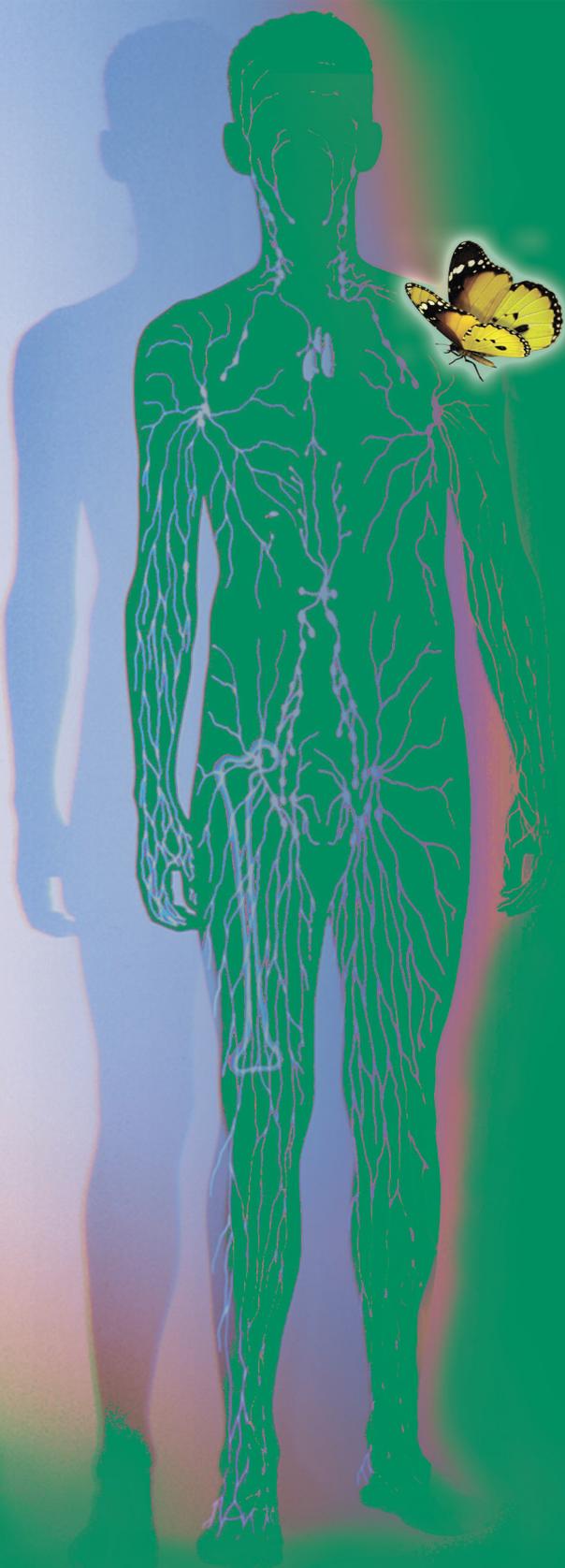


# ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА



№1.2017



- Независимая научная организация в области изучения экономики программ здравоохранения
- Более 200 исследований в области оценки медицинских технологий
- Опубликовано около 210 научных работ в рецензируемых медицинских журналах
- Партнёры – 40 ведущих зарубежных и российских фармацевтических компаний

### Основные направления научной деятельности

- разработка научно-методических основ фармакоэкономических, фармакоэпидемиологических исследований и оценки качества жизни
- развитие методологии проведения оценки медицинских технологий

### ПОЛНЫЙ СПЕКТР УСЛУГ ПО ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ

- фармакоэкономические исследования
- фармакоэпидемиологические исследования
- наблюдательные неинтервенционные исследования
- непрямые сравнительные исследования
- оценка технологий здравоохранения
- оценка качества жизни, связанного со здоровьем
- систематический литературный обзор и мета-анализ
- разработка математических моделей и локальная адаптация
- анализ больших баз данных
- создание мобильных приложений и интерактивных онлайн-презентаций
- формирование доказательной базы
- экспертиза и разработка клинико-экономического досье
- образовательные услуги
- информационно-консультационные услуги



Издательство  
**ОКИ**

## Главный редактор

**Жердиев 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

### Белолипецкая

**Вера Геннадиевна**  
к.б.н., Москва

### Белоусов Юрий Борисович

член-корр. РАН, д.м.н.,  
профессор, 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

### Кулмагамбетов

**Ильяс Райханович**  
д.м.н., профессор, академик  
НАН, Казахстан, Алматы

### Мирзоян Рубен Симонович

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

### Насонов Александр Сергеевич

к.б.н., Москва

### Раменская

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

### Сариев Абрек Куангалиевич

д.м.н., профессор, Москва

### Соколов Андрей Владимирович

д.б.н., Москва

### Спасов Александр Алексеевич

академик РАН, д.м.н.,  
профессор, Волгоград

### Стародубцев

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

### Сычёв Дмитрий Александрович

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

### Тюренок 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 (910) 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 18.03.2017 г.

ООО «МЕДИАКОЛОР», www.mediacolor.ru

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБУ «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 «Качественная клиническая практика». Журнал «Качественная клиническая практика» зарегистрирован 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

### ИССЛЕДОВАНИЯ ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Роль фармакокинетических и биофармацевтических исследований при создании новых дипептидных лекарственных средств (экспериментальное исследование)

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

*Гудашева Т.А. .... 3*

### ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Эффективность аскорбата лития на модели хронической алкогольной интоксикации

*Остренко К.В., Громова О.А., Сардарян И.С., Демидов В.И., Жидоморов Н.Ю., Торшин И.Ю.,*

*Пронин А.В., Кривоногов В.А., Карпунина Ю.В. .... 11*

Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов

ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью

*Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Неробкова Л.Н., Литвинова С.А., Гайдуков И.О., Воронина Т.А.,*

*Гудашева Т.А. .... 22*

### ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ

Протеомный анализ магний-зависимых белков в системе «мать-плод-ребёнок»

*Громова О.А., Торшин И.Ю., Тапильская Н.И. .... 27*

Синергидные нейропротекторные эффекты тиамин, пиридоксина и цианокобаламина в рамках протеома человека

*Громова О.А., Торшин И.Ю., Гусев Е.И. .... 40*

### ИССЛЕДОВАНИЯ КЛИНИЧЕСКОЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Клиническая фармакокинетика оригинального дипептидного анксиолитика ГБ-115

*Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А.,*

*Смирнов В.В., Колик Л.Г., Раскин С.Ю.,*

*Ивашкина Н.Ю., Гудашева Т.А.,*

*Середенин С.Б. .... 52*

Исследование фармакокинетики мебеверина

в форме капсул с пролонгированным высвобождением

*Хохлов А.Л., Джурко Ю.А., Шитов Л.Н.,*

*Яичков И.И., Шитова А.М., Хозова Л.А.,*

*Мирошников А.Е. .... 56*



## 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

### Belousov Yuri

Corresponding Member RAS,

Ph.D., Professor, 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

### Kulmagambetov Ilyas

Ph.D., Professor, Academician

National Academy of Sciences,  
Almaty, Kazakhstan

### Mirzoyan Ruben

Honored Scientist RF, Ph.D.,

Professor, Moscow

### Nasonov Alexander

Ph.D., Moscow

### Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

### Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

### Sokolov Andrey

Ph.D., Moscow

### Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

### Starodubtcev 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: [clininvest@mail.ru](mailto:clininvest@mail.ru)

### Afanasyeva Elena

CEO in LLC «Publishing OKI»

subscription

+7(916)986-04-65

e-mail: [eva88@list.ru](mailto:eva88@list.ru)

site: [www.izdat-ok.ru](http://www.izdat-ok.ru)

### Zhuk Elena

Design and layout

e-mail: [elenazuk70@mail.ru](mailto:elenazuk70@mail.ru)

**Signed in print** 18.03.2017 r.

**Typography:** LCC «MEDIACOLOR», [www.mediacolor.ru](http://www.mediacolor.ru)

**Editorial address:** 125315, Moscow, ul. Baltiiskay, 8  
FGBI «Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusova» RAS  
Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: [zherdevpharm@mail.ru](mailto: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](http://www.Antibiotics-Chemotherapy.ru)

[www.ClinVest.ru](http://www.ClinVest.ru)

[www.Clinical-Pharmacy.ru](http://www.Clinical-Pharmacy.ru)

[www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru](http://www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru)

## Journals

Antibiotics and Chemotherapy

Good Clinical Practice

Clinical Pharmacy

Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

## WEB-portals

[www.HealthEconomics.ru](http://www.HealthEconomics.ru)

[www.Market-Access-Solutions.ru](http://www.Market-Access-Solutions.ru)

[www.izdat-Ok.ru](http://www.izdat-Ok.ru)

Center of Pharmacoeconomics Research

Market Access Solutions

Publisher OKI

### PRECLINICAL PHARMACOKINETICS STUDIES

The Role of pharmacokinetics and biopharmaceutical investigations in the creation of a new dipeptide drugs (experimental investigation)

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

Gudasheva T.A. .... 3

### PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

The effectiveness of lithium ascorbate on chronic alcohol intoxication model

Ostrenko K.V., Gromova O.A., Sardaryan I.S.,

Demidov V.I., Zhidomorov N.Yu., Torshin I.Yu.,

Pronin A.V., Krivonogov V.A., Karpunina Yu.V. .... 11

Novel 4-benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with aticonvulsant activity

Zhmurenko L.A., Mokrov G.V., Nerobkova L.N.,

Litvinova S.A., Gaydukov I.O., Voronina T.A.,

Gudasheva T.A. .... 22

### PROTEOMIC ANALYSIS

Proteomic analysis of magnesium-dependent proteins and children's health

Gromova O.A., Torshin I.Yu., Tapilskaya N.I. .... 27

Synergistic neuroprotective effects of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin on the level of human proteome

Gromov O.A., Torshin I.Yu., Gusev E.I. .... 40

### CLINICAL PHARMACOKINETICS STUDIES

Clinical pharmacokinetics of a new original dipeptide anxiolytic GB-115

Zherdev V.P., Kolyvanov G.B., Litvin A.A.,

Smirnov V.V., Kolik L.G., Raskin S.Yu.,

Ivashkina N.Yu., Gudasheva T.A.,

Seredenin S.B. .... 52

Pharmacokinetic study of prolonged release capsules of mebeverine

Khokhlov A.L., Dzhurko Yu.A., Shitov L.N.,

Yaichkov I.I., Shitova A.M., Khozova L.A.,

Miroshnikov A.E. .... 56

# Роль фармакокинетических и биофармацевтических исследований при создании новых дипептидных лекарственных средств (экспериментальное исследование)

**Жердев В.П., Бойко С.С., Шевченко Р.В., Гудашева Т.А.**

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

**Резюме.** В работе представлены результаты исследований фармакокинетики новых дипептидных нейропсихотропных лекарственных средств, модифицированных аналогов эндогенных нейропептидов, анализируются их преимущества с позиций фармакокинетики в сравнении с олигопептидами и методические подходы улучшения их фармакокинетических свойств как на стадии разработки субстанций дипептидов, так и на стадии создания их пероральных лекарственных форм.

**Ключевые слова:** фармакокинетика, биодоступность, энзиматическая устойчивость, дипептидные лекарственные средства, пероральные лекарственные формы

## The Role of pharmacokinetics and biopharmaceutical investigations in the creation of a new dipeptide drugs (experimental investigation)

Zherdev V.P, Boyko S.S., Shevchenko R.V., Gudasheva T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Resume.** In the paper presents the results of investigations pharmacokinetics a new dipeptides neuropsychotropics drugs modifycated analogues of endogenics neuropeptids analyzes in posishin of pharmacokinetics their comparable wich endogenics neuropeptids and metodical pathways of their pharmacokinetics impruwds on the studium of creating substation of dipeptids also on the sudium creating of oral drug forms.

**Keywords:** pharmacokinetics, bioavailability, enzymatics stability, oral drugs forms

Автор, ответственный за переписку:

*Жердев Владимир Павлович – д.м.н., профессор, зав. лабораторией фармакокинетики ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАН; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru*

## Введение

В связи с большим ростом в настоящее время нейропсихических заболеваний, таких как нарушение когнитивных функций, депрессии, неврозы, шизофрения, тревожные состояния, проблема разработки и создания новых нейротропных лекарственных средств является актуальной. В течение длительного времени для лечения заболеваний, сопровождающихся нарушением когнитивных функций (ишемия мозга, инсульт, травма мозга) использовали в основном пирарцетам и другие ноотропные средства этого ряда. Однако они применяются в высоких дозах, неэкономичны и вызывают привыкание. В клинической практике для лечения шизофрении до настоящего времени использовали типичные и атипичные нейролептики, результатом применения которых могут быть серьёзные осложнения, усугубляющие состояние пациентов. Кроме того, 25% больных оказались резистентными к терапии нейролептиками [1]. Длительное время для терапии тревожных состояний и фобий в качестве анксиолитиков применяли препараты бензодиазепинового ряда, которые также обладают рядом побочных эффектов, таких как атаксия, миорелаксация, утомля-

емость, сонливость, нарушение памяти, психическая и физическая зависимость, синдром отмены, что существенно снижает качество жизни пациентов. Одним из анксиолитиков, лишённых побочных эффектов бензодиазепинов, является созданный в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» препарат Афобазол, который занял в настоящее время прочное место в медицинской практике для лечения фобий и тревожных расстройств [2, 3].

Всё вышесказанное определяет необходимость разработки и создания новых высокоактивных и конкурентоспособных лекарственных средств, лишённых недостатков вышеуказанных лекарственных препаратов. В настоящее время учёные уделяют большое внимание поиску активных веществ среди эндогенных пептидов, которые образуются в центральной и периферической нервной системе и осуществляют все регулирующие физиологические функции организма.

Лекарственные препараты, созданные на основе природных нейропептидов, имеют ряд преимуществ по сравнению с препаратами непептидной структуры, а именно высокую фармакологическую активность, отсутствие токсичности благодаря метаболизму до эндогенных аминокислот, отсутствие грубых побоч-

ных эффектов благодаря регуляторному механизму действия, меньшую вероятность развития толерантности и зависимости. Но их использование в качестве лекарственных препаратов, особенно пероральных лекарственных форм, не всегда представляется возможным, так как пептиды обладают низкой энзиматической устойчивостью, подвергаются пресистемному метаболизму, ограничено всасываются в ЖКТ из-за большой молекулярной массы.

В связи с вышеизложенным, актуальным явилась разработка новых лекарственных препаратов на основе дипептидов, которые имеют дополнительные преимущества перед олигопептидами, такие как меньшая полифункциональность и большая синтетическая доступность, большая энзиматическая устойчивость. Они выгодно отличаются возможностью их перорального применения за счёт большей стабильности и способности проникать через биологические барьеры. Кроме того, в организме имеются специфические транспортные системы переноса дипептидов (PEPT-1, обеспечивающая транспорт через энтеральную слизистую ЖКТ, и PEPT-2 – через ГЭБ) [4, 5], что даёт возможность их перорального использования.

Поэтому возникла целесообразность создания новых конкурентоспособных препаратов для лечения расстройств памяти, шизофрении, тревожных расстройств, депрессий на основе дипептидов, защищённых химическими концевыми группировками, придающими молекуле препарата липофильность и энзиматическую устойчивость. Такая модификация дипептидов способствует их стабильности и повышает биодоступность. Т.А. Гудашевой [6] разработана стратегия создания дипептидных препаратов с нейротропной активностью с использованием дизайна дипептидов, имитирующих структуру непептидного прототипа с определённой нейротропной активностью, а также фрагмента исходного пептида с аналогичной активностью.

На основе предложенной стратегии создан дипептидный аналог пираретама – Ноопепт – этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина [6]. Ноопепт по способности восстанавливать нарушенные когнитивные функции и по уровню активных доз оказался значительно эффективнее пираретама. Ноопепт внедрён в медицинскую практику в качестве ноотропного лекарственного средства и с 2006 г. прочно занял место в отечественной фармакотерапии когнитивных расстройств.

Аналогичный подход использован для дипептидного моделирования атипичного нейролептика сульпирида, в результате которого получено соединение – метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина [6]. В эксперименте была доказана его нейролептическая активность. Сконструированное соединение, получившее название Дилепт, прошло стадию доклинического изучения, а также I стадию клинического исследования, и в настоящее время решается вопрос о перспективности его внедрения в медицинскую практику.

Второй подход дизайнера пептидов состоит в нахождении дипептидного участка нейропептида, распознающего рецептор. В основе этого подхода лежит представление о ведущей роли гидрофобного взаимодействия лиганда с рецептором. В рамках данного подхода на основе анксиогенного нейропептида холецистокинина-4 создан дипептидный анксиолитик ГБ-115 [6].

Анксиолитические свойства препарата ГБ-115 подтверждены в большом количестве экспериментальных тестов, проведена I фаза клинических исследований и рассматривается вопрос о его внедрении в клиническую практику.

### Доклинические исследования фармакокинетики новых лекарственных средств

Исследования доклинической фармакокинетики новых лекарственных средств являются необходимым этапом для их дальнейшего продвижения в медицинскую практику [7]. Кроме того, выявление оптимальных фармакокинетических параметров позволяет создавать лекарственные формы с улучшенными фармакокинетическими характеристиками, учитывающими скорость и степень всасывания, величины биодоступности и энзиматической стабильности. Инструментальные методы, используемые для изучения фармакокинетики создаваемых дипептидных соединений, подробно описаны в ряде работ, посвящённых этой проблеме [8, 9, 16, 18, 21]. Экспериментальные доклинические исследования фармакокинетики оригинальных лекарственных средств проводятся в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению фармакокинетики лекарственных средств [7].

Фармакокинетические параметры изучаемых лекарственных средств позволяют оценить все взаимосвязанные процессы, происходящие с лекарственным веществом при его введении в организм: скорость и степень всасывания в ЖКТ, распределение во внутренней среде организма, процессы метаболизма и элиминации, а также биодоступность исследуемых препаратов.

Полученные фармакокинетические данные позволяют определить оптимальный путь и метод введения препарата, ориентировочную схему дозирования лекарственного средства при переносе данных с животных на человека, что является крайне важным при составлении протокола и проведения I фазы клинических исследований лекарственных средств.

### Фармакокинетические характеристики дипептидных лекарственных средств. Ноотропный препарат Ноопепт

Результаты доклинического изучения фармакокинетики ноопепта, представляющего собой этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина показали, что в неизменённом виде он определяется в плазме

крови крыс в течение 25 мин после внутривенного введения, что свидетельствует о его большей энзиматической устойчивости по сравнению с природными нейропептидами [8, 9, 16, 17]. Одновременно с ним в течение 4–6 ч после введения определяются 3 его основных метаболита: N-фенилацетилпролил-глицин, N-фенилацетилпролин и активный метаболит цикло-пролилглицин, структура которого была установлена методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии и определено его количественное содержание в плазме и мозге крыс [9, 10, 12]. Установлено, что цикло-пролилглицин, как и исходное соединение, обладает ноотропной активностью [12, 14, 15].

Цикло-пролилглицин, как пептид циклической структуры, более продолжительное время находится в плазме крови крыс, значительно более устойчив к энзиматическому воздействию по сравнению с ноопептом, на что указывает его период полувыведения, MRT и площадь под фармакокинетической кривой, которые значительно выше аналогичных параметров исходного соединения (табл. 1). Учитывая выявленную фармакологическую активность этого метаболита, а также улучшенные фармакокинетические характеристики в сравнении с ноопептом, на базе цикло-пролилглицина и его аналогов в настоящее время ведутся исследования по созданию нового лекарственного средства [13–15].

Таблица 1

Фармакокинетические параметры ноопепта и его активного метаболита после внутривенного введения субстанции в дозе 10 мг/кг

Препарат	AUC, мкг/мл × ч	Cl <sub>p</sub> , л/ч	kel, ч <sup>-1</sup>	T <sub>1/2</sub> , ч	MRT, ч	V <sub>d</sub> , л/кг
Ноопепт	0,310	18,77	3,63	0,19	0,22	5,17
Цикло-пролилглицин	2,80	—	0,26	2,65	2,59	—

После перорального введения (табл. 2) ноопепт быстро всасывается в ЖКТ, через 5 мин поступает в системный кровоток, определяется в плазме крови крыс в течение 25 мин после введения. Хорошо распределяется во внутренней среде организма экспериментальных животных. Фармакокинетические параметры ноопепта у крыс после перорального введения субстанции в дозе 50 мг/кг представлены в табл. 2.

На основании полученных данных можно сделать заключение о большей энзиматической устойчивости ноопепта по сравнению с вазопрессином и другими природными нейропептидами, время определения которых в плазме составляет 2–5 мин [17]. Следует подчеркнуть, что абсолютная биодоступность ноопепта у крыс составляет 7,1% [11], что значительно превосходит биодоступность других известных пептидных препаратов [16].

Таблица 2

Фармакокинетические параметры ноопепта после перорального введения субстанции в дозе 50 мг/кг

Параметры	Величина
C <sub>max</sub> , нг/мл	820
T <sub>max</sub> , мин	10
AUC, нг/мл × ч	216
T <sub>1/2</sub> , мин	6,96
C <sub>max</sub> /AUC, ч <sup>-1</sup>	3,45
V/F, л	38,75
MRT, мин	15,36
Cl/F, л/мин	3,86

Полученные результаты доклинических фармакокинетических исследований ноопепта дали возможность рекомендовать создание его пероральной лекарственной формы, результаты исследования фармакокинетики которой в сравнительном аспекте с субстанцией ноопепта представлены в табл. 3.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры ноопепта после перорального введения субстанции и таблеток в дозе 50 мг/кг

Параметры	Субстанция	Таблетки
C <sub>max</sub> , нг/мл	820	860
T <sub>max</sub> , ч	10	15
AUC, нг/мл × ч	216	208
T <sub>1/2</sub> , мин	6,96	6,18
C <sub>max</sub> /AUC, ч <sup>-1</sup>	3,45	3,25
V/F, л	38,75	40,52
MRT, мин	15,36	14,39
Cl/F, л/ч	3 86	4,02
F (отн) %	—	92

При сравнительном изучении фармакокинетики субстанции и таблеток ноопепта не было выявлено существенных различий по основным фармакокинетическим параметрам ноопепта. Относительная биодоступность ноопепта при введении в лекарственной форме составила 92%, что позволило рекомендовать её для дальнейших клинических исследований. Ноопепт в данной лекарственной форме впоследствии был внедрён в медицинскую практику в качестве ноотропного средства.

### Антипсихотик дилепт

Другой модифицированный препарат – Дилепт – метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина является трипептоидным аналогом эндогенного антипсихотика нейротензина, обладает антипсихотическим действием, улучшает когнитивные функции и способен оказывать нейропротективное действие [16, 18].

Его экспериментальная фармакинетика была изучена при разных способах введения у крыс. Показано, что в неизменённом виде дилепт определяется в плазме крови крыс в течение 45 мин после внутривенного введения, при этом хорошо распределяется в органах и тканях крыс, о чём свидетельствует большая величина плазменного клиренса и объёма распределения (табл. 4).

Таблица 4

**Основные фармакокинетические параметры дилепта в плазме крови крыс после внутривенного введения субстанции в дозе 10 мг/кг**

AUC, нг/мл×ч	Cl <sub>p</sub> , л/ч	K <sub>el</sub> , ч <sup>-1</sup>	T <sub>1/2</sub> , ч	MRT, ч	V <sub>d</sub> , л/кг
121,72	82,160	4,147	0,167	0,217	8,942

Следующий этап исследования был связан с изучением фармакокинетики дилепта после перорального введения его субстанции в дозе 200 мг/кг, основные фармакокинетические параметры которой представлены в табл. 5. Доза была значительно увеличена (до 200 мг/кг) с целью более продолжительного наблюдения периода элиминации из-за низких концентраций препарата на этом участке его фармакокинетической кривой. В табл. 5 представлены основные фармакокинетические параметры дилепта после перорального введения субстанции в дозе 200 мг/кг.

Таблица 5

**Фармакокинетические параметры дилепта у крыс после перорального введения в дозе 200 мг/кг**

Параметр, размерность	Субстанция
C <sub>max</sub> , нг/мл	8,5
T <sub>max</sub> , мин	15
AUC <sub>0-∞</sub> , нг/мл × ч	2,5
Cl <sub>po</sub> , л/ч	8,050
T <sub>1/2</sub> , мин	27
MRT <sub>po</sub> , мин	42
V <sub>Zpo</sub> , л	52,968
F <sub>абс.</sub> , %	0,1

Из представленных в табл. 5 данных следует, что дилепт быстро и интенсивно распределяется во внутренней среде организма крыс, на что указывает высокая величина его плазменного клиренса и большого объёма распределения, что свидетельствует о быстром перераспределении дилепта из центральной камеры в периферическую, независимо от способа введения (внутривенно или перорально). Дилепт быстро метаболизируется с образованием 2 метаболитов: N- капроил-L-пролил-L-тирозин (M1) и N- капроил-L-пролил (M2), вследствие чего величина его абсолютной биодоступности составляет 0,1% (табл. 5). Такая низкая величина биодоступности обусловлена, скорее всего, эффектом первого прохождения дилепта через печень и его быстрым метаболизмом. В то же время из-за

плохой растворимости, нельзя исключить неполное всасывание дилепта в ЖКТ. Указанные выше метаболиты определяются в плазме крови крыс в течение более 4 ч после введения. Следует подчеркнуть, что дилепт проявляет антипсихотическую активность при пероральном введении субстанции, а метаболит M1 обладает, как и исходное соединение, фармакологической активностью [16, 18].

Анализируя полученные результаты, можно заключить, что дипептидный аналог нейротензина дилепт, несмотря на быстрый метаболизм, значительно превосходит по энзиматической стабильности исходный тридекапептид – нейротензин (НТ). Тогда как НТ разрушается энзимами крови в течение 30 с [17], дилепт при введении в вену определяется в крови экспериментальных животных более 30 мин.

Следует подчеркнуть, что сам НТ проявляет эффекты лишь при внутримозговом введении, дилепт же эффективен в условиях внутривенного и, что наиболее важно, перорального введения, что согласуется с фармакокинетическими параметрами дилепта (табл. 4, 5).

Полученные данные указывают на перспективность разработки пероральной лекарственной формы препарата.

В связи с изложенными результатами для улучшения фармакокинетических свойств дилепта были проведены исследования его фармакокинетики после введения пероральной лекарственной формы. Фармакокинетические параметры, рассчитанные на основе экспериментальных данных по сравнительному изучению фармакокинетики дилепта после введения субстанции и лекарственной формы в виде таблеток, представлены в табл. 6.

Таблица 6

**Основные фармакокинетические параметры дилепта в плазме крови крыс после введения субстанции и таблетированной лекарственной формы в дозе 200 мг/кг**

Параметр, размерность	Субстанция	Таблетки
C <sub>max</sub> , нг/мл	8,5	20
T <sub>max</sub> , мин	15	10
AUC <sub>0-∞</sub> , нг/мл × ч	2,5	3,0
Cl <sub>po</sub> , л/ч	8,0502	6,5786
K <sub>el</sub> , ч <sup>-1</sup>	1,5	5,38
T <sub>1/2</sub> , мин	27	8
MRT <sub>po</sub> , ч	0,7	0,3
V <sub>Zpo</sub> , л	5,297	12,23
F <sub>отн.</sub> , %	—	122

Так, для дилепта были установлены значительные различия фармакокинетических параметров как на стадии всасывания, так и на стадии элиминации при введении субстанции и таблеточной массы (табл. 6). Дилепт быстрее и полнее всасывается при его введении в форме таблеток, о чем свидетельствует уменьшение T<sub>max</sub> и увеличение величины C<sub>max</sub> и AUC в сравнении с этими параметрами субстанции. Величина отно-

сительной биодоступности увеличивается за счёт вспомогательных веществ лекарственной формы и составляет 122%, это может быть связано с замедлением процессов метаболизма дилепта (табл. 5, 6), о чём свидетельствует значительное уменьшение величины  $C_{max}$  и AUC метаболита M1 при введении таблеток. Результаты изучения фармакокинетики метаболита M1 представлены в табл. 7.

