: 0000-0002-4779-427X
 SPIN-code: 3405-8229
 PhD, senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Tsorin Iosif
 ORCID ID: 0000-0002-3988-7724
 SPIN-code: 4015-3025
 Doctor of biological sciences, leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Вититнова Марина Борисовна

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN-код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Vititnova Marina**

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN-code: 1901-8919

PhD, Senior researcher scientist of laboratory of
pharmacological screening FSBI «Zakusov Insti-
tute of Pharmacology», Moscow**Крыжановский Сергей Александрович**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., Заведующий лабораторией
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Kryzhanovskii Sergey**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-code: 6596-4865

Doctor of medical sciences, Head of laboratory of
pharmacological screening FSBI «Zakusov Insti-
tute of Pharmacology», Moscow**Гудашева Татьяна Александровна**

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN-код: 4970-0006

д. б. н., профессор, член-корреспондент РАН,
Руководитель отдела химии лекарственных
средств ФГБНУ «Научно-исследовательский
институт фармакологии имени В.В. Закусова»,
Москва**Gudasheva Tatiana**

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN-code: 4970-0006

doctor of biological Sciences, professor, RAS cor-
responding member Head of medicinal chemistry
department FSBI «Zakusov institute of Pharma-
cology», Moscow**Литература / References**

1. Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res.* 2000;86(5):580–588. DOI: 10.1161/01.RES.86.5.580
2. Aldakkak M, Camara AK, Heisner JS, et al. Ranolazine reduces Ca²⁺ overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res.* 2011;64(4):381–392. DOI: 10.1016/j.phrs.2011.06.018
3. Fragasso G, Salerno A, Spoladore R, et al. Effects of metabolic approach in diabetic patients with coronary artery disease. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(8):857–862. DOI: 10.2174/138161209787582093
4. Hu B, Li W, Xu T, et al. Evaluation of trimetazidine in angina pectoris by echocardiography and radionuclide angiography: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin. Cardiol.* 2011;34(6):395–400. DOI: 10.1002/clc.20888
5. Zhang L, Lu Y, Jiang H, et al. Additional use of trimetazidine in patients with chronic heart failure: a meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012;59(10):913–922. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.11.027

6. Vizzardi E, D'Aloia A, Quinzani F, et al. A focus on antiarrhythmic properties of ranolazine. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2012;17(4):353–356. DOI: 10.1177/1074248412442000
7. Yamamoto S, Matsui K, Sasabe M, Ohashi N. Effect of an orally active Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, SMP-300, on experimental angina and myocardial infarction models in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002;39(2):234–241. DOI: 10.1097/00005344-200202000-00010
8. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. — М.: — Гриф и К. 2013. [Mironov AN. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Part 1. Moscow. Grif i K. 2013. (In Russ).]
9. Илюшкина И.А., Берчатова А.Н., Дьяченко И.А. и др. Модели оценки новых противоаритмических препаратов // *Биомедицина.* — 2012. — № 2. — С. 6–13. [Ilushkina IA, Berchatova AN, Dyachenko IA, et al. Model evaluation of new antiarrhythmic drugs. *Biomedicina*, 2012;2:6–13. (In Russ).]
10. Харкевич Д.А. *Фармакология.* — М.: ГЭОТАР-МЕД, 2004. [Kharkevich DA. *Farmakologiya.* — М.: GEOTAR-MED, 2004. (In Russ).]

Влияние мексидола на физическую и умственную работоспособность при стрессогенных воздействиях в эксперименте

Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А.

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

Резюме. Изучено влияния мексидола на физическую работоспособность мышей в экстремальных условиях теста «Плавание с грузом» и на умственную работоспособность крыс в условиях невротического состояния, вызванного функциональным нарушением сформированного инструментального оборонительного рефлекса активного избегания. Показана способность мексидола как при однократном (50 и 100 мг/кг), так и при субхроническом внутрибрюшинном введении (100 мг/кг) увеличивать физическую работоспособность мышей, сопоставимую по эффективности с милдронатом (100 мг/кг). Установлена способность мексидола улучшать скорость формирования условных реакций, сохранение памятного следа и его восстановление при однократных и повторных функциональных нарушениях условного рефлекса активного избегания, не отличающаяся по эффективности действия от препарата сравнения пирacetama (300 мг/кг).

Ключевые слова: работоспособность; обучение; память; функциональные нарушения

Для цитирования:

Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А. Влияние мексидола на физическую и умственную работоспособность при стрессогенных воздействиях в эксперименте // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019 – № 1. – С. 12–17. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10034.

Effect of mexidol on physical and mental performance under stressogenic conditions in experiment

Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The effect of Mexidol on physical performance of mice under the extreme conditions of the weight-loaded forced swim test and on the mental performance of rats under the conditions of a neurosis-like state caused by a functional disturbance of a defensive instrumental conditioned active avoidance reflex was studied. A single dose (50 and 100 mg/kg) or a subchronic regimen (100 mg/kg) of Mexidol administered intraperitoneally enhances the physical performance of mice similarly to mildronate (100 mg/kg). Mexidol improves the rate of operant conditioning, the preservation of the memory trace and its restoration after single or multiple instances of disruption of the conditioned active avoidance reflex, and its effect does not differ from the effect of the comparison drug piracetam (300 mg/kg).

Keywords: performance; learning; memory; functional disturbance

For citations:

Kapitsa IG, Ivanova EA, Voronina TA. Effect of mexidol on physical and mental performance under stressogenic conditions in experiment. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:12–17. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10034.

Современные реалии сталкивают человека с необходимостью адаптироваться к возросшим нагрузкам на психику, связанным с экономической и политической нестабильностью, социальными проблемами, а также техногенными и экологическими факторами, которые в своей совокупности приводят к развитию городского стресса, сопровождающегося усталостью, раздражительностью, напряжением и даже немотивированной ненавистью и агрессией [1]. Под воздействием экстремальных факторов среды в организме могут происходить физиологические сдвиги и сопутствующие и/или предшествующие им различной степени выраженности сдвиги в психике, в картине проявлений которых общим является своеобразная «блокада» познавательных процессов, в результате чего сужается объем восприятия, нарушаются процессы синтеза в мышлении, дезорганизуется целенаправленное поведение [2]. В связи с этим поиск, разработка и применение препаратов, повышающих стрессоустойчивость, сопротивляемость к воздействию патогенных факторов и работоспособность, активи-

зирующих умственную деятельность, способность к концентрации внимания и обучению, обладающих минимальными побочными эффектами, является актуальной задачей фармакологии.

Отечественный препарат мексидол (2-этил-6-метил-3-оксипиридин сукцинат) обладает ярко выраженным антиоксидантным, антигипоксическим и мембранотропным действием [3–5]. Мексидол повышает резистентность организма к широкому спектру различных экстремальных факторов, таких как конфликтные ситуации, гипоксия, лишение сна, электрошок, физические и умственные нагрузки, снимает токсическое воздействие этилового спирта и интоксикацию лекарственными препаратами, устраняет нарушения кровообращения в мозге. Кроме того, мексидол предупреждает и устраняет нарушения поведения при новизне обстановки, при страхе открытых приподнятых пространств, а также оказывает лечебное действие при ишемии и травме, в том числе головного мозга, болевом синдроме [5]. Мексидол стимулирует репаративные процессы, а также обладает

гепатозащитными свойствами. Наряду с этим препарат практически не обладает побочными эффектами традиционных нейropsychотропных препаратов [3–5].

Цель исследования — изучение влияния мексидола на физическую работоспособность мышей в экстремальных условиях теста «Плавание с грузом» и на умственную работоспособность крыс в условиях неврозоподобного состояния, вызванного нарушением ранее сформированного инструментального оборонительного рефлекса активного избегания.

Материалы и методы исследования

Эксперименты проводили на самцах аутбредных белых половозрелых мышей массой 22–25 г и белых аутбредных крыс массой 250–280 г без соматической и инфекционной патологии. Животные были получены из питомника ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Содержание животных и выполнение работы осуществлялись в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51, Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года.

Изучение влияния мексидола на физическую работоспособность у мышей проводили при их однократном и субхроническом введении (5 дней). Экспериментальные группы (по 9–12 животных в каждой) были сформированы методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака (разброс по исходной массе между и внутри групп не превышал $\pm 10\%$). Мексидол вводили внутривентриально в дозах 50 и 100 мг/кг, препарат сравнения милдронат — в дозе 100 мг/кг. Контрольные животные получали физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,1 мл на 10 г веса тела). Последняя инъекция препаратов осуществлялась за 40 минут до тестирования.

Для оценки влияния вещества на физическую работоспособность использовали тест плавания с дополнительной нагрузкой у мышей [6]. Данная методика для сухопутных животных, к которым относятся мыши, является тестированием физической выносливости в условиях стресса, т. е. в условиях, позволяющих максимально проявить незначительные нарушения функционирования органов и систем (стрессорные и гипоксические воздействия различной природы, при нарушениях функционирования ЦНС и в других случаях).

Животное помещали в сосуд (18 см в диаметре и высотой не менее 40 см) с предварительно отстоянной водой температурой 25–26 °С. Животные плавали с грузом массой 8 % веса тела, прикрепляемым к корню

хвоста до утомления, показателем которого являлось нахождение его под водой свыше 10 секунд.

Изучение влияния мексидола на умственную работоспособность крыс проводили при его субхроническом введении за 40 минут до каждого тестирования. В каждой группе было по 10 животных. Мексидол вводили внутривентриально в дозе 100 мг/кг, препарат сравнения пираретам — в дозе 300 мг/кг. Контрольные животные получали физиологический раствор в эквивалентном объеме (0,2 мл на 100 г веса тела).

Выработку условного оборонительного рефлекса активного избегания (УРАИ) у крыс [6] проводили в челночной камере фирмы «Ugo Basile» (Италия), разделенной перегородкой с отверстием на два одинаковых отделения размером 19×21×22 см, с электрифицированным решетчатым полом. Процедура выработки УРАИ: крыса после посадки в установку в течение 10 секунд подвергалась изолированному действию условного раздражителя (звук 700 Гц), к которому на 10 следующих секунд подключали безусловный раздражитель — электрический ток силой 0,5–0,6 мА. Переход животного в другую половину камеры на фоне предъявления тока со звуком (реакция избегания) или звука (реакция избегания) отключает раздражители. Если животное переходит в продолжение звукового сигнала, то ток не предъявляют, а звук прекращается. Каждый опыт состоял из 25 предъявлений с 30 секундным межсигнальным периодом. Опыты проводили ежедневно в течение 5 дней до формирования устойчивого рефлекса, который оценивали по критерию обученности (более 80 % реакций избегания от числа предъявлений).

В эксперименте специальными приемами удаётся вызывать в коре головного мозга стойкие функциональные расстройства нормальных соотношений процессов возбуждения и торможения, их силы, подвижности и уравновешенности, а также их перенапряжения или столкновения между собой во времени или в пространстве («сшибки»). Возникающие при этом нарушения высшей нервной деятельности — экспериментальные неврозы, которые являются биологическими моделями невротических состояний, наблюдаемых в клинике. Нарушение соотношения основных нервных процессов в данной работе достигалось изменением ставшего привычным для животных порядка в системе сформированного условного рефлекса — изменение динамического стереотипа («сшибка»), под которым понимают зафиксированную последовательность процессов в коре головного мозга.

В работе использованы два приема функциональных нарушений (ФН) УРАИ. Первый — «сбой» УРАИ заключался в том, что после достижения животными критерия обученности (выполнение более 80 % реакций избегания) переход крысы в другую половину камеры переставал приводить к отключению раздражителей, что повторялось на протяжении 5 переходов. Таким образом животное подвергалось экстремному

неизбегаемому воздействию электрического тока [7]. После последнего перехода ток выключали немедленно, а звук — спустя 2 секунды. Сразу после процедуры «сбоя» тестировали уровень воспроизведения условных реакций в стандартных условиях (20 предъявлений). Второй приём моделирования ФН УРАИ заключался в перемене местоположения отверстия (ПМПО), т. е. отверстие, через которое животное переходило в другую половину камеры во время обучения, закрывали и открывали в противоположной стороне перегородки [8]. Сразу после этого в течение 20 предъявлений проводили тестирование УРАИ в изменённых условиях.

Ввиду того, что воздействия, приводящие к нарушению когнитивной и эмоциональной сферы, часто являются не изолированными и могут иметь повторный характер, изучение влияния нейрорепрограммирующих средств проводили в условиях повторных ФН. С целью создания условий для проведения повторного функционального воздействия спустя двое суток после ФН проводилось восстановление УРАИ до достижения животными критерия обученности. При этом меняли характер ФН: животным, подвергшимся при первом ФН «сбою» УРАИ, предъявляли другое ФН — ПМПО, и наоборот.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью статистического пакета «BioStat» для Windows. Рассчитывали средние показатели и стандартную ошибку среднего ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$). Достоверность различий рассчитывали, используя непараметрический анализ для независимых переменных (U-тест Манна-Уитни) и зависимых переменных (W-критерий Уилкоксона).

Результаты

Однократное и субхроническое (в течение 5 дней) введение мексидола приводило к повышению физической работоспособности животных в тесте «Плавание с грузом» (табл. 1). Так, средняя длительность плавания мышей с грузом, однократно получавших мексидол в дозе 50 мг/кг и 100 мг/кг, была на 50,3 и 81,0 % больше, соответственно, чем в контрольной группе. Введение мексидола на протяжении 5 дней в дозе 100 мг/кг приводило к увеличению длительности

Таблица 1

Влияние мексидола на длительность плавания мышей с грузом ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$)

Группа, вещество, доза количество животных	Длительность плавания с нагрузкой, с	
	однократное введение	субхроническое введение
Контроль, физ. р-р. $n = 11$	429,5 $\pm$ 59,0	464,3 $\pm$ 71,3
Мексидол 50 мг/кг, $n = 10$	645,6 $\pm$ 64,0*	—
Мексидол 100 мг/кг, $n = 11$	777,4 $\pm$ 95,6*	873,5 $\pm$ 146,6*
Милдронат 100 мг/кг, $n = 12$	744,5 $\pm$ 112,7*	775,3 $\pm$ 89,2*
Примечание: * — $p < 0,05$, достоверность различий относительно значений контрольной группы.		

плавания животных на 88,1 % ($p < 0,05$) по сравнению с группой контрольных мышей (см. табл. 1). При этом по выраженности эффекта на физическую работоспособность мышей мексидол при однократном введении в дозе 50 мг/кг и 100 мг/кг, а также при субхроническом введении оказывал сходный эффект с милдронатом в дозе 100 мг/кг.

Анализ динамики формирования УРАИ на фоне введения мексидола в дозе 100 мг/кг выявил его активирующее влияние на обучение. Подобно пираретаму (300 мг/кг) мексидол обеспечил превышение условных реакций (реакций избегания) по сравнению с контролем в первые три дня обучения (табл. 2). На 5-й день обучения животные всех групп достигли уровня критерия обученности УРАИ, и ФН проводились в исходно одинаковых условиях.

ФН — «сбой» УРАИ вызвал резкое нарушение сформированного навыка в контрольной группе животных, приводя к драматическому снижению числа условных реакций (табл. 3). На фоне мексидола уровень сохранения памятного следа после травмирующего воздействия оставался на более высоком уровне, чем в контроле. Так, в первом после ФН блоке из 5 предъявлений стимулов у крыс, которым вводили мексидол, число реакций избегания в 2,2 раза превышало показатели контрольной группы ($p < 0,05$). Положительное

Таблица 2

Влияние мексидола на динамику формирования УРАИ ($\text{Mean} \pm \text{SEM}$)

Препарат, доза, число животных	Реакции избегания, %				
	1-й день	2-й день	3-й день	4-й день	5-й день
Контроль, физ. р-р, $n = 8$	6,4 $\pm$ 2,2	16,0 $\pm$ 2,0	32,4 $\pm$ 3,1	60,0 $\pm$ 4,4	84,8 $\pm$ 1,9
Мексидол, 100 мг/кг, $n = 8$	10,8 $\pm$ 1,7	22,8 $\pm$ 2,4*	40,2 $\pm$ 2,9 ($p = 0,087$)	61,6 $\pm$ 5,5	86,4 $\pm$ 2,4
Пирацетам, 300 мг/кг, $n = 8$	12,3 $\pm$ 2,4 ($p = 0,09$)	27,0 $\pm$ 5,4*	48,8 $\pm$ 8,4 ($p = 0,088$)	69,6 $\pm$ 8,2	87,4 $\pm$ 2,2
Примечание: * — $p < 0,05$, достоверность различий относительно значений контрольной группы.					

влияние мексидола на воспроизведение навыка также отмечалось во 2-м, 3-м и 4-м блоках предъявлений стимулов, превышая контрольные показатели в 1,4; 1,3 и 1,2 раза соответственно (табл. 3). При этом различий между соответствующими показателями воспроизведения навыка после однократного ФН — «сбоя реакции избегания» в группах животных, получавших мексидол и пирацетам, не было (см. табл. 3).

ФН — ПМПО привела к ещё более глубокому нарушению УРАИ, чем «сбой», что проявилось в уменьшении до 12 % числа условных реакций контрольных животных в первом блоке предъявлений стимулов (табл. 3). На фоне введения мексидола уровень воспроизведения условно-рефлекторных реакций сразу после пространственной переделки был в 4 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). В последующих блоках предъявления стимулов: 2-м, 3-м и 4-м число условных реакций животных на фоне препарата превышало контрольные значения в 1,6; 1,4 и 1,3 раза соответственно (табл. 3). Введение пирацетама предотвратило нарушение ПМПО выработанного навыка, что выразилось в превышении числа условных реакций в первом блоке предъявления стимулов

сразу после стрессорного воздействия в 6,3 и 1,6 раза соответственно, относительно значений контрольной группы и группы, получавшей мексидол (см. табл. 3). В последующих блоках предъявления стимулов различий между группами «Мексидол» и «Пирацетам» не наблюдалось (см. табл. 3).

Ранее было показано, что при сбое эффективны как анксиолитики, так и ноотропы [9], а при пространственной переделке — только ноотропы [10]. Мексидол как соединение, сочетающее в спектре своей фармакологической активности анксиолитические и ноотропные свойства, оказывает корректирующее действие на оба ФН, вызванные изменением ставшего привычным для животных порядка в системе сформированного условного рефлекса — «сбоем» и ПМПО.

Повторные ФН УРАИ привели к резкому снижению условных реакций у контрольных животных (табл. 3). Мексидол снизил нарушение, вызванное повторным ФН: ПМПО — число реакций избегания в первом блоке предъявления стимулов было в 2,8 раза выше, чем в контрольной группе ($p < 0,05$). Превышение условных реакций под влиянием мексидола относительно контроля наблюдалось и в ходе даль-

Таблица 3

Влияние мексидола на сохранение памятного следа и его восстановление после проведения однократного и повторного функционального нарушения УРАИ (Mean $\pm$ SEM)

Препарат, доза, число животных	Реакции избегания, %					
	Блоки предъявления стимулов при воспроизведении УРАИ сразу после ФН (по 5 предъявлений в каждом блоке)				Предъявление стимулов при восстановлении УРАИ через 2 дня после ФН	
	1	2	3	4	1 предъявление	Все (25)
<i>ФН1 — «сбой»</i>						
Контроль, физ.р-р, $n = 8$	20,0 $\pm$ 7,2	48,0 $\pm$ 6,2	60,0 $\pm$ 4,7	75,2 $\pm$ 3,8	20,0 $\pm$ 19,6&	76,0 $\pm$ 4,9
Мексидол, 100 мг/кг, $n = 8$	43,2 $\pm$ 5,3*	65,3 $\pm$ 4,8*	76,0 $\pm$ 4,6*	88,6 $\pm$ 2,4*	100*	88,0 $\pm$ 5,5
Пирацетам, 300 мг/кг, $n = 8$	66,1 $\pm$ 8,4*	73,3 $\pm$ 5,7*	87,0 $\pm$ 6,6*	93,2 $\pm$ 4,3*	83,3 $\pm$ 17,5*	91,3 $\pm$ 4,2*
<i>ФН1 — пространственная переделка навыка</i>						
Контроль, физ.р-р, $n = 8$	12,3 $\pm$ 4,9	36,2 $\pm$ 6,9	51,5 $\pm$ 11,2	68,5 $\pm$ 5,5	0&	71,2 $\pm$ 3,0
Мексидол, 100 мг/кг, $n = 8$	48,0 $\pm$ 4,9*#	56,5 $\pm$ 6,2*	72,0 $\pm$ 5,7	88,4 $\pm$ 4,7*	100*	90,4 $\pm$ 4,0*
Пирацетам, 300 мг/кг, $n = 8$	77,8 $\pm$ 8,5*	83,0 $\pm$ 14,4*	89,2 $\pm$ 8,9*	97,4 $\pm$ 3,1*	60,0 $\pm$ 24,4*	90,4 $\pm$ 3,1*
<i>ФН2 — пространственная переделка навыка после ФН1: «сбой»</i>						
Контроль, физ.р-р, $n = 8$	16,0 $\pm$ 7,5	40,0 $\pm$ 6,9	56,0 $\pm$ 7,5	72,0 $\pm$ 4,9	20,0 $\pm$ 19,6&	74,4 $\pm$ 2,5
Мексидол, 100 мг/кг, $n = 8$	44,0 $\pm$ 9,7*	48,0 $\pm$ 4,9	76,0 $\pm$ 7,2 $P = 0,075$	92,0 $\pm$ 4,9*	80,0 $\pm$ 20,2*	91,2 $\pm$ 5,2*
Пирацетам, 300 мг/кг, $n = 8$	73,3 $\pm$ 9,8*	83,3 $\pm$ 3,3*	90,0 $\pm$ 4,5*	96,7 $\pm$ 3,3*	100*	93,3 $\pm$ 2,5*
<i>ФН2 — «сбой» после ФН1: пространственная переделка навыка</i>						
Контроль, физ.р-р, $n = 8$	24,0 $\pm$ 10,5	52,0 $\pm$ 7,6	72,0 $\pm$ 4,9	80,0 $\pm$ 6,3	40,0 $\pm$ 24,2&	82,4 $\pm$ 3,1
Мексидол, 100 мг/кг, $n = 8$	36,0 $\pm$ 7,5	60,0 $\pm$ 8,9	76,0 $\pm$ 7,5	88,0 $\pm$ 4,9	100*	89,6 $\pm$ 5,3
Пирацетам, 300 мг/кг, $n = 8$	52,0 $\pm$ 6,0*	80,0 $\pm$ 6,3*	88,0 $\pm$ 4,9*	96,0 $\pm$ 4,0*	80,0 $\pm$ 14,7*	92,0 $\pm$ 2,3*
Примечания: * — $p < 0,05$, достоверность различий относительно контрольной группы; # — $p < 0,05$, достоверность различий относительно группы «Пирацетам»; & — $p < 0,05$, достоверность различий относительно значения в последнем блоке подачи стимулов сразу после ФН (критерий Уилкоксона).						

нейшей процедуры воспроизведения навыка. Однако в условиях повторного ФН УРАИ — «сбоя» мексидол был не эффективен, при этом различий по уровню воспроизведения условных реакций после повторного ФН между группами животных, получавших мексидол и пирацетам, не обнаружено (см. табл. 3).

Спустя два дня после каждого ФН проводилось восстановление нарушенного навыка до исходного уровня обученности. У контрольных животных наблюдалось драматическое снижение условных реакций при первом предъявлении стимулов относительно значений, зафиксированных при тестировании УРАИ непосредственного после нанесения ФН (см. табл. 3). Мексидол устранил отдаленные последствия нарушений УРАИ, вызванные «сбоем» и ПМПО, как при однократных, так и при повторных ФН. Показано, что на фоне препарата уровень воспроизведения условных реакций в первом предъявлении восстановительного периода был равен 80–100 %, тогда как в контроле этот показатель был значительно ниже (см. табл. 3).

Пирацетам также сгладил разрушающее влияние отдаленных последствий ФН на сохранение и воспроизведение памятного следа: на его фоне число условных реакций при первом предъявлении стимулов было незначительно ниже или равно уровню реакций

избегания, зарегистрированных при тестировании сохранности навыка сразу после нанесенного ФН (последний блок предъявлений) (см. табл. 3).

Таким образом, оценка влияния мексидола на физическую работоспособность мышей в тесте плавания с нагрузкой выявила его способность улучшать физическую выносливость животных как при однократном (доза 50 мг/кг и 100 мг/кг), так и при субхроническом введении (доза 100 мг/кг) и не отличаться по эффективности от милдроната (100 мг/кг).

Анализ влияния мексидола на умственную работоспособность крыс в условиях стрессогенного воздействия однократных и повторных ФН сформированного устойчивого паттерна условно-рефлекторных реакций выявил способность препарата ослаблять негативные последствия этих нарушений и улучшать воспроизведение навыка, как это характерно для классического ноотропа пирацетама.

Таким образом, полученные в ходе настоящего исследования данные показали, что мексидол благодаря своему поликомпонентному механизму действия является одним из лекарственных препаратов, который может рассматриваться в качестве сбалансированного стресспротективного средства, позволяющего повысить качество жизни и способствующего улучшению физической и умственной работоспособности.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Капица Инга Геннадиевна

Автор, ответственный за переписку

E-mail: ingakap73@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-4487-0991

SPIN-код: 7339-8634

к. б. н., ст. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kapitsa Inga

Corresponding author

E-mail: ingakap73@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-4487-0991

SPIN-code: 7339-8634

Candidate of Biological Sciences, senior researcher scientist of psychopharmacology department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Иванова Елена Анатольевна

ORCID: 0000-0003-4961-2051

SPIN-код: 5005-0337

к. фарм. н., ст. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Ivanova Elena

ORCID: 0000-0002-2659-7998

SPIN-code: 1375-1114

Candidate of Chemical Sciences, Senior researcher in of Institute of Pharmacoinformatics at the Department of Intellectual Systems FRC CSC RAS, Moscow

Воронина Татьяна Александровна

ORCID: 0000-0002-0200-5097

SPIN-код: 5766-3452

д. м. н., профессор, руководитель лаборатории психофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Voronina Tatiana

ORCID: 0000-0002-0200-5097

SPIN-code: 5766-3452

MD, professor, Head of psychopharmacology department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Барковская А.Ю., Назарова М.П. Стресс-факторы в социокультурном пространстве современного большого города // *Известия ВолгГТУ*. — 2014. — Т. 16. — № 5. — С. 37–42. [Barkovskaya AYU, Nazarova MP. Stress-factory v sociokul'turnom prostranstve sovremennogo bol'shogo goroda. *Izvestiya VolgGTU*. 2014;16(5):37–42. (In Russ).]
2. Зайцев Г.С. Экстремальные условия деятельности: понятие, содержание, классификации // *Вестник КРСУ*. — 2014. — Т. 4. — № 10. — С. 25–29. [Zaytsev GS. Extreme conditions of professional activity: concept, content and classification. 2014;4(10):25–29. (In Russ).]
3. Воронина Т.А. Антмоксидант мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // *Психофармакол. Биол. Наркол.* — 2001. — Т. 1. — № 1. — С. 2–12. [Voronina TA. Antioxidant Mexidol. The basic neuropsychotropic effects and mechanism of action. *Psychopharmakol. Biol. Narkol*. 2001;1(1):2–12. (In Russ).]
4. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия // *Фарматека*. — 2009. — № 6. — С. 28–31. [Voronina TA. Mexidol: osnovnye nejropsihotropnye efekty i mekhanizm dejstviya. *Farmateka*. 2009;(6):28–31. (In Russ).]
5. Воронина Т.А. Мексидол: спектр фармакологических эффектов // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. — 2012. — Т. 112. — № 12. — С. 86–90. [Voronina TA. Mexidol: the spectrum of pharmacological effects. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2009;(6):28–31. (In Russ).]
6. Воронина Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия. В кн.: *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*. — М.: Гриф и К; 2012. [Voronina TA, Ostrovskaya RU, Garibova TL. Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniyu lekarstvennyh sredstv s nootropnym tipom dejstviya. V kn.: *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv*. Moscow; Grif i K; 2012. (In Russ).]
7. Иноземцев А.Н., Кокаева Ф.Ф. Особенности функционального обратимого «сбоя» реакции избегания у крыс // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова*. — 1990. — № 4. — С. 386–888. [Inozemtsev AN, Kokaeva FF. Osobennosti funktsional'nogo obratimogo «sboya» reakcii izbeganiya u kryс. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I.P. Pavlova*. 1990;4: 386–888. (In Russ).]
8. Иноземцев А.Н., Прагина Л.Л. Методические приемы стрессогенных воздействий для исследования ноотропных влияний на обучение и память // *Вестн. Моск. Ун-та. Сер. 16. Биология*. — 1992. — № 4. — С. 23–31. [Inozemtsev AN, Praguina LL. Stress actions as experimental model for investigation of nootropic influence on avoidance learning. *Vestn. Mosk. Un-ta. Ser. 16. Biologiya*. 1992;4:23–31. (In Russ).]
9. Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б., Воронина Т.А., Тушмалова Н.А. Сопоставление влияния транквилизаторов и ноотропов на выработку и функциональное нарушение реакции избегания // *Бюл. эксп. биол. и мед.* — 1996. — Т. 122. — № 8. — С. 152–155. [Inozemtsev AN, Bokieva SB, Voronina TA, Tushmalova NA. Sopotavlenie vliyaniya trankvilizatorov i nootropov na vyработку i funktsional'noe narushenie reakcii izbeganiya. *Byul. eksp. biol. i med.* 1996;122(8):152–155. (In Russ).]
10. Иноземцев А.Н., Воронина Т.А., Прагина Л.Л., Крутикова И.А., Тушмалова Н.А. Различия в эффектах пиретама и феназепам при эмоциональном напряжении, вызываемом пространственной переделкой навыка // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 1996. — Т. 59. — № 6. — С. 3–5. [Inozemtsev AN, Voronina TA, Pragina LL, Krutikova IA, Tushmalova NA. Razlichiya v effektah piracetama i fenazepam pri emotsional'nom napryazhenii, vyzyvayemom prostranstvennoy peredelkoj navyka. *Éksperimentalnaya i klinicheskaya Farmakologiya*. 1996;59(6):3–5. (In Russ).]

Исследование протекторных свойств агониста TrkA-рецептора ГК-2 на модели окислительного стресса в культуре клеток сосуда эндотелия человека (HUVEC)

Антипова Т.А., Николаев С.В., Крыжановский С.А., Пекельдина Е.С.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Окислительный стресс приводил к достоверному снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем (78 ± 5 % и 100 ± 6 % соответственно, $p \leq 0,05$). Внесение как ГК-2, так и NGF предотвращало снижение жизнеспособности клеток HUVEC под действием H_2O_2 (95 ± 3 % для ГК-2 и 97 ± 4 % для NGF против 78 ± 5 % для H_2O_2 , $p \leq 0,05$). В контроле количество клеток с конденсированным хроматином составило 9 ± 2 , после внесения H_2O_2 78 ± 9 ($p \leq 0,05$ по сравнению с контролем). Внесение NGF или ГК-2 после H_2O_2 достоверно снижало число таких клеток (44 ± 9 и 41 ± 8 соответственно) ($p \leq 0,05$ по сравнению с перекисью водорода) и препятствовало развитию морфологических изменений ядерного хроматина. Таким образом, ГК-2, подобно NGF, в культуре клеток эндотелия человека HUVEC препятствует развитию процесса апоптоза, вызванного окислительным стрессом.

Ключевые слова: NGF; димерный дипептидный миметик ГК-2; HUVEC клетки эндотелия человека; окислительный стресс; апоптоз

Для цитирования:

Антипова Т.А., Николаев С.В., Крыжановский С.А., Пекельдина Е.С. Исследование протекторных свойств агониста TrkA-рецептора ГК-2 на модели окислительного стресса в культуре клеток сосуда эндотелия человека (HUVEC) // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 1. – С. 18–21. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10035.

Research of neuroprotective properties of TrkA-receptor agonist GK-2 on model of oxidative stress in human vascular endothelial cells (HUVEC)

Antipova T.A., Nikolaev S.V., Kryzhanovsky S.A., Pekeldina E.S.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Oxidative stress resulted to decrease in cells viability compared to the control (78 ± 5 % and 100 ± 6 %, respectively, $p \leq 0,05$). GK-2 and NGF prevented H_2O_2 -induced HUVEC cells damages (95 ± 3 % for HA-2 and 97 ± 4 % for NGF vs. 78 ± 5 % for H_2O_2 , $p \leq 0,05$). In control the number of cells with condensed chromatin was 9 ± 2 , after the addition of H_2O_2 78 ± 9 ($p \leq 0,05$ compared with the control). The addition of NGF or GK-2 after H_2O_2 significantly reduced the number of such cells (44 ± 9 and 41 ± 8 , respectively) ($p \leq 0,05$ compared to hydrogen peroxide) and prevented the development of morphological changes in nuclear chromatin. Thus GK-2, like NGF, in human endothelial cell culture HUVEC prevented the apoptosis development caused by hydrogen peroxide.

Keywords: NGF; dimeric dipeptide mimetic GK-2; HUVEC; oxidative stress; apoptosis

For citations:

Antipova TA, Nikolaev SV, Kryzhanovsky SA, Pekeldina ES. Research of neuroprotective properties of TrkA-receptor agonist GK-2 on model of oxidative stress in human vascular endothelial cells (HUVEC). *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:18–21. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10035.

Введение

Хронические ишемические состояния, в том числе ишемическая болезнь сердца и хроническая ишемия нижних конечностей лидируют в структуре летальности и инвалидизации. Одним из возможных подходов к лечению этих состояний является использование биоподобных фармакологических агентов, способных посредством стимуляции ангиогенеза обеспечить адекватное кровоснабжение ишемизированных тканей. Такое направление терапии получило название терапевтический ангиогенез или биологическое шунтирование [1]. Наиболее перспективным в этом направлении представляется разработка и внедрение в клиническую практику экзогенных аналогов эндогенных факторов роста [2]. Известно, что фактор роста нервов (NGF) помимо центральной нервной системы синтезируется и экскретируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, а на их клеточной мембране имеются специфичные для NGF TrkA рецепторы, через которые реализуются его ангиогенные эффекты [3]. В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова синтезиро-

ван димерный дипептидный миметик 4 петли NGF – соединение ГК-2, обладающий свойствами агониста TrkA рецепторов [4]. Ранее нами в экспериментах, выполненных на культуре клеток эндотелия человека (HUVEC), было показано, что ГК-2 проявляет выраженную ангиогенную активность, соизмеримую с таковой у NGF [5].

Цель исследования

Целью настоящей работы было исследование ангиопротекторных свойств димерного дипептидного миметика 4-й петли NGF ГК-2 в условиях окислительного стресса на культуре клеток эндотелия человека – HUVEC.

Материалы и методы

Для экспериментов использовались реактивы: среда DMEM (HyClone), фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco), L-глутамин (ICN) HEPES (ICN), гепарин (Панфарма), желатин (БиолоТ), ECGF (Sigma Aldrich),

MTT (Sigma Aldrich), ДМСО (Panreac), PBS (Sigma Aldrich).

Эндотелиальные клетки пупочной вены человека HUVEC культивировали в среде ДЕМЕМ с добавлением 20мМ буфера HEPES, 5 ЕД/мл гепарина, 200 мкг/мл ECGF, 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (FBS) при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Клетки рассеивались в 96-луночные планшеты, покрытые желатином, с плотностью 5 тыс. клеток на лунку. Через 24 ч инкубации добавляли перекись водорода (H₂O₂) в конечной концентрации 200 мкМ. Спустя 24 ч культуральную среду, содержащую H₂O₂, заменяли на нормальную, вносили NGF в качестве положительно-го контроля в конечной концентрации 100 нг/мл (10⁻⁹М) и ГК-2 (10⁻⁶М). Затем NGF и ГК-2 вносили каждые 48 ч в течение 6 суток. Через 24 ч после последнего внесения оценивали жизнеспособность клеток и количество клеток с нарушенной структурой хроматина.

Жизнеспособность клеток измеряли с использованием МТТ-теста. По окончании эксперимента среду отбирали, добавляли 0,5 % раствор 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (MTT) в PBS, содержащем 0,9 мМ CaCl₂ и 0,5 мМ MgCl₂. Для растворения образующихся кристаллов формазана использовали ДМСО. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 600 нм [6]. Количество клеток с нарушенной структурой хроматина определяли после окрашивания ядерным красителем Хёхст 33258 (1 мкг/мл) в течение 30 мин. Клетки фотографировали при увеличении 200х с помощью микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Япония) при длине волны возбуждения 340–380 нм и длине волны испускания 435–485 нм. Подсчитывали количество клеток с измененной структурой хроматина в 5 полях зрения в каждой лунке (24 лунки в каждой экспериментальной группе).

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде $m \pm s.d.$ Данные считались достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для моделирования окислительного стресса использовали H₂O₂ (200 мкМ), которая согласно литературным данным стимулирует программируемую гибель клеток — апоптоз [7], сопровождающуюся рядом биохимических и морфологических изменений в клетке: конденсация хроматина, фрагментация ДНК, повышение проницаемости мембран, сжатие клетки.

Показано, что окислительный стресс приводил к достоверному снижению жизнеспособности клеток по сравнению с контролем (78 ± 5 и 100 ± 6 % соответственно, $p \leq 0,05$) (табл. 1).

NGF (10⁻⁹М) и ГК-2 (10⁻⁶М) в условиях окислительного стресса проявляли выраженную цитопро-

Таблица 1

Влияние ГК-2 на жизнеспособность клеток эндотелия человека (HUVEC) в условиях окислительного стресса (МТТ-тест) ($M \pm m$)

Группы ($n = 16$)	Жизнеспособность клеток (% от Контроля)
Контроль	100 ± 6
H ₂ O ₂ (200 мкМ)	78 ± 5 *
H ₂ O ₂ (200 мкМ) + NGF (10 ⁻⁹ М)	97 ± 4 ^
H ₂ O ₂ (200 мкМ) + ГК-2 (10 ⁻⁶ М)	95 ± 3 ^
Примечание: * — $p \leq 0,05$ от Контроля, ^ — $p \leq 0,05$ от H ₂ O ₂ (критерий Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну).	

текторную активность, предотвращая снижение жизнеспособности клеток HUVEC под действием H₂O₂ (95 ± 3 % для ГК-2 и 97 ± 4 % для NGF против 78 ± 5 % для H₂O₂, $p \leq 0,05$). Поскольку данная концентрация перекиси водорода вызывает, по литературным данным, повреждение хроматина ядра клетки, проводили окрашивание ядерным красителем Хёхст 33258.

В контроле количество клеток с конденсированным хроматином составило 9 ± 2 , после внесения H₂O₂ 78 ± 9 ($p \leq 0,05$ по сравнению с контролем). NGF или ГК-2 внесенные после H₂O₂ достоверно снижали число таких клеток (44 ± 9 и 41 ± 8 соответственно) ($p \leq 0,05$ по сравнению с перекисью водорода) и препятствовали развитию морфологических изменений ядерного хроматина (рис. 1а, 1б).

Таким образом, ГК-2, подобно NGF, в условиях окислительного стресса не только препятствует снижению жизнеспособности эндотелиальных клеток HUVEC, но и предотвращает повреждение ядерного хроматина.

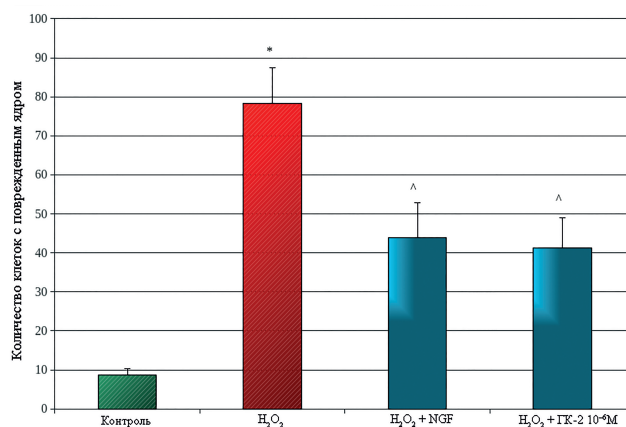


Рис. 1а. Влияние ГК-2 и NGF на повреждение ядер клеток эндотелия человека (HUVEC) в условиях окислительного стресса.

Примечания: Окрашивание ядерным красителем Хёхст 33258. Увеличение 200х. Достоверность отличий от Контроля — * $p \leq 0,05$, от H₂O₂ — ^ $p \leq 0,05$ по критерию Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну. Результаты подсчета.

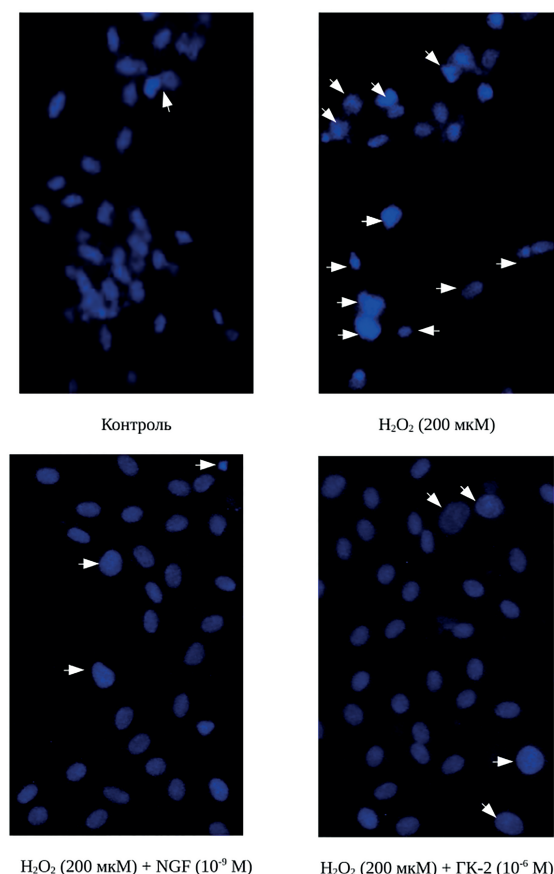


Рис. 16. Влияние ГК-2 и NGF на повреждение ядер клеток эндотелия человека (HUVEC) в условиях окислительного стресса.

Примечания: Окрашивание ядерным красителем Хёхст 33258. Увеличение 200х. Достоверность отличий от Контроля — * $p \leq 0,05$, от H_2O_2 — ^ $p \leq 0,05$ по критерию Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну. Оригинальные снимки.

Конденсация хроматина — это наиболее характерное проявление апоптоза. Хроматин конденсируется по периферии, под мембраной ядра, при этом обра-

зуются чётко очерченные плотные массы различной формы и размеров. Ядро может разрываться на два или несколько фрагментов. Механизм конденсации хроматина обусловлен расщеплением ядерной ДНК в местах, связывающих отдельные нуклеосомы, что приводит к развитию большого количества фрагментов. Ранее нами было показано, что внесение как ГК-2, так и NGF в культуру гиппокампальных клеток линии HT-22 приводило к синтезу белков HSP70 [8]. Хорошо известно, что увеличение содержания HSP70 приводит к возрастанию уровня антиапоптотических белков Bcl-2 и снижению проапоптотических Bax [9]. Кроме того, HSP70 блокирует вовлечение прокаспазы-9 в апоптосомы, а также саму каспазу-9 [10]. HSP70 может связываться с эндонуклеазой EndoG и блокировать транслокацию этого проапоптотического фактора в ядро [11]. Таким образом, антиапоптотическое действие ГК-2 может быть опосредовано его влиянием на синтез белков теплового шока HSP70, являющихся основным звеном защиты клеток от повреждений, в том числе вызванных окислительным стрессом.

Вывод

Димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF — соединение ГК-2, подобно NGF, в культуре клеток эндотелия человека HUVEC препятствует развитию процесса апоптоза, вызванного окислительным стрессом.

Участие авторов. Антипова Т.А. — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование и финальное утверждение рукописи. Николаев С.В. — выполнение экспериментальной работы, написание текста, подготовка иллюстраций. Крыжановский С.А. — написание текста, редактирование и финальное утверждение рукописи. Пекельдина Е.С. — выполнение экспериментальной работы, написание текста.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Николаев Сергей Владимирович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: sergej.nikolajev@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4584-746X
SPIN-код: 1144-0269
н. с. лаборатории фармакологии
нейропротекции ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва

Антипова Татьяна Алексеевна
ORCID: 0000-0002-9309-4872
SPIN-код: 7723-6008
к. б. н., заведующая лабораторией
фармакологии нейропротекции ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Nikolaev Sergey
Corresponding author
e-mail: sergej.nikolajev@gmail.com
ORCID: 0000-0003-4584-746X
SPIN-code: 1144-0269
researcher scientist of psychopharmacology department
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
Moscow

Antipova Tatyana
ORCID: 0000-0002-9309-4872
SPIN-code: 7723-6008
Candidate of Biological Sciences, head of the Laboratory of pharmacology of neuroprotection, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Крыжановский Сергей Александрович

ORCID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kryzhanovskii Sergey

ORCID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-code: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, head of the laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Пекельдина Евгения Сергеевна

SPIN-код: 3225-9216

н. с., лаборатория фармакологического скрининга, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Pekeldina Evgeniya

SPIN-code: 3225-9216

Research Officer, head of the laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы // *Кардиологический вестник*. — 2017. — Т. 2. — № 2(14). — С. 5–14. [Parfenova EV, Tkachuk VA. Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects. *Kardiologicheskij vestnik*. 2017;2(2(14)):5–15. (In Russ).]
2. Ko SH, Bandyk DF. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia. *Semin. Vasc. Surg.* 2014;27:1:23–31.
3. Blais M, L vesque P, Bellenfant S, Berthod F. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin-3 and glial-derived neurotrophic factor enhance angiogenesis in a tissue-engineered in vitro model. *Tissue Eng. Part A*. 2013;19(15–16):1655–1664.
4. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов // *ДАН*. — 2010. — Т. 434. — № 4. — С. 549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2010;434(4):549–552. (In Russ).]
5. Крыжановский С.А., Антипова Т.А., Цорин И.Б., и др. Ангиогенные эффекты димерного дипептидного миметика четвертой петли фактора роста нервов // *Бюл. эксперим. биол. и медицины*. — 2016. — Т. 161. — № 4. — С. 503–507. [Kryzhanovskii SA, Antipova TA, Tsorin IB. Angiogenic effects of dimeric dipeptide mimetic of loop 4 of nerve growth factor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2016;161(4):513–517. (In Russ).]
4. Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 2000;87(10):840–844.

5. Berry C, Brosnan MJ, Fennell JP, et al. Oxidative stress and vascular damage in hypertension. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 2001;10(2):247–255.
6. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*. 1987;56:279–285.
7. Mu P, Liu Q, Zheng R. Biphasic regulation of H₂O₂ on angiogenesis implicated NADPH oxidase. *Cell Biology International*. 2010;34(10):1013–1020.
8. Антипова Т.А. Нейропротекторное действие низкомолекулярного пептидного миметика фактора роста нервов NGF ГК-2 связано с активацией синтеза белков теплового шока HSP32 и HSP70 и увеличением фосфорилирования TrkA // *Эксперим. и клин. фармакол.* — 2010. — Т. 73. — № 12. — С. 6–8. [Antipova TA. Neuroprotective effect of low-molecular peptide mimetic (GK-2) of nerve growth factor is related to activated synthesis of heat shock proteins (HSP32 and HSP70) and increased phosphorylation of TrkA receptor. *Eksp. i klin. Farmakol.* 2010;73(12):6–8. (In Russ).] DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2010-73-12-6-8>.
9. Stankiewicz AR, Lachapelle G, Foo CP, et al. Hsp70 inhibits heat-induced apoptosis upstream of mitochondria by preventing Bax translocation. *J. Biol. Chem.* 2005;280(46):38729–38739.
10. Saleh A, Srinivasula SM, Balkir L, Robbins PD, Alnemri ES. Negative regulation of the APAF-1 apoptosome by HSP70. *Nat. Cell Biology*. 2000;2(8):476–483.
11. Kalinowska M, Garncarz W, Pietrowska M, et al. Regulation of the human apoptotic DNase/RNase Endonuclease G: Involvement of Hsp70 and ATP. *Apoptosis*. 2005;10(4):821–830.