Таблица 7

**Основные фармакокинетические параметры N-капроил-L-пролил-L-тирозина (M1) в плазме крови крыс после введения субстанции и таблеточной массы дилепта в дозе 200 мг/кг**

Параметр, размерность	Субстанция	Таблетки
$C_{max}$ , нг/мл	506,6	188,0
$T_{max}$ , мин	20	10
AUC <sub>0-240</sub> , нг/мл × ч	1047,20	191,91
$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	0,33	0,54
$T_{1/2}$ , ч	2,089	1,284
AUC <sub>0-240 subst</sub> /AUC <sub>0-240 tab</sub>	5,45	

Из данных табл. 7 следует, что после введения таблеточной массы значительно уменьшается величина максимальной концентрации метаболита M1 и его площади под фармакокинетической кривой, при этом степень образования метаболита M1 уменьшается в 5,45 раз по сравнению с субстанцией. По всей вероятности, входящий в состав лекарственной формы лудипресс, существенно замедляет метаболизм дилепта [16]. Полученные результаты позволили рекомендовать предложенную лекарственную форму для дальнейшего фармакологического изучения.

### Селективный анксиолитик ГБ-115

При изучении фармакокинетики трипептоидного аналога холецистокинина-4 анксиолитика ГБ-115, представляющего собой амид N-фенилгексаноил-L-пролил-L-триптофана, было установлено, что соединение определяется в плазме крови крыс в течение 45 мин после его внутривенного введения, медленно элиминируется из крови и хорошо распределяется во внутренней среде организма, о чём свидетельствует величина клиренса и объёма распределения (табл. 8).

Следующий этап исследования был связан с изучением фармакокинетики после перорального введения субстанции соединения ГБ-115, результаты которого представлены в табл. 9.

Таблица 8

**Основные фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови крыс после внутривенного введения субстанции в дозе 10 мг/кг**

AUC, нг/мл × ч	$Cl_r$ , л/ч	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	MRT, ч	$V_d$ , л/кг
740	13,89	2,0667	0,33	0,35	4,70

Таблица 9

**Основные фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови крыс после перорального введения субстанции в дозе 100 мг/кг**

Параметр, размерность	Величина параметра
$C_{max}$ , нг/мл	240
$T_{max}$ , мин	15
AUC <sub>0-∞</sub> , нг/мл × ч	147,50
$C_{max}/AUC_{0-∞}$ , ч <sup>-1</sup>	1,6
$Cl_{po}$ , л/ч	305,06
$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	1,76
$T_{1/2}$ , мин	19,8
MRT <sub>po</sub> , ч (мин)	5,08 (304,8)
$Vz_{po}$ , л	46,21
$F_{abs.}$ , %	199

Анализируя приведённые в таблице данные можно отметить, что соединение ГБ-115 достигает максимальной концентрации через 15 мин после перорального введения субстанции, но при этом быстро покидает системный кровоток и распределяется во внутренних органах и тканях крыс, о чём свидетельствует большая величина плазменного клиренса и объёма распределения, значительно превышающая реальный объём жидкости в организме крыс, вследствие чего величина площади под фармакокинетической кривой составляет 147,50 нг/мл × ч и абсолютная биодоступность равняется 199%.

### Оптимизация лекарственной формы анксиолитика ГБ-115 с использованием данных его фармакокинетики

Исследование фармакокинетики лекарственных форм для перорального применения ноопепта и дилепта и их оптимизация за счёт вспомогательных веществ, влияющих на фармакокинетику активного соединения, касались в основном стадии создания самой лекарственной формы, а не модификации субстанций. Имеется большое количество публикаций, касающихся различных методических подходов модификации субстанций лекарственных веществ, направленных на увеличение энзиматической устойчивости, скорости и степени всасывания, величины биодоступности [22–24]. Одним из таких подходов является микронизация субстанций, которая значительно увеличивает удельную поверхность субстанции, определены оптимальные размеры частиц, способствующие более полному всасыванию и увеличению биодоступности изучаемых лекарственных веществ [23].

Здесь целесообразно привести в качестве примера разработку пероральной лекарственной формы и оптимизации её фармакокинетических параметров анксиолитика ГБ-115, которая была связана как со стадией модификации субстанции, так и со стадией

разработки фармацевтической композиции, составляющей основу лекарственной формы препарата для перорального применения. Имеются литературные данные о влиянии на фармакокинетику, особенно на процессы абсорбции, именно, на скорость и степень всасывания и, следовательно, на величину биодоступности размерности частиц субстанции, установлен наиболее оптимальный размер частиц для пептидов, составляющий 10 мкм [21].

Нами была изучена фармакокинетика у крыс после перорального введения 2 видов субстанций: кристаллической и микронизированной в дозе 100 мг/кг, параметры частиц которой составляли 10 мкм. Результаты влияния микронизации субстанции соединения ГБ-115 на его фармакокинетические параметры представлены в табл. 10.

Таблица 10

**Фармакокинетические параметры соединения ГБ-115 у крыс после перорального введения кристаллической и микронизированной субстанций в одной дозе (100 мг/кг)**

Параметр, размерность	Кристаллическая субстанция	Микронизированная субстанция
$C_{\max}$ , нг/мл	146,16	113,02
$T_{\max}$ , мин	10	20
$AUC_{0-\infty}$ , нг/мл × ч	3279,311	4983,617
$Cl_{po}$ , л/мин	6,988	4,013
$C_{\max}/AUC_{0-\infty}$ , ч <sup>-1</sup>	0,052	0,028
$T_{1/2}$ , мин	14,73	21,79
$K_{el}$ , мин <sup>-1</sup>	0,0471	0,0323
$MRT_{po}$ , мин	23,83	39,87
$Vz_{po}$ , л	129,60	124,40
$F$ , %	—	142,48

Установлены существенные различия фармакокинетики соединения ГБ-115 после введения кристаллической и микронизированной субстанций как на стадии всасывания, так и на стадии его элиминации и распределения (табл. 10). Так, величина максимальной концентрации меньше, а время её достижения больше после введения микронизированной субстанции по сравнению с аналогичными параметрами кристаллической субстанции. В данном случае микронизация субстанции ГБ-115 не привела к позитивному результату — увеличению скорости и степени всасывания, что, вероятно, связано с плохой смачиваемостью труднорастворимой субстанции препарата. Микронизация субстанции значительно увеличивает её удельную поверхность, что сопровождается накоплением электростатического заряда и приводит к агрегации и агрегации частиц субстанции, вследствие чего снижается скорость растворения и абсорбции препарата [17]. В то же время было установлено положительное влияние микронизации субстанции на стадии элиминации и распределения препарата. Такие параметры, как период полувыведения, MRT, константа элиминации, величина плазменного клиренса свидетельствуют о

более длительном пребывании соединения ГБ-115 (до 1,5 ч) в организме экспериментальных животных после введения микронизированной субстанции препарата. При этом величина AUC после введения микронизированной субстанции значительно увеличивается, по сравнению с этим параметром у кристаллической субстанции, и относительная биодоступность составляет 142%. Увеличение биодоступности при введении микронизированной субстанции, по сравнению с кристаллической, обусловлено увеличением величин периода полувыведения и MRT, а также снижением плазменного клиренса и константы элиминации препарата. Величина объёма распределения при введении обеих субстанций отличается незначительно, что указывает на сходный характер распределения этих субстанций в органах и тканях экспериментальных животных.

Следующий этап создания препарата был связан с разработкой его оптимальной по фармакокинетическим параметрам лекарственной формы. С этой целью в ОТО ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» были разработаны 4 фармацевтические композиции на основе кристаллической и микронизированной субстанций с различным составом вспомогательных веществ (табл. 11).

Таблица 11

**Состав фармацевтических композиций (ФК) для создания оптимальной лекарственной формы соединения ГБ-115**

№ ФК	Состав ФК
ФК 1	Кристаллическая субстанция, лудипресс, неусиллин
ФК 2	Микронизированная субстанция, твердая дисперсная система с поливинилпирролидоном
ФК 3	Микронизированная субстанция, лудипресс, неусиллин
ФК 4	Микронизированная субстанция, лактоза, микрокристаллическая целлюлоза, гидроксиметил пропицеллюлоза

В ранее опубликованной работе [20] представлены результаты детального изучения фармакокинетики 4 фармацевтических композиций с использованием кристаллической и микронизированной субстанций, а также различным составом вспомогательных веществ. Показано, что ФК №1, изготовленная на основе кристаллической субстанции характеризуется значительно худшими фармакокинетическими показателями: меньшей скоростью и степенью всасывания, и величиной биодоступности изучаемого соединения по сравнению с этими показателями ФК №3; использование микронизированной субстанции при том же составе вспомогательных веществ приводило к улучшению фармакокинетических параметров и увеличивало величину биодоступности на 42%. На основе полученных результатов по сравнительному изучению фармакокинетики этих фармацевтических композиций были рассчитаны их фармакокинетические параметры, представленные в табл. 12.

Таблица 12

## Фармакокинетические параметры 4 фармацевтических композиций соединения ГБ-115

Параметры	ФК 1	ФК 2	ФК 3	ФК 4
$C_{\max}$ , нг/мл	126,250	185,09	97,364	121,50
$T_{\max}$ , мин	20	15	20	15
$AUC_{0-\infty}$ , нг/мл × мин	2332,12	10399,65	11967,19	12615,99
$C_{\max}$ , нг/мл	126,250	185,098	97,384	121,50
$C_{\max}/AUC$ , ч <sup>-1</sup>	0,059	0,024	0,021	0,016
$Cl_{po}$ , мл/мин	8,576	1,923	1,672	1,58
$K_{el}$ , мин <sup>-1</sup>	0,1475	0,0155	0,0094	0,0109
$T_{1/2}$ , мин	4,70	44,75	74,01	63,86
$MRT_{po}$ , мин	18,26	68,32	113,20	95,75
$V_{z_{po}}$ , мл	58,15	124,20	178,50	146,00
$F$ , %	53,15	192,36	117,14	190,68

Полученные фармакокинетические характеристики позволили отобрать две оптимальные фармацевтические композиции (№2 и №4) по близкой величине биодоступности. Увеличение биодоступности ФК № 2 обусловлено, помимо микронизации субстанции, наличием в составе вспомогательных компонентов твёрдой дисперсной системы с поливинилпирролидоном, за счёт матрицы которой скорость и продолжительность действия лекарственного вещества может быть повышена в 2–3 раза, о чём свидетельствуют источники литературы [19–21]. В данном случае биодоступность значительно увеличилась и составила 192,36%. Что касается ФК № 4, то её высокую величину биодоступности можно объяснить наличием в качестве вспомогательного вещества гидроксипропилметилцеллюлозы – гидрофильной матрицы с контролируемой доставкой активного вещества, которая значительно повышает продолжительность высвобождения действующего вещества из фармацевтической композиции, что может в значительной степени пролонгировать фармакологический эффект лекарственного препарата [22–24]. В связи с полученными данными обе фармацевтические композиции № 2 и № 4 были рекомендованы для дальнейшего фармакологического изучения [21].

В результате дальнейшего изучения фармакологической активности этих двух фармацевтических композиций была отобрана композиция № 4, как наиболее оптимальная как по фармакокинетическим характеристикам, так и по выраженности фармакологической активности, что явилось основанием для создания таблеточной лекарственной формы ГБ-115, которая была рекомендована для проведения клинических испытаний [25].

### Заключение

Таким образом, в результате изучения фармакокинетики трёх дипептидных препаратов – модифицирован-

ных аналогов эндогенных нейропептидов – установлены существенные различия фармакокинетических параметров скорости метаболизма, энзиматической устойчивости и биодоступности в зависимости от структуры дипептида, его лекарственной формы, а также размерности частиц субстанции и состава вспомогательных веществ лекарственной формы. Большое теоретическое и практическое значение имеют полученные впервые результаты по созданию пероральных лекарственных форм новых активных пептидов с улучшенными фармакокинетическими параметрами за счёт использования микронизированных субстанций и контролируемой системы доставки активного вещества, обеспечивающей пролонгирование фармакологического эффекта. Внедрение нового поколения современного инструментального оборудования на основе масс-спектрометрии в разработку научных исследований по созданию оригинальных пептидных препаратов и оптимизации их лекарственных форм, особенно для перорального применения, позволит проводить изучение фармакокинетики и количественного определения низких, сопоставимых с уровнем эндогенных пептидов, концентраций перспективных пептидных соединений в биологическом материале, что позволит более адекватно оценивать результаты экспериментальных данных в плане переноса их на пациента. Полученные результаты будут способствовать созданию оптимальных, с позиций фармакокинетики, лекарственных форм новых пептидных препаратов и их более эффективному использованию в клинической практике.

### Выводы

1. Установлено, что изученные дипептидные препараты, защищённые концевыми группировками, обладают большей энзиматической устойчивостью, и более продолжительное время определяются в биологических средах экспериментальных животных в сравнении с эндогенными нейропептидами.

2. Фармакокинетические исследования дипептидов ноопепта, дилепта и ГБ-115 при разных путях введения показали возможность создания пероральных лекарственных форм этих препаратов.

3. Биофармацевтические исследования дилепта, ноопепта и ГБ-115 способствовали созданию оптимальных лекарственных форм этих препаратов и их внедрению (ноопепт) и рекомендации к внедрению (дилепт и ГБ-115) в медицинскую практику.

### Литература

1. Жердев В.П., Бойко С.С., Месонжик Н.В. и соавт. Экспериментальная фармакокинетика фармакологического препарата Дилепт. Эксп. биол. и мед. 2009; 22: 3: 16–21.
2. Аведисова А.С., Чахова В.О., Лесс Ю.Э. и соавт. Новый анксиолитик Афобазол при терапии генерализованного тревожного расстройства (результаты сравнительного исследования с диазепамом). Психиатр и психофармакотер. 2006; 8: 116–119.

3. Краснов В.Н., Вельтищев Д.Ю., Немцов А.В. и соавт. Новые подходы к лечению стрессовых и тревожных расстройств: результаты многоцентрового исследования эффективности афобазола в психиатрической практике. Психиатр и психофармаколог. 2007; 9 (4): 16–20.
4. Sala-Rabanal M., Loo D.F., Hirayama B.A. et al. Molekullar interaction betwin dipeptides drugs and the human intestinal H<sup>+</sup>-oligopeptide cotransport hPEPT. J. Physiol. 2006; 574: 149–166.
5. Ganapathy M.E., Prasad P.D., Makcenzje at al. Interaction of anionic cephalosporins wih intestinal and renal peptide transporters PEPT1 and PEPT2. Biochim. Biophys Acta. 1997; 1324: 296–308.
6. Гудашева Т.А. Стратегия создания дипептидных лекарств. Вестник РАМН. 2011; 7: 8–16.
7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I, ЗАО «ГРИФ и К», М.: 2013.
8. Бойко С.С., Жердев В.П., Дворянинов А.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У. Фармакокинетика дипептидного аналога пирacetама с ноотропной активностью ГВС-111 и его основных метаболитов. Эксп. и клин. фармакол. 1997; 2: 53–55.
9. Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У. Фармакокинетика нового потенциально активного дипептидного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс. Хим-фарм. журнал. 2001; 9: 11–13.
10. Бойко С.С., Островская Р.У., Жердев В.П. и соавт. Фармакокинетика и проницаемость через гематоэнцефалический барьер нового ацилпролилдипептида с ноотропными свойства после перорального введения. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2000; 120 (4): 426–429.
11. Бойко С.С., Жердев В.П., Гудашева Т.А. и соавт. Биодоступность ноопепта — нового ноотропного препарата дипептидной структуры. Хим.-фарм. журнал. 2004; 38: 12: 3–5.
12. Gudasheva T.A., Boyko S.S., Ostrovskaya R.U. et al. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and similarity to endogenous neuropeptide cycloprolylglycine. European Journal of drug metabolism and pharmacokinetics. 1997; 22: 3: 245–252.
13. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А. и соавт. Сходство цикло-пролилглицина с пирacetамом по антигипоксическому и нейропротективному эффектам. Эксп. и клин. фармакол. 2012; 75: 9: 3–6.
14. Колясникова К.Н., Вичужанин М.В., Константинопольский М.А. и соавт. Синтез и фармакологическая активность аналогов эндогенного нейротропного цикло-пролилглицина. Хим-фарм. журнал. 2012; 46: 2: 31–37.
15. Гудашева Т.А., Колясникова К.М., Кузнецова Е.А. и соавт. Этиловый эфир N-фенилацетилпролил-глицина метаболизируется до циклопролил-глицина превосходный спектр нейротропной активности. Хим.фарм. журнал. 2016; 11: 3–8.
16. Gudasheva T.A., Voronina T.A., Ostrovskaya R.U. et al. Design of N-acylprolyltyrosine Tripeptide Analogs of Neurotensin as Potential Atypical Antipsychotic Agents. J. Med. Chem. 1998; 41: 294–290.
17. Aronin N., R. Garrawaj. W., Ferris C.G. Peptides. 1982; 3 (4): 637–642.
18. Островская Р.У., Ретюнская М.В., Гузевых Л.И. Трипептидный аналог нейротензина дилепт сочетает нейролептическую активность с мнемотропным действием. Экспер. и клин. фармакол. 2005; 68: 1: 3–6.
19. Бойко С.С., Жердев В.П., Колыванов Г.Б. и соавт. Экспериментальная фармакокинетика анксиолитика ГБ-115 при разных способах введения. Бюлл. эксп. биол. и мед. 2007; 144: 9: 285–288.
20. Жердев В.П., Бойко С.С., Блынская и соавт. Доклиническое изучение фармакокинетики нового анксиолитика дипептидной природы ГБ-115. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2015; 1: 55–59.
21. Колик Л.Г., Жердев В.П., Бойко С.С. и соавт. Экспериментальная фармакокинетика и фармакодинамика субстанции дипептидного анксиолитика ГБ-115. Экспер. и клин. фармакол. 2016; 11: 42–46.
22. Harris J.M., Chess R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals. Nat. Rev. 2010; 2: 214–221.
23. Bodhankar M.M., Agnihotri V.V., Bhushan S.B. Feasibility formulation, characterization innovative microparticles for oral delivery of peptide drug. Int. J. of Research in Pharm. and Chem. 2011; 1 (3): 630–636.
24. Herrero E.P., Alonso M.J., Csaba N. Polymer-based oral peptide nanomedicines. Therapeutic Delivery. 2012; 3 (5): 657–668.
25. Жердев В.П., Бойко С.С., Константинопольский М.А. и соавт. Фармакокинетика и фармакодинамика фармацевтических композиций дипептидного анксиолитика ГБ-115. Хим-фарм. журнал. 2016; 50: 5: 42–46.

# Эффективность аскорбата лития на модели хронической алкогольной интоксикации

Остренко К.В.<sup>1</sup>, Громова О.А.<sup>2</sup>, Сардарян И.С.<sup>3</sup>, Демидов В.И.<sup>2</sup>, Жидоморов Н.Ю.<sup>2</sup>, Торшин И.Ю.<sup>4</sup>, Пронин А.В.<sup>2</sup>, Кривоногов В.А.<sup>2</sup>, Карпунина Ю.В.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБНУ «ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных», Калужская обл., г. Боровск

<sup>2</sup> – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

<sup>3</sup> – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург

<sup>4</sup> – ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Долгопрудный

**Резюме.** Исследовано действие аскорбата лития на модели хронической алкогольной интоксикации. Воздействие алкоголя приводит к возникновению девиантного поведения у животных, повышает агрессию и вызывает необратимые дегенеративные изменения в печени и ЦНС. Аскорбат лития в дозе 5 мг/кг, как и в более высоких дозах (10 и 30 мг/кг), активирует адаптивные механизмы, нормализуя поведенческие реакции в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Гистологический анализ показал, что использование аскорбата лития минимизировало уровень ишемического повреждения нейроцитов до уровня обратимого состояния. В целом, применение аскорбата лития способствует купированию абстинентного синдрома, блокирует возникновение судорог и способствует сохранности функции ЦНС в модели хронической алкогольной интоксикации.

**Ключевые слова:** алкогольная интоксикация, аскорбат лития, нормотим

## The effectiveness of lithium ascorbate on chronic alcohol intoxication model

Ostrenko K.V.<sup>1</sup>, Gromova O.A.<sup>2</sup>, Sardaryan I.S.<sup>3</sup>, Demidov V.I.<sup>2</sup>, Zhidomorov N.Yu.<sup>2</sup>,

Torshin I.Yu.<sup>4</sup>, Pronin A.V.<sup>2</sup>, Krivonogov V.A.<sup>2</sup>, Karpunina Yu.V.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – FGBNU «Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals», Kaluga region., Borovsk

<sup>2</sup> – Ivanovo State Medical Academy», Ivanovo

<sup>3</sup> – FFSBI HPE «Saint Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg

<sup>4</sup> – Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

**Resume.** The alcohol leads to deviant behavior in animals, increases aggression and irreversible degenerative changes in the liver and in the central nervous system. Lithium ascorbate in dose of 5 mg/kg, as well as higher doses (10 and 30 mg/kg), activates adaptive mechanisms normalizing behavioral responses in the tests «open field» and «elevated plus-maze». Histological analysis showed that lithium ascorbate minimize ischemic damage of neurocytes to a reversible state. In general, the use of lithium ascorbate contributes to relief of withdrawal symptoms, inhibited the occurrence of seizures and contributed to preservation of the function of the central nervous system in the model of chronic alcohol intoxication.

**Keywords:** alcohol intoxication, lithium ascorbate, Normotim

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, г. Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

## Введение

Механизмы развития алкогольной зависимости включают нарушения функционирования дофаминергической и других медиаторных систем головного мозга [1], гуморальных и нейротрофических факторов [2]. Перспективным направлением исследований является изучение ролей обеспеченности макро- и микроэлементами в формировании, профилактике и лечении алкогольной зависимости, т.к. микроэлементный статус организма может высокоспецифично регулироваться специальными препаратами, содержащими микроэлементы.

Ионы лития играют важные роли в регуляции нейромедиаторного баланса, поддержании баланса нейротрофических факторов и многих других физиологических процессах, важных для ЦНС. В соответ-

ствии с имеющимися публикациями по биологическим ролям лития (около 40 000 к настоящему времени), наиболее изучены фармакологические применения сверхвысоких доз карбоната лития при психиатрических расстройствах [3]. Однако спектр биологических ролей лития гораздо шире.

Установлено участие ионов лития в метаболизме простых сахаров (в т.ч. регуляции секреции инсулина [4]), участие ионов лития в обмене липидов [5], регуляции артериального давления [6], кроветворения [7]. Ионы лития способствуют ингибированию циклооксигеназы-2, что снижает концентрации пирогенного простагландина E2 в головном мозге и в других тканях и приводит к противовоспалительному действию препаратов лития [8].

Особо следует подчеркнуть важность участия ионов лития в гомеостазе нейромедиаторов. Ионы лития избирательно накапливаются в ЦНС и оказывают

существенное воздействие на гомеостаз многих нейротрансмиттеров. Так, *ионы лития влияют на метаболизм и активность рецепторов ацетилхолина*, активность ацетилхолинэстеразы и секрецию ацетилхолина в коре головного мозга [9]. В эксперименте *ионы лития* регулировали уровни энкефалинов в гипофизе [10]. Ионы лития ингибируют накопление циклического АМФ в нейронах мозга, происходящего при активации адренергических рецепторов [11].

Важно отметить, что ионы лития воздействуют на *гомеостаз допамина* [12], активность *рецепторов серотонина* [13], повышают уровни рецепторов ГАМК, ослабляют активность сигнальных каскадов, активируемых посредством NMDA-рецепторов [14], тормозят формирование зависимости от каннабиноидов посредством модуляции сигнальных путей цАМФ, ERK1/2 и GSK-3. Изучаются и другие гормональные эффекты лития: установлено воздействие ионов лития на нейроактивные стероиды и нейропластичность [15]. Все эти биохимические механизмы, так или иначе, нарушаются при воздействии алкоголя.

Для усиления противоалкогольных биологических эффектов лития (например, за счёт улучшения транспорта ионов лития внутрь нейронов) могут использоваться органические анионы — в частности, аскорбат-анион. Хемореактомное моделирование эффектов аскорбата лития в сравнении с другими органическими солями лития показало, что аскорбат-аниону, по сравнению с контрольными молекулами (никотинатом, оксибутиратом, коменатом) свойственно большее родство к дофаминовым, серотониновым, бензодиазепиновым, адренергическим рецепторам. Более высокое родство к рецепторам, указывает, во-первых, на возможность модуляции активности этих рецепторов аскорбатом лития и, во-вторых, на более интенсивный транспорт аскорбата лития внутрь нейронов. Аскорбат-анион также может проявлять анксиолитический, умеренный антикоагуляционный, антигиперлипидемический и антигипергликемический эффекты, что также способствует нормализации гемодинамики ЦНС при алкогольной интоксикации [16].

Таким образом, аскорбат лития может способствовать существенному улучшению состояния ЦНС при моделировании алкогольной интоксикации.

*Цель исследования* — определение минимально эффективных доз аскорбата лития, предупреждающих развитие алкогольной зависимости у крыс линии Вистар и изучение эффективности терапии алкогольной интоксикации.

## Материалы и методы

В качестве модельного объекта были использованы самцы белых крыс линии Вистар массой 200–250 г ( $n=168$ ). Все процедуры и опыты на крысах проводились в соответствии с международными правилами обращения с животными и в соответствии с заклю-

чением этического комитета ГБОУ ВПО ИвГМА МЗ РФ (протокол № 2 от 27 апреля 2016 г.). Животные содержались в одинаковых комнатах, в клетках по 7 крыс в каждой, при температуре 19–21 °С. Животных ежедневно кормили комбикормом из расчёта 40–50 г на особь.

**Создание модели алкогольной зависимости.** Критерием отбора крыс, наряду с отсутствием видимых отклонений в состоянии и поведении, являлось исходное предпочтение 6% раствора этилового спирта перед водопроводной водой. Для выявления этого предпочтения в течение 3 дней проводился предварительный эксперимент в индивидуальных клетках со свободным доступом к обеим жидкостям. После отбора в качестве единственного источника жидкости предлагался 6% раствор этилового спирта, через неделю концентрация спирта была увеличена до 15%. Через 2 недели спирт заменялся водопроводной водой.

**Дозировка и применение препарата.** Эксперимент проводился в двух сериях — «профилактика» и «лечение», по четыре группы в каждой серии: 1) доза 30 мг/кг (опытная группа 1); 2) доза 10 мг/кг (опытная группа 2); 3) доза 5 мг/кг (опытная группа 3); 4) группа плацебо. В серии экспериментов «профилактика» препарат вводился параллельно с созданием модели, а в серии экспериментов «лечение» — после создания модели. В каждую группу входило 21 животное. В течение 14 дней препарат вводился в растворённом виде внутрижелудочно, с помощью зонда, 1 раз в сутки в объёме 0,5 мл на каждое животное.

**Неврологическое тестирование.** Проводилась общая оценка соматического и неврологического статуса животных всех исследованных групп. Оценка уровня тревожности, адаптогенности и негативного воздействия алкоголя на ЦНС осуществляли путём наблюдения за поведением животных в тестах открытое поле (ОП) и приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) через 7 и 14 дней введения аскорбата лития.