Подходы к прогнозированию аффинности лигандов 18 кДа транслокаторного белка TSPO с целью создания молекул с нейропсихотропной активностью

Барaboшкин Н.М., Пантiлеев А.С., Мокров Г.В.

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

Резюме. Выполнено прогнозирование аффинности к 18 кДа транслокаторному белку (TSPO) соединений в ряду 1-арилпирроло[1,2-а]пирозин-3-карбоксамидов методами QSAR (Quantitative structure–activity relationship) и молекулярного докинга. Были созданы 9 моделей из комбинации трёх методов машинного обучения (ASNN, FSMLR, PLS) с различным набором 2D фрагментарных дескрипторов (OEState, ISIDA, GSfrag). Для валидации модели использовался 5-кратный перекрёстный контроль. Для молекулярного докинга использовались следующие программы: для построения 3D моделей лигандов программный пакет Marvin от ChemAxon, подготовка белка 2MGY (Protein Data Bank) выполнялась в AutodockTools, а для установления аффинности Autodock 4.2. дополнительно было проведено исследование гидрофобного соответствия в веб-сервисе PLATINUM. В результате данных исследований были выявлены наиболее перспективные лиганды TSPO. Произведён анализ связи структура-аффинность.

Ключевые слова: 18 кДа транслокаторный белок TSPO; молекулярный докинг; QSAR; нейропсихотропная активность

Для цитирования:

Барaboшкин Н.М., Пантiлеев А.С., Мокров Г.В. Подходы к прогнозированию аффинности лигандов 18 кДа транслокаторного белка TSPO с целью создания молекул с нейропсихотропной активностью // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 1. – С. 22–30.
DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10036.

Approaches to predict ligands affinity towards translocator protein TSPO 18 kDa in order to create molecules possessing neuropsychotropic activity

Baraboshkin N.M., Pantileev A.S., Mokrov G.V.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Predict of anxiolytic activity and affinity for the translocator protein (TSPO), compounds in the 1-arylpyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamide series by QSAR (Quantitative structure–activity relationship) and molecular docking was carried out. 9 Models were created from a combination of three methods of machine learning (ASNN, FSMLR, PLS) with a different set of 2D fragmented descriptors (OEState, ISIDA, GSfrag). For the validation of the model, 5-fold cross-checking was used. For molecular docking, the following programs were used: for building 3D ligand models, Marvin software package from ChemAxon, preparation of protein 2MGY (Protein Data Bank) was performed in AutodockTools, and to establish the affinity of Autodock 4.2. In addition, a study was made of the hydrophobic correspondence in the PLATINUM web service. As a result of these studies, the most promising TSPO ligands were identified. Also, the structure–property relationship was evaluated.

Keywords: 18 kDa translocator protein TSPO; molecular docking; QSAR; neuropsychotropic activity

For citations:

Baraboshkin NM, Pantileev AS, Mokrov GV. Approaches to predict ligands affinity towards translocator protein TSPO 18 kDa in order to create molecules possessing neuropsychotropic activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:22–30. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10036.

Введение

Транслокаторный белок массой 18 кДа (TSPO) — это богатый триптофаном трансмембранный белок, состоящий из пяти α -спиралей. Он локализуется преимущественно на наружной митохондриальной мембране в стероид-синтезирующих тканях, включая ткани мозга. TSPO участвует в переносе холестерина из цитоплазмы на внутреннюю сторону митохондриальной мембраны, этот процесс является скоростью-лимитирующим фактором в синтезе стероидов и нейростероидов [1].

Лиганды, связывающиеся с активным центром TSPO, облегчают трансмембранный транспорт холестерина в митохондрию, который под воздействием ферментов трансформируется в нейростероиды. Последние аллостерически связываются с ГАМК_A рецептором, активируя ток анионов хлора внутрь клетки, что реализуется в дальнейшем в противотревожном эффекте [2].

На основании высокоаффинных синтетических лигандов (рис. 1) и данных, полученных нами ранее, была модифицирована известная фармакофорная модель TSPO-лигандов (рис. 2). Ядром лиганда должен являться плоский ароматический гетероцикл, в котором одно из положений замещено на ароматическое кольцо. Также в гетероцикле должна присутствовать амидная группа с липофильными заместителями, которая должна быть удалена от ядра не более чем на длину одной углерод-углеродной связи. Важно наличие карбонильной группы в липофильном фрагменте молекулы, она выступает в качестве акцептора водородной связи [3].

Несмотря на достаточно большое количество полученных лигандов TSPO, среди них (на 2018 год) нет зарегистрированных препаратов, за исключением препарата «Стрезам», однако он не одобрен FDA [14], кроме того, его механизм действия обусловлен не только взаимодействием с TSPO, но и прямым

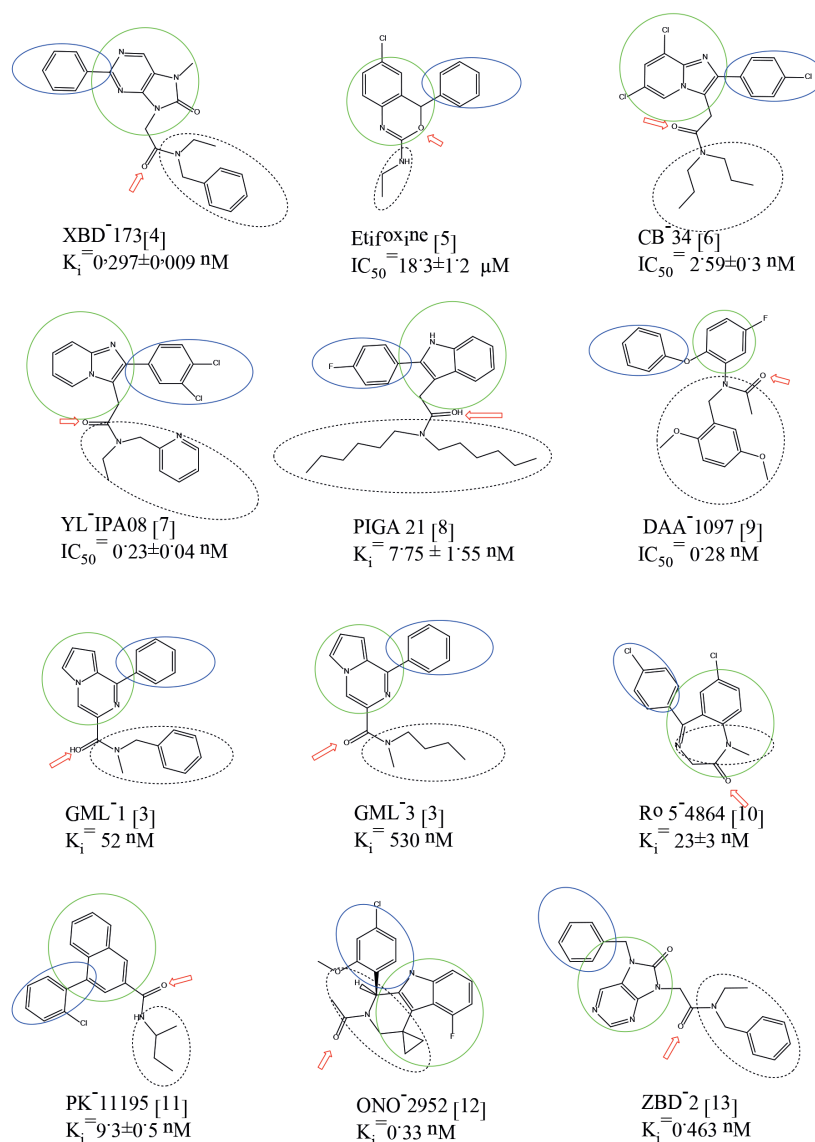


Рис. 1. Классические синтетические лиганды TSPO с экспериментальными константами ингибирования

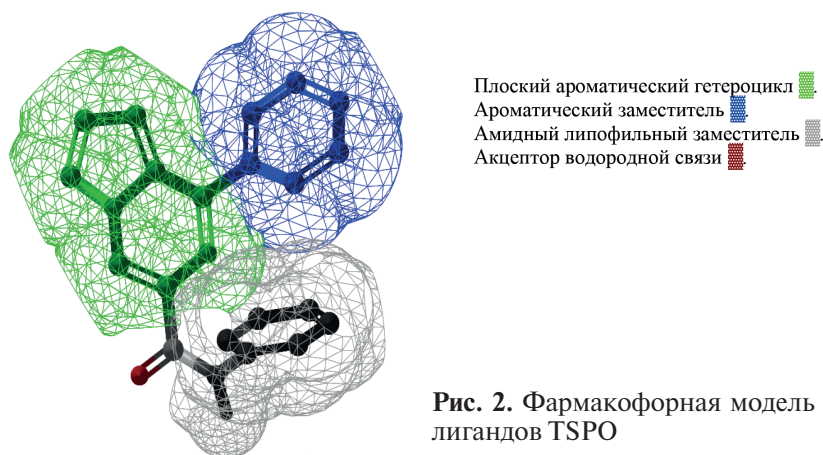


Рис. 2. Фармакофорная модель лигандов TSPO

связыванием с ГАМК_A рецептором. Таким образом, на сегодняшний день не найдено фармакологического решения задачи по созданию эффективных нейropsychотропных препаратов среди лигандов TSPO вследствие нежелательных побочных эффектов, недостаточной афинности к TSPO и токсичности большинства из них [15]. Вследствие этого актуальной задачей остаётся дальнейшая разработка лигандов TSPO, обладающих нейropsychотропной активностью, с отсутствием побочных эффектов и токсичности. Для решения данной проблемы в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был синтезирован ряд соединений на основе разработанной фармакофорной модели (см. рис. 2). В качестве основного гетероцикла был выбран пирроло[1,2-а]пиазин с фенильным кольцом в 1-м положении и наличием амидной группировки в 3-м положении (рис. 3). [3].

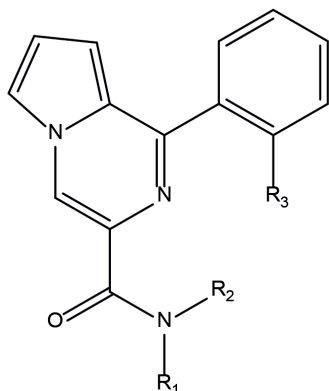


Рис. 3. Структура разработанного гетероциклического ядра и ряд полученных соединений

Шифр	R ₁	R ₂	R ₃
ГМЛ – 1	CH ₃	Bz	H
ГМЛ – 2	CH ₃	n-Bu	Cl
ГМЛ – 3	CH ₃	n-Bu	H
ГМЛ – 4	CH ₃	n-Bu	F
ГМЛ – 5	CH ₃	n-Bu	Br
ГМЛ – 6	CH ₃	втор-Bu	H
ГМЛ – 7	H	Bz	H
ГМЛ – 8	H	CH ₃	H
ГМЛ – 9	CH ₃	Bz	F
ГМЛ – 10	CH ₃	Bz	Cl
МЛ – 291	CH ₃	изо-Bu	H

Анализ связи структура-активность

С целью анализа прогностических возможностей метода QSAR и молекулярного докинга использовались как ранее синтезированные и изученные соединения, так и новые сконструированные молекулы. Вещества с шифром ГМЛ и МЛ были синтезированы нами ранее [3], для остальных указан порядковый номер.

На основе ранее изученных соединений анализ связи структура-активность [3] показал, что наибольшую активность проявляют соединения, у которых отсутствует заместитель в бензольном кольце (R₃ = H), а амидная группа замещена на метильную (R₁ = CH₃) и бензильную или н-бутильную группу (R₂ = Bz, n-Bu). Различные вариации ортозаместителя R₃ в бензольном кольце ГМЛ-2, ГМЛ-4, ГМЛ-5 при R₁ = CH₃, R₂ = n-Bu приводят к снижению активности. При введении фтора в положение R₃ активность снижается, а при введении брома и хлора полностью исчезает. Удаление одного из заместителей у амидной группы ГМЛ-7 и ГМЛ-8 R₁ или R₂ = H существенно снижает активность. Замена н-бутильного остатка на более разветвленный втор-бутил также снижает активность. В результате выделены основные перспективные соединения ГМЛ-1 и ГМЛ-3, у которых отсутствует заместитель в положении R₃, а амидная группа замещена по обоим атомам водорода.

Одним из ключевых параметров лигандов TSPO, определяющих их биологическую активность, является их афинность по отношению к этому рецептору. На основании анализа связи структура-активность разработан ряд модифицированных лигандов в ряду пирроло[1,2-а]пиазинов и проведён прогноз сродства с использованием QSAR и метода молекулярного докинга.

QSAR/QSPR — метод измерения количественной связи между структурой молекулы и её свойством, в нашем случае активностью. Методы QSAR появились в начале 1960-х и их основателем был Корвин Ганч. Основное применение QSAR моделей — прогноз биологической активности для химических соединений [16]. Для числового обозначения молекулы используют независимые друг от друга числовые параметры молекулы — дескрипторы. [17]

Топологические методы QSAR используют информацию о атомах и типах связи между ними, а также другие локальные дескрипторы (липофильность, константы заместителей, дипольный момент и др.) Структурная формула молекул записывается в виде молекулярного графа, где атомы — это вершины, а ребра — это связи между атомами. Однако топологический подход не позволяет учитывать информацию о взаимном расположении структурных особенностей в пространстве и такие методы не могут быть универсальным инструментом прогнозирования физиологической активности.

Для построения QSAR моделей формируется обучающая и тестовая выборка из молекул, для которых заранее известна биологическая активность. Обучающая выборка загружается в компьютерную программу, которая проводит подбор дескрипторов и строит зависимость как:

$$A = f(D), \text{ где}$$

A — активность,
D — дескриптор.

На основе обучающей выборки строится корреляционное уравнение активности от набора дескрипторов. Модель проверяется с помощью тестовой выборки, в которой активность молекул уже известна. Таким образом, модель связывает активность с определенными фрагментами в молекуле и их окружением. Точность модели зависит от размера обучающей выборки и оптимального набора дескрипторов [18].

Для прогнозирования аффинности лигандов к TSPO построена QSAR модель на основе обучающей выборки из 1 297 лигандов TSPO с известной константой ингибирования. Первоначально осуществляли поиск лигандов TSPO с известными константами ингибирования в базе данных химических структур ZINC [19]. Полученную базу в формате sdf загрузили в веб-сервис для QSAR моделирования — OCHEM [20]. Было создано 9 моделей из комбинации трёх методов машинного обучения (ASNN, FSMLR, PLS) с различным набором 2D фрагментарных дескрипторов (OEState, ISIDA, GSFRag). Для валидации модели использовался 5-кратный перекрёстный контроль (табл. 1).

В результате была выбрана модель на основе искусственных нейронных сетей от фрагментарных дескрипторов ISIDA с коэффициентом корреляции

$R_2 = 0,68$ (Таблица и параметром перекрёстного контроля $q^2 = 0,65$. Для промежуточной оценки модели использовали значение RMSE (root mean square derivative) среднеквадратичного отклонения и параметра перекрёстного контроля Q^2 (рис. 4).

Фрагментарные дескрипторы ISIDA базируются на двух классах дескрипторов: подструктурные молекулярные фрагменты и фармакофорные триплеты. Первые разбиты на три класса:

1. Последовательность соединённых атомов и связей.
2. Только атомы или пары атомов.
3. Расширенный набор атомов с близкой средой и их связей.

Фармакофорные триплеты производят поиск и выделение определённых фармакофорных фрагментов (Н-доноры, Н-акцепторы, анионы, катионы и т. д.) на заданных топологических расстояниях.

В результате были получены прогнозируемые значения аффинности для 22 структур с различными заместителями у амидной группы (табл. 2).

Таблица 2

Прогнозируемая аффинность пирроло[1,2-а]пиазинов

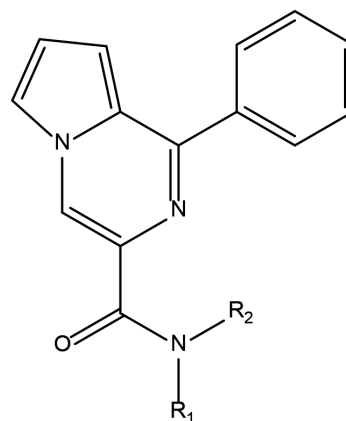


Таблица 1

Статистические показатели построенных моделей

R^2	ASNN	FSMLR	PLS
ALogPS, OEstate	0,62	0,32	0,41
Fragmentor (Length 2–4)	0,68	0,41	0,5
GSFRag	0,67	0,22	0,33
Q^2	ASNN	FSMLR	PLS
ALogPS, OEstate	0,6	0,24	0,39
Fragmentor (Length 2–4)	0,65	0,4	0,48
GSFRag	0,64	0	0,32

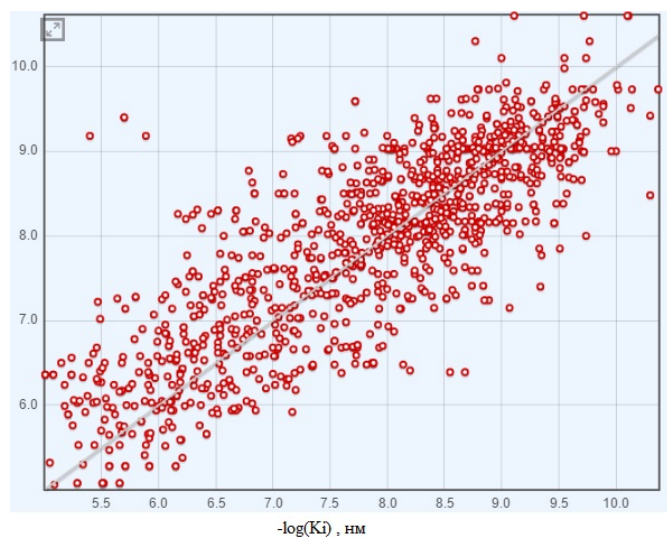


Рис. 4. Графическое отображение модели от фрагментарных дескрипторов ISIDA

№	R ₁	R ₂	K _i , -log(M)	№	R ₁	R ₂	K _i , -log(M)
ГМЛ-8	Me	H	5,3	ГМЛ-23	Ph	n-Bu	6,2
1	Et	Et	5,5	ГМЛ-1	Bz	Me	6,9
ГМЛ-12	Pr	Pr	6	4	Bz	Et	5,7
ГМЛ-3	Me	n-Bu	6	5	Bz	n-Bu	6,2
МЛ-291	Me	i-Bu	6	6	Bz	i-Pr	5,4
ГМЛ-6	Me	sec-Bu	6,4	7	Bz	Bz	5,5
2	циклогексил		5,1	ГМЛ-11	Ph	Bz	5,8
ГМЛ-7	Bz	H	5,2	8	Ph	Ph	6,1
ГМЛ-22	Ph	Et	5,7	9	Ph	циклогексил	5,2
3	Ph	Pr	6,1	10	Ph	циклопентил	5,6
ГМЛ-21	Ph	Me	6,4	11	Naph	H	5,6

Молекулярный докинг

Молекулярный докинг — это метод моделирования, который позволяет предсказать наиболее выгодную для образования устойчивого комплекса ориентацию и положение одной молекулы по отношению к другой. В данной статье мы использовали метод взаимодействия лиганд-рецептор. Сначала выбрали рецептор с нативным лигандом в PDB и выполнили подготовительные преобразования, затем взяли как ранее синтезированные и изученные лиганды, так и сконструировали несуществующие, но легко синтезируемые по отработанной методике. Для построения 3D моделей молекул была выбрана программа MarvinSketch, входящая в программный пакет Marvin от компании ChemAxon. Рецептор TSPO домового мыши был взят из PDB (protein data bank) шифр 2MGY [21]. Данный белок получен путём экспрессии ДНК-последовательности TSPO мыши в кишечной палочке. Аминокислотная последовательность транслокаторного белка человека от белка мыши отличается наличием полиморфизма генов rs6971 у человека. Этот однонуклеотидный полиморфизм заключается в замене аланина в 147-м положении на треонин [22].

Предварительно в программе AutoDockTools [23] в структуру рецептора добавили водороды, удалили нативный лиганд PK 11195 и посчитали заряд по методу Gaisteger [24]. Аналогичную процедуру проводили с лигандами. Затем нами были построены

электростатические решетки для N-терминального кармана связывания. Молекулярный докинг проводили с помощью программы AutoDock 4.2. Конформационный поиск в активном центре выполнялся по генетическому алгоритму.

Для проверки правильности подсчёта скоринг-функции проводили докинг с 4 известными высоко-аффинными лигандами транслокаторного белка (табл. 3).

После проведения проверки приступили к основной процедуре докирования. Аффинность лигандов к TSPO колебалась от мкМ до нМ значений. Наилучшие K_i наблюдали для соединений 6, 7, 8, ГМЛ-11, 11 (табл. 4).

Дальнейшему анализу подвергали самые аффинные соединения 6, 7, 8, ГМЛ-11, 11 и соединения с Clog P < 4,5: ГМЛ-21, ГМЛ-22, ГМЛ-1, 4. В результате докинга определилось два основных мотива связывания.

В одном мотиве пирролопипазиновый остов наиболее аффинных соединений ГМЛ 11 и 8 гидрофобно взаимодействует с ароматическими остатками триптофана (95, 107), аланина (110, 147) и лейцина 150, а липофильные заместители амидной группы — с лейцином 150, серином 41, триптофаном 143, изолейцином 52. Фенильное кольцо у гетероароматического остова располагается около двух остатков триптофана 53 и 95 (рис. 5). Соединение ГМЛ 22 имеет похожий мотив связывания, однако фенильное кольцо в гетероцикле несколько сдвинуто к остатку триптофана 143 (см. рис. 5), в отличие от соединений ГМЛ-11 и 8, которые не могут сдвинуться из-за наличия объёмных заместителей у амидной группы.

Альтернативный мотив связывания предсказан для структур ГМЛ-21, ГМЛ-1, 4, 6, 11. В отличие от соединений ГМЛ-22, ГМЛ-11, 8 гетероциклический остов молекул ГМЛ-1 и 7 (Рис. 6) взаимодействует с остатками триптофана (53, 143), изолейцина 52 и аланина 23. Однако у соединений ГМЛ-21, 4, 11 фенильное кольцо сдвигается в сторону стэкинг взаи-

Таблица 3

Значения скоринг функции AutoDock классических лигандов TSPO и ГМЛ-1

Название лиганда	G score
DAA1097	-10,3
FIGN1-27	-9,1
PBR28	-10,6
XBD-173	-10,9
ГМЛ-1	-10,2

Значения аффинности для ряда лигандов пирроло[1,2-а]пипазинов

№	R1	R2	Ki, nM	Clog P	№	R1	R2	Ki, nM	Clog P
ГМЛ-8	Me	H	3610	1,89	ГМЛ-23	Ph	n-Bu	29	5,09
1	Et	Et	1910	2,82	ГМЛ-1	Bz	Me	38	3,83
ГМЛ-12	Pr	Pr	1490	3,87	4	Bz	Et	71	4,19
ГМЛ-3	Me	n-Bu	1220	3,43	5	Bz	n-Bu	26	5,16
МЛ-291	Me	i-Bu	810	3,35	6	Bz	i-Pr	11	4,61
ГМЛ-6	Me	sec-Bu	715	3,4	7	Bz	Bz	9	5,56
2	цикло	гексил	183	2,96	ГМЛ-11	Ph	Bz	4	5,49
ГМЛ-7	Bz	H	213	3,61	8	Ph	Ph	6	5,42
ГМЛ-21	Ph	Me	134	3,77	11	Naph	H	10	4,89
ГМЛ-22	Ph	Et	58	4,12	9	Ph	циклогексил	41	5,57
3	Ph	Pr	50	4,65	10	Ph	циклопентил	14	5,48

Таблица 4

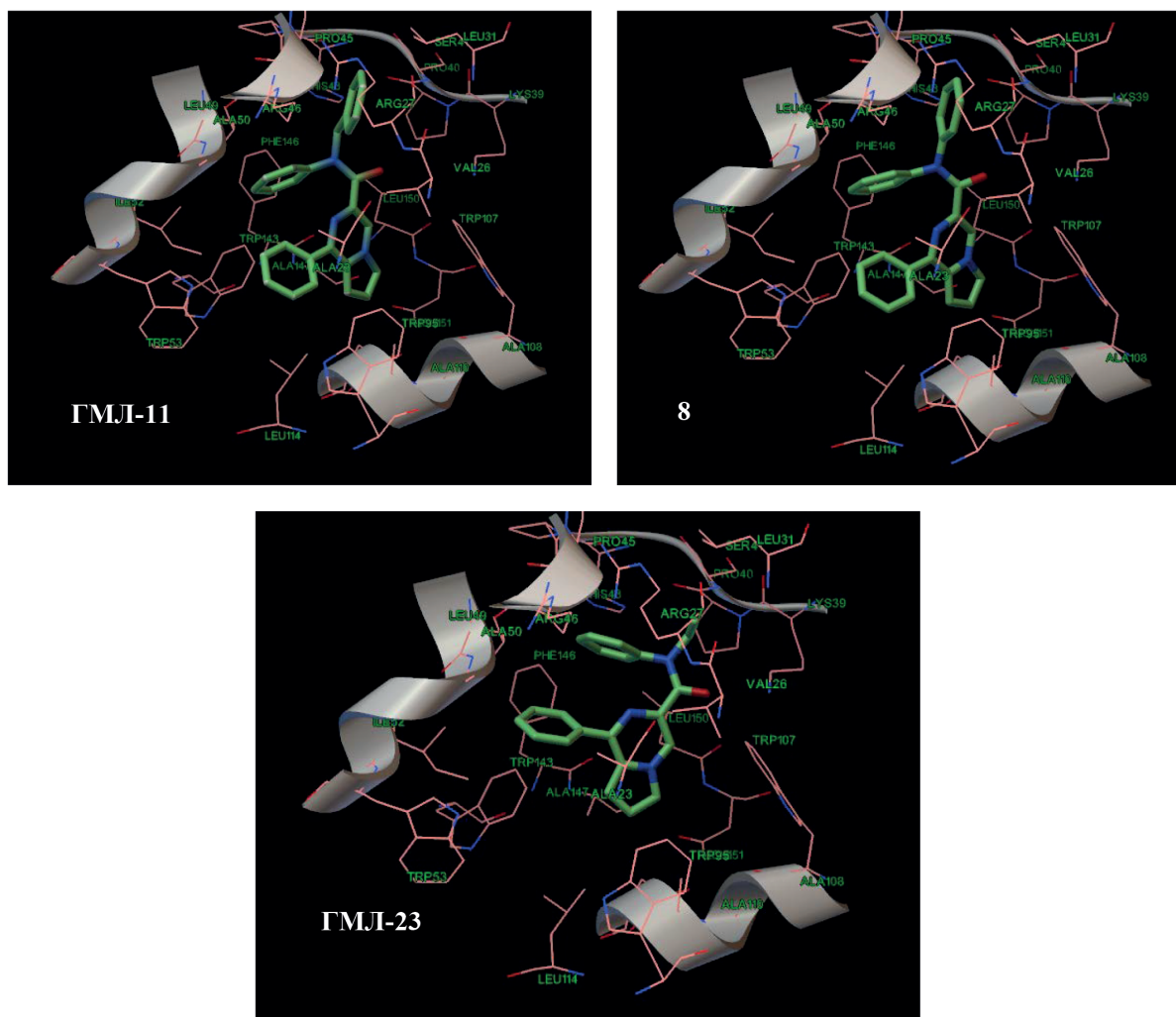


Рис. 5. Положение соединений ГМЛ-11, 8 и ГМЛ-23 в сайте связывания РК 11195 белка TSPO (protein data bank: 2MGY)

модействия с триптофаном 107, что в итоге сдвигает пирролопиразинный цикл к остатку триптофана 95 и лейцина 114 (рис. 6). У амидного атома азота соединений ГМЛ-1 и 7 положения бензильной группы совпадают, а насыщенные атомы углерода направлены к лейцину 49. Этильный радикал у амидного азота соединения 4 также направлен к лейцину 49, а бензильная группа — к валину 26. Соединение ГМЛ-21 тоже несколько сдвинуто по метильному радикалу к остатку лейцина 49. Нафтильная группа в соединении 11 имеет дополнительную область связывания с валином 26, лейцином 31, серином 41 и аргинином 46. Таким образом, введение электроноакцепторной группы в паразоложение фенильного кольца у атома амидного азота может увеличить сродство к TSPO.

По причине того, что карман активного центра РК-11195 достаточно гидрофобен, проведён анализ соответствия гидрофобной поверхности лиганда к поверхности белка с помощью веб-сервиса PLATINUM. В этом веб-сервисе проводятся вычисления, основанные на концепции молекулярного гидрофобного

потенциала, который присваивается каждому атому в зависимости от его природы. Затем проводится анализ поверхности молекулы лиганда и его окрестностей. Результат — это число, полученное при делении гидрофобно комплементарной поверхности лиганда к белку на общую поверхность лиганда. Также на основе эмпирических функций ведётся учёт π - π стэкинг-взаимодействий между ароматическими остатками аминокислот и ароматическими фрагментами лигандов. Результаты исследуемых структур сравнивали с результатами классического лиганда TSPO РК-11195 (табл. 5).

В итоге вышеперечисленных прогнозов, принимая во внимание коэффициент clogP и результаты соответствия гидрофобных поверхностей. Соединения ГМЛ-23, 5, 7, ГМЛ-11, 8 не подходят к правилу Липински $\text{clogP} < 5$ [25]. Оптимальные значения $\log P$ для проникновения через гематоэнцефалический барьер лежат в интервале 1,5-2,7 [26]. Таким образом, перспективными соединениями, учитывая липофильность, аффинность и гидрофобный потенциал, стали соединения ГМЛ-21, ГМЛ-22, ГМЛ-1, 4.

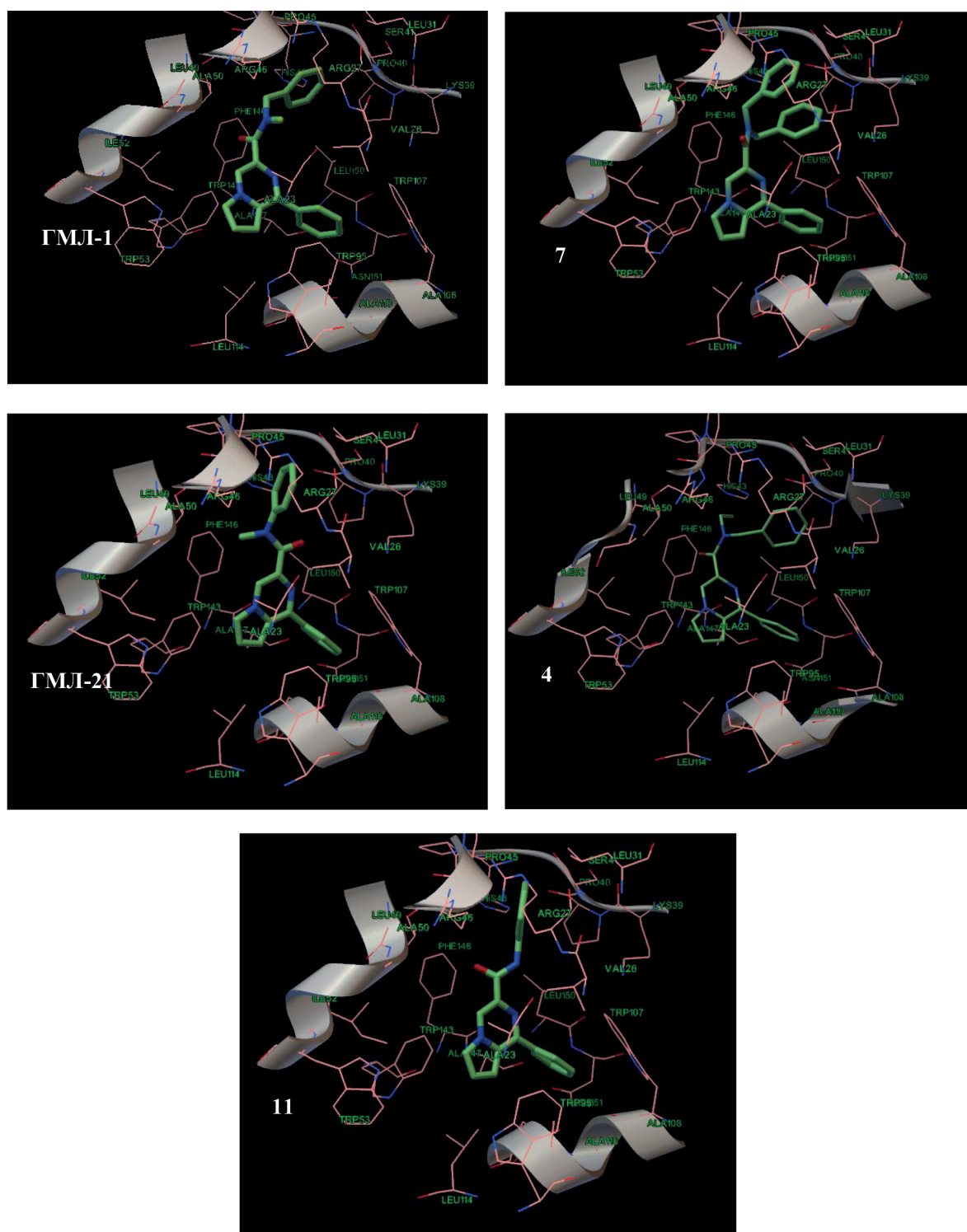


Рис. 6. Положение соединений ГМЛ-1, 7, ГМЛ-21, 4 и 11 в сайте связывания РК 11195 белка TSPO (protein data bank: 2MGY)

Таблица 5

Результаты проверки гидрофобного соответствия
в веб-сервисе PLATINUM

Номер молекулы	$\pi - \pi$ стэкинг	Соответствие
ГМЛ-21	1,65	0,8859
ГМЛ-22	0,87	0,9459
ГМЛ-1	2,42	0,9139
4	2,03	0,9371
7	1,78	0,8971
ГМЛ-11	0,71	0,9235
8	0,95	0,9339
11	1,76	0,8701
РК-11195	1,97	0,9609

Выводы

В результате данной работы были спрогнозированы перспективные соединения — лиганды транслокаторного белка. Часть соединений в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова уже была изучена ранее и была включена в выборку для проверки методов молекулярного моделирования (табл. 6).

Таблица 6

Результаты молекулярного моделирования и эксперимента

№	Соответствие правилу Липнински	Активность <i>in vivo</i>	Кіэксп, нМ
ГМЛ-23	—	—	нет данных
5	—	нет данных	нет данных
7	—	нет данных	нет данных
ГМЛ-11	—	++	нет данных
8	—	нет данных	нет данных
ГМЛ-21	+	+	нет данных
ГМЛ-22	+	+	нет данных
ГМЛ-1	+	+	80
4	+	нет данных	нет данных

Расчётные данные для ГМЛ-21, ГМЛ-22, ГМЛ-23, ГМЛ-1 соотносятся с результатами эксперимента, кроме ГМЛ-11, который проявил анксиолитическую активность, несмотря на несоответствие правилу Липнински.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Пантилеев Андрей Сергеевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: and.pantileev@academpharm.ru
ORCID 0000-0001-9288-594X
SPIN-код: 4356-7680
м. н. с. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Pantileev Andrey
Corresponding author
e-mail: and.pantileev@academpharm.ru
ORCID 0000-0001-9288-594X
SPIN-code: 4356-7680
junior researcher FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Мокров Григорий Владимирович
ORCID 0000-0003-2617-0334
SPIN-код: 8755-7666
к. х. н., и. о., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Mokrov Grigory
ORCID 0000-0003-2617-0334
SPIN-code: 8755-7666
PhD, Acting leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Барабоскин Никита Михайлович
ORCID 0000-0001-9288-594X
Студент РХТУ им. Менделеева

Baraboshkin Nikita
ORCID 0000-0001-9288-594X
Student D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia

Литература / References

1. Rupprecht R, Papadopoulos V, Rammes G, et al. Translocator protein (18 kDa)(TSPO) as a therapeutic target for neurological and psychiatric disorders. *Nature reviews Drug discovery*. 2010;9(12):971. URL: <https://doi.org/10.1038/nrd3295>.
2. Rone MB, Fan J, et al. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein–protein interactions and implications in disease states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2009;1791(7):646–658. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.03.001>.
3. Mokrov GV, Deeva OA, Gudasheva TA, et al. Design, synthesis and anxiolytic-like activity of 1-arylpyrrolo [1, 2-a] pyrazine-3-carboxamides. *Bioorganic & medicinal chemistry*. 2005;23(13):3368–3378. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.04.049>.
4. Verma A, Nye JS, Snyder SH. Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1987;84(8):2256–2260. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.84.8.2256>.
5. Verleye M, Akwa Y, Liere P, et al. The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2005;82(4):712–720. URL: <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2005.11.013>.
6. Serra M, Madau P, Chessa MF, et al. 2 Phenyl imidazo [1, 2 a] pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats. *British journal of pharmacology*. 1999;127(1):177–187. URL: <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702530>.
7. Zhang LM, Zhao N, Guo WZ, et al. Antidepressant-like and anxiolytic-like effects of YL-IPA08, a potent ligand for the translocator protein (18 kDa). *Neuropharmacology*. 2014; 81:116–125. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2013.09.016>.
8. Da Settimo F, Simorini F, Taliani S, et al. Anxiolytic-like effects of N, N-dialkyl-2-phenylindol-3-ylglyoxylamides by modulation of translocator protein promoting neurosteroid biosynthesis. *Journal of medicinal chemistry*. 2008;51(18):5798–5806. URL: <https://doi.org/10.1021/jm8003224>.
9. Okuyama S, Chaki S, Yoshikawa R, et al. Neuropharmacological profile of peripheral benzodiazepine receptor agonists, DAA1097 and DAA1106. *Life sciences*. 1999;64(16):1455–1464. URL: [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00079-X](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00079-X).
10. Gavioli EC, Duarte FS, Bressan, E, et al. Antidepressant-like effect of Ro5-4864, a peripheral-type benzodiazepine receptor ligand, in forced swimming test. *European journal of pharmacology*. 2003;471(1):21–26. URL: [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(03\)01789-8](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(03)01789-8).
11. Ryu, JK, Choi HB, et al. Peripheral benzodiazepine receptor ligand PK11195 reduces microglial activation and neuronal death in quinolinic acid-injected rat striatum. *Neurobiology of disease*. 2005;20(2):550–561. URL: <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.04.010>.
12. Mitsui K, Niwa T, Kawahara Y, et al. Anti-stress effects of ONO-2952, a novel translocator protein 18 kDa antagonist, in rats. *Neuropharmacology*. 2015;99:51–66. URL: <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.07.011>.
13. Li XB, Guo HL, Shi TY, et al. Neuroprotective effects of a novel translocator protein (18 kDa) ligand, ZBD 2, against focal cerebral ischemia and NMDA induced neurotoxicity. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2015;42(10):1068–1074. URL: <https://doi.org/10.1111/1440-1681.12460>.
14. URL: <https://www.fda.gov/>
15. Hamon A, Morel A, Hue B, et al. The modulatory effects of the anxiolytic etifoxine on GABAA receptors are mediated by the $\alpha 5$ subunit. *Neuropharmacology*. 2003;45(3):293–303. URL: [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(03\)00187-4](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(03)00187-4).
16. Free SM, et al. A mathematical contribution to structure-activity studies. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1964;7(4):395–399. URL: <https://doi.org/10.1021/jm00334a001>.
17. Mitra I, Saha A, et al. Predictive modeling of antioxidant coumarin derivatives using multiple approaches: descriptor-based QSAR, 3D-pharmacophore mapping, and HQSAR. *Scientia pharmaceutica*. 2002;81(1):57–80. URL: <https://doi.org/10.3797/scipharm.1208-01>.
18. Gramatica P. Principles of QSAR models validation: internal and external. *QSAR & combinatorial science*. 2007;26(5):694–701. URL: <https://doi.org/10.1002/qsar.200610151>.
19. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, et al. ZINC: a free tool to discover chemistry for biology. *Journal of chemical information and modeling*. 2012;52(7):1757–1768. URL: <https://doi.org/10.1021/ci3001277>.
20. Sushko I, Novotarskyi S, Kerner R, et al. Online chemical modeling environment (OCHEM): web platform for data storage, model development and publishing of chemical information. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. 2011;25(6):533–554. URL: <https://doi.org/10.1007/s10822-011-9440-2>.
21. Jaremko Ł, Jaremko M, Giller K, et al. Structure of the mitochondrial translocator protein in complex with a diagnostic ligand. *Science*. 2014;343(6177):1363–1366. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1248725>.
22. Kreisl WC, Jenko K J, Hines CS, et al. A genetic polymorphism for translocator protein 18 kDa affects both in vitro and in vivo radioligand binding in human brain to this putative biomarker of neuroinflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2013;33(1):53–58. URL: <https://doi.org/10.1038%2Fjcbfm.2012.131>.
23. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of computational chemistry*. 2009;30(16):2785–2791. URL: <https://doi.org/10.1002/jcc.21256>.
24. Gasteiger, J., & Marsili, M. (1980). Iterative partial equalization of orbital electronegativity—a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, 36(22), 3219–3228. URL: [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(80\)80168-2](https://doi.org/10.1016/0040-4020(80)80168-2).
25. Lipinski CA. Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*. 2004;1(4):337–341. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2004.11.007>.
26. Hansch C, Rockwell SD, Jow PY, et al. Substituent constants for correlation analysis. *Journal of medicinal chemistry*. 1977;20(2):304–306. URL: <https://doi.org/10.1021/jm00212a024>.

Изучение особенностей проницаемости гемато-энцефалического барьера для новых нейротропных пептидных лекарственных препаратов

Жердев В.П., Бойко С.С., Шевченко Р.В.

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

Резюме. В работе представлены результаты исследований особенностей проникновения через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) крыс трёх новых пептидных лекарственных препаратов — модифицированных аналогов эндогенных нейропептидов и их активных метаболитов, созданных в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Обсуждаются основные физико-химические характеристики дипептидных препаратов, позволяющие прогнозировать проникновение изучаемых соединений через ГЭБ. Все три изучаемые соединения: ноопепт — пептидный аналог пирацетама (этиловый эфир N-фенил-ацетил-L-пролил-L-глицин) с ноотропной и нейропротективной активностью, дилепт — аналог нейротензина (метилэтер N-капроил-L-пролил-L-тирозина) — антипсихотик с положительным когнитивнотропным эффектом и соединение ГБ-115 (амид N-гексаноил-L-глицил-L-триптофана) — ретроаналог холецистокинина-4 — селективный анксиолитик. С использованием метода ВЭЖХ-МС/МС показано, что ноопепт и его активный метаболит цикло-пролил-глицин (ЦПГ) обнаруживаются в мозге крыс после перорального введения ноопепта, что указывает на их проникновение через ГЭБ с коэффициентами $K_{\text{мозг/плазма}}$ 1,61 и 1,36 соответственно; дилепт и его активный метаболит M_1 проникают через ГЭБ с разными коэффициентами $K_{\text{мозг/плазма}}$, составляющими для дилепта 2,0 и метаболита — 0,5, что может указывать на различные механизмы транспорта этих соединений в ЦНС. Показано, что анксиолитик ГБ-115 также проникает через ГЭБ с высоким коэффициентом $K_{\text{мозг/плазма}}$ — 1,41. Таким образом, все три дипептидных аналога природных нейропептидов проникают через ГЭБ, имеют высокую тропность к ткани мозга крыс, что может свидетельствовать об их возможном прямом влиянии на структуры мозга, принимающие участие в реализации фармакологических эффектов этих препаратов.

Ключевые слова: модифицированные аналоги природных нейропептидов; проникновение через ГЭБ; фармакокинетические параметры; коэффициент распределения $K_{\text{мозг/плазма}}$

Для цитирования:

Жердев В.П., Бойко С.С., Шевченко Р.В. Изучение особенностей проницаемости гемато-энцефалического барьера для новых нейротропных пептидных лекарственных препаратов // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 1. – С. 31–36. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10037.

The study of the permeability of the blood-brain barrier for new neurotropic peptide drugs

Zherdev V.P., Boyko S.S., Shevchenko R.V.

FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The paper presents the results of studies of penetration through the hemato-encephalic barrier (BBB) of rats of three new peptide drugs – modified analogues of endogenous neuropeptides and their active metabolites created in the research Zakusov institute of Pharmacology. Discussed the main physical-chemical characteristics of study dipeptides which allow predicting the penetration of peptide compounds through the BBB. All three of the studied compounds: noopept is a peptide analog of piracetam (ethyl ether N-phenylacetyl-L-prolyl-L-glycine) with nootropic and neuroprotective activity, dilept – analogue of neurotensin (methyl ether of N-caproyl-L-prolyl-L-tyrosine) – antipsychotic with positive mnemotropic effect and the compound GB-115 (amide N-hexanoyl-L-glycyl-L-tryptophan) – retroanalogue of cholecystokinin-4 is a selective anxiolytic with anti-alcohol effect. In experiments on rats using the method of HPLC-MS/MS was shown that noopept and its metabolite cyclo-prolyl-L-glycine (CPG) are found in brain of rats after oral administration of the substance drugs, which indicates their penetration through the BBB with coefficients $K_{\text{brain/plasma}}$ 1.61 and 1.38, respectively; Dilept and its active metabolite M_1 , are detected in the brain of rats, which indicates the penetration of both compounds through the BBB with the coefficients the brain/plasma for dilept 2.0 and metabolite-0.5, that indicated on different mechanism of transport these compounds through the BBB. It is shown that the anxiolytic GB-115 also penetrates through the BBB with a high coefficient $K_{\text{brain/plasma}}$ — 1.41. Thus, all three dipeptide analogues of natural neuropeptides penetrate the BBB, have a high tropicity to the brain tissue of rats, which may indicate their direct influence on the brain structures involved in the realization of pharmacological effects of these drugs.

Keywords: modified analogues of natural neuropeptides; the penetration through the BBB; pharmacokinetic parameters; the distribution coefficient $K_{\text{brain/plasma}}$

For citations:

Zherdev V.P., Boyko S.S., Shevchenko R.V. The study of the permeability of the blood-brain barrier for new neurotropic peptide drugs. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:31–36. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10037.

Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе аналогов природных нейропептидов разработаны три дипептидных препарата: ноопепт — этиловый эфир фенил-ацетил-L-пролил-L-глицин, являющийся пептидным аналогом пирacetama и вазопрессина, с 2006 года внедрён в медицинскую практику в качестве ноотропного средства, препарат дилепт — метиловый эфир капроноил-L-пролил-L-тирозина — аналог природного антипсихотика нейротензина с положительным мнемотропным действием прошёл стадии доклинического и клинического изучения, в настоящее время решается вопрос о его внедрении в медицинскую практику. Третий препарат — соединение ГБ-115 — гексаноил-L-глицил-L-триптофан амид, являющийся ретроаналогом холецистокинина-4, также прошёл стадии доклинического и клинического изучения, разработана новая технология его таблеточной лекарственной формы на основе микронизированной субстанции с улучшенными фармакокинетическими характеристиками — энзиматической устойчивостью и большей величиной тканевой биодоступности. В настоящее время также рассматривается вопрос о его внедрении в клиническую практику для лечения тревожных состояний, фобий и других патологических состояний.