В тесте *открытое поле* регистрировалась вертикальная двигательная активность, горизонтальная двигательная активность, количество заглядываний в отверстия (т.н. «норочный рефлекс»), число актов груминга, количество выходов в центральную зону. В тесте ОП животное помещали в один и тот же квадрат, расположенный возле стенки. Время экспозиции каждого животного в модели составило 5 мин. Круглое ОП представляет собой арену 1 м в диаметре, с высотой стенки 0,4 м, дно которой имело деления на сектора. В открытом поле было очерчено 3 зоны: центральная, промежуточная (6 секторов), периферическая (12 секторов). Освещение производится 2 лампами, мощностью по 60 Вт, которые располагались на высоте 1,5 м от дна камеры над центральными сегментами поля. В тесте фиксировалась горизонтальная активность в центральной и периферической зоне, вертикальная активность, количество актов груминга, количество актов дефекации, норковые рефлекс. После каждого

животного стенки и дно обрабатывались влажной и сухой салфеткой.

В тесте *приподнятого крестообразного лабиринта* регистрировали время нахождения животных в открытых (ОР) и закрытых рукавах (ЗР) и в центре лабиринта, длительность груминга в закрытом рукаве, количество эпизодов груминга в закрытом рукаве. Объект помещали в центр ПКЛ, носом к открытому рукаву. Время тестирования животных в ПКЛ составляло 5 мин. Тест ПКЛ представлял установку, имеющую два рукава, в месте пересечения которых находилась открытая площадка. Один из рукавов лабиринта имел закрытые отсеки. Лабиринт устанавливали на высоте одного метра от пола. Регистрировалось время нахождения в открытом и закрытом рукаве, количество актов груминга, количество вертикальных стоек.

**Измерения биохимических показателей.** На день «0» и день «14» у животных всех групп определялись биохимические показатели: аланиновая трансаминаза (АЛТ), аспаратаминотрансфераза (АСТ), малоновый диальдегид (МДА), дофамин, норадреналин, адреналин, серотонин в сыворотке крови и алкогольдегидрогеназы (АДГ) в клетках печени. Отбор крови производился из подъязычной вены при помощи подрезки подъязычной уздечки. Из цельной крови получали сыворотку согласно «Руководству по назначению и интерпретации биохимических анализов крови» (Е. Сидоров, 2015 г.). Определение проводилось на автоматическом биохимическом анализаторе «Konelab-20i» (Финляндия—США). Клетки печени для определения АДГ отбирались у животных после проведения эксперимента. Активность АДГ в гепатоцитах определялась фотометрическим методом.

АЛТ и АСТ (в мкмоль/мл/ч) определялись на автоматическом фотометрическом анализаторе CHEM WELL 2910 (C) (Combi) (США) при помощи стандартных наборов производства ООО «Эйлитон» (Россия) «АЛТ – UTS» и «АСТ – UTS» соответственно, МДА в нмоль/мл [17] и ААД, в нмоль/мг белка/мин [18] – на микроспектрофотометре NanoDrop™ 2000. Серотонин определялся по методу Майкея. Катехоламины (в нмоль/мл) определялись на жидкостном хроматографе Waters 590 с амперометрическим детектором (НПО «Химавтоматика») (материал рабочего электрода – стеклоуглерод), колонка Ascentic C18 (5 мкм, 4,6×250 мм). Электрофоретическое определение проводилось на системе капиллярного электрофореза «Капель-105» (ООО «НПФ Люмэкс») со спектрофотометрическим детектором, немодифицированный кварцевый капилляр, общая длина – 60 см, эффективная длина – 50 см, внутренний диаметр – 50 мкм.

**Гистологический анализ нервной ткани.** После краниотомии головной мозг извлекался целиком и фиксировался в 10% растворе нейтрального формалина, через 1 сут с помощью фронтальных разрезов выделялась зона прецентральной извилины переднего мозга. Проводка нервной ткани осуществлялась по

стандартной схеме (обезживание в этиловом спирте, ксилоле) с последующим изготовлением парафиновых блоков. Изготовленные на санном микротоме «Microm» гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Дубликаты срезов с помощью набора реактивов компании «Бивитрум» были окрашены по методу Ниссля и импрегнированы серебром. Морфометрическое исследование гистологических срезов проводилось на анализаторе изображения «BioVision» (Австрия) и заключалось в подсчёте повреждённых нейроцитов пирамидного слоя коры полушарий переднего мозга в 10 различных полях зрения с последующей статистической обработкой результатов. Микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа «Micros» и цифровой окулярной камеры DCM 900.

**Обработка результатов.** Результаты обрабатывали с использованием программных пакетов Excel 2003 и Statistica 8.0. Достоверность различий между группами определяли по непараметрическому U-критерию – тесту Вилкоксона–Манна–Уитни.

## Результаты

В результате исследования было установлено, что аскорбат лития был эффективен в терапии и профилактике последствий алкогольной интоксикации. Показатели неврологических тестов и биохимического анализа крови достоверно улучшались уже при использовании наименьшей из исследованных доз аскорбата лития (5 мг/кг). Увеличение дозы аскорбата лития (10 мг/кг, 30 мг/кг) не приводило к существенному улучшению исследованных показателей состояния. Гистологический анализ подтвердил результаты неврологических тестов и биохимических анализов и показал, что аскорбат лития снижает ишемию нервной ткани, способствует сохранности нервных путей.

## Модель алкогольной интоксикации

Интактные животные демонстрировали нормальные показатели при неврологическом тестировании (табл. 1), имели блестящую, гладкую шерстку, были активны.

Замена воды на 6%, а затем 15% спиртовой раствор, в течение двух недель приводила к нарушению поведенческих реакций у крыс. У крыс контрольной группы, получавших только спиртовой раствор, при тестировании в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт отмечается повышение горизонтальной периферической активности при полном исключении захождения в центр. У животных отмечалась тусклая шерстка с очагами аллопеции. Животные двигались хаотично, вдоль стенки, не проявляя исследовательского поведения и поисковых навыков. Это может свидетельствовать о превалировании у животных чувств тревоги и страха на фоне интоксика-

Таблица 1

## Поведение интактных животных

Поведение животных в тесте Открытое поле						
группы	вертикальная двигательная активность	горизонтальная двигательная активность		количество заглядываний в отверстие	число актов груминга	количество болюсов, шт.
		центральная	периферическая			
1-я группа (30 мг/кг)	3,0	2,9	12,3	6,0	2,3	1,0
2-я группа (10 мг/кг)	2,9	2,6	12,1	6,1	1,9	0,9
3-я группа (5 мг/кг)	3,2	3,0	13,1	6,5	2,6	1,2
контрольная	2,9	2,4	11,9	6,3	2,0	1,0
Поведение животных в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт						
группы	время пребывания в открытом рукаве, с	время пребывания в закрытом рукаве, с	количество актов груминга	вертикальная активность		
1-я группа (30 мг/кг)	40,15	258,34	3,04	2,3		
2-я группа (10 мг/кг)	42,24	244,13	2,95	1,94		
3-я группа (5 мг/кг)	50,12	246,16	3,10	2,8		
контрольная	46,24	250,45	3,01	2,1		

Таблица 2

## Изменения показателей неврологического тестирования и биохимического анализа крови при хронической алкогольной интоксикации

Показатель	M±m день «0»	M±m день «14»	P
<i>Открытое поле</i>			
Горизонтальная активность периферическая	13,00±1,63	19,00±6,06	0,013182
Вертикальная двигательная активность	3,00±1,63	0,29±0,49	0,000601
Горизонтальная активность центральная	2,86±1,77	0,00±0,00	0,00055
Отверстия	6,00±1,83	0,29±0,49	1,88E-06
Груминг	2,29±1,60	7,57±2,88	0,000569
Болюсы	1,00±1,15	16,43±6,50	2,36E-05
<i>Приподнятый крестообразный лабиринт</i>			
Груминг	3,00±1,15	7,71±2,06	9,66E-05
Вертикальная активность	2,86±1,07	0,29±0,49	4,31E-05
Время ОР	42,24±2,37	0,55±0,21	3,25E-15
Время ЗР	250,74±4,80	299,31±0,34	2,32E-12
<i>Биохимические показатели</i>			
АДГ	4,93±0,43	8,40±1,29	1,04E-05
АЛТ	2,74±0,57	6,12±0,74	2,9E-07
АСТ	1,50±0,22	4,78±0,76	6,11E-08
МДА	2,04±0,10	6,22±1,13	2,16E-07
ДОФ	54,30±3,78	84,16±1,56	1,04E-10
НОРАДР	46,23±2,55	86,22±3,30	4,26E-12
АДР	33,40±0,95	95,76±5,47	6,56E-13
СЕРТ	1070,29±9,07	857,12±5,23	5,5E-16

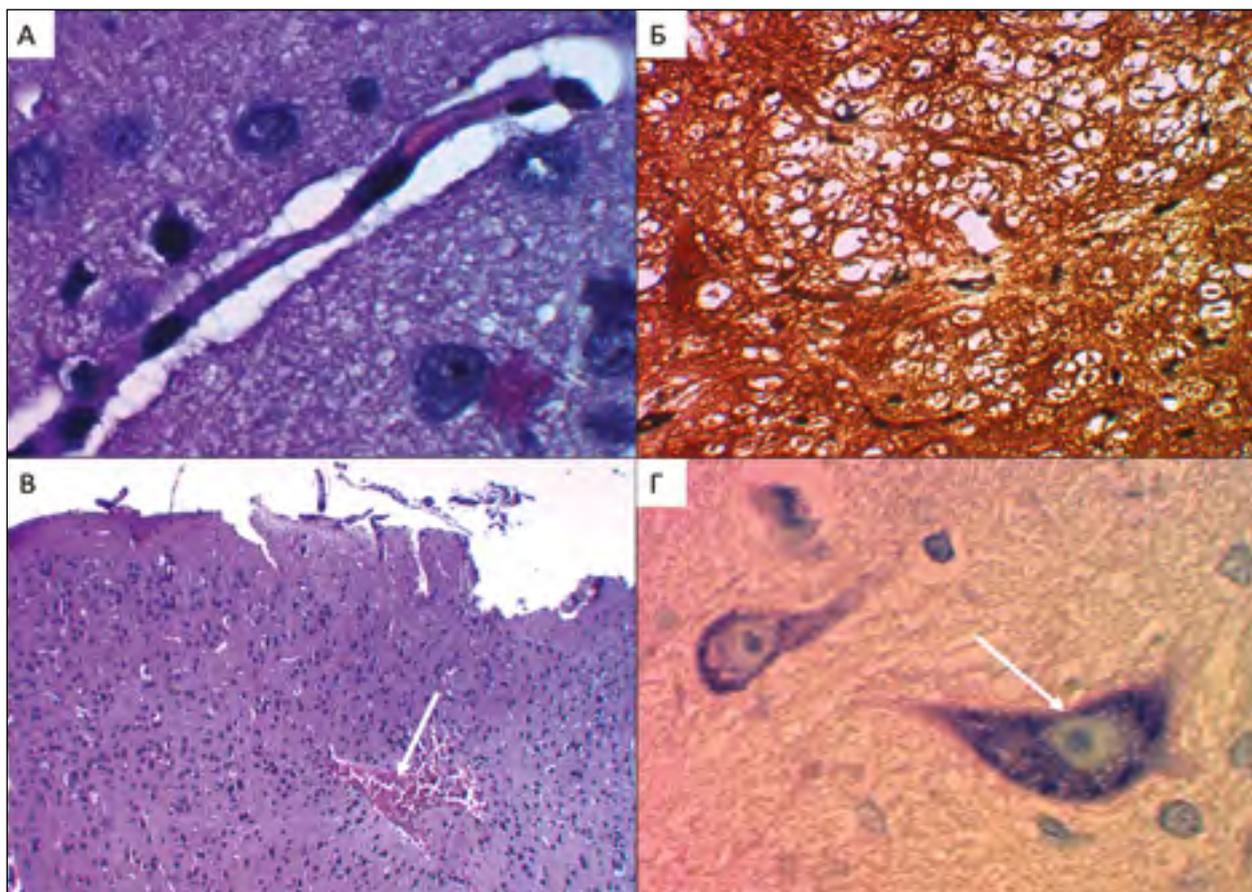
ции алкоголем. На данном фоне заметно увеличение актов дефекации и груминга. Более подробно изменения показателей неврологического тестирования и биохимического анализа крови, происходившие при создании модели, представлены в табл. 2.

Гистологический анализ показал, что при моделировании хронической алкогольной интоксикации во всех наблюдениях контрольной группы выявлены нарушения кровообращения, которые характеризовались гемостазом в капиллярах и венулах с развитием выраженного периваскулярного отёка нервной ткани (рис. 1А). В условиях нарушения гемоциркуляции на уровне МЦР постепенно нарастал перичеллюлярный отёк белого вещества больших полушарий и ствола головного мозга (рис. 1Б). В коре больших полушарий и стволовом отделе головного мозга выявлены мелкоочаговые кровоизлияния (рис. 1В). Токсическое повреждение нейроцитов коры больших полушарий характеризовалось острым набуханием пирамидных клеток с округлением клеточного тела, набуханием аксона, гомогенизацией цитоплазмы с исчезновением грануляций Ниссля, нарушением контуров ядра (рис. 1Г).

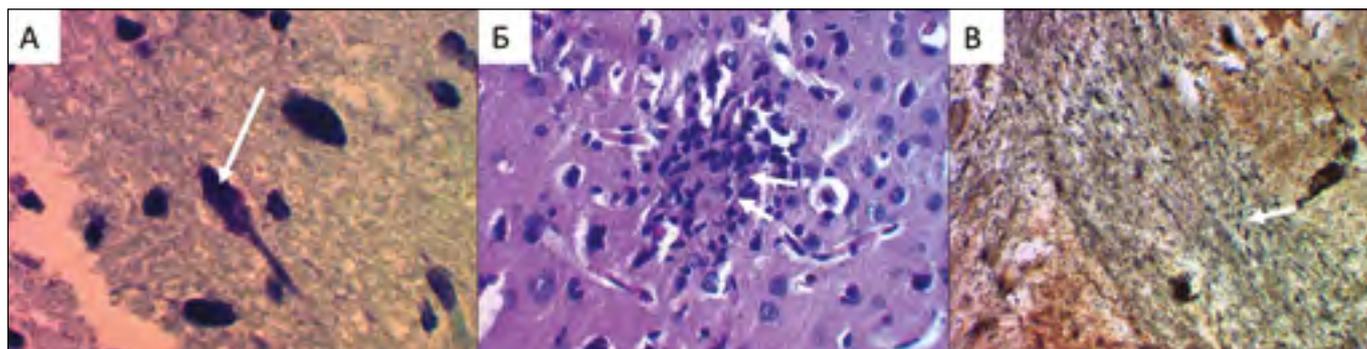
Необратимые изменения нейронов коры больших полушарий сопровождалась гиперхроматозом, пикнозом нейроцитов с последующим глыбчатым распадом и формированием нейрофагических узелков (рис. 2А, 2Б). При изучении зон головного мозга, содержащих проводящие пути, выявлено набухание волокон с неравномерным распределением миелина, варикозными утолщениями по ходу волокон (рис. 2В). Таким образом, при создании модели алкогольной интоксикации отмечаются выраженные неврологические и биохимические нарушения, которые соответствуют тяжёлой патологии нервной ткани.

### Результаты профилактического применения аскорбата лития при алкогольной интоксикации

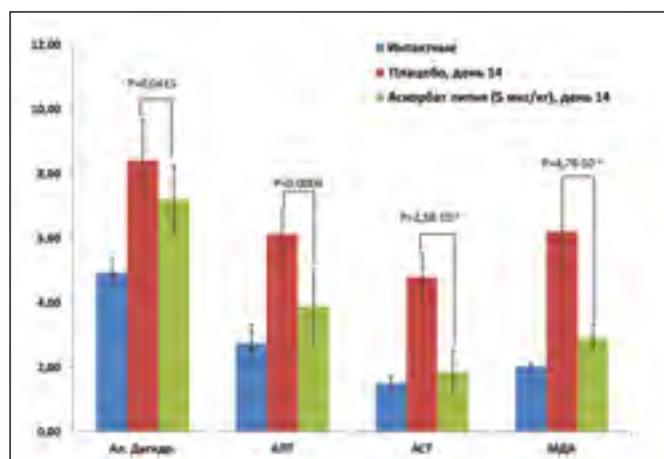
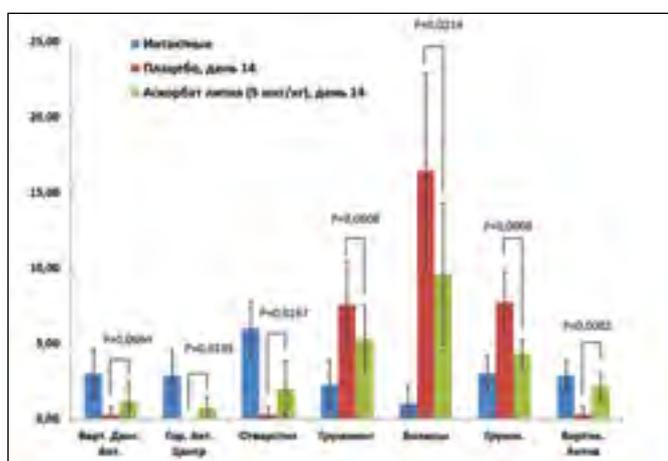
Совместное введение со спиртовым раствором аскорбата лития в различных дозировках заметно изменяло картину интоксикации у подопытных животных. Курсовое введение в течение 2 недель в различных дозировках аскорбата лития, на фоне алкогольной интоксикации увеличивало в тестах вертикальную



**Рис. 1.** Гистология нервной ткани в модели алкогольной интоксикации. А) Агрегация эритроцитов, перикапиллярный отёк серого вещества коры переднего мозга. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 1\,200$ ; Б) Выраженный перичеллюлярный отёк ствола головного мозга. Импрегнация серебром. Увеличение  $\times 480$ ; В) Мелкоочаговое кровоизлияние в пирамидном слое коры больших полушарий. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 120$ ; Г) Острое набухание пирамидной нервной клетки коры с явлением хроматолиза. Окраска толуидиновым синим по Ниссля. Увеличение  $\times 1\,200$



**Рис. 2.** Необратимые изменения нейронов коры больших полушарий. А) Глубчатый распад гиперхромного сморщенного нейрона. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение  $\times 1200$ ; Б) Формирование нейрофактического узелка в коре больших полушарий. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 480$ ; В) Комиссуральные волокна коры головного мозга имеют размытые контуры с фрагментами миелина. Импрегнация серебром. Увеличение  $\times 1200$

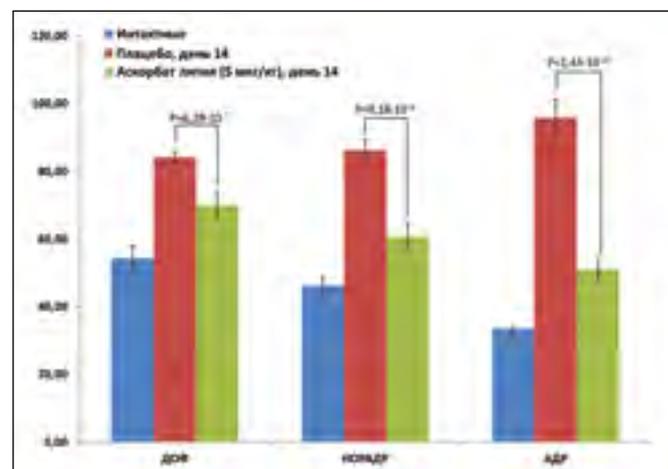


**Рис. 3.** Показатели неврологических тестов при создании модели алкогольной интоксикации и профилактическом применении аскорбата лития в дозе 5 мг/кг

активность и другие показатели тестов (рис. 3). Количество посещений центральных квадратов и показатель норкового рефлекса у животных данных групп сравнимо с показателями для здоровых животных. Эффективная профилактика неврологических нарушений отмечалась, начиная с дозы аскорбата лития в 5 мг/кг.

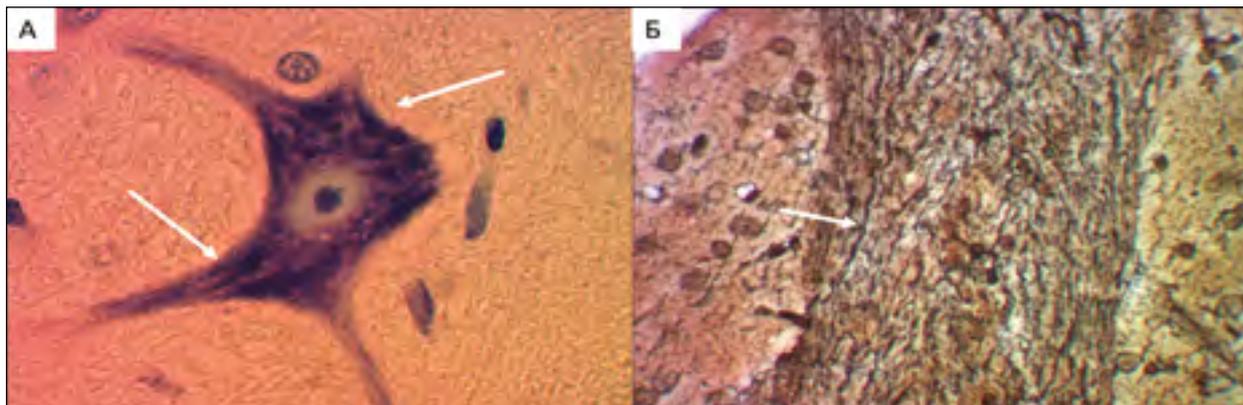
Длительная алкогольная интоксикация вызывала повышение концентрации катехоламинов в крови, что указывает на выраженную активацию симпатико-адреналовой системы (рис. 4). Применения аскорбата лития совместно с алкоголем препятствовало повышению содержания катехоламинов в крови животных и предупреждало развитие негативного действия алкоголя. Эффективность аскорбата лития проявляется активацией АДГ в печени, что соответствует ускорению элиминации этанола.

Известно, что введение этанола [19] вызывает активацию перекисного окисления липидов (ПОЛ) в мембранах клеток печени, мозга и сердца, что приводит к накоплению содержания первичных и вторичных продуктов окисления в биологических жидкостях. В



**Рис. 4.** Биохимические показатели при создании модели алкогольной интоксикации и профилактическом применении аскорбата лития в дозе 5 мг/кг

ходе исследования было установлено, что алкоголь вызывает значимое повышение МДА в сыворотке крови. Введение аскорбата лития снижало уровни МДА (рис. 4), что соответствует ингибированию ПОЛ и активации антиоксидантной системы организма.

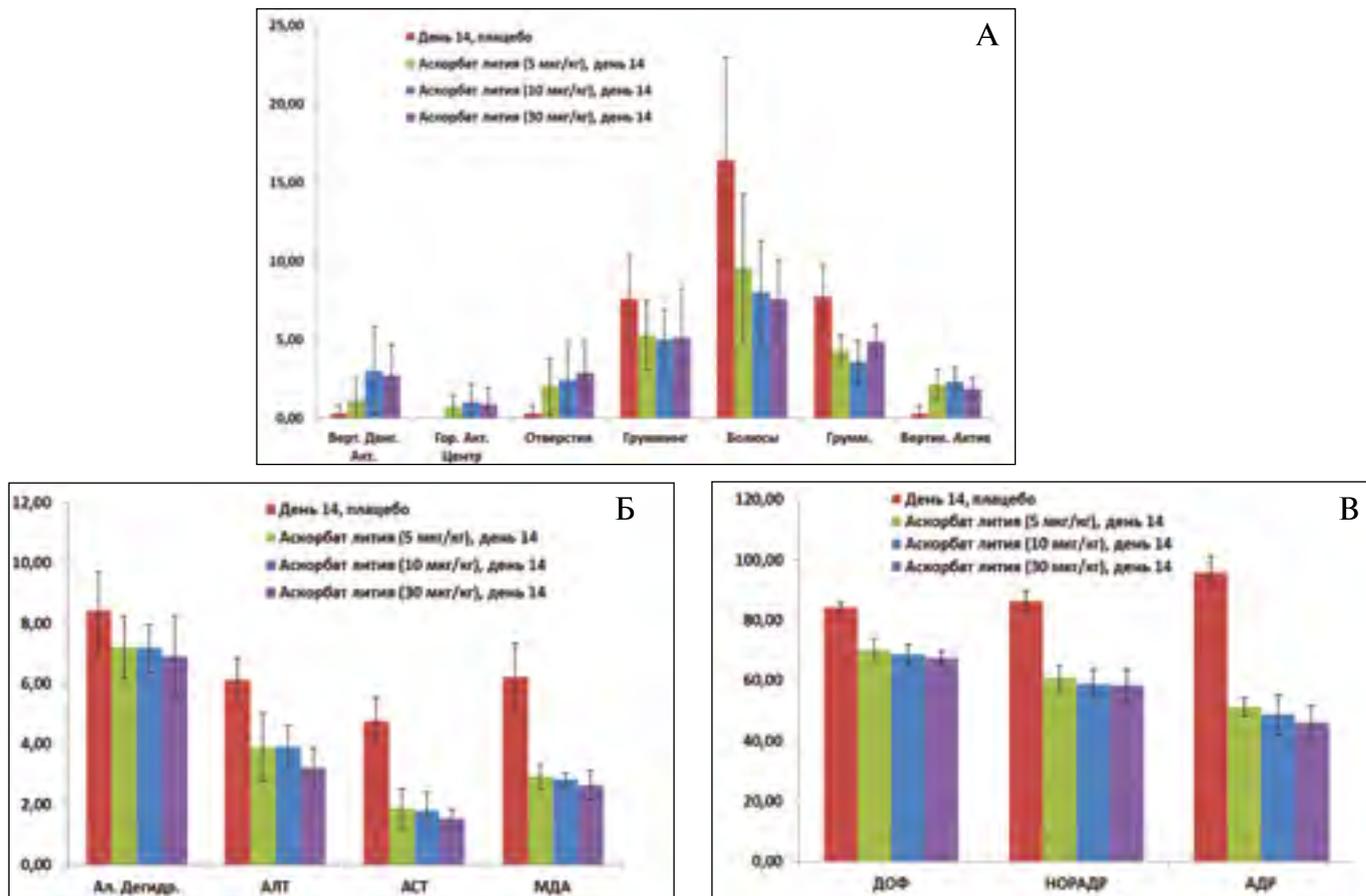


**Рис. 5.** Гистологические эффекты применения аскорбата лития. А) Очаговые слияния глыбок Ниссля в цитоплазме пирамидной клетки. Окраска толуидиновым синим по Ниссля. Увеличение  $\times 1200$ ; Б) Четкие контрастированные контуры комиссуральных волокон головного мозга. Импрегнация серебром. Увеличение  $\times 1200$

Таким образом, аскорбат лития достоверно активирует механизмы нейроадаптации, повышает антиоксидантный ресурс организма, нормализует поведенческие реакции в тестах «открытое поле» и ПКЛ. Эти результаты согласуются с результатами гистологического анализа образцов тканей мозга.

Профилактическое использование аскорбата лития в условиях хронической алкогольной интоксикации

значительно смягчает гистологические проявления ишемии мозга. По сравнению с группой плацебо, во всех группах животных, получавших аскорбат лития, расстройства кровообращения нервной ткани характеризовались очаговым гемостазом в капиллярах и умеренно выраженным перикапиллярным отёком нервной ткани коры, белого вещества больших полушарий и ствола головного мозга.



**Рис. 6.** Дозозависимость профилактических эффектов лития на исследованные показатели. А) Неврологические показатели; Б, В) Биохимические показатели

Поведение животных в тесте ОП и ПКЛ после 7 введения дней аскорбата лития

Поведение животных в тесте Открытое поле						
группы	вертикальная двигательная активность	горизонтальная двигательная активность		число заглядываний в отверстия	число актов груминга	количество болюсов, шт.
		центральная	периферическая			
1-я группа (30 мг/кг)	1,6	1,9	17,0	2,0	5,9	12,2
2-я группа (10 мг/кг)	1,4	1,8	17,9	1,9	6,3	12,6
3-я группа (5 мг/кг)	0,9	1,0	19,3	1,1	8,9	15,1
контрольная	0	0	4,7	0	17,8	24,4
Поведение животных в тесте Приподнятый крестообразный лабиринт						
группы	время пребывания в открытом рукаве, с	время пребывания в закрытом рукаве, с	количество актов груминга	вертикальная активность		
1-я группа (30 мг/кг)	38,26	259,01	5,8	1,7		
2-я группа (10 мг/кг)	34,81	265,19	6,3	1,5		
3-я группа (5 мг/кг)	27,73	270,67	9,1	0,8		
контрольная	0	299,71	14,5	0		

Важно отметить, что значительная часть нейроцитов коры и подкорковых ядер характеризовалась обратимыми изменениями, которые выражались распылением и нечёткостью контуров тигроида, очаговым слиянием глыбок Ниссля в цитоплазме, умеренно выраженным набуханием ядра и аксонального отростка (рис. 5А.). Макроглиальная реакция нервной ткани была минимальной и выражалась отёком периакулярных астроцитов. Импрегнация проводящих путей головного мозга серебром показала сохранность нервных волокон, которые имели чёткие контуры (рис. 5Б).

Морфометрический анализ показал, что в группе животных, получавших аскорбат лития в дозе 5 мг/кг, количество повреждённых нервных клеток коры составило 18,5%, а в группе плацебо количество повреждённых клеток составило 34,8% при достоверных морфологических признаках необратимой гибели нейроцитов.

Анализ эффектов различных доз аскорбата лития при профилактическом применении показал, что достаточная эффективность аскорбата лития отмечается уже при дозе в 5 мг/кг. Более высокие дозы не приводили к существенному повышению эффективности действия аскорбата лития на исследованные показатели (рис. 6).

### Результаты применения аскорбата лития для лечения алкогольной интоксикации

В серии экспериментов «лечение» аскорбат лития (5, 10, 30 мг/кг) начали вводить сразу после отмены спиртового раствора. «Лечение» представляет собой более жёсткую модель алкогольной интоксикации для оценки эффективности препарата. В группе плацебо после отмены спиртового раствора наблюдалась ярко выраженная абстиненция в виде агрессивности,

особенно во время кормления, перепадов настроения в течение короткого промежутка времени. Резкие и внезапные приступы агрессии сменялись ступорообразным состоянием; у животных отмечались эпизодические судороги. Животные выглядели измождено, впадали в поверхностный неглубокий сон. После пробуждения животные снова проявляли признаки агрессии, дрались, отказывались пить воду, кусали поилки. При введении аскорбата лития количество агрессивных инцидентов было снижено. У животных наблюдался более глубокий и длительный сон, реже отмечалось впадение в ступор. При приёме аскорбата лития судороги не отмечались. Тестирование по шкалам ОП и ПКЛ показало достоверно улучшение состояния (табл. 3, рис. 7), подтверждаемое результатами биохимических тестов (рис. 8).

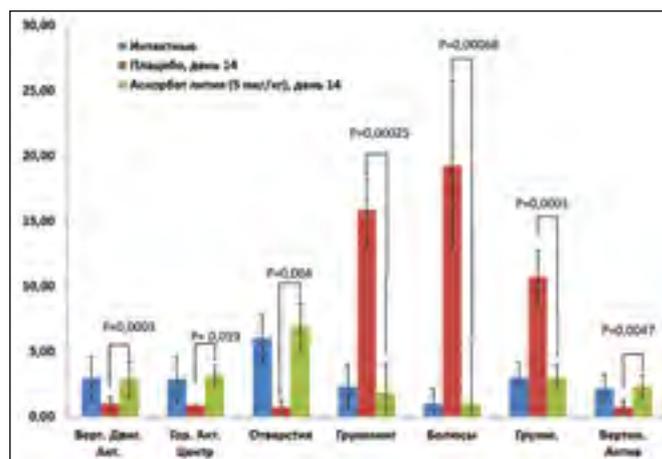
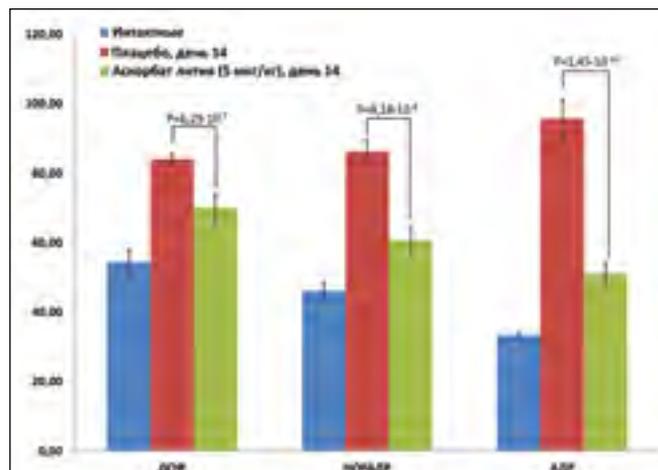
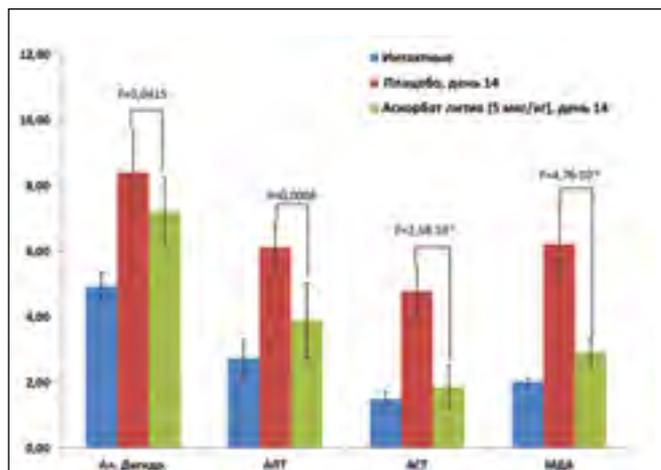


Рис. 7. Показатели неврологических тестов при создании модели алкогольной интоксикации и терапевтическом применении аскорбата лития в дозе 5 мг/кг

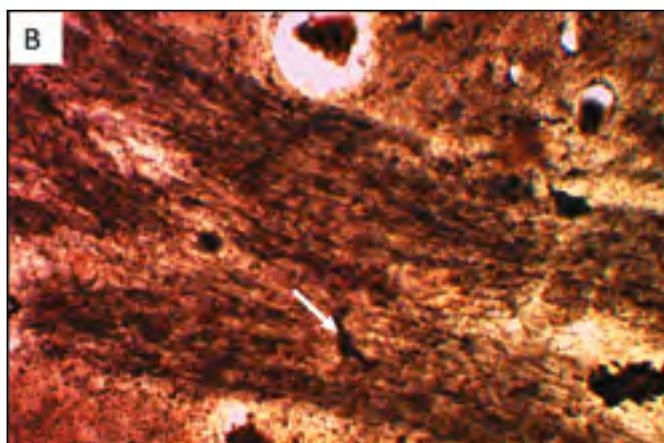
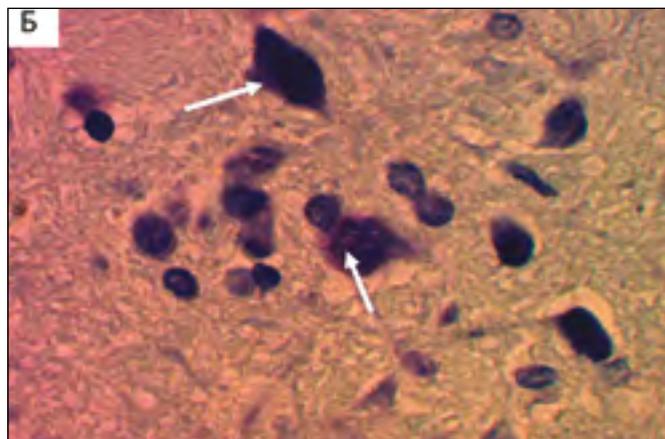
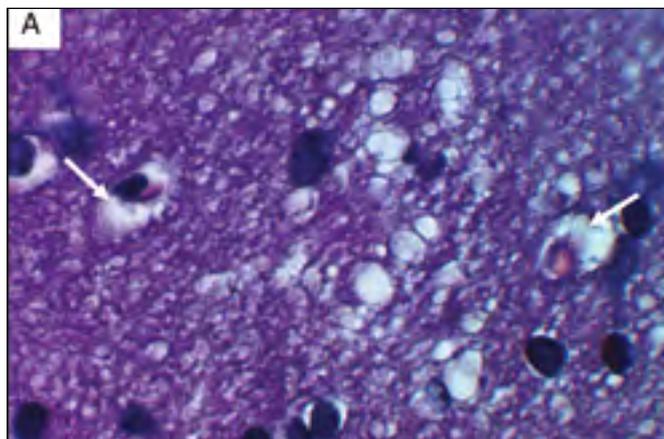


**Рис. 8.** Биохимические показатели при создании модели алкогольной интоксикации и терапевтическом применении аскорбата лития в дозе 5 мг/кг

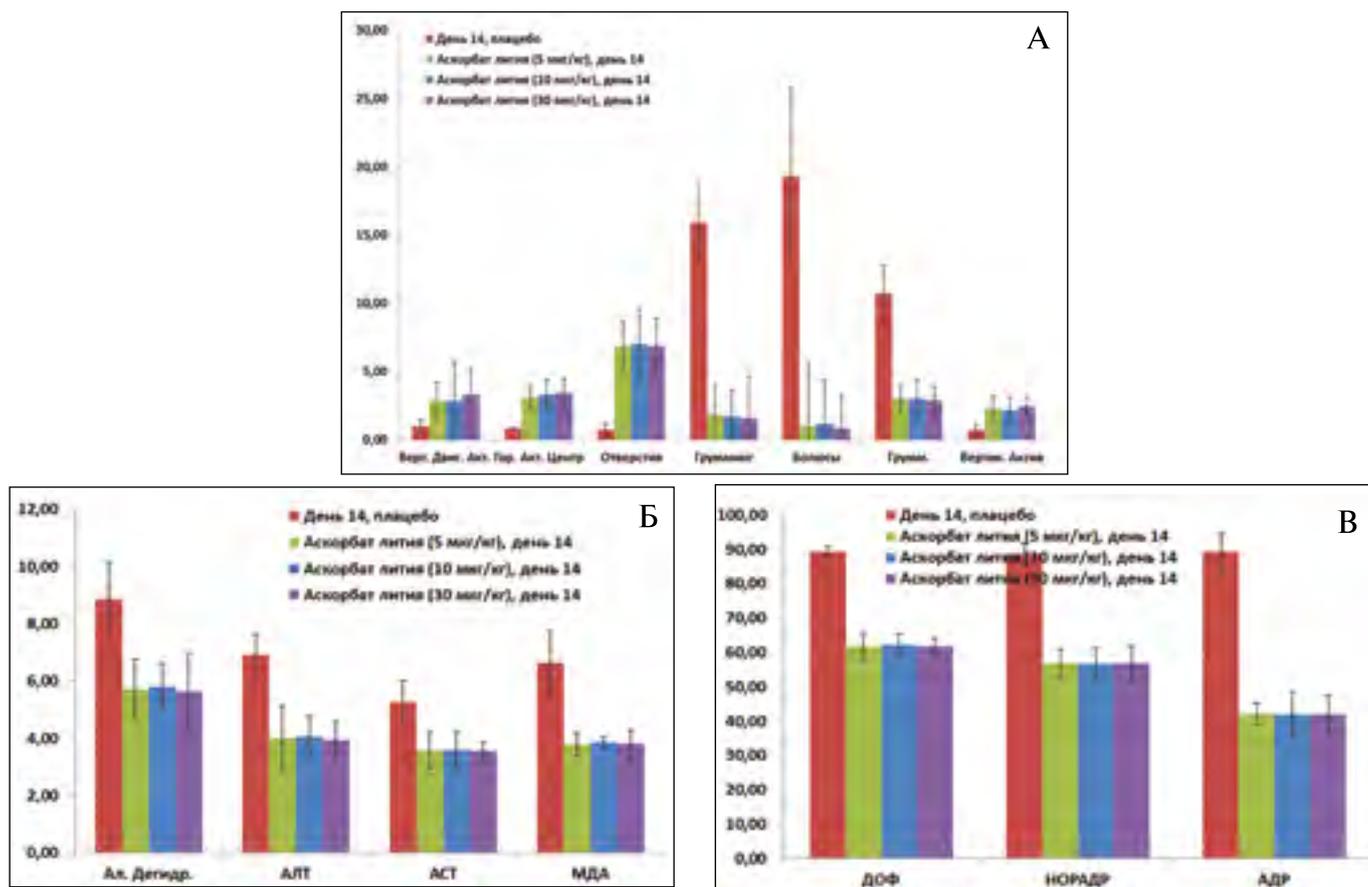
Таким образом, лечебное применение аскорбата лития в различных дозах способствует более быстрому восстановлению организма крыс после алкогольной интоксикации. В группах на аскорбате лития животные быстрее адаптировались к отсутствию алкоголя в рационе, у них быстрее восстанавливались поведенческие и исследовательские рефлексы.

Гистологический анализ показал, что при использовании аскорбата лития с лечебной целью расстройства кровообращения нервной ткани характеризова-

лись меньшей степенью диффузно-очагового гемостаза в капиллярах, чем в группе плацебо. Образцы мозга при приёме аскорбата лития характеризовались умеренной дилатацией и полнокровием венул, менее выраженным перикапиллярным отёком нервной ткани коры и белого вещества больших полушарий и ствола головного мозга (рис. 9А). В образцах мозга животных, получавших аскорбат лития, обнаруживались мелкоочаговые, а не крупноочаговые диапетезные кровоизлияния в коре больших полушарий (как в груп-



**Рис. 9.** Терапевтическое применение аскорбата лития: гистологическая картина. А) Выраженный перикапиллярный отёк нервной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 1200$ ; Б) Гиперхроматоз, пикноз нейроцитов. Гипертрофия астроглиоцитов. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение  $\times 1200$ ; В) Очаговые поражения нервных волокон головного мозга. Импрегнация серебром. Увеличение  $\times 1200$



**Рис. 10.** Дозозависимость терапевтических эффектов лития. А) Неврологические показатели; Б, В) Биохимические показатели

пе плацебо). В группах на аскорбате лития отмечены только единичные нейроны с достаточно лёгкими повреждениями, которые выражались распылением и нечёткостью контуров тигроида, очаговым слиянием глыбок Ниссля в цитоплазме и умеренно выраженным набуханием ядра (рис. 9Б). Состояние проводящей системы головного мозга животных, получавших плацебо, характеризовалось очаговым набуханием миелиновых волокон с неравномерным распределением миелина, что при импрегнации серебром создавало картину нечётких контуров (рис. 9В).

Анализ эффектов различных доз аскорбата лития при лечебном применении показал, что достаточная эффективность аскорбата лития отмечается уже при дозе в 5 мг/кг. Более высокие дозы не приводили к существенному повышению эффективности действия аскорбата лития на исследованные показатели (рис. 10).

### Заключение

Воздействие алкоголя в течение длительного времени приводит к возникновению девиантного поведения у животных, повышает агрессию; вызывает необратимые дегенеративные изменения в печени, активирует симпатико-адреналовую систему. Используемая модель хронического алкогольного

отравления имела отчётливые характерные морфологические подтверждения в печени, в мозге, проводящих нервных путях во всех случаях наблюдений. Аскорбат лития активизирует адаптивные механизмы, нормализуя поведенческие реакции в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт». Когнитивные функции мозга могут улучшаться, в частности, за счёт ингибирования перекисного окисления липидов и активации антиоксидантной системы. Кроме того, аскорбат лития вне зависимости от дозировки предупреждает активацию этанолом симпатико-адреналовой системы и замедляет элиминацию этанола из крови. Гистологический анализ показал, что использование аскорбата лития минимизировало уровень ишемического повреждения нейроцитов до уровня обратимого состояния и способствовало сохранению нервных путей. В целом, применение аскорбата лития способствует купированию абстинентного синдрома, блокирует возникновение судорог и способствует выживаемости животных. Активируя защитно-приспособительные механизмы организма в условиях хронической алкогольной интоксикации, аскорбат лития препятствует возникновению необратимых изменений нервной ткани.

*Работа выполнена в рамках диссертационного исследования.*

## Литература

1. Myers R.D., McMillen B.A., Adell A. Neurotransmitter and neuromodulatory mechanisms involved in alcohol abuse and alcoholism: Epitome of cerebral complexity. *Neurochem. Int.* 1995; 26: 337.
2. Darq E., Warnault V., Phamluong K., Besserer G.M., Liu F., Ron D. MicroRNA-30a-5p in the prefrontal cortex controls the transition from moderate to excessive alcohol consumption. *Mol. Psychiatry.* 2014 Oct 21.
3. Chang C.M., Wu C.S., Huang Y.W., Chau Y.L., Tsai H.J. Utilization of Psychopharmacological Treatment Among Patients With Newly Diagnosed Bipolar Disorder From 2001 to 2010. *J Clin Psychopharmacol.* 2016; 36 (1): 32-44 doi.
4. Zawalich W.S., Zawalich K.C., Rasmussen H. Interactions between lithium, inositol and mono-oleoylglycerol in the regulation of insulin secretion from isolated perfused rat islets. *Biochem J.* 1989; 262 (2): 557-561.
5. Diaz-Sastre C., Perez-Rodriguez M.M., Cebollada A., Ruiz J.S., Baca-Garcia E., de Leon J. Cholesterol and lithium levels were correlated but serum HDL and total cholesterol levels were not associated with current mood state in bipolar patients. *J Clin Psychiatry.* 2005; 66 (3): 399-400.
6. Koda L.Y., Shoemaker W.J., Baetge G., Bloom F.E. Lithium treatment decreases blood pressure in genetically hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1981; 76 (4): 411-415.
7. Focosi D., Azzara A., Kast R.E., Carulli G., Petrini M. Lithium and hematology: established and proposed uses. *J Leukoc Biol.* 2009; 85 (1): 20-8 doi.
8. Phelan K.M., Mosholder A.D., Lu S. Lithium interaction with the cyclooxygenase 2 inhibitors rofecoxib and celecoxib and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *J Clin Psychiatry.* 2003; 64 (11): 1328-1334.
9. Hillert M.H., Imran I., Zimmermann M., Lau H., Weinfurter S., Klein J. Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *J Neurochem.* 2014; 131 (1): 42-52 doi.
10. Stengaard-Pedersen K., Schou M. In vitro and in vivo inhibition by lithium of enkephalin binding to opiate receptors in rat brain. *Neuropharmacology.* 1982; 21 (8): 817-823.
11. Ebstein R.P., Hermoni M., Belmaker R.H. The effect of lithium on noradrenaline-induced cyclic AMP accumulation in rat brain: inhibition after chronic treatment and absence of supersensitivity. *J Pharmacol Exp Ther.* 1980; 213 (1): 161-167.
12. Basselin M., Chang L., Bell J.M., Rapoport S.I. Chronic lithium chloride administration to unanesthetized rats attenuates brain dopamine D2-like receptor-initiated signaling via arachidonic acid. *Neuropsychopharmacol* 2005; 30 (6):1064-1075.
13. Castro L., Athanazio R., Barbetta M., Ramos A.C., Angelo A.L., Campos I., Varjao B., Ferreira H., Fregoneze J., de Castro e Silva E. Central 5-HT2B/2C and 5-HT3 receptor stimulation decreases salt intake in sodium-depleted rats. *Brain Res.* 2003; 981 (1-2):151-159.
14. Basselin M., Chang L., Bell J.M., Rapoport S.I. Chronic lithium chloride administration attenuates brain NMDA receptor-initiated signaling via arachidonic acid in unanesthetized rats. *Neuropsychopharmacol.* 2006; 31 (8): 1659-74 Epub 2005 N.
15. Marx C.E., Yuan P., Kilts J.D., Madison R.D., Shampine L.J., Manji H.K. Neuroactive steroids, mood stabilizers, and neuroplasticity: alterations following lithium and changes in Bcl-2 knockout mice. *Int J Neuropsychopharmacol* 2008; 11 (4): 547-52 doi.
16. Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Громова О.А., Расташанский В.А., Федотова Л.Э. Хемореактомное моделирование аскорбата лития. *Фармакокинетика и фармакодинамика*, 2016; 3: 47-58.
17. Mihara M., Uchiyama M. *Biochemistry.* N.Y.: Med, 1980; 23: 302.
18. Бочкарева А.В., Зимин Ю.В. Изменение активности алкоголь-дегидрогеназы клеток печени крыс при действии этанола и гепарина. *Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского*, 2010; 2 (2): 490-493.
19. Шабанов П.Д., Калишевич С.Ю. *Биология алкоголизма.* СПб.: 1998; 272.

# Новое производное оксимов 4-бензоилпиридинов ГИЖ-298, обладающее противосудорожной активностью

**Жмуренко Л.А., Мокров Г.В., Неробкова Л.Н., Литвинова С.А.,  
Гайдуков И.О., Воронина Т.А., Гудашева Т.А.**

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

**Резюме.** В настоящей работе осуществлён дизайн и синтез нового производного оксима 4-бензоилпиридина – ГИЖ-298 (оксалат O-(2-морфолиноэтил)оксима 4-бензоилпиридина). Это соединение обладает противосудорожной активностью, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком (МЭШ) и коразолом в дозах 0,5–100 мг/кг у грызунов внутрибрюшинно. LD<sub>50</sub> при внутрибрюшинном введении для соединения ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг (мыши). Таким образом, ГИЖ-298 имеет большую терапевтическую широту.

**Ключевые слова:** противосудорожные средства, оксимы бензоилпиридинов, тест максимального электрошока, тест антагонизма с коразолом

## **Novel 4-benzoylpyridine oxime derivative GIZH-298 with anticonvulsant activity**

Zhmurenko L.A., Mokrov G.V., Nerobkova L.N., Litvinova S.A., Gaydukov I.O.,  
Voronina T.A., Gudasheva T.A.

Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow

**Resume.** Novel derivative of benzoylpyridine oximes – GIZH-298 (4-benzoylpyridine O-(2-morpholinoethyl) oxime oxalate) was designed and synthesized in this work. This compound has a broad spectrum of anticonvulsant effects, eliminating primary generalized seizures in maximal electroshock (MES) and corazol antagonism tests in rodents in the doses of 0,5-100 mg/kg. LD<sub>50</sub> for compound GIZH-298 is 316 mg/kg intraperitoneally (mouse). GIZH-298 has a large therapeutic breadth.

**Keywords:** anticonvulsant drugs, benzoylpyridine oximes, maximal electroshock test, corazol antagonism test

Автор, ответственный за переписку:

*Мокров Григорий Владимирович – к.х.н., заведующий лабораторией тонкого органического синтеза ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; +7 (495)601-22-46; e-mail: g.mokrov@gmail.com*

## **Введение**

Распространённость эпилепсии в разных странах, по данным ВОЗ, варьирует в очень широком диапазоне – от 1,5 до 50 случаев на 1 000 населения [1, 2], а в Российской Федерации составляет 2,98 на 1 000 человек населения [3].

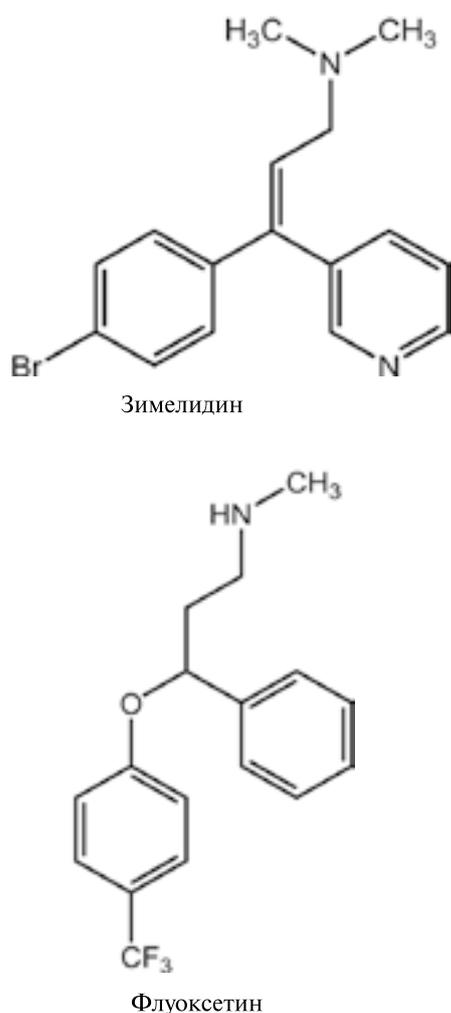
Для лечения эпилепсии применяется значительное количество противоэпилептических препаратов (ПЭП), таких как леветирацетам, топирамат, карбозапин, финлепсин, дифенин и другие, однако продолжается их активный поиск и совершенствование, что связано с тем, что современные ПЭП не удовлетворяют в полной мере требованиям клиники. Несмотря на широкий спектр противосудорожных средств около 20–30% больных остаются резистентными к лечению основными противосудорожными препаратами. Кроме того, отмечаются случаи провокации судорожных проявлений на фоне терапии ПЭП, обусловленных многообразием механизмов генерации судорог, что создаёт трудности подбора противосудорожной терапии [4, 5].

**Целью** настоящей работы явилось создание новых соединений, обладающих противосудорожной активностью.

## **Дизайн и синтез**

Для конструирования новых соединений, обладающих противосудорожной активностью, был использован фармакофорный подход, основанный на структурах известных препаратов, относящихся к классу селективных ингибиторов обратного захвата серотонина. Известно, что основным эффектом данной группы препаратов является антидепрессивное действие, однако у ряда представителей этого класса наблюдается выраженная противосудорожная активность. Так, антиконвульсивным действием обладает зимелидин [6] и флуоксетин [7] (рис. 1).

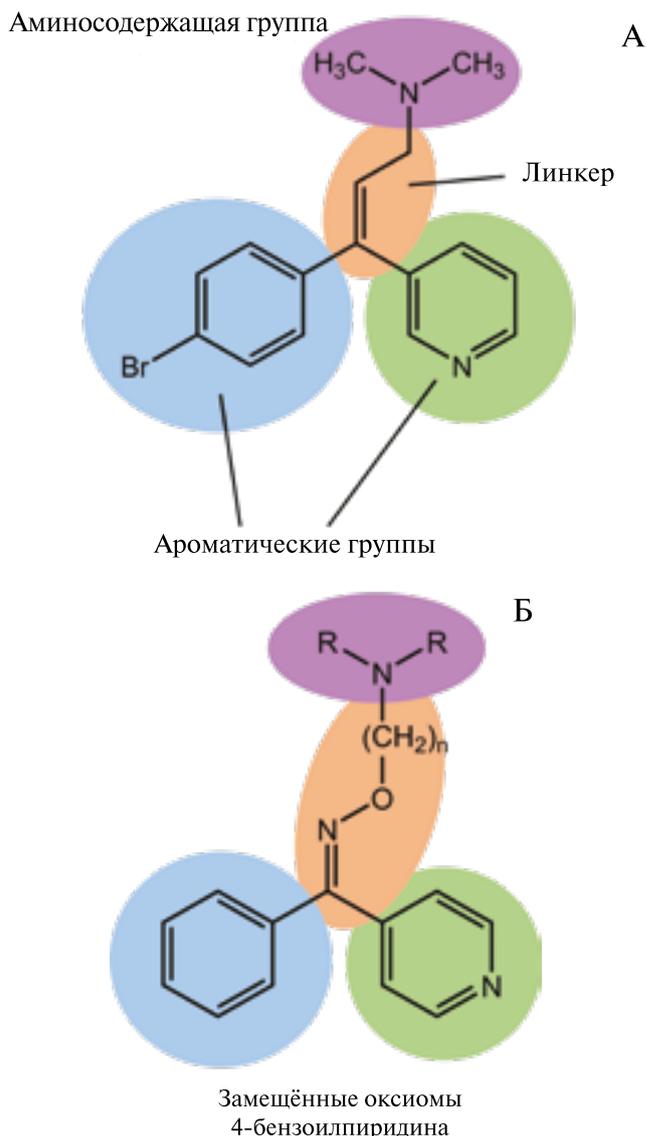
Анализ структур зимелидина и флуоксетина позволил сделать предположение о фармакофорных элементах, необходимых для наличия противосудорожной активности (рис. 2А). В молекуле должны быть два ароматических фармакофора и аминоксодержащий фармакофор. Указанные группы должны соединяться при помощи линкера, в состав которого должны входить не менее трёх атомов. На основании предложенной фармакофорной модели была сконструирована группа аминоксодержащих производных оксимов 4-бензоилпиридина (рис. 2Б).