Экспериментальная часть

Проницаемость ГЭБ для новых нейротропных пептидных препаратов

Изучение фармакокинетики новых лекарственных препаратов является необходимым этапом для их внедрения и эффективного и безопасного применения в клинике [1]. Особое значение это направление исследований имеет для пептидных лекарственных препаратов в связи с их энзиматической нестабильностью и образованием метаболитов, обладающих собственной фармакологической активностью. Кроме того, эффективность фармакотерапии зависит от доставки лекарственных веществ (ЛВ) в орган-мишень — мозг, которая определяется его способностью проникать через ГЭБ. ГЭБ осуществляет барьерную функцию, ограничивающую проникание фармакологически активных ЛВ в концентрациях, превышающих эффективные, и способствует сохранению гомеостаза. Экспериментальные данные о проницаемости пептидных ЛВ через ГЭБ могут иметь значение для выяснения механизма действия и их роли в проявлении фармакологических эффектов изучаемых лекарственных препаратов (ЛП).

В данной работе приводятся результаты исследования особенностей проникания изучаемых препаратов через гематоэнцефалический барьер в ЦНС (мозг крыс), которые оценивали по соотношению их площадей под фармакокинетическими кривыми в мозге и плазме крови крыс, характеризующее тканевую биодоступность к мозгу крыс, и выражали в виде коэффициента $K_{\text{мозг/плазма}}$.

Ноопепт

На основе структурной формулы молекулы ноопепта были рассчитаны его основные физико-химические характеристики, а также его метаболита — ЦПГ, позволяющие прогнозировать проникание изучаемых соединений через ГЭБ. В соответствии с «правилом пяти», предложенному *Lipinski* *CA* [2], ЛВ имеет хорошую абсорбцию, если его молекулярная масса менее 500 а. е. м., коэффициент распределения октанол/вода $\log/P$ менее 5, число доноров водородной связи, выраженной суммой ОН- и NH-, менее 5, число акцепторов водородной связи, выраженной количеством N- и O-атомов, менее 10. Молекулярный вес ноопепта 318 а. е. м., значение коэффициента распределения в системе октанол-вода — 2,51, число доноров водородной связи 2, число акцепторов водородной связи — 3. Молекулярная масса ЦПГ составляет 154 а. е. м., коэффициент распределения октанол/вода $\log/P$ равен 2,05, число доноров водородной связи — 2, число акцепторов водородной связи равно 2. Таким образом, ноопепт и его активный метаболит ЦПГ удовлетворяют используемому методу *Lipinski* «правилу пяти» и теоретически возможно их проникание через ГЭБ.

Целью наших исследований стало экспериментальное изучение проникания исследуемых соединений через ГЭБ крыс.

При изучении фармакокинетики ноопепта было установлено, что препарат быстро метаболизируется в организме крыс с образованием активного метаболита циклической структуры — цикло-пролил-L-глицин (ЦПГ), который определяется в плазме крови крыс в более высокой концентрации и значительно более продолжительное время — в течение 4–6 ч после введения по сравнению с ноопептом, период полувыведения которого составлял 25–30 мин после перорального введения субстанции препарата [3, 4]. В результате пресистемной элиминации ноопепта происходит отщепление фенилацетильного радикала от молекулы ноопепта с образованием пролил-глицина, который превращается в циклическую форму — ЦПГ. ЦПГ был впервые обнаружен нами в плазме и мозге крыс с использованием метода ВЭЖХ-МС/МС, установлена его структура, изучена его фармакокинетика и рассчитаны основные фармакокинетические параметры в плазме крови и мозге крыс в сравнении с аналогичными параметрами ноопепта после перорального введения субстанции препарата [3–6]. Рассчитанные фармакокинетические параметры ноопепта и ЦПГ представлены в табл. 1.

Из представленных в таблице фармакокинетических параметров ноопепта и его метаболита ЦПГ в плазме крови и мозге крыс видно, что величины максимальных концентраций и площадей под фармакокинетическими кривыми в мозге крыс как неизмененного препарата, так и его метаболита значительно превышают аналогичные параметры в плазме крови крыс. Полученные данные указывают на проникание через ГЭБ обоих

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ноопепта и ЦПГ в плазме крови и мозге крыс после перорального введения ноопепта в дозе 50 мг/кг

Параметры, размерность	Ноопепт, плазма	Ноопепт, мозг	$K_{\text{мозг/плазма}}$	ЦПГ, плазма	ЦПГ, мозг	$K_{\text{мозг/плазма}}$
C_{max} , мкг/мл	$0,820 \pm 0,28$	$1,289 \pm 0,15$	—	$0,72 \pm 0,078$	1,35	—
T_{max} , ч	$0,25 \pm 0,15$	$0,50 \pm 0,25$	—	$0,50 \pm 0,25$	$0,75 \pm 0,25$	—
$AUC_{0 \rightarrow t}$, мкг/мл*ч	$0,31 \pm 0,08$	$0,50 \pm 0,09$	1,61	$3,78 \pm 0,75$	$5,22 \pm 0,87$	1,38
$T_{1/2}$, ч	$0,19 \pm 0,08$	$0,215 \pm 0,05$	—	$3,99 \pm 0,67$	$2,87 \pm 0,65$	—
MRT, ч	$0,22 \pm 0,06$	$0,28 \pm 0,07$	—	$5,98 \pm 0,78$	$4,27 \pm 0,56$	—

Примечание: C_{max} , мкг/мл — максимальная концентрация соединений в плазме и мозге крыс; $AUC_{0 \rightarrow t}$, мкг/мл*ч — площадь под фармакокинетической кривой; $T_{1/2}$, ч — период полувыведения, за который выводится 50 % ЛВ; MRT, ч — среднее время удерживания соединений в неизмененном виде.

соединений с высоким коэффициентом распределения, рассчитанными по соотношению площадей под фармакокинетическими кривыми, составляющими для ноопепта $K_{\text{мозг/плазма}}$ — 1,61 и для ЦПГ — 1,38, что свидетельствует о высокой тропности ноопепта и его активного метаболита к ткани мозга крыс. Этот факт обусловлен близкими физико-химическими свойствами: небольшим молекулярным весом, количеством донорных и акцепторных связей обоих соединений, но в силу меньшей полярности, большей липофильности и лучшей растворимости в органических растворителях ноопепт проникает в мозг в большей степени, чем ЦПГ.

Кроме того, можно отметить незначительные различия параметров, характеризующих элиминацию в мозге и плазме крови крыс для ноопепта; в то время как ЦПГ более длительное время циркулирует как в плазме, так и в мозге крыс по сравнению с ноопептом, на что указывает значительное увеличение его периода полувыведения, а также величины MRT. Более продолжительный период полувыведения ЦПГ, очевидно, связан с его циклической структурой и меньшей протеазной активностью ткани мозга по сравнению с её активностью в плазме крови крыс [4, 5]. Полученные результаты совпадают с литературными данными о большей стабильности циклических структур известных дипептидов по сравнению с их линейными структурами [7]. Структурный фрагмент ноопепта — пролил-глицин образует циклическую форму, которая более длительное время сохраняется в неизмененном виде, что выгодно отличает его от ноопепта.

Кроме того, следует отметить, что ноопепт, являющийся пептидным аналогом пирацетама, значительно превосходит по проницаемости через ГЭБ и тропности к мозговой ткани крыс пирацетам, который проникает через ГЭБ медленнее — максимальная концентрация у крыс после введения внутрь достигается через 2 часа и в этот период устанавливается максимальный коэффициент $K_{\text{мозг/плазма}}$, который составляет 0,996 [8].

Дилепт

Дилепт является аналогом нейротензина, который не проникает через ГЭБ и проявляет свою активность только при непосредственном введении в мозг. На ос-

нове нейротензина и атипичного нейролептика сульпирида создан его аналог, который проявляет фармакологическую активность не только при внутрисосудистом, но, что наиболее важно, при пероральном введении в дозах 0,4–4,0 мг/кг и 4,0–8,0 мг/кг соответственно. Отличительной чертой от известных нейролептиков является его особенность улучшать когнитивные функции и нейропротективное действие [9].

При изучении метаболизма дилепта у крыс было показано, что он подвергается интенсивной пресистемной элиминации с образованием 2 деэстерифицированных продуктов — M_1 (N-капроил-L-пролил-L-тирозин) и M_2 (N-капроил-L-пролин). При этом показано, что M_1 обладает собственной фармакологической активностью [10]. На основе структурной формулы молекулы дилепта были рассчитаны основные физико-химические характеристики дилепта и его метаболита, позволяющие прогнозировать хорошую абсорбцию и проницаемость через ГЭБ изучаемых соединений. Молекулярный вес дилепта — 390 а. е. м., значение коэффициента распределения в системе октанол-вода — 2,51, число доноров водородной связи 2, число акцепторов водородной связи — 7. Таким образом, дилепт удовлетворяет описанному ранее методу Lipinski и теоретически может проникать через ГЭБ путём свободной диффузии в физиологических концентрациях. Молекула метаболита дилепта имеет близкие параметры: молекулярный вес — 376 а. е. м., сумма акцепторов водородной связи также, как у дилепта, равна 7, число доноров водородной связи равно 3 и $\log P$ составляет 2,36, но в то же время она более полярная по сравнению с молекулой дилепта, что может влиять на её транспорт через ГЭБ.

В связи с быстрой и интенсивной пресистемной элиминацией дилепта у крыс после перорального введения его субстанции, под влиянием энзиматических систем ЖКТ (эстераз и пептидаз) и его предельно низких концентраций в плазме крови у этого вида животных, особенно на терминальном участке фармакокинетической кривой, на основании которого рассчитывается константа элиминации и период полувыведения — параметров, влияющих на величину площади под фармакокинетической кривой, доза препарата была

Таблица 2

Содержание дилепта и его активного метаболита M_1 в плазме крови и мозге крыс после введения препарата в дозе 200 мг/кг

Содержание дилепта в плазме (нг/мл)	Содержание метаболита в плазме (нг/мл)	Содержание дилепта в мозге (нг/1 г)	Содержание метаболита в мозге (нг/1 г)	$K_{\text{мозг/плазма}}$	$K_{\text{мозг/плазма}}$
4,27±1,52	52,63±7,25	8,78±3,50	25,30±5,65	2,08	0,50

увеличена от 40 мг/кг до 200 мг/кг; при этом, однако, дозовой зависимости «доза-концентрация» неизменного препарата не наблюдалось, а концентрации образующихся метаболитов (особенно M_1) многократно превосходили уровень концентраций неизменного препарата. Учитывая вышеизложенное, при проведении экспериментов по изучению проникновения дилепта и его активного метаболита M_1 через ГЭБ определяли одновременно содержание изучаемых соединений в мозге и плазме крови крыс через 15 мин после введения — времени достижения максимальной концентрации дилепта и метаболита в 2 дозах — 40 и 200 мг/кг. В связи с тем, что не было выявлено дозовой зависимости содержания в плазме и мозге крыс как для дилепта, так и для метаболита, целесообразно привести данные, полученные после введения дилепта в максимальной дозе и через один интервал времени — 15 мин после введения — времени достижения максимальной концентрации изучаемых соединений (табл. 2).

Из представленных в таблице данных видно, что дилепт и его активный метаболит определяются в ткани мозга крыс через 15 мин после перорального введения дилепта, что свидетельствует о проницаемости ГЭБ для этих молекул; при этом коэффициент распределения $K_{\text{мозг/плазма}}$ для дилепта выше и, в среднем, составляет 2,0, а для активного метаболита — 0,5. Отсутствие зависимости «доза-концентрация» можно объяснить разным механизмом транспорта дилепта и его метаболита через ГЭБ. Большое значение коэффициента распределения дилепта между мозгом и плазмой крови крыс указывает на то, что его транспорт может быть реализован по механизму свободной диффузии; проникание же метаболита через ГЭБ, по всей вероятности, осуществляется с участием специфических пептидных переносчиков РерТ-2, связывание которых с субстратом ограничено [11, 12]. Меньшая величина коэффициента проницаемости ГЭБ для активного метаболита M_1 , по сравнению с аналогичной величиной этого коэффициента для дилепта, связана с его высокой концентрацией в плазме крови крыс и большей полярностью, вследствие этого ГЭБ осуществляет защитную функцию в отношении мозга, ограничивая поступление в мозг высоких концентраций активного метаболита, что может сопровождаться нежелательными последствиями как со стороны его фармакологического эффекта, так и токсикологического действия. Известно ограничивающее влияние ГЭБ на проникание высоких концентраций гормонов, медиаторов и психоактивных веществ в мозг для предотвращения их нежелательных токсических эффектов.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о различной проницаемости ГЭБ для дилепта и его активного метаболита и предотвращении проникания в мозг высоких концентраций активного метаболита. В то же время полученные данные свидетельствуют о проникании дилепта и метаболита M_1 в мозг, с чем может быть связано проявление его центральных эффектов.

Селективный анксиолитик ГБ-115

В соответствии с «правилом пяти» [2], предварительно были рассчитаны физико-химические показатели соединения ГБ-115, являющегося амидом N-фенил-N-гексаноил-L- глицил-L-триптофана, с целью прогнозирования возможности его проникания через ГЭБ. Молекулярная масса соединения ГБ-115 равна 434,52; число доноров водородной связи — 2; акцепторов — 3; растворимость в системе октанол-вода — 3,15, в соответствии с полученными данными изучаемый дипептид теоретически может проникать через ГЭБ.

Целью данного фрагмента работы было экспериментальное подтверждение проницаемости ГЭБ крыс для анксиолитика ГБ-115.

На основе полученных экспериментальных данных [13] рассчитаны основные фармакокинетические параметры анксиолитика в плазме крови и мозге крыс, которые представлены в табл. 3.

Из представленных в таблице данных видно, что анксиолитик быстро (в течение $0,75 \pm 0,25$ ч) и интенсивно проникает через ГЭБ в мозг крыс, на что указывает величина его C_{max} в ткани мозга, которая на 19 % выше по сравнению с величиной этого параметра в плазме крови, а также значительно больше величина площади под фармакокинетической кривой. По соотношению величин площадей под фармакоки-

Таблица 3

Основные фармакокинетические параметры соединения ГБ-115 в плазме и мозге крыс после перорального введения субстанции в дозе 100 мг/кг

Параметры, размерность	Плазма	Мозг	$K_{\text{мозг/плазма}}$
C_{max} , нг/мл	240 ± 19,2	285 ± 25,65	—
T_{max} , ч	0,5 ± 0,17	0,75 ± 0,25	—
AUC, нг/мл*ч	92,78 ± 8,75	136,75 ± 11,25	1,45
$T_{1/2}$, ч	0,33 ± 0,03	0,35 ± 0,16	—
MRT, ч	5,08 ± 0,45	7,32 ± 0,68	—

нетическими кривыми в мозге и плазме крови крыс было установлено, что соединение ГБ-115 проникает через ГЭБ в мозг с коэффициентом распределения $K_{\text{мозг/плазма}}$ — 1,45, что свидетельствует о высокой тропности анксиолитика к ткани мозга и его возможном непосредственном влиянии на внутриклеточные структуры мозга экспериментальных животных, связанные с проявлением его анксиолитического эффекта. Параметры, характеризующие процесс элиминации дипептида из мозга и плазмы крови крыс имеют близкие значения, за исключением параметра MRT, который в мозге выше, чем в плазме, что может указывать на связывание анксиолитика с клеточными структурами ткани мозга крыс и не исключает возможности его непосредственного влияния на структуры, связанные с реализацией анксиолитического действия изучаемого дипептида.

Заключение

В результате проведённых исследований установлено, что все 3 изучаемые дипептидные соединения с нейротропной активностью, представляющие собой модифицированные аналоги природных нейропептидов — ноотропный препарат ноопепт и его активный метаболит ЦПГ, антипсихотик с позитивным когнитотропным действием дилепт и селективный анксиолитик ГБ-115 обнаруживают высокую тропность к ткани мозга крыс и проникают через ГЭБ с высокими коэффициентами распределения $K_{\text{мозг/плазма}}$, что может указывать на

их непосредственное влияние на центральную нервную систему и формирование фармакологических эффектов этих соединений. В то же время для дилепта и его активного метаболита показаны отличительные особенности проникновения через ГЭБ, а именно, отсутствие дозовой зависимости и меньшей величины коэффициента $K_{\text{мозг/плазма}}$ для метаболита по сравнению с неизмененным препаратом, что может указывать на разный механизм транспорта этих соединений через ГЭБ: для дилепта — посредством пассивной диффузии, а для метаболита — с участием системы активных переносчиков, число которых ограничено, и защитную роль ГЭБ от проникновения в мозг высоких концентраций активного продукта метаболизма дилепта.

Выводы

1. Установлено, что изучаемые дипептидные аналоги природных нейропептидов проникают через ГЭБ, имеют высокую тропность к ткани мозга крыс, что может свидетельствовать об их непосредственном влиянии на нейромедиаторные системы мозга, принимающие участие в реализации фармакологических эффектов этих препаратов.

2. Показано для дилепта и его активного метаболита отсутствие дозовой зависимости проникновения этих соединений в мозг крыс, что, возможно, связано с большой дозой дилепта, высокими концентрациями образующегося активного метаболита, а также различным механизмом транспорта этих соединений через ГЭБ.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Жердев Владимир Павлович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID: 0000-0003-2710-7134
SPIN-код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Бойко Светлана Семёновна
ORCID: 0000-0003-2177-2010
SPIN-код: 4176-8921

к. б. н., старший научный сотрудник лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Шевченко Роман Владимирович
ORCID: 0000-0003-4646-7733
SPIN-код: 1844-6202

к. м. н., научный сотрудник лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zherdev Vladimir
Corresponding author
e-mail: zherdevpharm@mail.ru
ORCID: 0000-0003-2710-7134
SPIN-code: 2213-9592

MD, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Boyko Svetlana
ORCID: 0000-0003-2177-2010
SPIN-code: 4176-8921

Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Shevchenko Roman
ORCID: 0000-0003-4646-7733
SPIN-code: 1844-6202

PhD, Research Officer of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / под ред. Миронова А.Н. — М.: Гриф и К.; 2012. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Ed by Mironov AN. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).]
2. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approach to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997;23(1-3):3–25.
3. Boiko SS, Ostrovskaya RU, Zherdev VP, et al. Pharmacokinetics of new nootropic acylprolyldipeptide and its penetration across the blood-brain barrier after oral administration. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2000;129(4):359–361. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02439270>.
4. Boiko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA, et al. Pharmacokinetics of the new potential dipeptide nootrope GVS-111 and related metabolites in rat brain. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2001; 35(9):474–476. DOI: 10.1023/A:1014082406443.
5. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Lett.* 1996;391(1-2):149–152.
6. Gudasheva TA, Boyko SS, Ostrovskaya RU, et al. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and similarity to endogenous neuropeptide cycloprolylglycine. *Europ. J. Drug Metabol. and Pharmacokin.* 1997;22(3):245–252. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF03189814>.
7. Prasad C. Bioactive cyclic dipeptides. *Peptides.* 1995;16(1):151–164. DOI: [https://doi.org/10.1016/0196-9781\(94\)00017-Z](https://doi.org/10.1016/0196-9781(94)00017-Z).
8. Van Hoff H, editor. Nootropil. 4-th ed. Brussels: UCB Pharmaceutical Division; 1980.
9. Островская Р.У., Ретюнская М.В., Гузевых Л.С., и др. Трипептоидный аналог нейротензина дилепт сочетает нейролептическую активность с положительным мнемотропным действием // *Эксп. и клин. фармакол.* 2005;68(1):3–6. [Ostrovskaya RU, Retyunskaya MV, Guzevaykh LS, et al. Dilept: a tripeptoid neurotensin analog combining neuroleptic activity with positive mnemotropic action. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2005;68(1):3–6. (In Russ).]
10. Горелов П.И., Островская Р.У., Сазонова Н.М. Оценка прогностического эффекта дилепта и его основного метаболита, ГЗР-125, в тесте распознавания объектов у крыс // *Эксп. и клин. фармакол.* 2013;76(7):3–5. [Gorelov PI, Ostrovskaya RU, Sazonova NM. The Study of Procognitive Effect of the Potential Antipsychotic, Dilept and Its Main Metabolite, GZR-125 at the Novel Objects Recognition Test in Rats. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2013;76(7):3–5. (In Russ).] DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2013-76-7-3-5>.
11. Жердев В.П., Бойко С.С., Месонжник Н.В. и др. Экспериментальная фармакокинетика препарата дилепт // *Эксп. и клин. фармакол.* 2009;72(3):16–21. [Zherdev VP, Boiko SS, Mesonzhnik NV, et al. Experimental pharmacokinetics of the new neurotensin-derived antipsychotic drug dilept. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya.* 2009;72(3):16–21. (In Russ).] DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2009-72-3-16-21>.
12. Ganapathy ME, Prasad PD, Mackenzie B, et al. Interaction of anionic cephalosporins with the intestinal and renal peptide transporters PEPT 1 and PEPT 2. *Biochem. Biophys. Acta.* 1997;1324(2) 296–308. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0005-2736\(96\)00234-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2736(96)00234-9).
13. Бойко С.С., Колыванов Г.Б., Жердев В.П., и др. Экспериментальное исследование фармакокинетики триптофансодержащего дипептида ГБ-115 // *Бюлл. экпер. биол. и мед.* 2007;144(9):285–288. [Boyko SS, Kolyvanov GB, Zherdev VP, et al. Experimental study of the pharmacokinetics of a tryptophan-containing dipeptide GB-115. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2007;144(9):285–288. (In Russ).] DOI: <https://doi.org/10.1007/s10517-007-0319-0>.

Фармакокинетика дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 у крыс

Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Бочков П.О., Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Тарасюк А.В., Гудашева Т.А.

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

Резюме. На крысах изучена фармакокинетика соединения ГСБ-106 после различных способов введения. После однократного перорального введения исследуемое вещество в организме крыс определяется на протяжении 4 ч. Период полуэлиминации составил 0,65 ч. Показано, что тканевая доступность ГСБ-106 в хорошо васкуляризованных органах (печень, почки, селезёнка) выше, чем в скелетной мускулатуре крыс. В органе-мишени — мозге данный показатель составил 0,05. После однократного перорального введения ГСБ-106 крысам в дозе 150,0 мг/кг в суточной моче исходное соединение не обнаружено, а в кале обнаружено 0,0001 % ГСБ-106 от введённой дозы. Абсолютная биодоступность соединения ГСБ-106 у крыс составила 5,6 %.

Ключевые слова: антидепрессанты; ГСБ-106; доклиническая фармакокинетика; абсолютная биодоступность; тканевая доступность

Для цитирования:

Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Бочков П.О., Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Тарасюк А.В., Гудашева Т.А. Фармакокинетика дипептидного миметика BDNF ГСБ-106 у крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 1. – С. 37–43. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10038.

Pharmacokinetics of dipeptide mimetic BDNF GSB-106 in rats

Zherdev V.P., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Bochkov P.O., Gribakina O.G., Shevchenko R.V., Tarasyuk A.V., Gudasheva T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Pharmacokinetics of the GSB-106 in variety of administration ways in rats was studied. After single oral administration the test substance was determined for 4 h in the blood plasma. Half-life was 0.65 h. The GSB-106 tissue availability in high-vascularized organs (liver, kidney, spleen) was over then skeletal muscle. In brain (target-organ) that parameter was 0.05. In the 24-hour urine the parent compound was not detected and in the feces were determined of 0.0001 % GSB-106 after oral administration in dose 150 mg/kg. The absolute bioavailability of GSB-106 was 5.6 %.

Keywords: antidepressants; GSB-106; preclinical pharmacokinetics; absolute bioavailability; tissue availability

For citations:

Zherdev VP, Kolyvanov GB, Litvin AA, Bochkov PO, Gribakina OG, Shevchenko RV, Tarasyuk AV, Gudasheva TA. Pharmacokinetics of dipeptide mimetic BDNF GSB-106 in rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:37–43. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10038.