**Рис. 1.** Соединения, обладающие противосудорожной активностью, использовавшиеся для дизайна новых структур

Нами был получен ряд представителей предложенной группы, и в качестве наиболее перспективного соединения было отобрано вещество ГИЖ-298. Это соединение было синтезировано по следующей схеме (рис. 3).

Оксим 4-бензоилпиридина, который получают в соответствии с методикой [8], вводят во взаимодействие с хлорэтилморфолином в ДМФА в присутствии гидроксида натрия. Основание O-(2-морфолиноэтил) оксима 4-бензоилпиридина превращают в оксалат действием щавелевой кислоты в этаноле. Выход конечного соединения составляет 75%. Т.пл. 154–155°C (из этанола). Спектр ЯМР  $^1\text{H}$  (ДМСО- $d_6$ ,  $\delta$ , м.д.): 2,83 (4H, м,  $-\text{CH}_2-\text{N}-\text{CH}_2-$  (морфолина)); 3,10 (2H, т,  $\text{CH}_2\text{N}$ ); 3,67 (4H, м,  $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-$  (морфолина)); 4,39 (2H, т,  $\text{CH}_2\text{O}$ ); 5,10 устр. (HDO и  $(\text{COOH})_2$ ); 7,35 (2H, м, 3- и 5-H Py); 7,37–7,51 (5H, м, ArH), 8,71 (2H, м, 2- и 6-H Py). Данные элементного анализа соответствуют расчётной брутто формуле  $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_2 \cdot \text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ .



**Рис. 2.** Фармакофорная модель строения бис-арильных соединений, обладающих противосудорожной активностью (на примере зимелидина) (А) и соответствии предложенных соединений этой фармакофорной модели (Б)

## Материалы и методы

### Животные

Экспериментальных животных получали из питомника «Столбовая» ГУ НЦБМТ (Московская область). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и нормативным документам «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утверждённым Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. № 1045-73 и Приказом МЗ и социального развития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

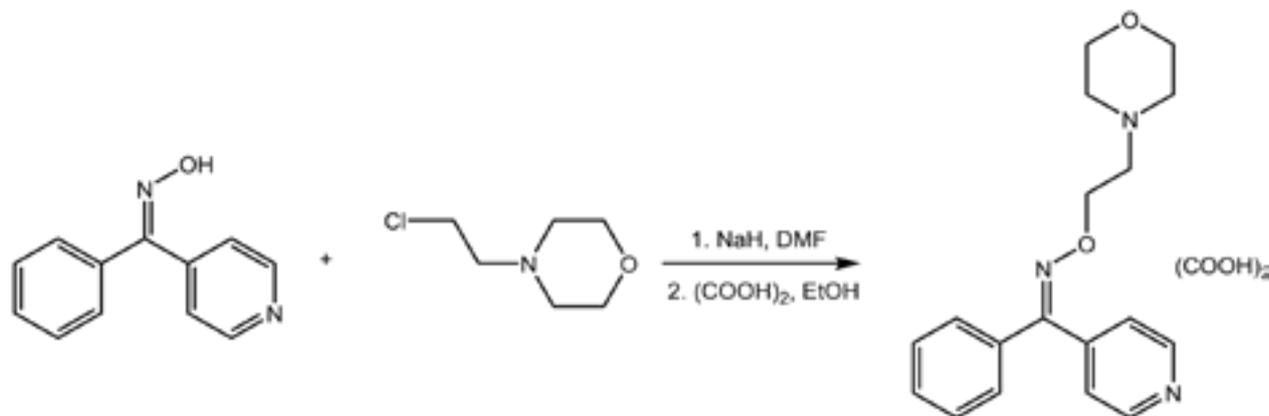


Рис. 3. Схема синтеза соединения ГИЖ-298

**Изучение противосудорожного действия ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных максимальным электрошоком**

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах, массой 20–26 г. Каждая доза соединения исследовалась на 8–10 животных. Методика максимального электрошока (МЭШ) моделирует первично-генерализованные судороги – так называемые «большие» (Grant mal) судорожные припадки и является базисным тестом при оценке действия веществ с противосудорожной активностью [9–11].

Максимальный электросудорожный припадок (МЭШ) создавали с использованием сертифицированной установки «Rodent Shocker RS», type 221 (Harvard Apparatus, GmbH, Германия). Животные получали через специальные корнеальные электроды электрические стимулы (режим 500/300 V/mA: 144 mA, длительностью 0,3 с). Регистрировали следующие показатели: тоническую экстензию задних и передних конечностей, а затем, клонические судороги и гибель животных. Противосудорожный эффект заявляемых соединений оценивали по способности предупреждать развитие тонической экстензии и гибель животных. Соединения вводили внутривентриально за 40 мин до проведения МЭШ. Для определения ЭД<sub>50</sub> (эффективной дозы вещества, оказывающей противосудорожный эффект у 50% животных) использовался метод пробит-анализа (метод Финни) с помощью программного пакета StatplusV5 рассчитывали ЭД<sub>16</sub>, ЭД<sub>50</sub>, ЭД<sub>84</sub> – дозы, при введении которых противосудорожный эффект наблюдался, соответственно, у 16, 50 и 84% животных.

**Изучение противосудорожного действия ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных коразолом**

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах, массой 20–26 г. Каждая доза соединения исследовалась на 8–10 животных. Тест антагонизма с коразолом (пентилентетразол, Sigma-Aldrich, США) – антагонистом ГАМК-А рецепторов, также

как и тест максимального электрошока, является базисной методикой при оценке действия веществ с противосудорожной активностью [9, 11]. В этой методике судороги вызываются химическим воздействием и моделируют первично-генерализованные судороги при так называемых «малых» (Petit mal) судорожных припадках.

Опытным группам внутривентриально вводили соединение ГИЖ-298, растворённое в физиологическом растворе в дозах 1,0 и 50,0 мг/кг за 40 мин до коразола. Контрольным животным внутривентриально вводили физиологический раствор в эквивалентном объёме. Для получения судорожного припадка животным подкожно в область шейного отдела спины вводился коразол в дозе 95,0 мг/кг, вызывающей судороги у 97% мышей. Животные наблюдались в течение 30–60 мин после инъекции коразола. Регистрировали: латентный период первого генерализованного приступа с потерей рефлекса переворачивания (ЛП), время гибели и число погибших животных.

**Изучение острой токсичности ГИЖ-298**

Эксперименты проводили на белых беспородных мышах-самцах, массой 22–26 г. Соединения вводили однократно, внутривентриально. Регистрацию гибели животных проводили через 24 часа и 14 дней после введения. Методом пробит-анализа (метод Финни) с помощью программного пакета Statplus V5 рассчитывали ЛД<sub>16</sub>, ЛД<sub>50</sub>, ЛД<sub>84</sub> – доз, при введении которых погибало 16, 50 и 84% животных, соответственно.

**Результаты и их обсуждение**

**Противосудорожное действие ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных максимальным электрошоком**

Установлено, что проведение МЭШ вызывало тоническую экстензию и гибель 88–100% мышей. Соединение ГИЖ-298 в диапазоне доз от 0,5 до 10,0 мг/кг уменьшало (на уровне тенденции) число животных с тонической экстензией и увеличивало количество выживших животных по сравнению с контролем.

Таблица 1

Противосудорожная активность соединения ГИЖ-298 тесте максимального электрошока на мышах

Группа	Доза, мг/кг	Число выживших животных без судорог/ число животных в группе	Число выживших животных без судорог, %
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	0,5	2/8	25
Контроль, МЭШ	—	1/10	10
ГИЖ-298 + МЭШ	1	5/10	50
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	5,0	3/7	43
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	10,0	4/8	50
Контроль, МЭШ	—	0/9	0
ГИЖ-298 + МЭШ	20,0	6/9*	66,7*
	40,0	6/9*	66,7*
Контроль, МЭШ	—	1/8	12,5
ГИЖ-298 + МЭШ	60,0	8/8*	100*
	80,0	8/8*	100*
Контроль, МЭШ	—	0/8	0
ГИЖ-298 + МЭШ	100,0	8/8*	100*

**Примечание:** \*значимость отличий от контрольной группы, при  $p \leq 0,05$  (точный критерий Фи

Таблица 2

Влияние ГИЖ-298 на судороги, вызванные коразолом

Группа	Доза, мг/кг	Число выживших мышей/ число животных в группе, а.е.	Число выживших мышей, %	ЛП 1-го приступа, с	Время гибели, с
Коразол	95,0	0/8	0	32,8±7,2	361,0±129,3
ГИЖ-298 + коразол	20,0	1/8	12,5	180,3±37,4*	735,4±224,9
Коразол	95,0	2/10	20,0	53,7±12,5	355,5±105,2
ГИЖ-298 + коразол	60,0	2/10	20,0	91,4±10,1*	457,3±126,5

Соединение ГИЖ-298 в дозах от 20,0 до 150,0 мг/кг статистически достоверно уменьшало число животных с тонической экстензией и увеличивало количество выживших животных по сравнению с контролем. Так, в дозе 20 мг/кг устранение судорог и увеличение выживаемости наблюдалось у 67% животных, а в дозах 60,0; 80,0; 100,0 и 150 мг/кг — у 100% мышей (табл. 1).

**Противосудорожное действие ГИЖ-298 на модели первично-генерализованных судорог, вызванных коразолом**

Установлено, что у контрольных животных после введения коразола в дозе 95,0 мг/кг судорожные проявления развивались в следующей последовательности.

1. Одно или более миоклонических подергиваний всего тела — 100% мышей.

2. Повторяющиеся клонические судороги передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания — 100% мышей.

3. Генерализованные клонические судороги передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания — 90% мышей.

4. Гибель животных — 80–100% мышей.

Установлено, что соединение ГИЖ-298 в дозах 20,0 и 60,0 мг/кг статистически достоверно увеличивает латентный период первого приступа (ЛП) на 148 и 59 с, соответственно, по сравнению с контрольной группой животных, но не предотвращает развитие вызванных коразолом судорог и гибель животных (табл. 2). Кроме того, было обнаружено, что ГИЖ-298 меняет картину судорожных проявлений, устраняя как тоническую экстензию задних конечностей, так и клонические судороги передних конечностей.

**Острая токсичность ГИЖ-298**

Установлено, что соединение ГИЖ-298 при введении в дозе 220 мг/кг через 24 ч вызывало гибель одного животного из десяти (10%). В течение последующих 14 дней после однократного введения соединения ГИЖ-298 гибели животных не зарегистрировано.

При введении соединения ГИЖ-298 в дозе 300,0 мг/кг наблюдалась гибель 40% животных (4 из 10) через 24 ч после введения; изменения показателя выживаемости через последующие две недели не наблюдалось. После введения соединения ГИЖ-298 в дозе 350,0 мг/кг через 24 ч погибло 50% животных (5 из 10), а в дозе 400,0 мг/кг – 90% животных (9 из 10); через 14 дней после введения соединения ГИЖ-298 дополнительной гибели крыс не наблюдалось. Расчётное значение ЛД<sub>50</sub> для соединения ГИЖ-298 составило 316 мг/кг.

### Выводы

Таким образом, производное оксима 4-бензоилпиридина ГИЖ-298 обладает широким спектром противосудорожных эффектов, устраняя первично-генерализованные судороги в тестах антагонизма с максимальным электрошоком (МЭШ) и коразолом. Противосудорожный эффект соединения ГИЖ-298 наблюдается в широком диапазоне доз (от 20 до

100 мг/кг), не вызывающих побочных эффектов. В тесте максимального электрошока соединение ГИЖ-298 (60–100 мг/кг) предупреждает судороги и гибель 100% животных (ЭД<sub>50</sub> – составляет 15 мг/кг), а на модели антагонизма с коразолом статистически достоверно увеличивает латентный период развития первого приступа и меняет картину судорожных проявлений, устраняя как тоническую экстензию задних конечностей, так и клонические судороги передних конечностей.

ЛД<sub>50</sub> для соединения ГИЖ-298 составляет 316 мг/кг. Рассчитанный по соотношению ЛД<sub>50</sub> к ЭД<sub>50</sub> терапевтический индекс составляет для соединения ГИЖ-298 21, что свидетельствует о том, что оксалат О-(2-морфолиноэтил)оксима 4-бензоилпиридина (соединение ГИЖ-298) имеет большую терапевтическую широту и относится к классу нетоксичных веществ. Полученные данные позволяют сделать вывод, что соединение ГИЖ-298 перспективно для дальнейших исследований с целью создания инновационного противосудорожного средства.

### Литература

1. Сидоренко К.В., Даренская Е.Ю. Распространенность эпилепсии в мире. Успехи современного естествознания. 201; 6.
2. Hauser W.A. Epidemiology of epilepsy. X Всероссийский съезд неврологов с международным участием: материалы съезда. Нижний Новгород, 2012; 313–314.
3. Гехт В.А., Хаузер Л.Е. Мильчакова и др. X Всероссийский съезд неврологов 125с международным участием: материалы съезда. Нижний Новгород. 2012; 277.
4. Портер Р.Дж., Мелдрум Б.С. Противоэpileптические средства / В кн. Б.Г. Катцунг. Базисная и клиническая фармакология: В 2 т. Т. 1. / Пер. с англ. 2-е изд., перераб. и доп. М.; СПб.: Изд-во Бинном, Изд-во «Диалект», 2007; 464–491.
5. Карлов В.А. Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин: руководство для врачей. М.: Медицина, 2010; 717.
6. D. Peričić, Štrac D.Š., Vlanić J. Zimelidine decreases seizure susceptibility in stressed mice. Journal of Neural Transmission. 113; 12: 1863–1871.

7. Favale E., Rubino V., Mainardi P., Lunardi G. and Albano C. Anticonvulsant effect of fluoxetine in humans, Neurology October. 1995; 45: 10: 1926–1927
8. Kochhar M.M., Brown R.G., Delgado J.N. Anticholinergic heterocyclic ketoximino-ethers and -esters. J. Pharm. Sci. 1965; 54: 393–398.
9. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств» Часть. I. ФГБУ «НЦЭМСП». М.: Изд-во Гриф и К, 2012; 14: 235–250.
10. Loscher et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. II. Maximal electroshock seizure models, Epilepsy Res. 1991; 8: 79–94.
11. Swinyard E.A. Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Review of laboratory methods, Epilepsia. 1969; 10: 107–119.
12. Loscher et al. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. III. Pentylentetrazol seizure models. Epilepsy Res. 1991; 8: 171–189.

# Протеомный анализ магний-зависимых белков в системе «мать–плод–ребёнок»

Громова О.А.<sup>1</sup>, Торшин И.Ю.<sup>2</sup>, Тапильская Н.И.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

<sup>2</sup> – ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Долгопрудный

<sup>3</sup> – ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет», г. Санкт-Петербург

**Резюме.** Системно-биологический анализ более 700 магний-зависимых белков протеома человека указал на 7 важнейших направлений действия магния: (1) эмбриональное развитие; (2) энергетический метаболизм; (3) процессы передачи сигналов от рецепторов; (4) неврологические роли; (5) поддержка структуры соединительной ткани; (6) сердечно-сосудистые и (7) иммунологические роли. Дефицит магния во время беременности будет способствовать развитию пороков развития (скелетные дефекты, рахит, грыжа диафрагмы, лицевые пороки, краниосиностоз, нарушения строения сетчатки и зрения, брахидактилия). В раннем возрасте дефицит магния ассоциирован с синдромом внезапной смерти, в дошкольном и подростковом возрасте приводит к нарушениям функции мышц что, в случае миокарда, ассоциировано с нарушениями сократимости желудочков сердца и аритмией. Для дефицита магния также характерны митохондриальные нарушения, гиперинсулинемия, нарушения структуры кожи и её придатков, опухолевые заболевания и заболевания, ассоциированными с нарушениями энергетического метаболизма (в т. ч. гипопаратиреоз и анемия). Эффекты дефицита магния у плода и у детей существенно утяжеляются на фоне недостаточности витамина В<sub>6</sub> (пиридоксин). Результаты протеомного анализа позволили указать на соответствующие молекулярно-физиологические механизмы синергизма магния и пиридоксина. В целом, результаты настоящего анализа указывают на весьма обширные области для коррекции недостаточности магния и пиридоксина с целью профилактики и терапии широкого круга заболеваний, начиная с периода внутриутробного развития и раннего детства до подросткового периода.

**Ключевые слова:** протеом, системная биология магния, беременные, плод, дети, подростки, профилактика дефицита магния, пиридоксин (витамин В<sub>6</sub>)

## Proteomic analysis of magnesium - dependent proteins and children's health

Gromova O.A.<sup>1</sup>, Torshin I.Yu.<sup>2</sup>, Tapilskaya N.I.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – FSBEI HE IvSMA MOH Russia, Ivanovo

<sup>2</sup> – Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

<sup>3</sup> – FFSBI HPE «Saint Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg

**Resume.** Systems biology analysis of over 700 magnesium-dependent proteins in human proteome shown that these proteins affect (1) the embryonic development, (2) energy metabolism, (3) signal transduction processes from receptors, (4) neurological function, (5) support of connective tissue structure, (6) cardiovascular and (7) immunological roles. Magnesium deficiency during pregnancy will stimulate development of congenital malformations (skeletal defects, rickets, hernia of the diaphragm, facial defects, craniosynostosis, structural disorders of the retina and vision, brachydactyly). Magnesium deficiency at an early age is associated with sudden death syndrome in preschool and adolescence leads to impaired function of skeletal muscles and myocardium. Magnesium deficiency is also characterized by mitochondrial disorders, hyperinsulinemia, disorders of the skin structure and its appendages, tumors and diseases associated with impaired energy metabolism (including hypoparathyroidism and anemia). Effects of magnesium deficiency in children significantly heavier on the background of lack of vitamin B<sub>6</sub> (pyridoxine). The results of proteomic analysis enable to point out the relevant molecular and physiological mechanisms of synergy between magnesium and pyridoxine. Overall, the results of the analysis indicate a very extensive area for the correction of magnesium and pyridoxine deficiency for the prevention and treatment of a wide range of diseases, from the period of fetal development and early childhood through adolescence.

**Keywords:** proteomics, systems biology, magnesium, embryo, children, adolescents, prevention of magnesium deficiency, pyridoxine (vitamin B<sub>6</sub>)

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, г. Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

## Введение

Взгляд на магний как специфическое средство, используемое преимущественно для лечения судорог у недоношенных детей [1], устарел, по меньшей мере, на 50 лет. Воздействие иона магния на организм ребёнка вовсе не ограничивается профилактикой судорог, и

приводимые в настоящей работе результаты анализа белков протеома человека указывают на широкий спектр возможных применений препаратов магния в педиатрии. Данная работа продолжает серию работ по системно-биологическим анализам белков и генов, участвующих в реализации эффектов микронутриентов; в одной из первых работ были представлены ре-

зультаты системно-биологического анализа эффектов витамина D [2].

Магний является одним из четырёх важнейших электролитов организма. Обязательное комплексообразование ионов  $Mg^{2+}$  с молекулой АТФ, необходимое для синтеза и осуществления функций АТФ, указывает на фундаментальное значение иона магния для поддержки метаболизма всех типов клеток. Однако молекулярно-биологические свойства магния далеко не исчерпываются описанными выше ролями.

Известно, например, что ион  $Mg^{2+}$  принципиально необходим для ингибирования глутаматных NMDA-рецепторов, метаболизма катехоламинов, поддержания ритма сердца и многих других процессов [3]. Данные роли магния осуществляются посредством специфического связывания ионов  $Mg^{2+}$  с определёнными белками протеома человека и имеют важное значение для комплексной оценки физиологического воздействия магния на здоровье ребёнка.

В период активного роста организма плода и ребёнка магний необходим для полноценного развития тканей. Недостаток магния у детей проявляется задержкой роста, слабым развитием мышц. С точки зрения ЦНС, дефицит магния негативно влияет на формирование памяти и познавательной деятельности. При недостаточной обеспеченности магнием дети страдают неусидчивостью, переходящей в гиперактивность, с трудом удерживают внимание [4]. Клинические проявления дефицита магния относительно не специфичны и включают в себя в основном коликообразные боли в животе, которые могут сопровождаться головной болью, тиком, онемением конечностей и/или болями в мышцах, отмечается беспокойный сон.

В нескольких клинических исследованиях было показано, что различные органические соли магния вызывают уменьшение этих симптомов у детей [5]. При этом самым достоверным подтверждением диагноза «Е61.2 Недостаточность магния» является исчезновение симптомов после перорального применения органических препаратов магния [6].

Возникновение описанных выше и многих других симптомов дефицита магния у детей [3] связано с нарушением специфических взаимодействий иона магния с белками протеома, которые отвечают за широкий круг биологических ролей. Проведённые нами поиски по базам данных протеома человека (NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT, Human Proteome Map (HPM), BIOCYC-HUMAN и др.) показали, что в протеоме человека представлено не менее 720 белков, активность которых, так или иначе, регулируется уровнями  $Mg^{2+}$  (рис. 1).

Ион магния влияет на структуру и функцию геномной ДНК, РНК, белков протеома и некоторых метаболитов. Однако взаимодействия магния с ДНК и РНК неспецифичны (т. к.  $Mg^{2+}$  необходимы для стабилизации структуры двойной спирали любых ДНК или РНК). За исключением отдельных метаболитов (прежде всего, АТФ), взаимодействия ионов  $Mg^{2+}$  с метаболитами также малоспецифичны. В то же время взаимодействия  $Mg^{2+}$  с белками протеома носят высокоспецифичный характер и затрагивают обширный круг биологических функций и соответствующих заболеваний.

Таким образом, анализ биологических ролей магний-зависимых белков протеома позволяет провести комплексную системно-биологическую оценку всех возможных биологических ролей магния и, соответственно, описать спектр клинических применений препаратов магния у детей. В настоящей работе представлены результаты такого системно-биологического анализа.

## Материалы и методы

Список из 720 магний-зависимых белков анализировался посредством метода функционального связывания [7], на основе имеющихся аннотаций генома человека, представленных в базах данных NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT и HPM. Анализ функциональных взаимосвязей — одна из информа-

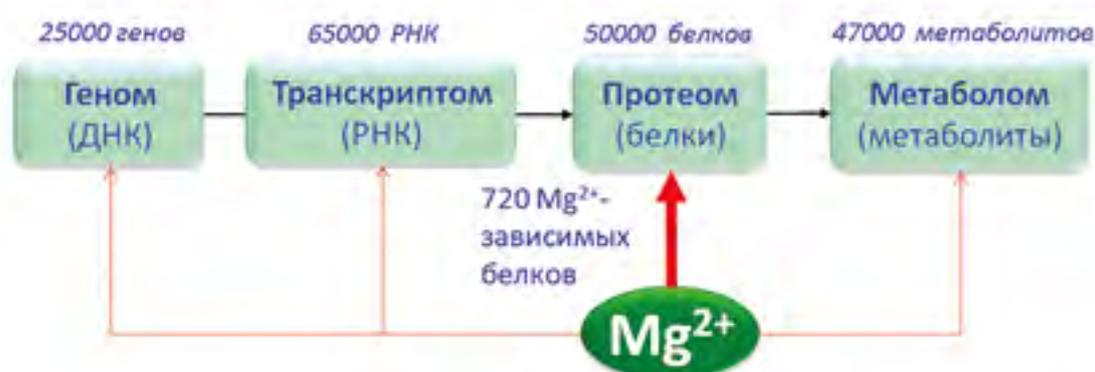


Рис. 1. Ион магния в постгеномной перспективе (геном человека)

ционных технологий современной биоинформатики. Данный метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов — белков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов), в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации определённой геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго очерченный круг специфических функций. Как врождённые мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (магния, кальция, определённых витаминов и др.) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической клинической симптоматики (рис. 2).

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней информации (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточных ролях белков, симптоматику и критерии диагностики заболеваний и т. д.), позволяет систематически рассмотреть все возможные биологические роли магния. В целом, при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей (рис. 2) каждый белок протеома человека представлен строкой в таблице, включающей такие описания белка/гена как:

- аминокислотная последовательность белка;
- список эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности ионов магния для активности рассматриваемого белка);
- список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка и соответствующего гена;
- список клинических симптомов рассматриваемых моногенных заболеваний;

- список клеточных функций белка (по БД Gene Ontology, GO и др.);
- список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

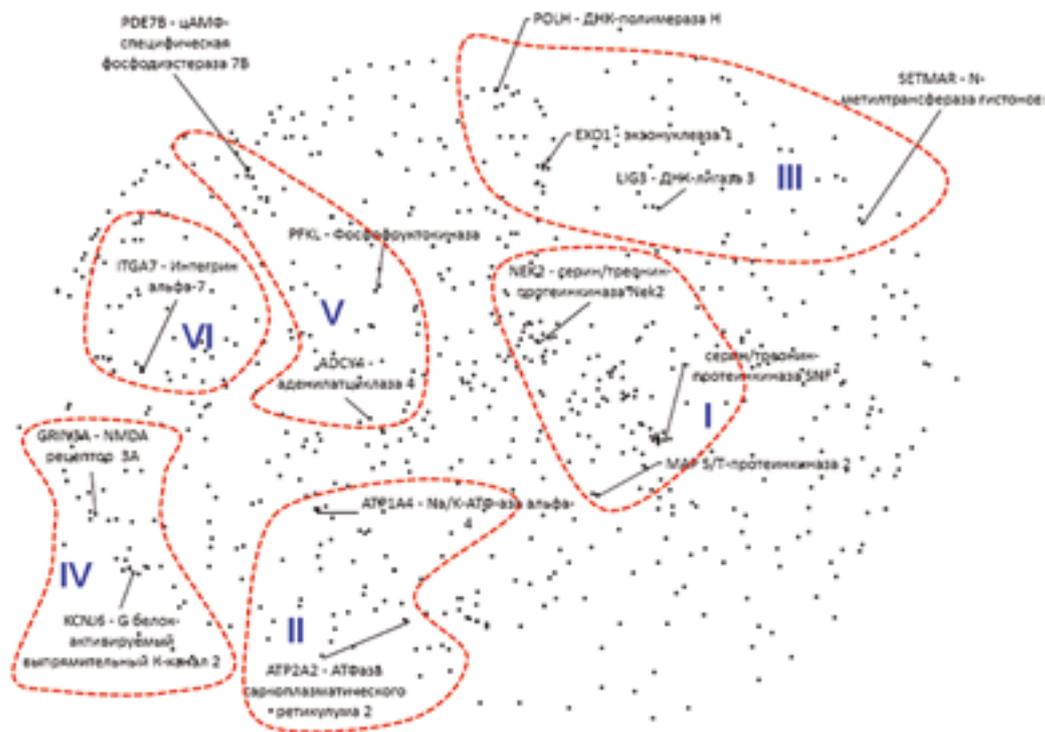
Далее, в полученном списке генов выделяются гены, соответствующие белкам из списка Mg-зависимых белков, и на основании статистических критериев проводятся последующие анализы частот встречаемости биологических ролей этих белков. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия  $\chi$ -квадрат, критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и теста Стьюдента. Для статистической обработки материала использовалась прикладная программа STATISTICA 6.0 и электронные таблицы Microsoft Excel.