Введение

Депрессия и связанные с ней расстройства психики в последние годы затронули во всех странах и регионах мира порядка 350 миллионов человек [1]. Большое число клинических и экспериментальных данных свидетельствуют о вовлечении в патогенез депрессии нейротрофинов, в частности мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor; BDNF). В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе структуры четвёртой петли BDNF сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик ГСБ-106, представляющий собой замещённый димерный дипептид, гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) [2]. В процессе фармакологического скрининга (однократное введение в тесте вынужденного плавания по Порсолту) четырёх соединений (миметиков первой и четвёртой петель BDNF) дипептид ГСБ-106 был отобран как вещество, обладающее антидепрессивной активностью у мышей линии Balb/c [3]. Исследования ГСБ-106 *in vitro* на культуре immortalized клеток линии HT22 гиппокампа мыши показали, что в концентрации от 10^{-5} до 10^{-8} М это соединение проявляет нейропротективную

активность на моделях окислительного стресса и глутаматной токсичности. Нейропротективное действие ГСБ-106 выявлено также на клетках линии SH-SY5Y нейробластомы человека в условиях действия нейротоксина 6-оксидофамина [4]. На крысах и мышах ГСБ-106 проявлял антидепрессивную активность в дозе 0,1–10 мг/кг внутрибрюшинно и перорально в моделях неизбежного плавания, подвешивания за хвост и выученной беспомощности [5]. ГСБ-106 оказывал стимулирующее влияние на нейрогенез в условиях субхронического стресса у мышей, вызванного контактом с хищником [6]. Предварительные токсикологические исследования показали, что ГСБ-106 нетоксичен (LD_{50} для беспородных мышей-самцов $>4,5$ г/кг) и проникает через гематоэнцефалический барьер.

Необходимым этапом разработки оригинального лекарственного средства является доклиническое изучение его фармакокинетики (ФК). Поэтому цель настоящего исследования заключалась в изучении процессов всасывания, распределения и экскреции соединения ГСБ-106 после однократного и многократного (4-кратного) внутривенного и перорального введения крысам.

Методы исследования

На рис. 1 представлена структурная формула изучаемого соединения.

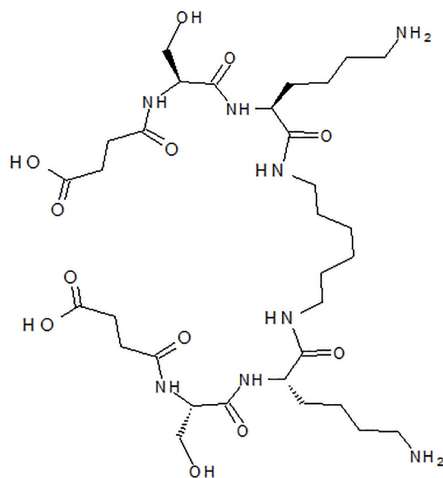


Рис. 1. Структурная формула ГСБ-106

Фармацевтическая субстанция представляет собой гигроскопичный порошок, белого цвета, без запаха, очень легко растворима в воде, легко в диметилсульфоксиде и нерастворима в этиловом спирте, хлороформе. Молекулярная масса ГСБ-106 – 746,85 г/моль.

Изучение фармакокинетики ГСБ-106 проводили на белых беспородных крысах-самцах (масса тела 200–300 г), полученных из питомника Филиал «Столбовая» ФГБУ науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (Московская область). Фармацевтическую субстанцию вводили животным перорально и внутривенно в виде водного раствора в дозе 150 мг/кг. Содержание ГСБ-106 определяли в плазме крови, гомогенатах печени, селезенки, скелетной мышцы, почек, мозга, через 0,0 (контроль), 5, 15 и 30 мин, 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 и 6,0 ч после перорального введения исследуемого вещества и после внутривенного введения в плазме крови, через 0,0 (контроль), 3, 5, 15 и 30 мин, 1, 2, 3, 4 и 6 ч.

Образцы крови, тканей и органов крыс получали после декапитации животных. На каждую дискретную точку использовали по 5 животных. Для изучения экскреции ГСБ-106 с мочой и калом крыс (6 животных) собирали суточную мочу и кал, измеряли объем (массу) и закладывали для хранения в морозильную камеру.

Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией, касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами (СОП) лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Полученные путем декапитации животных образцы крови центрифугировали (2 500 об/мин в течение 10 мин) с целью получения плазмы.

Плазму крови крыс объемом 100 мкл вносили в пластиковую пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл водно-метанольного раствора (соотношение компонентов 1:1, об./об.), встряхивали на вортексе 30 с. К полученному раствору прибавляли 300 мкл ацетонитрила для преципитации белков плазмы крови, встряхивали на вортексе в течение 30 с. Полученные образцы центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость отделяли, после чего к ней добавляли 800 мкл дихлорметана для отделения водного слоя, встряхивали на вортексе (30 с) и центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 5 мин. Далее для анализа отбирали 50 мкл верхнего водного слоя.

В пластиковую пробирку вместимостью 12 мл вносили навески органов/тканей массой около 500 мг (1 почку целиком), добавляли 500 мкл водно-метанольного раствора (соотношение компонентов 50:50, об./об.), гомогенизировали. К гомогенату добавляли 1,5 мл ацетонитрила для преципитации белков, встряхивали на вортексе в течение 30 с. Полученные образцы центрифугировали при 12 000 об./мин в течение 15 мин, надосадочную жидкость отделяли, после чего к ней добавляли 4,0 мл дихлорметана для отделения водного слоя, встряхивали на вортексе и центрифугировали при 10 000 об./мин в течение 5 мин. Далее отбирали около 50 мкл верхнего водного слоя для анализа.

Мочу и кал крыс собирали в течение 24 ч после однократного п/о введения соединения в дозе 150 мг/кг. Образцы мочи крыс, хранящиеся при –50 °С, размораживали при комнатной температуре. Мочу объемом 100 мкл вносили в пластиковую пробирку типа Eppendorf объемом 1,5 мл, добавляли 100 мкл водно-метанольного раствора (соотношение компонентов 1:1, об./об.), встряхивали на вортексе 30 с. Далее поступали как описано при обработке плазмы крови.

Кал высушивали в сухожаровом шкафу при температуре 40 °С в течение 3 ч. Навеску кала (около 0,5 г) измельчали, суспендировали, добавляя 500 мкл водно-метанольного раствора (соотношение компонентов 50:50, об./об.), гомогенизировали. Далее поступали как при обработке образцов органов и тканей.

Для количественного определения ГСБ-106 в плазме крови, моче, кале и гомогенатах органов и тканей животных использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием [7].

Предел детектирования ГСБ-106 составил 25 нг/мл.

Основные ФК параметры ГСБ-106 рассчитаны модельно-независимым методом [8]: AUC_{0-t} — площадь под фармакокинетической кривой от нуля до 4 ч (площадь под кривой концентрация — время) после в/в или п/о введения; C_0 — кажущаяся концентрация вещества в плазме крови после в/в введения в нулевой

момент времени; $T_{\max}$ — время достижения максимальной концентрации исследуемого соединения в плазме крови после п/о введения; $C_{\max}$ — максимальная концентрация в плазме крови после п/о введения; C_{ss} — концентрация исследуемого вещества в плазме крови в стационарном состоянии; MRT — среднее время удерживания исследуемого соединения в организме; k_{el} — константа скорости элиминации; $t_{1/2el}$ — период, за который выводится половина введенной и всосавшейся дозы анализируемого вещества; Cl — плазменный клиренс после в/в введения; Cl/F — плазменный клиренс после п/о введения; V_d — кажущийся объём распределения после в/в введения; $V_{d/F}$ — кажущийся объём распределения после п/о введения; f_t — тканевая доступность; $f_{abs.}$ — абсолютная биодоступность.

$$f_t = \frac{AUC_{T0-t}}{AUC_{p0-t}},$$

где AUC_{T0-t} — AUC в ткани, AUC_{p0-t} — AUC в плазме крови;

$$f_{abs.} = \frac{AUC_{p0-t}}{AUC_{iv0-t}},$$

где AUC_{p0-t} — AUC в плазме крови после п/о введения препарата, AUC_{iv0-t} — AUC в плазме крови после в/в введения исследуемого вещества.

Результаты и их обсуждение

Усредненные ФК профили ГСБ-106 в плазме крови крыс после однократного п/о и в/в введения представлены на рис. 2.

Из рис. 2 видно, что снижение концентраций исследуемого соединения в плазме крови независимо от способа введения носит моноэкспоненциальный характер. Поскольку на каждую временную

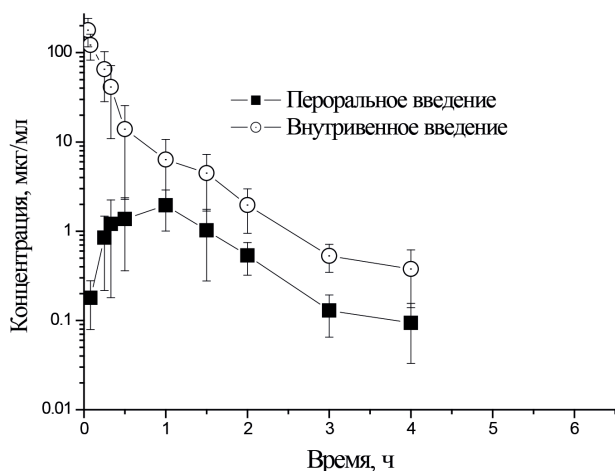


Рис. 2. Фармакокинетические профили ГСБ-106 в плазме крови крыс после однократного внутривенного и перорального введения фармацевтической субстанции ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг ($n = 5$; $\bar{x} \pm SD$)

точку использовали по 5 животных, результирующая ФК-кривая была построена по усредненным концентрациям, поэтому при расчётах ФК-параметров отсутствует статистическая обработка результатов. ФК-характеристики исследуемого соединения в плазме крови животных после однократного п/о введения представлены в табл. 1.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ГСБ-106 в плазме крови крыс после однократного п/о и в/в введения фармацевтической субстанции ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг

Параметры	Способ введения	
	в/в	п/о
C_0 (мкг/мл)	340,228	—
$C_{\max}$ (мкг/мл)	—	1,949
AUC_{0-t} (мкг/мл ч)	51,48	2,80
k_{el} (ч ⁻¹)	1,0730	1,0600
$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ (мкг/мл ч)	51,73	2,89
$t_{1/2}$ (ч)	0,65	0,65
MRT (ч)	1,40	1,34
$V_d, V_{d/F}$ (л/кг)	2,70	48,96
$Cl, Cl/F$ (л/ч/кг)	2,90	51,93
$T_{\max}$ (ч)	—	1,00
$f_{abs.}$ (%)	—	5,59

После п/о введения ГСБ-106 крысам вещество быстро всасывается из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и определяется в плазме крови на протяжении 4 ч. Учитывая, что период полуэлиминации ($t_{1/2el}$) составил 0,65 ч, ГСБ-106 можно отнести к группе «короткоживущих» лекарственных веществ.

Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$, среднее время удерживания вещества в организме (MRT — 1,34 ч) и общий плазменный клиренс (Cl/F — 51,93 л/ч/кг) указывают на короткое нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Максимальная концентрация ($C_{\max}$) в плазме крови регистрировалась через 1,0 ч ($T_{\max}$) после введения лекарственного вещества, а её величина составила 1,949 мкг/мл.

Величина кажущегося объёма распределения ($V_{d/F}$) ГСБ-106 после п/о введения в дозе 150 мг/кг составила 48,96 л/кг. Кажущийся объём распределения обычно не эквивалентен анатомическому объёму, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так, если препарат связывается преимущественно белками крови, V_d будет меньше, чем реальный. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения V_d над реальным объёмом. В нашем случае расчёт величины $V_{d/F}$ дал высокие значения, указывающие, что ГСБ-106 проникает в органы и ткани крыс [9].

В отличие от п/о введения, в/в введение ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг позволяет проследить кинетику снижения концентраций более 4 ч. Однако для корректной оценки абсолютной биодоступности мы ограничили время регистрации концентраций исследуемого вещества так же 4 часами.

Усредненная концентрационная кривая ГСБ-106 и соответствующие ей ФК-параметры исследуемого соединения в плазме крови животных после однократного в/в введения представлены на рис. 2 и в табл. 1.

Такие фармакокинетические параметры, как $t_{1/2el}$, равный 0,65 ч, MRT — 1,40 ч, также указывают на относительно короткое нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных. Кажущаяся начальная концентрация (C_0) ГСБ-106 в плазме крови крыс составила 340,228 мкг/мл.

Величина V_d значительно отличалась от значения, полученного после п/о введения, и составила 2,70 л/кг.

Абсолютная биодоступность $f_{абс.}$ составила 5,59 %, что говорит о потенциальной возможности разработки таблетированной лекарственной формы.

Важным этапом при проведении фармакокинетических исследований является изучение тканевой доступности новых лекарственных средств. Основным результатом процессов распределения является транспорт лекарственного средства в зону действия, где оно взаимодействует со структурами, определяющими эффект препарата. На основании определения величины тканевой доступности возможна количественная оценка интенсивности проникновения действующего вещества в периферические ткани.

Распределение ГСБ-106 изучали в органах и тканях, отличавшихся друг от друга различной степенью кровоснабжения (селезенка, скелетные мышцы), органах, обеспечивающих элиминацию (печень, почки), органе-мишени — мозге. Установлено, что ГСБ-106 регистрируется во всех исследуемых органах и тканях. На рис. 3 и в табл. 2 представлены полученные результаты.

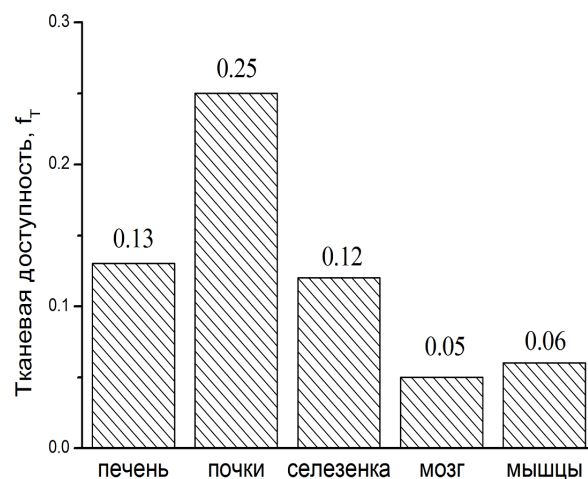


Рис. 3. Тканевая доступность ГСБ-106 в органах крыс после однократного п/о введения фармацевтической субстанции ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг.

Примечание: f_t ГСБ-106 в мозге рассчитана по результатам в/в введения.

В распределении препарата по органам прослеживается значительная гетерогенность.

Изучаемое соединение определяется в органах в течение 4 ч. Время достижения максимальной концентрации (T_{max}) ГСБ-106 во всех исследуемых органах составило 1,0 ч.

Максимальная концентрация (C_{max}) ГСБ-106 возрастала в ряду мозг — мышцы — селезенка — печень — почки — плазма крови (0,016; 0,090; 0,132; 0,178; 0,317; 1,949; мкг/г(мл), соответственно).

Анализ величин тканевой доступности ГСБ-106 показал, что исследуемое соединение наиболее интенсивно распределяется в хорошо васкуляризованных органах (почки, печень, селезенка), и в значительно меньшей степени — в умеренно и слабо васкуляризованных органах (скелетные мышцы) (см. рис. 3).

Тканевая доступность ГСБ-106 в системе «почки — плазма крови» составила 0,25; «печень — плазма крови» — 0,13. Для системы «селезенка — плазма

Таблица 2

Фармакокинетические параметры ГСБ-106 в плазме крови и различных тканях крыс после однократного перорального введения фармацевтической субстанции ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг

Параметры	Органы и ткани				
	Печень	Почки	Селезенка	Мышцы	Плазма крови
C_{max} (мкг/(г)мл)	0,178	0,317	0,132	0,090	1,949
T_{max} (ч)	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
AUC_{0-t} (мкг/мл(г) ч)	0,35	0,65	0,31	0,16	2,80
k_{el} (ч ⁻¹)	0,6346	0,6171	0,5867	0,9398	1,0600
$AUC_{0-\infty}$ (мкг/мл(г) ч)	0,39	0,73	0,35	0,16	2,89
$t_{1/2}$ (ч)	1,09	1,12	1,18	0,74	0,65
MRT (ч)	2,02	2,04	2,12	1,71	1,34
f_t	0,13	0,25	0,12	0,06	—

крови» этот показатель составил 0,12. Для скелетных мышц — 0,06.

Из-за недостаточно высокой чувствительности методики количественного определения ГСБ-106 в биоматериале (25 нг/мл) определить его концентрации в органе-мишени (мозге) во все дискретные временные интервалы наблюдения не удалось (см. табл. 2). Поэтому данные f_t после п/о введения ГСБ-106 для мозга отсутствуют. Оценить величину тканевой доступности исследуемого соединения в мозге оказалось возможным после в/в введения ГСБ-106. Для органа-мишени — мозга — f_t составила 0,05 (см. рис. 3).

Анализ фармакокинетического параметра, характеризующего элиминацию изучаемого соединения — $t_{1/2el}$, позволяет заключить, что ГСБ-106 довольно быстро выводится из организма животных, на что указывают значения периода полувыведения препарата из органов, которые составляют от 0,74 ч для скелетных мышц и до 1,18 ч для селезёнки.

После однократного п/о введения фармацевтической субстанции ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг в суточной моче крыс исходное соединение не обнаружено, а в суточном кале крыс в среднем обнаружено около 0,0001 % исходного соединения. Таким образом ГСБ-106 полностью всасывается из ЖКТ экспериментальных животных в системный кровоток и затем, по-видимому, подвергается интенсивной биотрансформации с образованием метаболитов.

Дополнительно изучена фармакокинетика ГСБ-106 в плазме крови крыс после его многократного (4-кратного) п/о введения в дозе 150 мг/кг. Интервал дозирования исследуемого вещества определяли исходя из величины $t_{1/2el}$ ГСБ-106 после однократного п/о введения, т. е. 0,65 ч. Другими словами, через 3,3 ч после введения уровень исследуемого вещества в плазме крови составит немногим более 3,1 % максимальной концентрации. Поэтому для обеспечения достаточно высоких концентраций ГСБ-106 в плазме крови после его п/о введения, а также для удобства дозирования препарат вводили каждые 2 ч. Фармакокинетические параметры исследуемого соединения в плазме крови животных представлены в табл. 3.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры ГСБ-106 в плазме крови крыс после 4-кратного перорального введения фармацевтической субстанции ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг

Параметры	$t_{1/2el}$ ч	C_{ss} мкг/ мл	$AUC_{0 \rightarrow t}$ мкг/ мл×ч	$AUC_{0 \rightarrow \infty}$ мкг/ мл×ч	k_{el} ч ⁻¹	Cl/F л/ч/кг	V_d/F л/кг
Значения	0,82	1,529	11,46	11,59	0,8473	51,77	61,10

Из табл. 3 следует, что после 4-кратного введения внутрь ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг (общая доза равна 600 мг/кг) дозозависимый параметр — период полувыведения (см. табл. 1) практически не изменился в сравнении с однократным введением. Его величина составила 0,82 ч. Кажущийся объём распределения увеличился на 20 % по сравнению с однократным п/о введением (с 48,96 до 61,10 л/кг). Полученные результаты указывают, что ГСБ-106, по-видимому, практически не кумулируется в организме крыс.

Выводы

1. После однократного перорального введения ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг в организме крыс исследуемое соединение определяется на протяжении 4 ч. Период полувыведения ГСБ-106 из плазмы крови после перорального введения составил 0,65 ч.

2. Показано, что ГСБ-106 распределяется по органам и тканям неравномерно. Тканевая доступность уменьшалась в ряду: почки>печень>селезёнка>мышцы>мозг (0,25>0,13>0,12>0,06>0,05).

3. После однократного перорального введения ГСБ-106 в дозе 150 мг/кг в суточной моче исходное соединение не обнаружено, а в суточном кале регистрировалось крайне незначительное количество неизмененного соединения от введенной дозы.

4. Абсолютная биодоступность соединения ГСБ-106 после однократного перорального введения составила 5,6 %, что говорит о перспективе создания таблетированной лекарственной формы.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Жердев Владимир Павлович

ORCID: 0000-0003-2710-7134

SPIN-код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zherdev Vladimir

ORCID: 0000-0003-2710-7134

SPIN-code: 2213-9592

MD, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литвин Александр Алексеевич
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: litbiopharm@yandex.ru
 ORCID ID: 0000-0002-2818-3457
 SPIN-код: 6193-5770
 д. б. н., в. н. с., лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
 фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Колыванов Геннадий Борисович
 ORCID: 0000-0002-2571-0047
 SPIN-код: 2538-8639
 д. б. н., в. н. с., лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
 фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Шевченко Роман Владимирович
 ORCID: 0000-0003-4646-7733
 SPIN-код: 1844-6202
 к. м. н., научный сотрудник лаборатории
 фармакокинетики ФГБНУ «Научно-
 исследовательский институт фармакологии
 имени В.В. Закусова», Москва

Бочков Павел Олегович
 ORCID: 0000-0001-8555-5969
 SPIN-код: 5576-8174
 к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакокинетики
 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
 фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Грибакина Оксана Геннадиевна
 ORCID: 0000-0002-4604-4346
 SPIN-код: 6266-8161 к. б. н., н. с. лаборатории
 фармакокинетики ФГБНУ «Научно-
 исследовательский институт фармакологии
 имени В.В. Закусова», Москва

Тарасюк Алексей Валерьевич
 ORCID: 0000-0001-9750-4157
 SPIN-код: 9670-2415
 н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов
 ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
 фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Гудашева Татьяна Александровна
 ORCID: 0000-0002-5185-4474
 SPIN-код: 4970-0006
 профессор, д. б. н., член-корреспондент РАН,
 Руководитель отдела химии лекарственных
 средств ФГБНУ «Научно-исследовательский
 институт фармакологии имени В.В. Закусова»,
 Москва

Litvin Alexander
Corresponding author
 e-mail: litbiopharm@yandex.ru
 ORCID ID: 0000-0002-2818-3457
 SPIN-code: 6193-5770
 Doctor of Biological Sciences, Leading researcher of
 the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov
 institute of Pharmacology», Moscow

Kolyvanov Gennadiy
 ORCID: 0000-0002-2571-0047
 SPIN- code: 2538-8639
 Doctor of Biological Sciences, Leading researcher
 of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
 «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Shevchenko Roman
 ORCID: 0000-0003-4646-7733
 SPIN-code: 1844-6202
 PhD, Research Officer of laboratory pharmacoki-
 netics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
 Moscow

Bochkov Pavel
 ORCID: 0000-0001-8555-5969
 SPIN- code: 5576-8174
 Candidate of Biological Sciences, Senior Research-
 er of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
 «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Gribakina Oxana
 ORCID: 0000-0002-4604-4346
 SPIN-code: 6266-8161
 Candidate of Biological sciences, Researcher of
 the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zaku-
 sov institute of Pharmacology», Moscow

Tarasiuk Aleksey
 ORCID: 0000-0001-9750-4157
 SPIN-code: 9670-2415
 Researcher of the laboratory of peptide bioregula-
 tors FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
 Moscow

Gudasheva Tatiana
 ORCID: 0000-0002-5185-4474
 SPIN- code: 4970-0006
 Professor, doctor of biological Sciences, RAS cor-
 responding member, Head of medicinal chemistry
 department FSBI «Zakusov institute of Pharma-
 cology», Moscow

Литература / References

1. World Health Organization, World suicide prevention day 2012 http://www.who.int/mediacentre/events/annual/world_suicide_prevention_day/en/ Accessed 16.6.2012.
2. Патент РФ на изобретение № 2410392 / 27.01.11. Бюлл. № 3 Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейтрофинов NGF и BDNF [Patent RUS № 2410392/ 27.01.11. Byul. №3 Seredenin S., Gudasheva T. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. (In Russ).] URL: <http://www.freepatent/2572076>. Ссылка активна на 09.09.2018.
3. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В. и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора // *Биоорганическая химия*. — 2012. — Т. 38. — № 8. — С. 280–290. [Gudasheva T, Tarasyuk A, Pomogaybo S, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of brain-derived neurotrophic factor. *Bioorganicheskaya khimia*. 2012;38(8):280-290 (In Russ).]
4. Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. и др. Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ–106 в экспериментах *in vitro* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2013. — Т. 155. — № 3. — С. 319–323. [Logvinov I, Antipova T, Gudasheva T, et al. Neuroprotective properties of dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor. *Bulleten experimentalnoy biologii i medicini*. 2013;155(3):319-323 (In Russ).]
5. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., и др. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ–106 // *Acta Naturae*. — 2013. — Т. 5. — № 4(19). — С. 116–120. [Seredenin S, Voronina T, Gudasheva T, et al. Antidepressivnyi effekt originalnogo nizkomolekulyarnogo mimetika BDNF, dimernogo peptida GSB-106. *Acta Naturae*. 2013;5(4):116–120 (In Russ).]
6. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора предотвращает нарушение нейрогенеза у стрессированных мышей // *Бюлл. экпер. биол. и мед.* — 2016. — Т. 162. — № 10. — С. 448–451. [Gudasheva T, Povarnina P, Seredenin S. Dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor prevents of neurogenesis damage in stressed mice. *Bulleten experimentalnoy biologii i medicini*. 2016;162(10): 448–451. (In Russ).]
7. Грибакина О.Г., Бочков П.О., Шевченко Р.В., Жердев В.П. Валидация методики количественного определения соединения ГСБ–106 в плазме крови крыс с использованием ВЭЖХ/МС. /5-й съезд фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарств»; май 14–18, 2018; Ярославль. [Gribakina O, Bochkov P, Shevchenko R, Zherdev V. Validatsiya metodiki kolichestvennogo opredeleniya soedineniya GSB-106 v plasme krovi kris s ispolzovaniem HPLC/MS. (Congress proceedings) 5-th Pharmacologists Congress of Russia “Nauchnye osnovy poiska i sozdaniya novykh lekarstv. 2018 May 14–18; Yaroslavl (In Russ).] DOI:10.30906/0869-2092-2018-81.
8. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-ind системы оценки параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов // *Химико-фармацевтический журнал*. — 1991. — Т. 25. — № 10. — С. 16–19. [Agafonov A, Piotrovskiy V. M-ind program of pharmacokinetic parameters system evaluation by model-independent method of statistic moments. *Khimiko-farmaceuticheskiy zhurnal*. 1991;25(3):16–19. (In Russ).]
9. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. *Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение*. — М.: Издательство РАМН; 2003. [Sergienko VI, Gelliff R, Bondareva IB. *Prikladnaya farmakokinetika i klinicheskoye primeneniye*. Moscow: Izdatelstvo RAMN; 2003. (In Russ).]