### Результаты

В результате проведённого анализа, среди известных 50 057 белков протеома человека было выделено 20 180 аннотированных белков протеома (т. е. белков, для которых известны хотя бы основные биологические роли). Среди 20 180 белков 720 белков являлись магнием-зависимыми: для данных белков либо имелась информация, подтверждающая связывание одного или нескольких ионов  $Mg^{2+}$  соответствующим белком, либо



Рис. 2. Основы системно-биологического подхода к анализу Mg-зависимых белков



**Рис. 3.** Результаты кластеризации магний-зависимых белков протеома человека в соответствии с их биохимическими ролями

**Примечание:** Приведены примеры конкретных белков в каждом кластере. Кластер I «Серин/треониновые протеинкиназы», Кластер II «АТФазы», Кластер III «Ферменты метаболизма и ремонта ДНК», Кластер IV «Mg-зависимые ионные каналы», Кластер V «Аденилатциклазы и другие белки цАМФ-зависимой внутриклеточной передачи сигнала от рецепторов», Кластер VI «Интегрины и другие белки межклеточного взаимодействия»

экспериментальная информация о воздействии (пусть даже и косвенном) ионов  $Mg^{2+}$  на активность данного белка. Рассмотрение всех этих белков в рамках настоящей статьи не представляется возможным. Поэтому, рассмотрим различные способы системно-биологической группировки (кластеризации) этих белков.

Используя методы анализа метрических конфигураций [8–10], мы провели кластерный анализ всех магний-зависимых белков в соответствии с их биохимическими функциями. Биохимические функции белков извлекались из аннотаций биологических ролей белков в соответствии с международной номенклатурой GO (Gene Ontology, см. далее). В качестве метрической функции расстояния использовалась лямбда-метрика [7], позволяющая оценить «расстояние» между биохимическими ролями произвольной пары белков. Результаты кластерного анализа представлены на рис. 3.

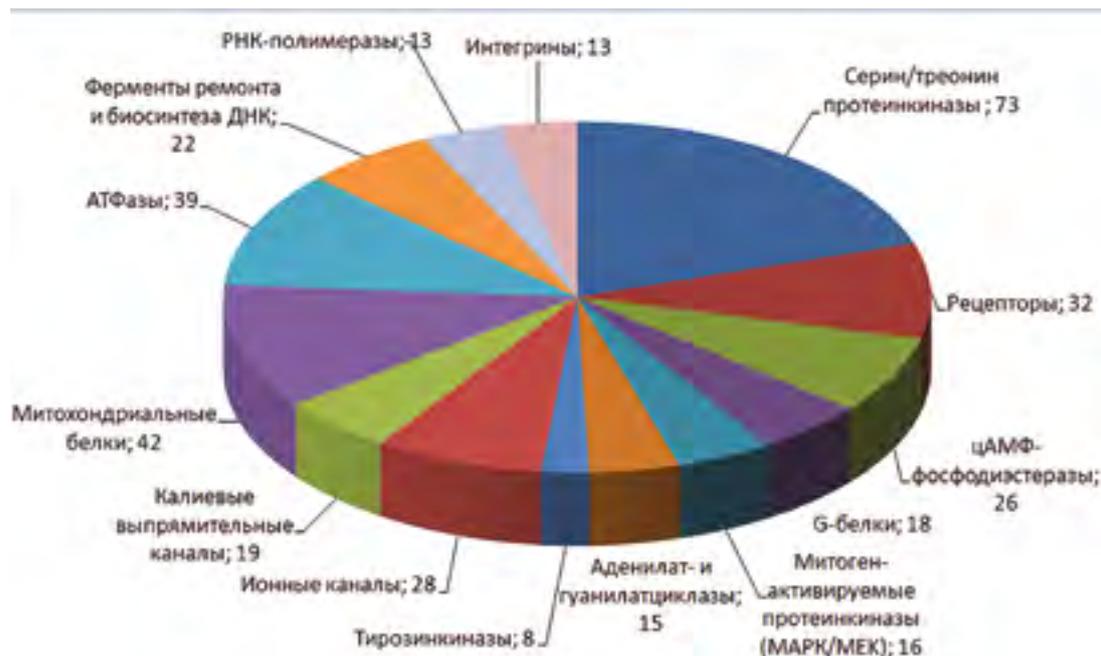
Результаты кластерного анализа показывают, что почти половина белков с известными биохимическими ролями не относятся к какому-либо кластеру. Иначе говоря, значительная пропорция магний-зависимых белков выполняет существенно различные биохимические роли.

В то же время, было выделено 6 кластеров магний-зависимых белков с достаточно близкими биохимическими ролями: кластер I «Серин/треониновые

протеинкиназы», кластер II «АТФазы», кластер III «Ферменты метаболизма и ремонта ДНК», кластер IV «Mg-зависимые ионные каналы», кластер V «Аденилатциклазы и другие белки цАМФ-зависимой внутриклеточной передачи сигнала от рецепторов», кластер VI «Интегрины и другие белки межклеточного взаимодействия». Эти группы белков обсуждаются более подробно далее.

Результаты анализа частоты встречаемости ключевых слов в текстовых аннотациях магний-зависимых белков (рис. 4) подтверждают результаты кластерного анализа. Действительно, наиболее частыми ключевыми словами были именно «серин/треониновая киназа», «аденилатциклаза», «ионные каналы», «АТФазы», «фермент биосинтеза и ремонта ДНК», «интегрины» и др.

Анализ биологических ролей Mg-зависимых белков, аннотированных в соответствии с международной номенклатурой Gene Ontology (GO) позволил установить биологические роли белков, специфично ассоциированные именно с эффектами магния (табл. 1). Специфичность ассоциации этих биологических ролей именно с магнием подразумевает, что эти биологические роли встречались достоверно чаще именно в подмножестве магний-зависимых белков, чем в произвольном подмножестве белков протеома человека. Можно сказать, что в осуществление этих биологических активностей



**Рис. 4.** Результаты анализа текстовых аннотаций магний-зависимых белков. Указаны числа белков, соответствующих каждой из приводимых текстовых аннотаций

вносят существенный вклад именно ионы магния, а не какие-либо другие ионы.

Анализ перечисленных в табл. 1 биологических ролей Mg-зависимых белков показал, что ион магния характеризуется разносторонним специфическим действием на различные системы организма. В целом, можно выделить 7 основных направлений воздействия магния на организм:

- **Энергетический метаболизм** («Связывание АТФ», «Митохондрии», «Митохондриальный матрикс», «Метаболизм глюкозы», «Ответ на глюкозу», «Глюконеогенез»), необходимый для поддержки мембранного потенциала всех видов клеток;

- **Процессы передачи сигналов от рецепторов внутрь клеток** («Сигнал от рецепторов через S/T-киназы», «Связывание ГТФ», «метаболизм инозитолфосфатов», «Сигнальный путь Wnt», «аденилатциклазы», «цАМФ», «гуанилатциклазы», «тирозинкиназы»), принципиально необходимые для эмбрионального развития и поддержания функции сердечно-сосудистой, иммунной и нервной систем, а также для осуществления биологических эффектов многочисленных гормонов, в т. ч. инсулина и репродуктивных белковых гормонов (ГНВГ, ЛГ, ФСГ);

- **Эмбриональное развитие** («Внутриутробное развитие эмбриона», «Апоптоз», «Деление клеток», «Репарация ДНК», «Репликация ДНК», «Ангиогенез», «Развитие мозга», «Развитие сердца»);

- **Структура соединительной ткани** («Структура внеклеточного матрикса», «Взаимодействия клетка-матрикс»);

- **Сердечно-сосудистые роли** («Функция почек», «Импорт ионов калия», «Саркоlemma», «Активность кальциевых каналов», «Регуляция электрической активности сердца», «Регулирование АД», «Биосинтез холестерина», «Активация тромбоцитов», «Коагуляция крови»);

- **Иммунологические роли** («Воспалительная реакция», «Врождённый иммунный ответ», «Регулирование активности NF- $\kappa$ b», «Ответ на окислительный стресс», «Ответ на гипоксию»);

- **Неврологические роли** («Синаптическая передача сигнала», «Постсинаптическая мембрана», «Рост нейритов», «Визуальное восприятие», «Активность NMDA-рецепторов»).

Анализ биологических ролей отдельных белков в соответствии с GO-номенклатурой указывает на отдельные биологические процессы, для нормофизиологического протекания которых необходимы адекватные уровни магния как внутри клеток, так и во внеклеточной среде. Нормофизиологическое протекание всех этих биологических процессов является обязательным условием для здоровья плода и роста организма ребёнка.

Следует также отметить, что многие из этих биологических процессов зависят не только от обеспеченности организма магнием, но и витамином B<sub>6</sub>. Например, такие биологические роли магния, как «регуляция воспаления», «биосинтез холестерина», «метаболизм глюкозы» и др. не могут быть реализованы в организме без участия B<sub>6</sub>-зависимых ферментов, в которые входит кофактор пиридоксаль-5-фосфат [3]. B<sub>6</sub>-зависимые ферменты участвуют в регуляции уровней

Таблица 1

Биологические роли Mg-зависимых белков, специфически ассоциированные с действием иона магния

Биологическая роль	$n_1$	$v_1$	$v_0$	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Связывание АТФ	306	0,4256	0,0612	6,96	3,2E-289
Серин/треонин (S/T) протеинкиназы	120	0,1669	0,0113	14,82	3,7E-218
Митохондрии	86	0,1196	0,0598	2,00	2,92E-09
Связывание гуанозинтрифосфата (ГТФ)	56	0,0779	0,0166	4,70	2,24E-30
Митохондриальный матрикс	39	0,0542	0,0149	3,64	2,09E-14
Сигнал от рецепторов через S/T-киназы	28	0,0389	0,0013	29,60	5,34E-79
Апоптоз	27	0,0376	0,0239	1,57	—
Деление клеток	24	0,0334	0,0161	2,08	0,005388
Репарация ДНК	23	0,0320	0,0090	3,55	3,46E-08
Транспорт ионов калия в клетку	22	0,0306	0,0003	96,89	8,66E-97
Репликация ДНК	22	0,0306	0,0066	4,65	1,11E-11
Регуляция воспаления	20	0,0278	0,0182	1,53	—
Врождённый иммунный ответ	19	0,0264	0,0203	1,30	—
Регуляция электрической активности сердца	18	0,0250	0,0019	13,21	2,99E-29
Структура внеклеточного матрикса	18	0,0250	0,0091	2,77	0,00034
Постсинаптическая мембрана	17	0,0236	0,0098	2,40	0,004881
Внутриутробное развитие эмбриона	16	0,0223	0,0084	2,64	0,00183
Рост нейритов	16	0,0223	0,0112	1,99	0,061274
Ответ на окислительный стресс	14	0,0195	0,0045	4,35	7,73E-07
Регулирование активности NF-kb	14	0,0195	0,0061	3,19	0,000287
Визуальное восприятие	14	0,0195	0,0097	2,00	0,086879
Функция почек	13	0,0181	0,0010	18,08	7,31E-27
Ответ на гипоксию	13	0,0181	0,0085	2,13	0,062628
Ангиогенез	13	0,0181	0,0108	1,67	—
Сарколема миоцитов	12	0,0167	0,0041	4,07	2,32E-05
Развитие сердца	12	0,0167	0,0085	1,96	—
Активность кальциевых каналов	11	0,0153	0,0028	5,38	3,69E-07
Метаболизм инозитолфосфатов	10	0,0139	0,0019	7,34	2,51E-09
Взаимодействия «клетка-матрикс»	10	0,0139	0,0043	3,26	0,002865
Развитие мозга	10	0,0139	0,0096	1,44	—
Синаптическая передача сигнала	10	0,0139	0,0115	1,21	—
Метаболизм глюкозы	9	0,0125	0,0028	4,40	0,000143
Чувствительность клеток к глюкозе	9	0,0125	0,0032	3,96	0,000583
Активация тромбоцитов	9	0,0125	0,0054	2,33	—
Коагуляция крови	9	0,0125	0,0085	1,48	—
Биосинтез холестерина	8	0,0111	0,0015	7,55	9,92E-08
Связывание NAD	8	0,0111	0,0016	6,82	6,23E-07
Регулирование АД	8	0,0111	0,0031	3,64	0,003606
Сигнальный путь Wnt	8	0,0111	0,0088	1,27	—
Активность NMDA-рецепторов	7	0,0097	0,0001	184,98	1,68E-34
Глюконеогенез	7	0,0097	0,0019	5,00	0,00029

**Примечание:** биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой Gene Ontology (GO).  $n_1$  – число Mg-зависимых белков с данной биологической ролью;  $v_1$  – частота встречаемости биологической роли в выборке Mg-зависимых белков;  $v_0$  – общая частота встречаемости биологической роли во всём протеоме; О.Ш. – отношение шансов ( $v_1/v_0$ );  $P(\chi^2)$  – достоверность ассоциации. Биологические роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа Mg-зависимых белков ( $n_1$ ).

гомоцистеина – независимого фактора воспаления [11]. Витамин В<sub>6</sub> улучшает переработку глюкозы и профилактирует развитие инсулинорезистентности, нарушений липидного профиля и эндотелиальной дисфункции [12]. Существование витамин-В<sub>6</sub>-зависимых пороков развития указывает на важность витамина В<sub>6</sub> для ролей «внутриутробное развитие эмбриона» и «развитие мозга» [13].

Представляет интерес оценить, как ионы магния могут влиять на более «крупные» фрагменты метабо-

лизма — внутриклеточные сигнальные каскады, биосинтетические каскады и другие элементы реактома человека (реактом – совокупность всех химических реакций, протекающих в клетках и вне клеток данного организма). Данный анализ был проведён с использованием аннотаций белков протеома человека, приведённых в базе данных REACTOME (рис. 5, табл. 2).

Анализ с использованием данных реактома человека существенно детализирует молекулярные механизмы осуществления упоминаемых выше биологических

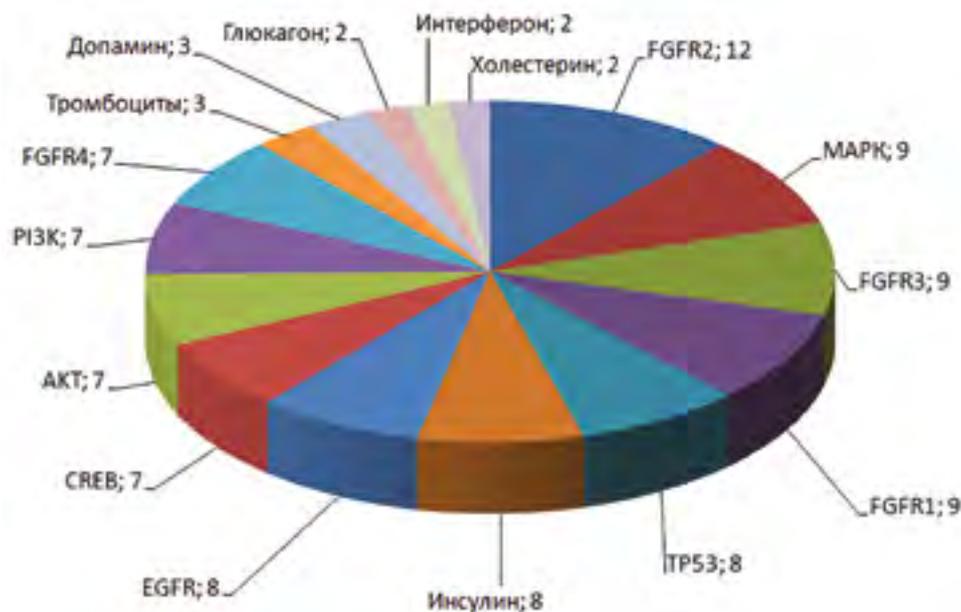


Рис. 5. Аннотации магний-зависимых белков протеома человека в базе данных REACTOME

эффектов магния. С учётом реактомных данных, молекулярные механизмы осуществления приведённых выше 7 основных направлений воздействия магния на организм детализируются следующим образом:

- **Энергетический метаболизм** — помимо участия в митохондриальном синтезе АТФ, магний принимает участие в важнейших реактомных путях метаболизма углеводов: активация протеинкиназы-А и сигнальный каскад рецептора глюкагона, регулирование секреции инсулина, гликолиз.

- **Процессы передачи сигналов от рецепторов внутрь клеток** осуществляются при участии сигнальных G(s)-, G(i)- и G(z)-белков (которые, в частности, управляют активацией G-белок управляемых калиевых каналов), сигнальных каскадов с участием ионов кальция, PLC (фосфолипаза С), фосфатидилхолина, фосфатидилэтаноламина, инозитолфосфатов (каскады RAF/MAPK/MEKK/ АКТ/PI3K) и фосфорилирования CREB.

- **Эмбриональное развитие** поддерживается ионами магния при участии описанных выше сигнальных каскадов, а также регулирования апоптоза посредством белка TP53, сигнального каскада «Sonic Hedgehog» (участвующего в процессе раннего развития и формирования левой/правой симметрии тела, прорезывании зубов, разделении пальцев на руках и на ногах), ремонта ДНК, сигнального пути фактора ангиогенеза VEGF и сигнального пути Wnt, а также молекулярные механизмы воздействия магния на соединительную ткань. Важно отметить, что более 100 магний-зависимых белков являются плацентарными белками [14].

- **Поддержка структуры соединительной ткани** ионами магния осуществляется через реактомные

пути рецепторов факторов роста фибробластов (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4), фактора роста эпидермиса EGFR, взаимодействия интегринов с внеклеточной матрицей и с другими клетками, биосинтеза протеогликанов внеклеточного матрикса.

- **Сердечно-сосудистые роли** магния осуществляются за счёт поддержки цикла сокращения/расслабления сарколеммы мышц, регуляции активности кальциевых и калиевых каналов, регуляции вазопрессинном почечного гомеостаза через аквапорины, поддержки метаболизма холестерина и длинноцепочечных жирных кислот посредством кофермента-А, регуляции свертывания крови (дегрануляция тромбоцитов, сигнальный путь тромбина через протеиназа-активированные рецепторы, сигнальный путь тромбоксана, адгезии тромбоцитов к коллагену).

- **Иммунологические роли** — ионы магния проявляют противовоспалительный эффект за счёт регулирования активности NF- $\kappa$ b, сигнального пути интерферона-гамма и сигнального пути интерлейкина-1.

- **Неврологические роли** магния осуществляются при участии иона  $Mg^{2+}$  в синаптической передаче сигнала с участием допамина, NMDA-рецепторов, участия в многочисленных сигнальных путях опосредования эффектов других нейротрансмиттеров (сигнальных G(s)-, G(i)- и G(z)-белков, ионов кальция, фосфолипазы С, которые участвуют в осуществлении эффектов катехоламинов, серотонина, допамина и др.). Нарушение активности этих белков будет приводить к дефициту внимания и гиперактивности, коморбидных дефициту магния [4, 15–17]. При этом, при дефиците витамина B<sub>6</sub> будет наблюдаться дефицит нейротрансмиттеров, который проявится у детей в задержке развития, у детей и взрослых —

Таблица 2

Реактомные роли Mg-зависимых белков, специфически ассоциированные с действием иона магния

Элементы реактома	$n_1$	$v_1$	$v_0$	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Ионные каналы, АТФазы	36	0,0501	0,0010	50,07	1,2E-129
Внутриклеточная передача сигнала G(s) белками	30	0,0417	0,0059	7,02	1,6E-26
Внутриклеточная передача сигнала G(i) белками	19	0,0264	0,0117	2,26	0,005934
Внутриклеточная передача сигнала G(z) белками	16	0,0223	0,0016	14,09	2,14E-27
Взаимодействия интегрин с внеклеточной матрицей и другими клетками	14	0,0195	0,0038	5,14	1,55E-08
Регулирование антионкогена TP53 посредством фосфорилирования	13	0,0181	0,0040	4,52	1,05E-06
Каскады киназ RAF/MAPK/MEKK/АКТ/PI3K	12	0,0167	0,0054	3,11	0,001471
Сигнальный каскад фактора роста «Sonic Hedgehog» (Shh)	12	0,0167	0,0023	7,37	3,24E-11
Регуляция вазопрессинном почечного гомеостаза через аквапорины	12	0,0167	0,0016	10,23	1,45E-15
Активация протеинкиназы-A (рецептор глюкогона)	11	0,0153	0,0003	48,45	6,68E-39
Гликолиз	10	0,0139	0,0012	12,01	5,42E-15
Сигнальный каскад рецептора глюкогона	10	0,0139	0,0008	16,52	2,39E-19
Активация G-белок управляемых калиевых каналов	10	0,0139	0,0008	17,62	2,79E-20
Регулирование секреции инсулина	8	0,0111	0,0013	8,46	1,11E-08
Передача сигнала через фосфолипазу C	8	0,0111	0,0004	26,43	4,32E-21
Передача сигнала ионами Ca <sup>2+</sup>	7	0,0097	0,0027	3,56	0,009857
Синтез фосфатидилхолина	7	0,0097	0,0007	14,23	4,16E-12
Синтез фосфатидилэтаноламина	7	0,0097	0,0003	30,83	4,26E-20
Протеогликаны внеклеточного матрикса	6	0,0083	0,0036	2,30	—
Ремонт коротких обрывов ДНК	6	0,0083	0,0029	2,83	—
Сигнальный путь тромбина через протеиназа-активированные рецепторы	6	0,0083	0,0014	6,10	0,000115
Фосфорилирование CREB через активацию кальмодулин киназы (CaMKII)	6	0,0083	0,0005	17,62	3,34E-12
Сигнальный путь интерферона-гамма	5	0,0070	0,0085	0,82	—
Регуляция выделения синтезируемых в тромбоцитах стимуляторов агрегации тромбоцитов	5	0,0070	0,0053	1,32	—
Сигнальный путь фактора ангиогенеза VEGF	5	0,0070	0,0030	2,32	—
Метаболизм гликофинголипидов	5	0,0070	0,0019	3,67	0,035967
Сигнальный путь интерлейкина-1	5	0,0070	0,0016	4,40	0,010223
Метаболизм длинноцепочечных жирных кислот посредством CoA	5	0,0070	0,0011	6,61	0,000266
Сигнальный путь тромбосана	5	0,0070	0,0009	7,34	8,47E-05
Сигнальные пути факторов роста фибробластов (FGFR2, FGFR3, FGFR1, FGFR4, EGFR)	5	0,0070	0,0009	7,34	8,47E-05
Биосинтез холестерина	5	0,0070	0,0007	9,44	3,96E-06
Регуляция NMDA рецепторов	5	0,0070	0,0006	11,01	4,86E-07
Фосфорилирование CREB через аденилатциклазы	5	0,0070	0,0001	66,06	1,01E-19
Регуляция адгезии тромбоцитов к коллагену	4	0,0056	0,0006	9,61	4,79E-05

**Примечание:**  $n_1$  – число Mg-зависимых белков с данной реактомной ролью;  $v_1$  – частота встречаемости реактомной роли в выборке Mg-зависимых белков;  $v_0$  – общая частота встречаемости в протеоме; О.Ш. – отношение шансов ( $v_1/v_0$ );  $P(\chi^2)$  – достоверность ассоциации. Реактомные роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа Mg-зависимых белков ( $n_1$ )

в дисфункции периферической нервной системы, гипотонии и гипокинезии [18]. Нейротрофические роли магния осуществляются при участии сигнальных путей MAPK/MEKK/ PI3K и фосфорилирования белка CREB через активацию кальмодулин киназы и ряда аденилатциклаз.

Очевидно, что приведённые выше молекулярные механизмы действия магния весьма обширны и не могут быть детально проанализированы в рамках настоящей статьи. Рассмотрим более подробно один пример: воздействие магния на структуру соединительной ткани посредством участия в осуществлении эффектов факторов роста фибробластов – основной группы ростовых факторов, регулирующих рост и структурирование соединительно-тканой основы паренхимы всех систем органов.

**Факторы роста фибробластов (ФРФ)** индуцируют деление клеток соединительной ткани [19]. Соединительная ткань, которая составляет около 50% всей массы тела и скрепляет воедино все ткани организма, формируется с первых дней жизни плода. Механически слабая соединительная ткань – основа морфофункциональных изменений не только при сколиозе, остеопорозе и других патологиях хрящевой и костной ткани, но и при сердечно-сосудистых и цереброваскулярных заболеваниях. Важно также отметить, что многие исследователи рассматривают нарушения формирования соединительной ткани (дисплазию соединительной ткани, ДСТ) как клиническую форму первичного магниевое дефицита, а использование препаратов магния рассматривается многими как средство патогенетического лечения ДСТ [20].

ДСТ у детей и подростков характеризуются широчайшим диапазоном проявлений. Детский и подростковый сколиоз, рахит, плоскостопие, нарушения фиксации органов (гастроптоз, нефроптоз, колоноптоз), пролапс митрального клапана, аневризмы сосудов, варикозное расширение вен, миопия, стрии в пубертате — все эти патологические состояния, так или иначе, связаны с патологией соединительной ткани. Если у взрослых дисплазия соединительной ткани чаще проявляется как аневризмы, гастроптозы, варикозное расширение вен, то у детей дисплазия проявляется пупочной, паховой или диафрагмальной грыжей, мальформациями лёгких, болезнью гиалиновых мембран и даже аномалиями развития (дивертикулы, гастрошизис, пороки сердца, незаращение дужек позвонков). Роль дефицита магния в синдроме внезапной смерти у детей известна педиатрам более 40 лет [1, 21].

Настоящий анализ показал, что магний участвует в осуществлении внутриклеточной передачи сигнала от всех четырёх видов рецепторов ФРФ — FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, которые связывают белки ФРФ [22] и активируют процессы роста соединительной ткани организма ребенка. Сигнальный каскад рецепторов ФРФ достаточно сложен и включает взаимодействия десятков ферментов и других белков. Активность многих из этих ферментов зависит от определённых нутриентных кофакторов — прежде всего, магния, цинка и кальция. Дефициты магния и других соответствующих нутриентов будут способствовать

нарушениям активности сигнального каскада ФРФ рецепторов и, следовательно, нарушениям структуры соединительной ткани, т.к. молекулы ФРФ важны для дифференцировки, миграции, выживания и апоптоза клеток соединительной ткани внутренних органов, хряща и костей [23].

Результаты настоящего анализа показали, что магний вовлечён в многочисленные сигнальные каскады (факторов роста фибробластов, каскады рецепторов ФНО, трансформирующего фактора роста и др.), сбалансированная активность которых принципиально важна для *поддержания соединительно-тканной структуры кости*. Дефицит магния приводит к нарушению активности этих сигнальных каскадов что, в свою очередь, является причиной усиления процессов воспаления, преждевременного апоптоза остеобластов, усиленного деления деградирующей костную ткань остеокластов и, соответственно, приводит к усилению резорбции кости и снижению минеральной плотности кости (рис. 6). Пиридоксин, являясь фармакокинетическим и фармакодинамическим синергистом иона  $Mg^{2+}$ , не только способствует усиленному всасыванию магния, но и проявляет самостоятельные эффекты в поддержке структуры соединительной ткани кости [24].

Выше был описан весьма обширный спектр «специфических» биологических ролей белков протеома человека, активность которых прямо или косвенно зависит от концентраций ионов магния в тканях организма. Совокупность столь разнородных ролей

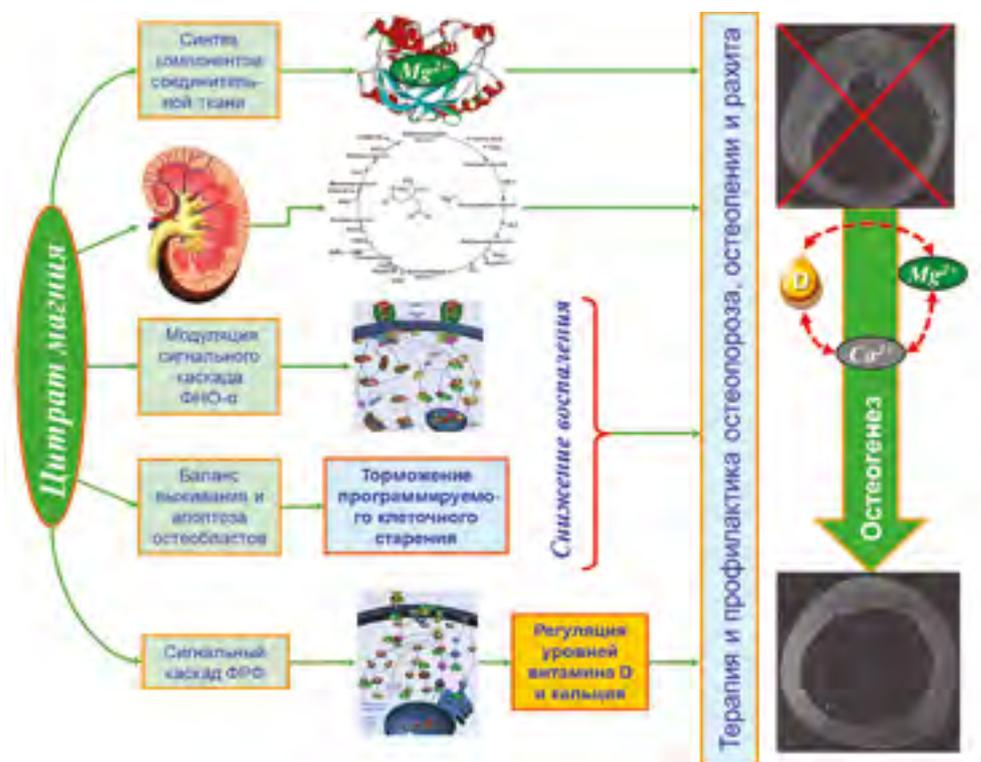


Рис. 6. Молекулярно-физиологические механизмы воздействия магния на структуру и функцию костной ткани

обуславливает не менее широкий спектр заболеваний, специфически ассоциированных с нарушениями активации магний-зависимых белков протеома человека (табл. 3, рис. 7).

Подчеркнём, что приведённые в табл. 3 симптомы и заболевания ассоциированы с нуклеотидными дефектами генов, кодирующих обсуждаемые магний-зависимые белки протеома (см. Методы). Поскольку биологическая активность этих белков в существенной мере зависит от обеспеченности организма магнием, то дефицит магния будет приводить к симптоматике, схожей с проявлениями генетических дефектов.

Так, дефицит магния во время беременности будет способствовать развитию скелетных дефектов, рахита, брахидактилии, краниосиностозов, нарушений строения ретины и зрения. В любом возрасте, дефицит магния, как известно, приводит к нарушениям функции мышц (прежде всего, судороги) и миопатии, что,

в случае миокарда, ассоциировано с желудочковыми нарушениями и аритмией. Для дефицита магния также характерны митохондриальные нарушения, гиперинсулинемия, нарушения пигментации кожи и ксеродерма (рис. 7).

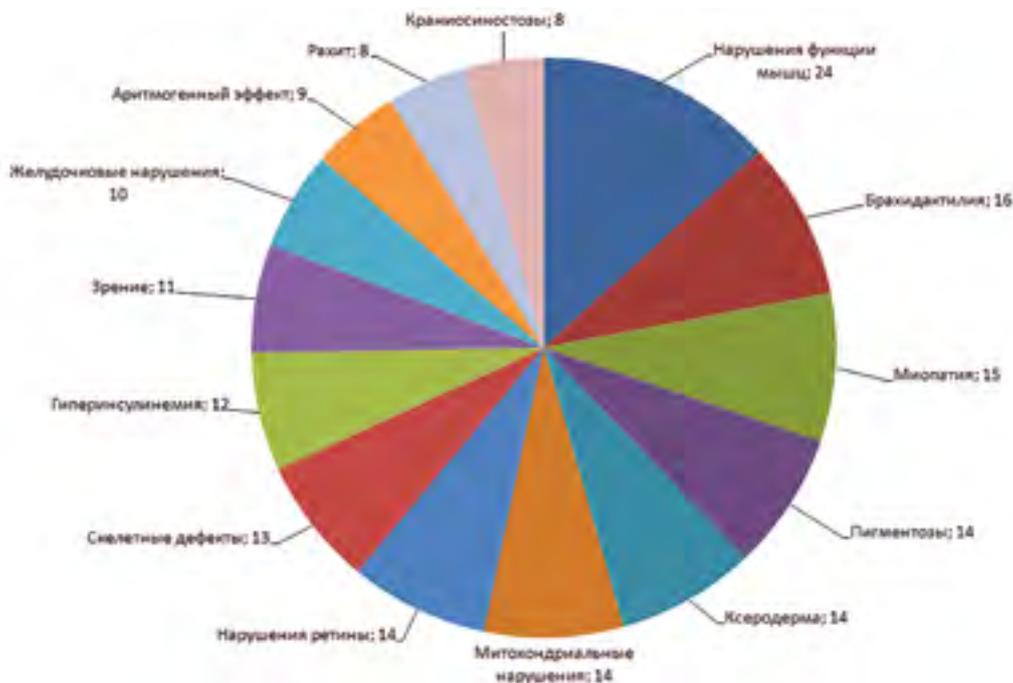
Анализ этих симптомов с учётом данных, представленных в базах данных OMIM, ORPHA, ICD-10 позволил выделить диагнозы по МКБ-10, специфически ассоциированные с магний-зависимыми белками протеома человека (рис. 8). Дефицит магния ассоциирован с пороками развития (Q87 Другие уточнённые синдромы врождённых аномалий [пороков развития], затрагивающих несколько систем; Q04 Другие врождённые аномалии [пороки развития] мозга; Q80 Врождённый ихтиоз), опухолевыми заболеваниями (Z80 Злокачественное новообразование в семейном анамнезе), заболеваниями, ассоциированными с нарушениями энергетического метаболизма

Таблица 3

Генетически-обусловленные заболевания в номенклатуре МКБ-10 и соответствующие симптомы, специфически ассоциированные с Mg-зависимыми белками

Заболевание/симптоматика	$n_1$	$v_1$	$v_0$	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Z80 (Злокачественное новообразование в семейном анамнезе)	25	0,0341	0,0002	221,23	5,08E-43
Аритмогенный эффект	22	0,0307	0,0003	99,55	1,92E-34
G72 (Другие миопатии)	15	0,0205	0,0006	33,18	3,58E-16
Нарушения пигментации кожи	34	0,0478	0,0020	23,82	7,16E-32
Ксеродерма	34	0,0478	0,0026	18,22	5,01E-27
E83 (Нарушения минерального обмена)	49	0,0683	0,0046	14,75	2,26E-33
E20 (Гипопаратиреоз)	20	0,0273	0,0019	14,75	2,55E-13
Гиперинсулинемия	30	0,0410	0,0042	9,83	2,65E-14
Рахит	20	0,0273	0,0031	8,85	1,09E-08
D55 (Анемия вследствие ферментных нарушений)	20	0,0273	0,0034	8,04	6,31E-08
L67 (Аномалии цвета волос и волосяного стержня)	15	0,0205	0,0028	7,37	1,63E-05
E79 (Нарушения обмена пуринов и пиримидинов)	20	0,0273	0,0037	7,37	2,9E-07
Желудочковые нарушения	25	0,0341	0,0059	5,82	5,65E-07
Q80 (Врождённый ихтиоз)	20	0,0273	0,0059	4,66	0,000259
H35 (Другие болезни сетчатки)	20	0,0273	0,0065	4,21	0,000856
G31 (Другие дегенеративные болезни нервной системы)	15	0,0205	0,0062	3,32	0,036588
Митохондриальные нарушения	34	0,0478	0,0164	2,92	0,00118
E74 (Другие нарушения обмена углеводов)	30	0,0410	0,0145	2,82	0,005239
Нарушения функции мышц	59	0,0819	0,0319	2,56	9,3E-05
Брахидактилия	39	0,0546	0,0218	2,51	0,003905
Q82 (Другие уточнённые врождённые аномалии кожи)	30	0,0410	0,0173	2,37	0,032859
G71 (первичные поражения мышц)	59	0,0819	0,0355	2,31	0,000797
Скелетные дефекты	32	0,0444	0,0193	2,30	0,031498
Q87 (Другие уточнённые синдромы врождённых аномалий [пороков развития], затрагивающих несколько систем)	128	0,1775	0,0839	2,11	1,04E-06
E72 (Другие нарушения обмена аминокислот)	30	0,0410	0,0194	2,11	0,08949
Дефекты зрения	27	0,0375	0,0182	2,06	—
Краниосиностозы	20	0,0273	0,0176	1,55	—
Нарушения ретины	34	0,0478	0,0322	1,48	—
Q04 (Другие врождённые аномалии [пороки развития] мозга)	25	0,0341	0,0238	1,44	—
E75 (Нарушения обмена сфинголипидов и другие болезни накопления липидов)	20	0,0273	0,0235	1,16	—

**Примечание:**  $n_1$  — число Mg-зависимых белков, соответствующих заболеванию/симптому;  $v_1$  — частота встречаемости заболевания/симптома в выборке Mg-зависимых белков;  $v_0$  — общая частота встречаемости в протеоме; О.Ш. — отношение шансов ( $v_1/v_0$ );  $P(\chi^2)$  — достоверность ассоциации. Заболевания/симптомы в таблице упорядочены в соответствии со значением О.Ш., т. е. от наиболее специфических для магния к наименее специфическим



**Рис. 7.** Симптомы, специфически ассоциированные с магнием-зависимыми белками протеома человека

(E74 Другие нарушения обмена углеводов, E72 Другие нарушения обмена аминокислот, E79 Нарушения обмена пуринов и пиримидинов, E75 Нарушения обмена сфинголипидов и другие болезни накопления липидов, E20 Гипопаратиреоз, D55 Анемия вследствие ферментных нарушений), дисфункцией мышц (G71 Первичные поражения мышц, G72 Другие миопатии), заболеваниями глаз (H35 Другие болезни сетчатки), нарушениями структуры кожи и её придатков (Q82 Другие уточнённые врождённые аномалии кожи, L67 Аномалии цвета волос и волосяного стержня (например, локальная седина волос у детей), G31 Другие дегенеративные болезни нервной системы).

По данным экспериментальных и клинических исследований, нарушения обмена магния действительно связаны с повышенным риском формирования пороков развития. Например, неотъемлемым элементом обмена магния в организме является Mg-транспортный канал TRPM6 (переходный рецепторный потенциал меластатина, подтип 6), обеспечивающий транспорт магния и абсорбцию магния в дистальных извитых канальцах нефрона [25].

Низкая или отсутствующая экспрессия/активность магниевого канала TRPM6 нарушает развитие эмбриона. Мутации гена ассоциированы с семейной гипомagneземией. Без лечения специальными препаратами магния дети с мутациями гена TRPM6 характеризуются задержкой умственного и физического развития, а также страдают от судорог [26]. Фундаментальные исследования показали, что экспрессия TRPM6 регулируется рядом гормонов (эпидермальный фактор роста, эстрогены и др.), внутриклеточными концен-

трациями  $Mg^{2+}$ , pH (ацидоз снижает экспрессию гена) и АТФ [27]. Определённые препараты (циклоспорин, тиазидные диуретики) вызывают снижение экспрессии и активности TRPM6, приводя к гипомagneземии во внутриутробном периоде.

Следует подчеркнуть, что многие из этих факторов, негативно влияющих на экспрессию и активность магниевого канала TRPM6, также ассоциированы и с повышенным риском пороков развития. В эксперименте делеции Mg-транспортного канала TRPM6 приводят к формированию тяжёлых пороков развития: дефектов нервной трубки, экзэнцефалии, расщелин позвоночника [28]. В клинической практике, тератогенные эффекты циклоспорина, тиазидных диуретиков, аминогликозидов, фторхинолонов хорошо известны. Напомним, что все эти препараты вызывают глубокий дефицит магния в организме [29].

#### **О компенсации дефицитов магния и пиридоксина**

Дефицит магния у детей приводит к слабости скелетных мышц, дисплазии соединительной ткани, нарушениям осанки, пролапсу митрального клапана, раннему развитию гипертонии и перебоев в сердце. Дети с низкой обеспеченностью магнием страдают астеническими состояниями, избыточной массой тела, нарушениями липидного обмена, инсулинорезистентностью [3].

Проводимые в России крупномасштабные исследования указывают на необходимость проведения коррекции недостаточной обеспеченности магнием и витамином B<sub>6</sub> в различных возрастных группах.

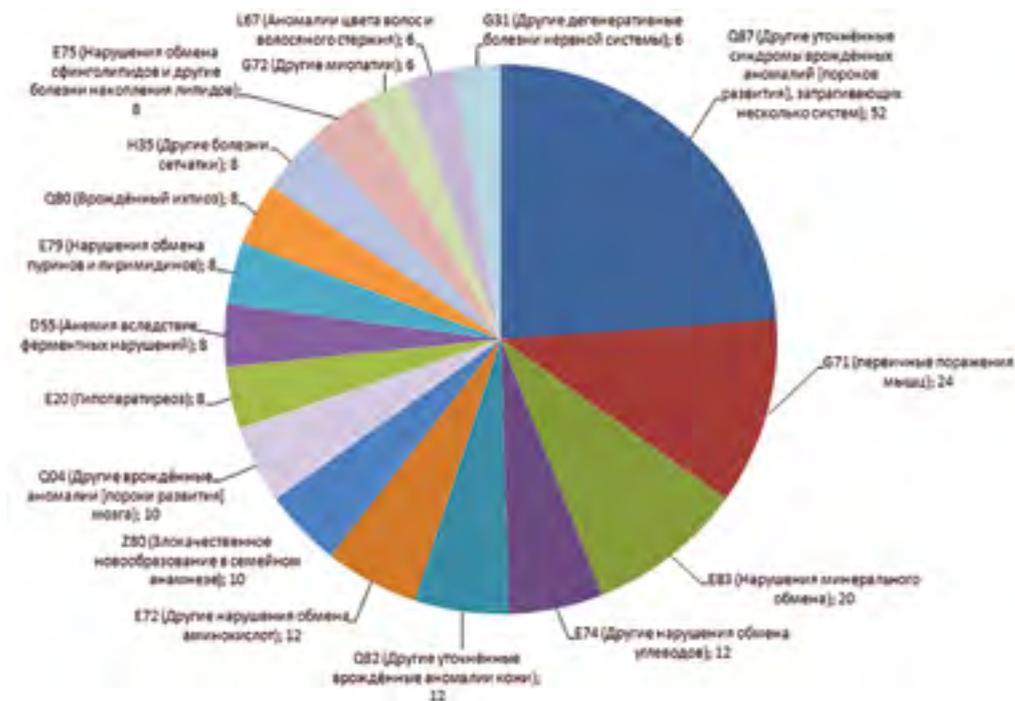


Рис. 8. Заболевания в номенклатуре МКБ-10, специфически ассоциированные с магнием-зависимыми белками протеома человека

Так, в результате многоцентрового скринингового исследования было установлено, что недостаточная обеспеченность витамином В<sub>6</sub> встречалась более чем у половины обследованных, в т. ч. детей [8]. При проведении коррекции недостаточности магния следует стремиться к достижению значений уровня магния в плазме крови более 0,83 ммоль/л (именно этот уровень соответствует достоверному снижению риска коморбидных дефициту магния патологий [8, 9]), а уровня магния в эритроцитах – более 1,65 ммоль/л [30].

Несмотря на большое количество продуктов-концентраторов магния и пиридоксина, компенсировать имеющиеся у ребёнка дефициты магния и пиридоксина только за счёт диеты не представляется возможным. Формально, продукт может содержать значительное количество магния. Например, различные виды морских водорослей содержат магний в количестве 600–1 000 мг/100 г, что соответствует 400–600 мг/100 г растворимого магния. Тем не менее, анализ съедобных японских водорослей показал, что, несмотря на высокое содержание магния, биодоступность магния из водорослей сравнима с биодоступностью магния из оксида магния (т. е. менее 5%) [31]. Низкая биодоступность магния из продуктов-концентраторов магния связана, во-первых, с наличием в этих продуктах фитатов или оксалатов, и, во-вторых, с состоянием секреции соляной кислоты желудочного сока у конкретного ребёнка. Высококалорийная диета с избытком насыщенных жиров и соли, недостатком клетчатки, инулинов и продуктов-доноров позитивной микробиоты (лактобактерий и др.) не обеспечивает

ребёнка магнием, провоцирует провоспалительный ответ и нарушает иммунную защиту.

Поэтому, компенсация дефицита магния должна быть комплексной. На фоне рекомендаций по оптимизации диеты (исключения «синтетической» высококалорийной, жирной пищи, включения продуктов-доноров магния с низким содержанием фитатов, дополнение диеты клетчаткой и инулин-содержащими продуктами и т. д.) следует также обеспечить приём достаточного количества элементного магния в составе органических солей (лактата, цитрата, пироглутамата магния и т. д.). Детям в возрасте 1 года и старше для компенсации дефицита магния используется питьевой раствор пироглутамата магния Магне В<sub>6</sub> (ампулы по 10 мл, 100 мг элементного магния, 10 мг пиридоксина). С 6-летнего возраста также может использоваться таблетированная форма Магне В<sub>6</sub> (в 1 таб. 48 мг элементного магния в форме лактата магния и 5 мг пиридоксина). Коррекция недостаточной обеспеченности детей магнием должна осуществляться в достаточных дозах, длительными курсами препаратов, содержащими и магний, и пиридоксин.

### Заключение

Долгое время считалось, что ионы магния регулируют активность всего 300 белков, включая ферменты. Подобная точка зрения существенно устарела: проведённый нами системно-биологический анализ протеома человека указал на наличие, по меньшей мере, 720 магнием-зависимых белков. Эти белки могут быть условно подразделены на 7 основных групп по

основному направлению действия (энергетический метаболизм, процессы передачи сигналов от рецепторов, эмбриональное развитие, поддержка структуры соединительной ткани, сердечно-сосудистые, иммунологические и неврологические роли). Активность большинства магний-зависимых белков начинается с внутриутробного периода развития и очень важна для прохождения этапов развития в детстве. Поэтому, дефицит магния нарушает программу развития плода и ребёнка, а затем приводит к формированию многочисленных хронических патологий.

Среди достаточно интересных результатов настоящей работы является установление, например, того факта то, что ионы магния принципиально необходимы для осуществления биологических эффектов таких важнейших сигнальных путей, как Wnt и сигнальных путей, регулирующих активность транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B. Новейшие данные показывают, что на-

рушения регуляции активности NF- $\kappa$ B ассоциированы с укорочением длительности жизни [32]. Нарушения активности сигнального пути Wnt, который также содержит магний-зависимые белки, ассоциированы с развитием нейродегенеративных заболеваний [33].

Одним из важных результатов настоящей работы является и то, что недостаточная активность магний-зависимых белков достоверно сопряжена с риском злокачественных новообразований в семейном анамнезе (диагноз Z80 по МКБ-10). Кроме того, дефицит магния во время беременности будет способствовать развитию пороков развития (скелетных дефектов, рахита, брахидактилии, краниосиностозов, нарушений строения ретины и зрения). Без компенсации дефицита магния у детей будет наблюдаться обширнейший круг отклонений развития и заболеваний, которые были рассмотрены в настоящей статье в ходе анализа магний-зависимых белков протеома человека.

### Литература

1. Пальчик А.Б., Шабалов Н.П. Гипоксически-ишемическая энцефалопатия новорожденных. СПб, 2001, 219.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Спиричев В.Б. Полногеномный анализ сайтов связывания рецептора витамина D указывает на широкий спектр потенциальных применений витамина D в терапии. Медицинский совет. 2016; 01: 12–22.
3. Torshin I.Y., Gromova O.A. Magnesium and pyridoxine: fundamental studies and clinical practice. Nova Science Publ. 2011; 196.
4. Starobrat-Hermelin B., Koziielec T. The effects of magnesium physiological supplementation on hyperactivity in children with attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Positive response to magnesium oral loading test. Magnes Res. 1997; 10: 149–56.
5. Paupe J.R., Ducroux T. La magnesotherapie chez l'enfant spasmophile. A propos de 292 observations. Med Nutr. 1980; 16: 37–42.
6. Baerlocher K. Magnesium in der paediatric. Paediatrica 1998; 9(5) <http://www.swisspaediatrics.org/ paediatrica/vol9/n6/mg-ge.htm>
7. Torshin I.Yu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA, 2009. In «Bioinformatics in the Post-Genomic Era» series. ISBN 1-60692-217-0.
8. Громова О.А., Калачева А.Г., Торшин И.Ю. с соавт. Недостаточность магния – достоверный фактор риска коморбидных состояний: результаты крупномасштабного скрининга магниевого статуса в регионах России. Фарматека. 2013; 6 (259): 115–29.
9. Громова О.А., Торшин И.Ю., Лиманова О.А., Гоголева И.В. с соавт. Анализ взаимосвязи между обеспеченностью магнием и риском соматических заболеваний у россиян 18–45 лет методами интеллектуального анализа данных. Эффективная фармакотерапия. Акушерство и Гинекология 2014; 2: 10–23.
10. Torshin I.Y. On metric spaces arising during formalization of problems of recognition and classification. Part 2: density properties. Pattern Recognition and Image analysis. 2016; 3.
11. 27453118 Lan X1, Dang SN, Zhao YL, Yan H, Yan H. Meta-analysis on effect of combined supplementation of folic acid, vitamin B12 and B6 on risk of cardio-cerebrovascular diseases in randomized control trials. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2016 Jul; 37 (7): 1028–34. doi: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2016.07.024.
12. 26881239 Liu Z, Li P, Zhao ZH, Zhang Y, Ma ZM, Wang SX. Vitamin B6 Prevents Endothelial Dysfunction, Insulin Resistance, and Hepatic Lipid Accumulation in ApoE (-/-) Mice Fed with High-Fat Diet. J Diabetes Res. 2016;2016:1748065. doi: 10.1155/2016/1748065. Epub 2015 Dec 31.
13. 22860981 Gu Q1, Li Y, Cui ZL, Luo XP. Homocysteine, folate, vitamin B12 and B6 in mothers of children with neural tube defects in Xinjiang, China. Acta Paediatr. 2012 Nov; 101 (11): e486-90. doi: 10.1111/j.1651-2227.2012.02795.x. Epub 2012 Aug 24.
14. Сухих Г.Т., Торшин И.Ю., Громова О.А., Рудаков К.В. Молекулярные механизмы регуляции магнием плацентарных белков. Росс. Вестн. Акуш. Гинекол. 2008; 6: 9–16.
15. Gromova O.A., Burtsev E.M., Fedotova L.E. Rola magnezuw leczenia dysfunkcji mozgowej u dzieci. 111 Zjazdu Towrzystwa Magnezologicznego im. Prof. Dr. Juliana Aleksandrowicza Poznan. 1998; 15–16.10: 92–98.

16. Mousain-Bosc M., Roche M., Rapin J., Bali J.P. Magnesium VitB6 intake reduces central nervous system hyperexcitability in children. J Am Coll Nutr. 2004; 23 (5): 545S–548S.
17. Nogovitsina O.R., Leviitina E.V. [Effect of MAGNE-B6 on the clinical and biochemical manifestations of the syndrome of attention deficit and hyperactivity in children] Eksp Klin Farmakol. 2006; 69 (1): 74–77.
18. Pons R., Ford B., Chiriboga C.A., Clayton P.T., Hinton V., Hyland K., Sharma R., De Vivo D.C. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: clinical features, treatment, and prognosis. Neurology. 2004 Apr 13; 62 (7): 1058–65.
19. Moursi A.M., Winnard P.L., Winnard A.V., Rubenstrunk J.M., Mooney M.P. Fibroblast growth factor 2 induces increased calvarial osteoblast proliferation and cranial suture fusion. Cleft Palate Craniofac J. 2002 Sep; 39 (5): 487–96.
20. Нечаева Г.И., Вукторовна И.А. Дисплазия соединительной ткани: терминология, диагностика, тактика ведения пациентов. Омск: Бланком. 2007; 188.
21. Вукторовна И.А. Методология курации пациентов с дисплазией соединительной ткани семейным врачом в аспекте профилактики ранней и внезапной смерти: Дис. ...док. мед.наук. 2005;432.
22. Zhang X., Ibrahim O.A., Olsen S.K., Umemori H., Mohammadi M., Ornitz D.M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. The complete mammalian FGF family. J Biol Chem. 2006 Jun 9; 281 (23): 15694–700.
23. Prié D., Friedlander G. Reciprocal control of 1,25-dihydroxyvitamin D and FGF23 formation involving the FGF23/Klotho system. Clin J Am Soc Nephrol. 2010 Sep; 5 (9): 1717–22.
24. Dai Z, Koh W.P. B-vitamins and bone health—a review of the current evidence. Nutrients. 2015 May 7;(5):3322-46. doi: 10.3390/nu7053322.
25. Xi Q., Hoenderop J.G., Bindels R.J. Regulation of magnesium reabsorption in DCT. Pflugers Arch. 2009; 458 (1): 89–98 doi.
26. Jalkanen R., Pronicka E., Tyynismaa H., Hanauer A., Walder R., Alitalo T. Genetic background of HSH in three Polish families and a patient with an X;9 translocation. Eur J Hum Genet. 2006; 14 (1): 55–62.
27. van der Wijst J., Hoenderop J.G., Bindels R.J. Epithelial Mg<sup>2+</sup> channel TRPM6: insight into the molecular regulation. Magnes Res. 2009; 22 (3): 127–132.
28. Walder R.Y., Yang B., Stokes J.B. Mice defective in Trpm6 show embryonic mortality and neural tube defects. Hum Mol Genet. 2009; 18 (22): 4367–75.
29. Campo S., Breda E., Di Girolamo M. Hypomagnesaemia on antibiotic therapy. Postgrad Med J. 1988 Apr; 64 (750): 336–7.
30. Громова О.А., Калачева А.Г., Торшин И.Ю., Гришина Т.П., Семенов В.А. Диагностика дефицита магния. Концентрации магния в биосубстратах в норме и при различной патологии. Кардиология. 2014; 10: 63–71.
31. Nakamura E., Yokota H., Matsui T. The *in vitro* digestibility and absorption of magnesium in some edible seaweeds. J Sci Food Agric. 2012; 92 (11): 2305–9.
32. Bernal G.M., Wahlstrom J.S., Crawley C.D., Cahill K.E., Pytel P., Liang H., Kang S., Weichselbaum R.R., Yamini B. Loss of Nfkb1 leads to early onset aging. Aging (Albany NY). 2014 Nov; 6 (11): 931–43.
33. Libro R., Bramanti P., Mazzon E. The role of the wnt canonical signaling in neurodegenerative diseases. Life Sci. 2016 Jun 28. pii: S0024-3205(16)30380-0.