Исследование хронической токсичности потенциального анксиолитика ГМЛ-1

Мирошкина И.А.¹, Сорокина А.В.¹, Волкова А.В.¹, Качалов К.С.^{1,2},
Алексеев И.В.^{1,2}, Захаров А.Д.¹, Алексеева С.В.¹, Дурнев А.Д.¹

¹ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

² – Московский медицинский университет «Реавиз», Москва

Резюме. Актуальность. Исследование хронической токсичности является необходимым этапом доклинической оценки вновь синтезированного фармакологического вещества ГМЛ-1, обладающего анксиолитической активностью. Целью настоящей работы стало изучение хронической токсичности таблетированной формы ГМЛ-1. Методы. ГМЛ-1 в виде таблеточной массы ежедневно вводили самцам и самкам крыс и кроликов перорально в дозах 1 и 10 мг/кг, в течении одного месяца. Наблюдали за внешним видом и общим состоянием животных, оценивали динамику массы тела, потребление корма и воды, поведенческие реакции, ректальную температуру, состояние сердечно-сосудистой системы (электрокардиография, измерение артериального давления), проводили гематологические, биохимические и патоморфологические исследования для определения возможных токсических эффектов и их обратимости, возможных органов-мишеней и местного раздражающего действия. Результаты. Параметры, регистрируемые в проведенных исследованиях, не выходили за пределы референтных значений для данных видов животных. ГМЛ-1 в условиях настоящего эксперимента не вызывал закономерных изменений во внутренних органах крыс и кроликов. Заключение. ГМЛ-1, вводимый крысам и кроликам в течение одного месяца перорально ежедневно в дозах 1 и 10 мг/кг, не продемонстрировал токсических эффектов и местного раздражающего действия.

Ключевые слова: ГМЛ-1; анксиолитик; хроническая токсичность; крысы; кролики

Для цитирования:

Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Волкова А.В., Качалов К.С., Алексеев И.В., Захаров А.Д., Алексеева С.В., Дурнев А.Д. Исследование хронической токсичности потенциального анксиолитика ГМЛ-1 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 1. – С. 44–53. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10039.

Study of acute toxicity of potential anxiolytic GML-1

Miroshkina I.A.¹, Sorokina A.V.¹, Volkova A.V.¹, Kachalov K.S.^{1,2}, Alekseev I.V.^{1,2}, Zaharov A.D.¹, Alekseeva S.V.¹, Durnev A.D.¹

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Moscow Medical University «Reaviz», Moscow

Resume. Relevance. Assessment of chronic toxicity is a necessary stage of preclinical research of a newly synthesized pharmacological substance GML-1 having anxiolytic activity. The aim of present research is study of chronic toxicity of tablet form GML-1. Methods. Tablet mass of GML-1 was administered orally to males and females of rats and rabbits in doses of 1 and 10 mg / kg for one month. The appearance and the general state of animals were observed, the dynamics of body weight, feed and water consumption, behavioral reactions, rectal temperature, state of the cardiovascular system (electrocardiography, blood pressure measurement) were evaluated, hematological, biochemical and pathomorphological examinations were conducted to determine possible toxic effects and their reversibility, possible target organs and local irritant effect. Results. Parameters registered in the conducted studies did not get out the limits of the reference values for these species of animals. GML-1 did not cause any regular changes in the structure of the internal organs of rats and rabbits. Conclusion. GML-1, administered to rats and rabbits for one month orally daily in doses of 1 and 10 mg / kg, did not demonstrate toxic effects and local irritant effect.

Keywords: GML-1; anxiolytic; chronic toxicity; rats; rabbits

For citations:

Miroshkina IA, Sorokina AV, Volkova AV, Kachalov KS, Alekseev IV, Zaharov AD, Alekseeva SV, Durnev AD. Study of acute toxicity of potential anxiolytic GML-1. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;1:44–53. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2019-10039.

Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезировано новое оригинальное фармакологически активное производное пирроло[1,2-а]пиразина (ГМЛ-1), по данным исследований специфической фармакологической активности определяемое как анксиолитик, лиганд 18 кДа транслокаторного белка (TSPO). Исследование хронической токсичности является необходимым этапом доклинической оценки безопасности лекарственных средств.

Цель исследования

Целью настоящей работы стало изучение хронической токсичности ГМЛ-1 в виде таблетированной лекарственной формы. Задачи исследования — определить возможные токсические эффекты ГМЛ-1 при его ежедневном пероральном введении в течение одного месяца, возможные органы-мишени токсических воздействий и местное раздражающее действие, а также обратимость возможных токсических эффектов.

Материалы и методы

Исследуемое вещество. В эксперименте использовали таблеточную массу ГМЛ-1. Каждые 100 г таблеточной массы содержали ГМЛ-1 — 1 г; микрокристаллическую целлюлозу (МСС-101) — 88 г; поливинилпирролидон (Kollidon 25) — 6 г, полипласдон XL — 4 г; магния стеарат — 1 г. ГМЛ-1 был произведён в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (серия 220916).

Животные. Исследование проводили на белых беспородных крысах обоего пола ($n = 48$), а также кроликах породы шиншилла обоего пола ($n = 36$). Все животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с крысами и кроликами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [1] на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123. Крыс разделили на 4 группы: 1-я гр. — контроль; 2-я гр. — препарат в фармакологически эффективной дозе (1 мг/кг в пересчёте на активное вещество); 3-я гр. — препарат в дозе, превышающей фармакологически эффективную в 10 раз (10 мг/кг в пересчёте на активное вещество); 4-я гр. — препарат в дозе 10 мг/кг в пересчёте на активное вещество («отставленная группа», сформированная для оценки обратимости возможных токсических эффектов). Кроликов делили на 3 группы: 1-я гр. — контроль; 2-я гр. — препарат в дозе 1 мг/кг в пересчёте на активное вещество; 3-я гр. — препарат в дозе 10 мг/кг в пересчёте на активное вещество. Животные контрольных групп получали 1 % раствор крахмала в эквивалентном объёме. ГМЛ-1 в 1 % растворе крахмала в экспериментальных группах или 1 % раствор крахмала в контроле вводили перорально (в соответствии с планируемым в клинике способом введения), с помощью металлического атравматического зонда крысам и с помощью одноразовых шприцов кроликам [2–4] ежедневно, в течение одного месяца. Перед каждым введением препарата оценивали внешний вид и поведение экспериментальных животных [5].

Исследование динамики массы тела. Массу крыс и кроликов определяли с помощью электронных весов SPU 601 (OHAUS Corp., США). Измерения проводили до начала введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала, далее еженедельно, а также перед выведением животных из эксперимента. У крыс «отставленной» группы № 4 данные измерения проводили также через 2 недели после заключительного введения ГМЛ-1, для оценки обратимости возможных токсических эффектов.

Суточное потребление корма и воды у крыс всех групп определяли до начала введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала, далее еженедельно, а также через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1–4),

через 2 недели после заключительного введения ГМЛ-1 (только крысы «отставленной» группы № 4).

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) [6]. Исследования проводили до начала введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала, через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1–3), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

Электрокардиографические исследования (ЭКГ) у крыс проводили с помощью компьютерного электрокардиографа «Поли-Спектр-8/В» во втором стандартном отведении. Регистрацию данных проводили через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1–3), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

Неинвазивное измерение пульса и артериального давления (АД) у крыс проводили с использованием модулей аппаратного комплекса ADInstruments и программного обеспечения LabChart (Австралия). Определяли пульс, систолическое, диастолическое и среднее артериальное давление. Исследования проводились до начала введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала, через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1–3 и кролики всех групп), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

Измерения ректальной температуры у крыс осуществляли с использованием ректального датчика на оборудовании производства компании ADInstruments Ltd (Австралия). Исследования проводились до начала введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала, через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1–3), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

Клиническое исследование крови у крыс и кроликов осуществляли с помощью автоматического гематологического анализатора «Abacus Unior vet», 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 [7, 8]. Взятие материала проводили до начала введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала, через 24 ч после заключитель-

ного введения (крысы групп №№ 1-3 и кролики всех групп), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

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. Взятие материала проводили через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1-3 и кролики всех групп), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

Биохимические исследования крови у крыс и кроликов осуществляли с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «Chem Well 2910 Combi» (США). Определяли содержание глюкозы, общего белка, альбумина, креатинина, мочевины, активность аланин- и аспаратаминотрансферазы. Взятие материала проводили через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1-3 и кролики всех групп), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

Биохимические исследования мочи у крыс проводили с помощью анализатора мочи «HandUReader» (Венгрия) и автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «Chem Well 2910 Combi», США, используя наборы реагентов для диагностики *in vitro* производства компании «SPINREACT S.A.» (Испания). Определяли удельный вес, кислотность, содержание глюкозы, белка. Взятие материала проводили до начала введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала (все группы крыс), через 24 ч после заключительного введения (крысы групп №№ 1-3), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4).

Патоморфологические исследования. Все животные опытных и контрольных групп были подвергнуты эвтаназии и патологоанатомическому вскрытию с последующей оценкой микроскопической картины внутренних органов [2, 9], через 24 ч после заключительного введения (крысы и кролики групп №№ 1-3), через 2 недели после заключительного введения (только крысы «отставленной» группы № 4). Внутренние органы фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина (фрагменты 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) или 96 % этаноле (фрагменты головного мозга крыс). 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. Срезы микроскопировали (микроскоп Nikon eclipse 55i,) в проходящем свете [10–13].

Оценка местного раздражающего действия. Возможное местное раздражающее действие ГМЛ-1 при пероральном введении оценивали клинически, затем макроскопически при проведении патологоанатомического вскрытия, а также микроскопически при исследовании гистологических срезов пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки.

Статистическая обработка результатов. Нормальность распределения полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Если данные имели нормальное распределение и дисперсии выборок были равны, для определения статистической значимости различий между независимыми выборками использовали однофакторный дисперсионный анализ с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену-Кейлсу. Для сравнения зависимых выборок использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. Результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок.

Если нормальность распределения отсутствовала или дисперсии выборок статистически различались, использовали непараметрические методы статистики. В случае независимых выборок сравнение проводили с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Краскалу-Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Фридмана, с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. Полученные результаты выражали в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Во всех случаях различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

В результате проведённых исследований было установлено, что ГМЛ-1 в дозах 1 и 10 мг/кг не вызывал изменений общего состояния и внешнего вида экспериментальных крыс и кроликов.

Исследование динамики массы тела. Препарат ГМЛ-1 в изученных дозах при ежедневном пероральном введении не влиял на динамику массы крыс и кроликов (табл. 1, 2).

Суточное потребление корма и воды у крыс. В результате наблюдения за потреблением корма было установлено, что в контрольной группе самки крыс в течение всего эксперимента потребляли меньше корма, чем до введения 1 % раствора крахмала. Самцы этой

Таблица 1

Влияние ГМЛ-1 на динамику массы крыс при пероральном введении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в течение месяца

Группа	Масса крыс до введения препарата, г	Масса, 1-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 2-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 3-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 4-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 5-я неделя после введения, г	Прирост массы, %	Масса, 6-я неделя после введения, г	Прирост массы, %
1-я гр. Контроль	♀	222,0 219÷229	235,0* 228÷245	5,6 4,8÷6,9	12,3 9,1÷12,9	254,5* 247÷259	13,6 12,1÷15,6	262,5* 253÷268	18,0 15,5÷19,6	—	—	—	—
	♂	253,5 250÷262	287,5* 278÷294	12,4 11,7÷15,2	22,3 19,6÷22,6	316,5* 308÷334	24,9 23,2÷30,0	341,5* 324÷353	33,2 32,2÷34,4	—	—	—	—
ГМЛ-1 2-я гр. 1 мг/кг	♀	222,5 214÷235	239,5* 225÷25	7,0 4,8÷7,7	10,1 8,4÷12,0	258,5* 246÷271	15,4 12,9÷16,9	261,5* 247÷278	17,3 14,5÷18,3	—	—	—	—
	♂	273,5* 267÷282	305,5* 287÷320	11,3 6,7÷14,3	15,8* 12,0 20,1	335,5* 312÷352	22,9 18,9÷25,2	345,5* 328÷365	25,6 22,8÷31,3	—	—	—	—
ГМЛ-1 3-я гр. и 4-я гр. 10 мг/кг	♀	240,5* 228÷256	254,0** 239÷267	5,2 2,7÷6,8	8,6 6,6÷11,3	269,5* 248÷289	11,7 7,7÷14,0	284,0* 256÷301	16,8 12,4÷19,6	285,5* 260÷320	16,5 11,8÷18,7	290,5 257÷314	15,6 12,3÷22,2
	♂	299,0* 278÷304	317,5** 300÷33	8,7* 7,1÷10,4	16,3* 15,1 20,8	360,0** 345÷386	25,2 21,1÷27,0	383,0** 357÷412	32,1 26,4÷34,8	391,5* 356÷438	34,1 28,1÷41,3	386,0 374÷435	32,5 26,5÷47,0

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; * — различие с фоном достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) между 3-й и 4-й группой; межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела-Уоллиса; для проверки различий между связанными выборками применялся критерий Вилкоксона.

Таблица 2

Влияние ГМЛ-1 на динамику массы кроликов при пероральном введении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в течение месяца

Группа	Масса кроликов до введения препарата, кг	Масса, 1-я неделя после введения, кг	Прирост массы, %	Масса, 2-я неделя после введения, кг	Прирост массы, %	Масса, 3-я неделя после введения, кг	Прирост массы, %	Масса, 4-я неделя после введения, кг	Прирост массы, %
Контроль 1-я группа	♀	2,61 2,59÷2,64	2,83 2,79÷2,87	7,44 7,09÷11,97	11,06 9,70÷16,99	3,01 2,99÷3,10	15,61 14,02÷18,66	3,10 3,00÷3,28	21,19 13,64÷27,80
	♂	2,50 2,46÷2,52	2,69 2,51÷2,75	6,31 5,02÷8,84	10,61 8,54÷12,45	2,83 2,75÷2,90	12,84 8,82÷16,32	2,88 2,64÷3,06	16,46 7,32÷19,68
ГМЛ-1 2-я группа 1 мг/кг	♀	2,58 2,56÷2,78	2,79* 2,69÷2,91	5,63 4,68÷6,25	13,38 10,07÷17,44	3,13* 3,06÷3,16	17,44 12,86÷22,48	3,29* 3,25÷3,38	26,29 17,63÷32,03
	♂	2,57 2,48÷2,66	2,71* 2,60÷2,84	5,36 4,84÷5,65	7,34 6,45÷8,06	2,73* 2,57÷3,02	5,98 4,17÷13,45	2,83* 2,62÷3,12	11,35 6,05÷16,00
ГМЛ-1 3-я группа 10 мг/кг	♀	2,61 2,59÷2,64	2,83* 2,79÷2,87	7,44 7,09÷11,97	11,06 9,70÷16,99	3,01* 2,99÷3,10	15,61 14,02÷18,66	3,10* 3,00÷3,28	21,19 13,64÷27,80
	♂	2,50 2,46÷2,52	2,69* 2,51÷2,75	6,31 5,02÷8,84	10,61* 8,54÷12,45	2,83* 2,75÷2,90	12,84 8,82÷16,32	2,89* 2,64÷3,06	16,46 7,32÷19,68

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; * — различие с фоном достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) между 3-й и 4-й группой; межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела-Уоллиса; для проверки различий между связанными выборками применялся критерий Вилкоксона.

группы, наоборот, первые три недели потребляли больше гранулята комбикорма, чем в начале эксперимента. Однако на 4-й неделе регистрируемый показатель был, так же как у самок, ниже исходного значения на 13 %. У крыс 2-й группы, которым в течение одного месяца вводили ГМЛ-1 в дозе 1 мг/кг, не выявлено закономерных различий в потреблении корма с контролем и исходными данными. Следует отметить, что у самок к окончанию эксперимента показатели потребления гранулята комбикорма были ниже контрольных на 14 %, в отличие от самцов, у которых данный показатель на 4-й неделе введения препарата был значимо выше контрольного на 21 %. Отмечено, что колебание показателей потребления корма самцами 3-й и 4-й групп, получавших в течение месяца ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг, не имело закономерных различий между этими группами и контролем. Потребление гранулята комбикорма самками этих групп к окончанию эксперимента не имело значимых различий с контролем, у самцов потребление корма было на 18 % выше контрольного показателя. У крыс 4-й «отставленной» группы, исследованных через 2 недели после отмены препарата, показатели потребления корма были на уровне контроля (табл. 3).

Установлено, что у животных контрольной группы к окончанию эксперимента потребление воды было значимо меньше, чем до введения 1 % раствора крахмала.

Колебание показателей потребления жидкости крысами опытных групп в первые три недели введения ГМЛ-1 не имело закономерных различий с контролем и исходными данными. Следует отметить, что через месяц самки и самцы этих групп пили значимо больше воды, чем контрольные животные (табл. 4).

Изучение поведенческих реакций у крыс. У животных контрольной группы в тесте «Открытое поле» через один месяц введения 1 % раствора крахмала не отмечалось значимых различий с исходными данными, за исключением снижения двигательной активности и уменьшения в 4-9 раз числа выхода в центр (табл. 5). Такие изменения являются закономерными после длительного пребывания животных, не получающих психотропные соединения, в ограниченном пространстве. К окончанию эксперимента у животных экспериментальных групп отмечались те же различия в показателях с исходными данными, что и в контроле. Важно, что при введении препарата ГМЛ-1 в течение месяца в дозах 1 и 10 мг/кг в тесте «открытое поле» показатели ориентировочно-исследовательской активности крыс опытных групп не имели значимых различий с контролем.

Электрокардиографические исследования у крыс. ГМЛ-1 не вызывал патологических изменений, регистрируемых по показателям ЭКГ во втором отведении у экспериментальных животных.

Неинвазивное измерение пульса и АД у крыс. При исследовании пульса и АД у крыс контрольной и опытных групп было установлено, что в ходе эксперимента изученные показатели не выходили за пределы физиологической нормы для данного вида животных. Таким образом, ГМЛ-1 в дозах 1 и 10 мг/кг не вызывал изменений пульса и АД у экспериментальных животных.

Измерения ректальной температуры у крыс. ГМЛ-1 не вызывал значимых изменений ректальной температуры у экспериментальных животных, исследуемый показатель находился в пределах физиологической нормы у крыс.

Таблица 3

Влияние ГМЛ-1 на суточное потребление корма у крыс при пероральном введении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в течение месяца

Корм, гр.								
Группа		фон	1-я неделя	2-я неделя	3-я неделя	4-я неделя	5-я неделя «отст.» гр.	6-я неделя «отст.» гр.
Контроль 1-я группа	♀	19,9 19,7÷20,6	13,9 [■] 13,5÷14,5	15,0 [■] 14,8÷15,3	17,0 [■] 16,5÷17,3	17,4 [■] 16,7÷17,7	—	—
	♂	22,5 22,2÷23,2	26,3 [■] 25,4÷26,9	25,1 [■] 23,9÷26,0	24,4 [■] 23,8÷25,8	19,6 [■] 18,6÷20,3	—	—
ГМЛ-1 2-я группа 1 мг/кг	♀	15,3 14,7÷16,2	13,9 [■] 13,0÷14,5	14,4 [■] 13,6÷14,9	17,1 [■] 16,3÷17,9	15,0 ^{■*} 14,1÷15,9	—	—
	♂	22,7 22,2÷23,4	21,2 ^{■*} 19,9÷22,2	27,5 [■] 25,6÷28,8	20,0 ^{■*} 18,6÷21,0	23,7 ^{■*} 22,5÷25,1	—	—
ГМЛ-1 3-я и 4-я «отст.» гр. 10 мг/кг	♀	15,0 14,0÷15,5	13,1 [■] 12,8÷14,2	15,2 14,2÷16,5	17,7 [■] 16,2÷19,9	15,9 [■] 15,3÷17,6	16,1 [■] 14,7÷18,1	15,9 [■] 14,0÷17,1
	♂	28,7 26,6÷29,1	24,2 [■] 22,0÷27,3	22,1 ^{■*} 21,1÷23,4	24,1 [■] 23,0÷25,8	23,2 ^{■*} 22,3÷25,1	22,0 [■] 20,0÷24,7	20,8 [■] 20,1÷23,4

Примечания: Данные представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей; [■] — различие с фоном достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; * — различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$.

Таблица 4

Влияние ГМЛ-1 на суточное потребление воды у крыс при пероральном введении в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в течение месяца

Группа		Вода, мл						
		Исходные данные	1-я неделя	2-я неделя	3-я неделя	4-я неделя	5-я неделя «отст.» гр.	6-я неделя «отст.» гр.
Контроль 1-я группа	♀	33,2 32,8÷34,3	29,9 [■] 29,0÷31,1	33,4 33,0÷33,9	26,9 [■] 26,1÷27,3	20,0 [■] 19,3÷20,5	—	—
	♂	24,6 24,3÷25,4	39,5 [■] 38,1÷40,3	41,0 [■] 39,0÷42,5	24,4 23,8÷25,8	20,3 [■] 19,3÷21,0	—	—
ГМЛ-1 2-я группа 1 мг/кг	♀	20,6* 19,8÷21,7	25,0 ^{■*} 23,5÷26,2	21,8 ^{■*} 20,5÷22,5	23,5 ^{■*} 22,3÷24,6	23,5 ^{■*} 22,2÷25,0	—	—
	♂	23,2* 22,7÷24,0	33,4 ^{■*} 31,4÷35,0	25,0 ^{■*} 23,2÷26,2	21,7 ^{■*} 20,1÷22,7	37,9 ^{■*} 36,0÷40,0	—	—
ГМЛ-1 3-я и 4-я «отст.» гр. 10 мг/кг	♀	15,1* 14,1÷15,6	20,5 ^{■*} 16,5÷23,3	24,9 ^{■*} 24,3÷27,2	23,6 ^{■*} 22,7÷25,8	25,1 ^{■*} 22,8÷26,8	23,1 [■] 21,0÷25,8	18,4 [■] 16,2÷19,9
	♂	34,1* 31,6÷34,6	30,2* 26,5÷35,3	34,5* 32,4÷37,2	33,4* 31,3÷35,5	34,0* 32,5÷36,8	33,6* 30,6÷37,6	33,0* 32,0÷37,2

Примечания: Данные представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей; [■] — различие с исходными данными достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; * — различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$.

Таблица 5

Оценка влияния ГМЛ-1 при пероральном введении в течение месяца на поведение крыс в тесте «открытое поле»

Препарат, доза			Число пересечённых квадратов	Число вертикальных стоек	Число заглядываний в отверстия	Выход в центр	Груминг	Замирание	Число актов дефекаций	Число уриаций
Контроль 1-я группа	до введения	♀	38,0 35,0÷50,0	19,5 17,0÷23,0	3,5 0,0÷6,0	9,5 7,0÷15,0	2,6 0,0÷8,1	0,0 0,0÷0,0	1,0 0,0÷2,0	0,0 0,0÷0,0
		♂	29,5 28,0 30,0	14,5 11,0÷23,0	2,0 1,0÷2,0	4,5 2,0÷11,0	1,5 0,4÷6,3	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷1,0	0,0 0,0÷0,0
	через месяц	♀	21,5 [■] 16,0÷28,0	8,5 [■] 4,0÷10,0	2,5 0,0÷6,0	1,0 [■] 0,0÷3,0	7,0 4,2÷9,1	0,1 0,0÷1,3	2,0 0,0÷4,0	0,0 0,0÷1,0
		♂	15,5 [■] 7,0÷20,0	7,5 5,0÷11,0	0,0 0,0÷1,0	0,0 [■] 0,0÷1,0	4,7 0,0÷48,1	0,4 0,0÷0,9	2,0 0,0÷ 6,0	0,0 0,0÷,0
ГМЛ-1 2-я группа 1 мг/кг	до введения	♀	27,0 18,0÷37,0	9,0 4,0÷13,0	3,0 0,0÷4,0	7,0 1,0÷9,0	6,0 4,5÷13,9	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷2,0	0,0 0,0÷,0
		♂	31,0 28,0÷34,0	6,0* 5,0÷9,0	5,5 3,0÷9,0	2,5 0,0÷8,0	1,0 0,0÷1,6	0,0 0,0÷0,0	4,0 0,0÷4,0	0,0 0,0÷0,0
	через месяц	♀	19,5 [■] 12,0÷23,0	4,5 [■] 4,0÷5,0	2,5 2,0÷3,0	0,0 0,0÷5,0	5,4 2,2÷6,9	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷1,0	0,0 0,0÷0,0
		♂	14,0 [■] 9,0÷15,0	3,0 [■] 2,0÷4,0	1,5 1,0÷2,0	1,0 0,0÷3,0	6,0 1,7÷9,9	0,8 0,0÷1,3	1,5 0,0÷5,0	0,0 0,0÷1,0
ГМЛ-1 3-я и 4-я группы 10 мг/кг	до введения	♀	31,5* 29,0÷5,0	10,0* 7,0÷16,0	3,0 3,0÷5,0	7,5 5,0÷14,0	2,7 2,0÷4,8	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷ 0,0	0,0 0,0÷0,0
		♂	21,5 16,0÷25,0	5,5* 4,0÷10,0	1,5 1,0÷4,0	0,0 0,0÷3,0	0,9 0,0÷6,0	0,0 0,0÷1,8	3,0 0,0÷4,0	0,0 0,0÷0,0
	через месяц	♀	22,0 [■] 20,0÷25,0	6,0 [■] 4,0÷9,0	5,0 3,0÷6,0	1,5 [■] 0,0÷4,0	7,6 [■] 5,6÷20,2	0,0 0,0÷0,9	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷0,0
		♂	8,0 [■] 5,0÷12,0	4,0 1,0÷5,0	2,0 0,0÷3,0	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷11,2	1,0 0,0÷3,2	1,5 0,0÷5,0	0,0 0,0÷0,0
	Через 1,5 месяца «отставл. гр.»	♀	18,5 [■] 16,0÷19,0	6,0 [■] 6,0÷8,0	3,0 2,0÷5,0	4,5 3,0÷6,0	6,7 1,1÷10,6	0,0 0,0÷3,6	0,0 0,0÷0,0	0,0 0,0÷0,0
		♂	27,0 15,0÷33,0	4,0 1,0÷8,0	0,0 0,0÷1,0	0,0 0,0÷4,0	6,9 0,0÷16,5	0,0 0,0÷0,0	0,5 0,0÷4,0	0,0 0,0÷0,0
Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; [■] — различие с фоном достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$; * — различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$.										

Лабораторно-клиническое исследование крови у крыс и кроликов

Крысы. Через месяц введения препарата ГМЛ-1 в дозе 1 мг/кг у крыс 2-й группы не отмечено значительных различий с контролем. По сравнению с первоначальными значениями, к окончанию эксперимента наблюдались колебания в пределах нормы показателей красной крови, снижение количества гемоглобина у самок (с 162,5 г/л до 154,5 г/л) и показателей эритроцитарных индексов у крыс обоего пола. В лейкограмме у самок крыс данной группы отмечено уменьшение числа лимфоцитов.

Через месяц введения препарата ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг у крыс 3-й группы не отмечено значимых различий с контролем. По сравнению с исходными данными в лейкоцитарной формуле у самцов регистрировали уменьшение числа сегментоядерных нейтрофилов на фоне роста числа лимфоцитов. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через месяц введения препарата в дозе 10 мг/кг у крыс 3-й группы не наблюдалось значительных различий с контролем, за исключением уменьшения диаметра эритроцитов у самцов до 6,29 мкм по сравнению с контролем (6,74 мкм) и исходными данными (6,63 мкм), и у самок по сравнению с исходными данными (с 6,59 до 6,35 мкм).

Через 2 недели после отмены препарата у крыс 4 «отставленной» группы было зарегистрировано увеличение содержания эозинофилов по сравнению с исходными данными, контролем и с данными, полученными к окончанию месячного введения препарата ГМЛ-1 (3-я группа). По сравнению с данными, полученными к окончанию месячного введения препарата ГМЛ-1 (3-я группа), у самцов 4-й «отставленной» группы отмечали увеличение числа анизохромных эритроцитов и показателя анизоцитоза.

Следует отметить, что несмотря на значимый характер изменений перечисленных показателей, изменения были невелики и не выходили за пределы референтных значений и вариабельности, наблюдаемых у лабораторных крыс.

Кролики. Через месяц введения 1 % раствора крахмала у кроликов контрольной группы регистрировалось увеличение показателей красной крови (значимое у самок): гемоглобина на 12 %, эритроцитов на 11 % соответственно. В целом, эти изменения были незначительны, не сказывались на эритроцитарных индексах и не выходили за референтные уровни.

Установлено, что у кроликов 2-й группы к окончанию эксперимента не выявлено значимых различий с контрольными данными. По сравнению с первоначальными значениями через месяц введения препарата у кроликов этой группы регистрировали некоторые изменения эритроцитарных индексов: так средние содержание и концентрация гемоглобина в эритроците (МСН и МСНС) были выше первоначальных данных

в среднем на 10 и 8 % соответственно. Количество тромбоцитов у самок уменьшилось в 2 раза, а у самцов, наоборот, увеличилось на 29 % по сравнению с показателями, полученными до эксперимента.

При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через месяц введения препарат ГМЛ-1 в дозе 1 мг/кг у кроликов 2-й группы выявлено значимое уменьшение числа дискоидных эритроцитов и, соответственно, возрастание числа пойкилоцитных форм по сравнению с контрольными и первоначальными данными. Однако колебания этих показателей не превышали в среднем 5–6 %, и были характерны для лабораторных кроликов. У самок выявлено снижение количества анизохромных эритроцитов на 18 % по сравнению с первоначальными данными.

Установлено, что у кроликов 3-й группы через месяц введения препарата ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг показатели периферической крови не имели значимых различий с контролем. По сравнению с первоначальными данными отмечено увеличение количества гемоглобина, и, как следствие, увеличение показателей МСН (самки) и МСНС (самки и самцы). Количество лейкоцитов у самок понизилось, а в лейкоцитарной формуле выявлено снижение уровня базофилов. Вариабельность этих показателей не выходит за пределы физиологической нормы в крови опытных животных.

При исследовании морфометрических показателей эритроцитов у кроликов 3-й группы через месяц введения препарата ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг не выявлено значимых различий с контролем. По сравнению с исходными данными у самок регистрировали значимое повышение уровня анизоцитоза с 6,0 до 7,0 %.

Следует отметить, что изменения перечисленных показателей у кроликов, хотя и были статистически значимыми, были незначительны и не выходили за границы референтных значений для данного вида животных.

Обобщённый анализ данных проведённых гематологических исследований не выявил эффектов, которые могли бы свидетельствовать о токсическом действии ГМЛ-1.

Исследование гемостаза у крыс и кроликов. При исследовании плазмы крови крыс 1-й (контроль) и 3-й групп все показатели находились в пределах обычно наблюдаемых значений. У самцов 2-й и 4-й («отставленная») групп было выявлено значимое удлинение АЧТВ на 26,1 и 26,6 %, соответственно по сравнению с контрольными животными. Следует отметить, что наблюдаемое удлинение АЧТВ свертывания крови у самцов крыс находилось в пределах обычно наблюдаемых значений. Таким образом, у крыс, получавших препарат ГМЛ-1 в дозах 1 и 10 мг/кг, все показатели гемостаза находились в границах физиологической нормы.

При изучении плазмы крови кроликов 1-й и 2-й групп все исследуемые показатели гемостаза находились в пределах физиологической нормы. У самок,

получавших ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (3-я группа), наблюдалось значимое удлинение ПВ на 35,9 % и снижение концентрации фибриногена на 11,5 % по сравнению с группой контроля. Следует отметить, что вариабельность указанных выше показателей гемостаза не выходила за границы референтных значений.

Таким образом, ГМЛ-1 в изученных дозах не оказывал повреждающего действия на систему гемостаза экспериментальных крыс и кроликов.

Биохимические исследования крови у крыс и кроликов. При биохимическом исследовании сыворотки крови крыс контрольной и опытных групп все показатели находились в пределах референтных значений. У самцов, получавших препарат в дозе 1 мг/кг (2-я группа), было зарегистрировано значимое снижение содержания мочевины на 32,4 % по сравнению с контрольной группой. У крыс, получавших ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (3-я группа), не установлено значимых различий с контрольными животными по содержанию биохимического состава крови. При исследовании крови крыс 4-й «отставленной» группы было отмечено значимое повышение глюкозы на 22,3 % у самок и активности АЛТ на 43,4 % у самцов по сравнению с аналогичными показателями животных 3-й группы. Выявленные колебания биохимических показателей в крови крыс всех групп находились в пределах обычно наблюдаемых значений, характерных для этого вида животных.

При изучении сыворотки крови кроликов контрольной и опытных групп все исследуемые биохимические показатели находились в пределах физиологической нормы. У кроликов, получавших препарат ГМЛ-1, не выявлено значимых различий в биохимическом составе крови по сравнению с контрольными животными, за исключением значимого повышения мочевины у самцов 2-й группы (1 мг/кг) на 25,8 % и у самок 3-й группы (10 мг/кг) на 34,7 %. Наблюдаемые колебания значений биохимических показателей у кроликов, получавших препарат в дозе 1 и 10 мг/кг, находились в пределах референтных значений для данного вида животных.

Таким образом, исследование показало, что введение препарата ГМЛ-1 крысам и кроликам в дозах 1 и 10 мг/кг не вызывает биохимических отклонений от физиологической нормы в крови опытных животных.

Биохимические исследования мочи у крыс. При исследовании физико-химических свойств мочи крыс контрольной и опытных групп все показатели находились в пределах референтных значений. Через месяц проведения эксперимента у контрольных самцов наблюдалось значимое повышение диуреза на 30 % и снижение концентрации мочевины на 32,9 % по сравнению с первоначальными данными. У самок контрольной группы было зарегистрировано значимое повышение уровня креатинина на 42,7 % по сравнению с первоначально пониженными значениями этого показателя в данной группе животных. У самок крыс, получавших препарат ГМЛ-1 в дозе 1 мг/кг

(2-я группа), в начале эксперимента был установлен значимо пониженный объём суточного диуреза на 31 % и повышенное содержание креатинина в 2 раза по сравнению с контрольной группой. У самцов этой группы был отмечен значимо повышенный уровень креатинина на 48,2 % по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе. Через месяц у самцов, получавших препарат ГМЛ-1 в дозе 1 мг/кг (2-я группа), было отмечено значимо повышенное содержание мочевины на 46 % по сравнению с данными контрольных животных. Исследование состава мочи крыс, получавших препарат ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (3-я группа), в начале эксперимента не выявило значимых различий с контролем, за исключением значимо повышенного содержания креатинина у самцов на 48,8 % по сравнению с первоначально сниженным уровнем этого показателя в моче контрольных животных. Через две недели после отмены препарата у крыс, получавших препарат ГМЛ-1 в дозе 10 мг/кг (отставленная группа), не было выявлено значимых различий в биохимическом составе мочи. Следует отметить, что наблюдаемые у самцов и самок крыс колебания диуреза, концентрации мочевины и креатинина не превышало физиологических значений, характерных для данного вида животных.

Таким образом, ГМЛ-1 не вызывал значимых изменений физико-химических свойств мочи у крыс.

Патоморфологические исследования. В результате проведённого патологоанатомического вскрытия, последующих макроскопических и микроскопических исследований установлено, что ГМЛ-1 в условиях настоящего эксперимента не вызывал закономерных изменений строения органов сердечно-сосудистой системы (сердце, магистральные сосуды), дыхательной системы (лёгкие, трахея), желудочно-кишечного тракта (пищевод, желудок, тонкий и толстый отделы кишечника, печень, поджелудочная железа), мочевыводящей системы (почки, мочевой пузырь), эндокринной системы (надпочечники, щитовидная железа, парашитовидная железа, островки Лангерганса поджелудочной железы), органов кроветворения (селезёнка, тимус, лимфатические узлы кишечника и лёгких), репродуктивной системы (семенники и придатки семенников самцов, яичники и маточные трубы самок) крыс и кроликов, нервной системы (головной мозг) крыс.

Оценка местного раздражающего действия. При осуществлении манипуляции перорального введения препарата все крысы и кролики контрольных и опытных групп вели себя спокойно, не проявляли признаков агрессии. При ежедневных осмотрах не было отмечено морфологических признаков раздражения слизистой оболочки ротовой полости ни у одного животного. В результате проведённого патоморфологического вскрытия не было обнаружено макроскопических изменений ротовой полости, языка, глотки, пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника крыс и кроликов контрольных и опытных групп. Микроскопическая

картина пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника крыс и кроликов экспериментальных групп, получавших препарат ГМЛ-1 в дозах 1 и 10 мг/кг, была идентичной таковой, наблюдаемой у контрольных крыс и кроликов, получавших 1% раствор крахмала. Таким образом, ГМЛ-1 в изученных дозах не оказывал местного раздражающего действия.

Заключение

ГМЛ-1, вводимый крысам и кроликам перорально в дозах 1 и 10 мг/кг в течение одного месяца, не продемонстрировал токсических эффектов и местного раздражающего действия в комплексном исследовании, выполненном в объеме, рекомендованном Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [2].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошкина Ирина Александровна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID: 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

Corresponding author

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-code: 4697-7938

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

Сорокина Александра Валериановна

ORCID: 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

ORCID: 0000-0002-9600-7244

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

Волкова Анна Валерьевна

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

Volkova Anna

Senior Researcher of the laboratory of psychop-
harmacology FSBI «Zakusov institute of Pharma-
cology», Moscow

Качалов Кирилл Сергеевич

SPIN-код: 2992-6789

инженер 1-й категории лаборатории
лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва;
студент фармацевтического факультета
Московского медицинского университета
«Реавиз», Москва

Kachalov Kirill

SPIN-code: 2992-6789

engineer of the 1st category of the laboratory of
drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Phar-
macology», Moscow;
student of pharmaceutical faculty of Moscow
Medical university "Reaviz", Moscow

Алексеев Иван Владимирович

SPIN-код: 9757-6210

инженер 1-й категории лаборатории
фармакологии мутагенеза ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва; студент
фармацевтического факультета Московского
медицинского университета «Реавиз», Москва

Alekseev Ivan

SPIN-code: 9757-6210

engineer of the 1st category of the laboratory of
pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow; student of
pharmaceutical faculty of Moscow Medical uni-
versity "Reaviz", Moscow

Захаров Алексей Дмитриевич

SPIN-код: 9013-6228

инженер 1-й категории лаборатории
лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва

Алексеева Светлана Витальевна

ORCID: 0000-0002-1262-6997

SPIN-код: 8985-3418

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

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

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

Zakharov Aleksei

SPIN-code: 9013-6228

engineer of the 1st category of the laboratory of
drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Phar-
macology», Moscow

Alekseeva Svetlana

ORCID: 0000-0002-1262-6997

SPIN-code: 8985-3418

Senior Researcher of the laboratory of drug toxi-
cology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
Moscow

Durnev Andrei

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-code: 8426-0380

Head of the laboratory of drug toxicology, RAS
corresponding member, Ph.D., Professor, Direc-
tor FSBI «Zakusov institute of Pharmacology»,
Moscow

Литература / References

1. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «хронической» токсичности. Медицина. — М.: 2005;47–54. [Guideline for Experimental (Preclinical) Studying of New Pharmacological Substances. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya farmakologicheskikh veshchestv. Izuchenie «khronicheskoi» toksichnosti. Moscow: Medicine; 2005. P. 41–47. (In Russ).]
3. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (РД 64-126-91). — М.: МЗ России, ФК, 1992; 45. [Pravila doklinicheskoi otsenki bezopasnosti farmakologicheskikh sredstv. RD 64-126-91. Moscow: Rosminzdrav, FK; 1992. (In Russ).]
4. Diehl KH, Hull R, Morton D. 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.
5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение хронической токсичности. Гриф и К. — М.: 2012;17–19. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie khronicheskoi toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012:17–19 (In Russ).]
6. Балынина Е.С., Березовская И.В. Сравнительная оценка методов определения ориентировочной реакции крыс в токсикологическом

- эксперименте // *Фарм. и Токсикол.* — 1976. — № 5. — С. 635–638. [Balynina ES, Berезovskaya IV. Sravnitel'naya otsenka metodov opredeleniya orientirovochnoi reaktsii kryis v toksikologicheskom eksperimente. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 1976;5:635-638. (In Russ).]
7. Тэмк Х., Диам Х., Хаферлах Т. Атлас по гематологии. — М.: МЕДпресс-информ, 2010. [Theml H, Diem H, Haferlach T. Color Atlas of Hematology. Moscow: MEDpress-inform. 2010. (In Russ).]
8. *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. Triada-X; 1997. (In Russ).]
9. Бельский М.Б. *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*. — М.: 1963. [Belen'kii MB. Elementy kolichestvennoy otsenki farmakologicheskogo efekta. Moscow: 1963. (In Russ).]
10. 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).]
11. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. — М.: Медицина; 1996 [Mikroskopicheskaya tekhnika. Rukovodstvo dlya vrachei i laborantov. Ed by Sarkisov DS, Perov YuL. Moscow: Medicine; 1996. (In Russ).]
12. 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).]
13. Rolls GO. 101 Steps to Better Histology — a Practical Guide to Good Histology Practice. Leica Microsystems; 2008.



Центр
Фармакоэкономических
Исследований

18 лет исследовательской работы

230 исследований

220 публикаций

48 партнёров

Комплексная клинико-экономическая оценка лекарственных средств для включения в ограничительные перечни

- Оценка эффективности и безопасности
 - систематический обзор
 - мета-анализ
 - не прямые и смешанные сравнения, сетевой мета-анализ
- Разработка моделей принятия решений в MS Excel
- Локальная адаптация CORE-моделей
- Клинико-экономический анализ
- Анализ влияния на бюджет
- Подготовка Предложения на включение в ограничительные перечни



Награждён в 2013 и 2014 гг. Всероссийской социальной премией в области организации здравоохранения, фармакоэкономики и рациональной фармакотерапии «Da.Signa»

Под общей редакцией
БЕЛОУСОВА Д.Ю., ЗЫРЯНОВА С.К., КОЛБИНА А.С.

Управление клиническими исследованиями



Учебное пособие
по планированию и проведению
клинических исследований
лекарственных средств

Учебное пособие «Управление клиническими исследованиями» описывает методологию эффективного управления проектом по изысканию, разработке и выводу на фармацевтический рынок лекарственных средств, начиная с этапа поиска перспективных химических соединений, проведения доклинических испытаний веществ—кандидатов, клинических исследований лекарств—кандидатов, фармаконадзора, управления данными, анализа полученных данных, составления окончательного отчёта об исследовании, получения регистрационного удостоверения, публикации результатов, заканчивая организацией пострегистрационных исследований безопасности, проведением неинтервенционных и фармакоэпидемиологических исследований, а также процесс обеспечения качества, проведения аудита и инспекций уполномоченных органов здравоохранения, создания стандартных операционных процедур, архивирования документов исследования.

Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и стран — участниц Евразийского экономического союза. Кропотливая работа авторского коллектива практикующих специалистов по клиническим исследованиям позволила сделать сложные понятия ясными в изложении и простыми для понимания читателем любого уровня опыта и подготовки.

Студентам, мониторам клинических исследований, стремящимся стать проектными менеджерами, и предназначено данное учебное пособие. Также книга будет интересна тем, кто непосредственно участвует в процессе разработки новых лекарственных средств: клиническим проектным менеджерам, специалистам по клиническим исследованиям, фармаконадзору, управлению данными, статистическому анализу, обеспечению качества, медицинским писателям, регистрации, представителям регуляторных и медицинских отделов, работающих в инновационных фармацевтических компаниях и контрактных исследовательских организациях. Представленные материалы будут полезны опытным врачам-исследователям, сотрудникам научно-исследовательских институтов и организаций, участвующих в поиске новых лекарственных веществ, организующих доклинические и клинические испытания, а также служащим уполномоченных органов здравоохранения, регулирующих их проведение.

Приобрести книгу

можно в офисе ООО «Издательство ОКИ»

тел.: +7 (910) 449-22-73

e-mail: eva88@list.ru

Выходные данные

Управление клиническими исследованиями / под общ. ред. Белоусова Д.Ю., Зырянова С.К., Колбина А.С. — 1-е изд. — М.: Буки Веди: Издательство ОКИ, 2017. — 676 с.: ил. ISBN 978-5-4465-1602-5



Издательство ОКИ

ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей, фармакологов, сотрудников фармацевтических компаний, служащих регулирующих органов, членов Комитетов по Этике.

Сайт издательства: www.izdat-oki.ru



Журнал «**Качественная клиническая практика**» публикует материалы по планированию и проведению клинических исследований лекарственных средств, фармакоэкономике, фармакоэпидемиологии, биомедицинской этике, фармаконадзору, которые используются в преподавательской работе во многих медицинских ВУЗах.

Сайт журнала: www.clinvest.ru



Журнал «**Фармакокинетика и Фармакодинамика**» освещает фундаментальные и прикладные аспекты доклинических и клинических исследований фармакокинетики, в частности терапевтического лекарственного мониторинга, фармакодинамического и биофармацевтического изучения препаратов, их взаимодействия, оценки их биодоступности и биоэквивалентности.

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



Журнал «**Фармакогенетика и фармакогеномика**» публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, клинико-экспериментальных и фундаментальных научных работах, обзоры, лекции, описания клинических случаев, а также вспомогательные материалы по всем актуальным проблемам персонализированной медицины

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



Журнал «**Антибиотики и химиотерапия**» освещает проблемы поиска и получения новых антибиотиков, ферментов, биологически активных веществ, а также вопросы экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций.

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

**Тел.: +7 (910) 449-22-73;
e-mail: clinvest@mail.ru**