# Синергидные нейропротекторные эффекты тиамина, пиридоксина и цианокобаламина в рамках протеома человека

Громова О.А.<sup>1,2</sup>, Торшин И.Ю.<sup>1,2</sup>, Гусев Е.И.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия», г. Иваново

<sup>2</sup> – РСЦ Института Микроэлементов ЮНЕСКО при ФГБОУ ВПО РНИМУ им Н.И. Пирогова, г. Москва

**Резюме.** Витамины группы В характеризуются нейропротекторными эффектами. Механизмы синергидного действия различных комбинаций витаминов недостаточно изучены. В настоящем исследовании в геномных и протеомных базах данных были найдены белки, активность или уровни которых взаимосвязаны с обеспеченностью организма витаминами В<sub>1</sub> (тиамин), В<sub>6</sub> (пиридоксин) и В<sub>12</sub> (цианокобаламин). Системно-биологический анализ показал, что тиамин необходим для синтеза АТФ (в т. ч. посредством метаболизма глюкозы, липидов и аминокислот с разветвленной цепью), кроветворения и для роста и поддержания структуры нейронов. Пиридоксин-зависимые белки протеома необходимы для метаболизма аминокислот, синтеза АТФ, синтеза нейротрансмиттеров и мембран нейронов. Витамин В<sub>12</sub> необходим для метаболизма липидов, кроветворения и проявляет нейропротекторный и нейротрофический эффекты. Выявлены многочисленные синергидные взаимодействия витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> на молекулярном уровне, включающие метаболизм аминокислот, углеводов, липидов, формирование структур нейронов, кроветворение, синтез АТФ и др. Установленные механизмы синергизма витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> на молекулярном уровне имеют фундаментальное значение для нейропротекции и профилактики цереброваскулярной патологии.

**Ключевые слова:** тиамин, пиридоксин, цианокобаламин, синергизм, биоинформатика, нейропротекция, Нейробион

## Synergistic neuroprotective effects of thiamine, pyridoxine and cyanocobalamin on the level of human proteome

Gromov O.A.<sup>1,2</sup>, Torshin I.Yu.<sup>1,2</sup>, Gusev E.I.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – «Ivanovo State Medical Academy», Ivanovo

<sup>2</sup> – RIC Institute of trace elements at UNESCO VPO Rnrmu them NI Pirogov, Moscow

**Resume.** Group B vitamins are characterized by neuroprotective effects. Mechanisms of action of synergistic combinations of various vitamins are insufficiently studied. In this study, proteins with activity or levels dependent on vitamins В<sub>1</sub> (thiamine), В<sub>6</sub> (pyridoxine) and В<sub>12</sub> (cyanocobalamin) were found in genomic and proteomic databases. Systems biology analysis showed that the thiamine is necessary for synthesis of ATP (glucose metabolism, lipid and branched chain amino acids), hemopoiesis and maintenance of neuronal structure. Pyridoxine-dependent proteins of the proteome are necessary for the metabolism of amino acids, ATP synthesis, synthesis of neurotransmitters and of neuronal membranes. Vitamin В<sub>12</sub> is needed for the metabolism of lipids, hemopoiesis and shows neuroprotective and neurotrophic effects. We identified numerous synergistic interactions of vitamins В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, at the molecular level, including the metabolism of amino acids, carbohydrates, lipids, forming structures of neurons, blood, ATP synthesis etc. The established mechanisms of vitamins В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> synergy at the molecular level are of fundamental importance for neuroprotection and prevention of cerebrovascular disease.

**Keywords:** thiamine, pyridoxine, cyanocobalamin, synergy, bioinformatics, neuroprotection, Neurobion

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России; 153012, г. Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

## Введение

Витамины группы В реализуют свои нейрофизиологические роли за счёт поддержания активности определённых ферментов и других разновидностей белков, входящих в протеом человека. Активность белков протеома зависит от множества кофакторов и, в частности, от витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub>. Например, синтез АТФ осуществляется посредством ферментов, кофакторами которых являются тиамин фосфат и пиридоксаль фосфат [1]. Кроме того, молекулярно-биологические роли витамина В<sub>6</sub> (производное пиридоксина) включают метаболизм аминокислот, синтез нейротрансмиттеров, биосинтез других вита-

минов. Витамин В<sub>12</sub> необходим для поддержания метаболизма фолатов, обезвреживания гомоцистеина и др.

Дефициты эти витаминов приводят к развитию неврологических заболеваний. Например, глубокий дефицит витамина В<sub>1</sub> у пациентов с алкоголизмом приводит к развитию синдрома С.С. Корсакова, характеризующегося снижением памяти на ближайшие события, депрессией, плаксивостью и демиелинизацией [2].

Для оценки реального масштаба воздействия витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> на организм человека следует рассмотреть их эффекты в постгеномной перспективе (рис. 1), т. е. в рамках воздействия на геном (совокупность всех генов организма), транскриптом (совокуп-

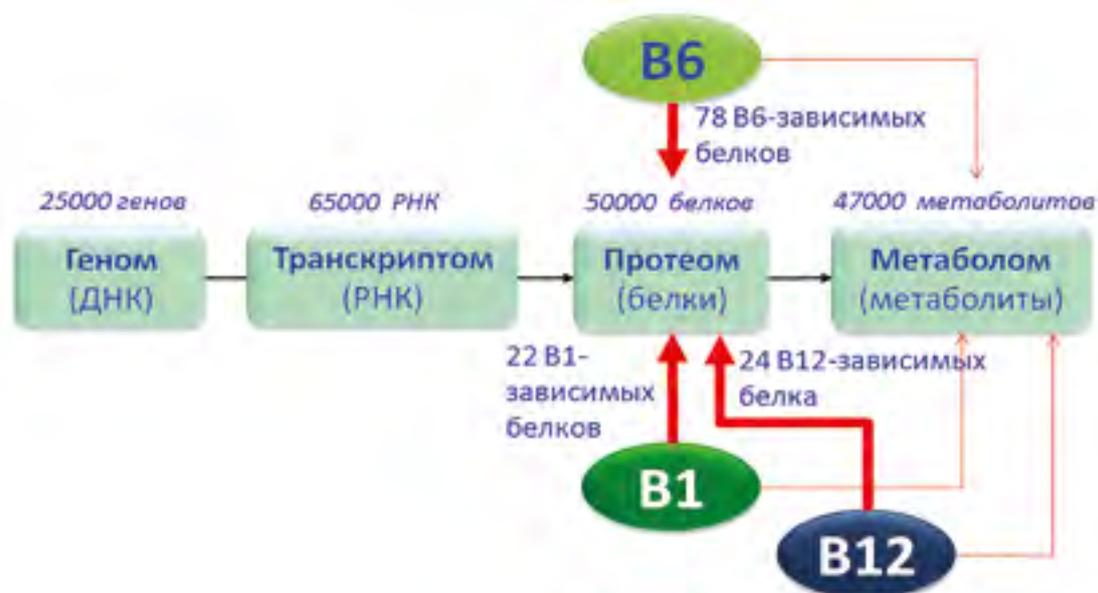


Рис. 1. Биологические эффекты витаминов группы В в постгеномной перспективе

ность всех РНК), протеом (совокупность всех белков) и метаболом (совокупность всех метаболитов) [3].

Важно отметить, что за широкий круг биологических ролей витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> отвечают специфические взаимодействия производных этих витаминов именно с белками *протеома*. Пиридоксин, тиамин, цианокобаламин не взаимодействуют ни с геномной ДНК, ни с РНК транскриптома, а продукты биотрансформаций молекул про-витаминов и активных форм витаминов просто являются отдельными метаболитами из метаболома. В то же время, проведённые нами поиски по базам данных протеома человека (NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT, Human Proteome Map (HPM), BIOCYS-HUMAN и др.) показали, что в протеоме человека существуют 78 витамин-В<sub>6</sub>-зависимых белков, 22 витамин-В<sub>1</sub>-зависимых белков, и 24 витамин-В<sub>12</sub>-зависимых белков (см. рис. 1). Системно-биологический анализ этих массивов белков позволяет провести комплексную системно-биологическую оценку всех возможных биологических эффектов сочетания витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub>, и, соответственно, оценить спектр клинических применений синергидного сочетания этих витаминов.

### Материалы и методы

Списки из 22 витамин-В<sub>1</sub>-зависимых белков, 78 витамин-В<sub>6</sub>-зависимых белков, и 24 витамин-В<sub>12</sub>-зависимых белков (включая белки метаболизма и транспорта перечисленных витаминов), составленные на основе имеющихся аннотаций генома человека в базах данных NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT и HPM, анализировались посредством метода функционального связывания [3]. Анализ функциональных взаимосвязей — одна из информационных технологий современной

биоинформатики. Данный метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов — белков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов), в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации определённой геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго очерченный круг специфических функций. Как врождённые мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> других витаминов и минералов) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической неврологической симптоматики (рис. 2).

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней информации (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточных ролях белков, симптоматику и критерии диагностики заболеваний и т. д.) в различных базах данных (БД), позволяет систематически рассмотреть все возможные биологические роли витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> и их синергидных сочетаний. В целом, при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей (см. рис. 2) каждый белок протеома человека представлен строкой в списке, включающем такие описания белка/гена как:

- аминокислотная последовательность белка;
- список эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности в производных витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub>, В<sub>12</sub> для активности рассматриваемого белка);
- список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка и соответствующего гена;
- список клинических симптомов рассматриваемых моногенных заболеваний;

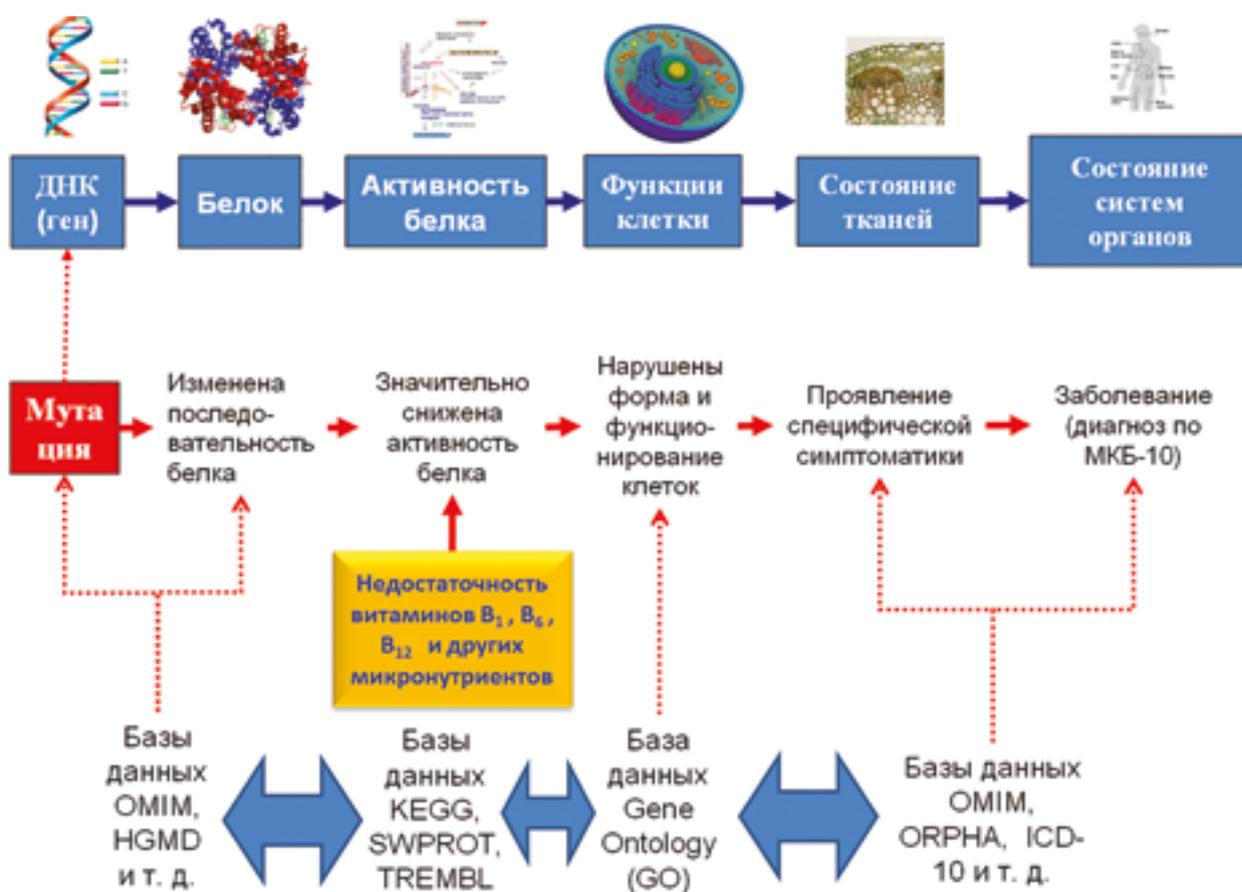


Рис. 2. Основы системно-биологического подхода к анализу витамин-В-зависимых белков

- список клеточных функций белка (по БД Gene Ontology, GO и др.);
- список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

Далее, в полученном списке выделяются гены, соответствующие белкам из списка витамин-В<sub>1</sub>-зависимых белков и др. и проводятся последующие анализы биологических ролей этих белков на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия  $\chi$ -квадрат, критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и теста Стьюдента. Для статистической обработки материала использовалась прикладная программа STATISTICA 6.0 и электронные таблицы Microsoft Excel.

## Результаты

В результате проведённого анализа, среди известных 50 057 белков протеома человека было выделено 20 180 аннотированных белков протеома (т. е. белков, для которых известны хотя бы основные биологические роли). Среди 20 180 белков, 78 являлись витамин-В<sub>6</sub>-зависимыми, 22 – витамин-В<sub>1</sub>-зависимыми, и 24 – витамин-В<sub>12</sub>-зависимыми белками. Рассмотрение всего массива этих белков в рамках настоящей статьи не представляется возможным. Поэтому, рассмотрим различные способы системно-биологической группировки этих белков в соответствии с различными международными рубриками биологических ролей белков и системой классификации заболеваний МКБ-10.

### **Анализ нейробиологических и клинических эффектов витамин-В<sub>1</sub>-зависимых белков**

Анализ витамин-В<sub>1</sub>-зависимых белков, аннотированных в соответствии с международной номенклатурой Gene Ontology (GO) позволил установить нейробиологические роли белков, ассоциированных с эффектами тиамина (табл. 1).

Таблица 1

Биологические роли тиамин-зависимых белков

Биологическая роль	$n_1$	$v_1$	$v_0$	$P(\chi^2)$
Митохондриальный белок	9	0,409	0,137	0,006922
Цикл Кребса	6	0,273	0,005	4,58E-18
Пируватдегидрогеназа	3	0,136	0,000	2,27E-12
Оксоглутарат дегидрогеназа	3	0,136	0,000	2,27E-12
Катаболизм аминокислот с разветвленной цепью	3	0,136	0,007	1,02E-05
Гликолиз	3	0,136	0,000	2,27E-12
Метаболизм глюкозы	3	0,136	0,007	1,02E-05
Митохондриальная $\alpha$ -кетоглутарат дегидрогеназа	3	0,136	0,000	2,27E-12
Транскетолаза	3	0,136	0,000	2,27E-12
Связывание иона магния	3	0,136	0,019	0,008306
Миелиновая оболочка	2	0,091	0,012	0,040298
Пероксисомальный белок	2	0,091	0,019	—
Активация сигнального пути рецептора аденозина	1	0,045	0,000	0,000274
Метаболизм аденозина	1	0,045	0,007	—
Развитие пирамидальных нейронов	1	0,045	0,002	0,036033
Развитие таламуса	1	0,045	0,000	0,000274
Развитие гиппокампа	1	0,045	0,005	—
Развитие стриатума	1	0,045	0,000	0,000274
Развитие коры мозжечка	1	0,045	0,000	0,000274
Транспортер фолатов	1	0,045	0,000	0,000274
Дифференцировка клеток при гемопоэзе	1	0,045	0,005	—
Альфа-окисление жирных кислот	1	0,045	0,000	0,000274

**Примечание:** биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой Gene Ontology (GO).  $n_1$  — число  $V_1$ -зависимых белков с данной биологической ролью;  $v_1$  — частота встречаемости биологической роли в выборке  $V_1$ -зависимых белков;  $v_0$  — общая частота встречаемости биологической роли во всём протеоме; О.Ш. — отношение шансов ( $v_1/v_0$ );  $P(\chi^2)$  — достоверность ассоциации. Биологические роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа  $V_1$ -зависимых белков ( $n_1$ ).

Анализ перечисленных в табл. 1 биологических ролей  $V_1$ -зависимых белков позволил выделить 4 основных направления воздействия тиамина на организм:

- **Неврологические роли** (миелиновая оболочка, активация сигнального пути рецептора аденозина, метаболизм аденозина, развитие пирамидальных нейронов, развитие таламуса, развитие гиппокампа, развитие стриатума, развитие коры мозжечка);

- **Энергетический метаболизм клетки и синтез АТФ** (митохондрия, митохондриальная  $\alpha$ -кетоглутарат дегидрогеназа, цикл Кребса, пируватдегидрогеназа, оксоглутарат дегидрогеназа, связывание иона магния);

- **Метаболизм углеводов** (гликолиз, метаболизм глюкозы, транскетолаза), **жиров** ( $\alpha$ -окисление жирных кислот), аминокислот (катаболизм аминокислот с разветвленной цепью);

- **Кроветворение** (транспортер фолатов, дифференцировка клеток при гемопоэзе).

Далее рассмотрим, как витамин  $V_1$  влияет на более «крупные» фрагменты метаболизма — внутриклеточные сигнальные каскады, биосинтетические каскады и другие элементы реактома человека (как известно, реактом — совокупность всех химических реакций, протекающих в нейронах, других клетках и в межклеточном пространстве с участием элементов протеома и метаболома).

Данный анализ был проведён с использованием аннотаций белков протеома человека, приведённых

в базе данных REACTOME (рис. 3). Результаты анализа подтверждают приведённую выше рубрику биологической ролей тиамина и указывают на дополнительные механизмы действия тиамина (передача сигналов ретиноидов). Заметим, что потеря памяти при синдроме С.С.Корсакова ассоциирована с авитаминозом  $V_1$  и, в частности, с нарушениями метаболизма аминокислот с разветвлённой цепью. Как известно, для восстановления памяти назначаются фармакологические дозы витамина  $V_1$  (50–100 мг/сут).

Описанный выше весьма обширный спектр нейробиологических ролей  $V_1$ -зависимых белков обуславливает не менее широкий спектр заболеваний. Анализ данных симптомов с учётом данных, представленных в базах данных OMIM, ORPHA, ICD-10, позволил выделить диагнозы по МКБ-10, специфически ассоциированные с  $V_1$ -зависимыми белками (рис. 4). Заметим, что практически все перечисленные заболевания, ассоциированные с недостаточностью витамина  $V_1$ , имеют неврологическую симптоматику. Например, любая форма анемии, особенно тиамин-зависимая мегалобластная анемия, ассоциирована с головокружением, апатией, астенией, снижением памяти и пр. вследствие хронической гипоксии мозга.

Дефицит  $V_1$  во время беременности ассоциирован с аномалиями развития (в т. ч. микроцефалией, дистрофией мышц, энцефалопатией). Низкая обеспеченность витамином  $V_1$  ассоциирована с такими заболеваниями,



Рис. 3. Аннотации  $V_1$ -зависимых белков протеома человека в базе данных REACTOME. Приведены числа соответствующих белков

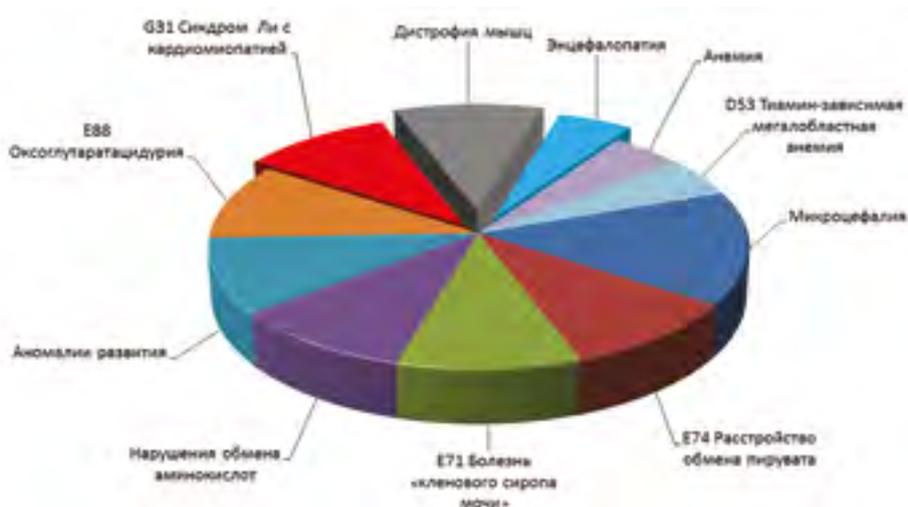


Рис. 4. Заболевания, специфически ассоциированные с  $V_1$ -зависимыми белками протеома человека

как E74, расстройство обмена пирувата, E71 Болезнь «кленового сиропа мочи», E88 Оксоглутаратацидурия, G31 Синдром Ли с кардиомиопатией, также характеризующихся тяжёлой неврологической симптоматикой.

Подчеркнём, что перечисленные симптомы и заболевания ассоциированы с нуклеотидными дефектами генов, кодирующих обсуждаемые  $V_1$ -зависимые белки протеома (см. Методы). Однако, поскольку биологическая активность этих белков в существенной мере зависит от обеспеченности организма витамином  $V_1$ , то дефицит этого витамина будет приводить к симптоматике, схожей с описанными проявлениями генетических дефектов. Заметим, что течение этих врождённых заболеваний значительно утяжеляется на фоне дефицита витамина  $V_1$ , а для компенсации потребности в витамине  $V_1$  у таких пациентов используются более высокие дозы [2].

#### Анализ нейробиологических и клинических эффектов витамин- $V_6$ -зависимых белков

Анализ биологических ролей  $V_6$ -зависимых белков, аннотированных в соответствии с международной номенклатурой Gene Ontology (GO) позволил установить нейробиологические роли белков, ассоциированные с эффектами пиридоксаль-5-фосфата — основной биологически активной формы витамина  $V_6$  (табл. 2).

Анализ перечисленных в табл. 2 биологических ролей  $V_6$ -зависимых белков показал, что витамин  $V_6$ , связывающийся с белками в виде кофактора пиридоксаль-5-фосфата, оказывает следующие воздействия витамина  $V_6$  на организм:

- **Неврологические роли** (биосинтез сфинголипидов, биосинтез ГАМК, миелин);
- **Метаболизм аминокислот** (*L*-цистеина, *L*-фенилаланина, *L*-аланина, *L*-аспартата, *L*-серина,

Таблица 2

Биологические роли  $V_6$ -зависимых белков. Биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой базы данных (БД) Gene Ontology (GO)

БД «GO»	Биологическая роль	$n_1$	$v_1$	$v_0$	О.Ш.
GO:0030170	Связывание пиридоксальфосфата	54	0,692	0,000	8,6-10-36
GO:0005829	Цитозоль	33	0,423	0,182	0,00068
GO:0005759	Митохондриальный матрикс	18	0,231	0,047	0,00011
GO:0008652	Биосинтез аминокислот	8	0,103	0,005	0,00098
GO:0006103	Метаболизм 2-оксоглутарата	6	0,077	0,005	0,010
GO:0006532	Биосинтез аспартата	5	0,064	0,000	0,006
GO:0030148	Биосинтез сфинголипидов	4	0,051	0,000	0,019
GO:0008483	Активность трансаминазы	4	0,051	0,000	0,019
GO:0006563	Метаболизм L-серина	4	0,051	0,000	0,019
GO:0006536	Метаболизм L-глутамата	4	0,051	0,000	0,019
GO:0001666	Ответ на гипоксию	4	0,051	0,000	0,019
GO:0009449	Биосинтез ГАМК	5	0,064	0,005	0,031
GO:0080130	L-фенилаланин: 2-оксоглутарат аминотрансфераза	3	0,038	0,000	0,058
GO:0070189	Метаболизм кинуренина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0046487	Метаболизм глиоксилата	3	0,038	0,000	0,058
GO:0043546	Молибдоптерин	3	0,038	0,000	0,058
GO:0043209	Миелин	3	0,038	0,000	0,058
GO:0042866	Биосинтез пирувата	3	0,038	0,000	0,058
GO:0042853	Катаболизм L-аланина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0042816	Метаболизм витамина $V_6$	3	0,038	0,000	0,058
GO:0035999	Метаболизм тетрагидрофолата	3	0,038	0,000	0,058
GO:0019343	Биосинтез цистеина (метаболизм гомоцистеина)	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006783	Биосинтез гема	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006569	Катаболизм L-триптофана	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006565	Катаболизм L-серина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006554	Катаболизм L-лизина	3	0,038	0,000	0,058
GO:0006094	Глюконеогенез	3	0,038	0,000	0,058
GO:0005980	Катаболизм гликогена	3	0,038	0,000	0,058
GO:0001887	Метаболизм селена	3	0,038	0,000	0,058
GO:0050661	Связывание кофактора НАДФ	3	0,038	0,000	0,058
GO:0000287	Связывание иона магния	3	0,038	0,000	0,058

Примечание:  $n_1$  — число  $V_6$ -зависимых белков с данной биологической ролью;  $v_1$  — частота встречаемости биологической роли в выборке  $V_6$ -зависимых белков;  $v_0$  — общая частота встречаемости биологической роли во всём протеоме; О.Ш. — отношение шансов ( $v_1/v_0$ );  $P(\chi^2)$  — достоверность ассоциации. Биологические роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа  $V_6$ -зависимых белков ( $n_1$ ).

L-глутамата, L-триптофана, L-лизина, активность трансаминазы);

• **Энергетический метаболизм клетки и синтез АТФ** (ответ на гипоксию, митохондриальный матрикс, метаболизм 2-оксоглутарата, метаболизм глиоксилата, биосинтез пирувата, глюконеогенез, катаболизм гликогена);

• **Синергидные пиридоксину микронутриенты** (магний, тетрагидрофолат, гем, селен, НАДФ, молибдоптерин).

Эти биологические роли витамин- $V_6$ -зависимых белков обуславливают определённый спектр врождённых заболеваний, специфически ассоциированных с нарушениями активации  $V_6$ -зависимых белков протео-

ма человека. Анализ таких заболеваний на основе данных, представленных в базах данных OMIM, ORPHA, ICD-10, позволил выделить диагнозы по МКБ-10, специфически ассоциированные с  $V_6$ -зависимыми белками протеома человека. Так, дефицит активности пиридоксин-зависимых белков был достоверно ассоциирован с нарушениями метаболизма аминокислот (E72 Другие нарушения обмена аминокислот; E70 Нарушения обмена ароматических аминокислот; G40 Эпилепсия), нарушениями кроветворения (D58 Другие наследственные гемолитические анемии, D72 Другие нарушения белых кровяных клеток) и др. (табл. 3, рис. 5).

Таблица 3

Генетически-обусловленные заболевания в номенклатуре МКБ-10 и соответствующие симптомы, специфически ассоциированные с  $V_6$ -зависимыми белками

Заболевание/симптоматика	$n_1$	$v_1$	$v_0$	О.Ш.	$P(\chi^2)$
Нарушение обмена веществ	20	0,055	0,0029	19,16	$6,8 \cdot 10^{-70}$
Аминокислота	17	0,046	0,0027	17,02	$2,3 \cdot 10^{-52}$
E72 Другие нарушения обмена аминокислот	12	0,033	0,0012	27,47	$2,3 \cdot 10^{-60}$
Малокровие	8	0,022	0,0013	16,84	$2,7 \cdot 10^{-24}$
G40 Эпилепсия	6	0,016	0,0006	27,91	$1,3 \cdot 10^{-30}$
E70 Нарушения обмена ароматических аминокислот	6	0,016	0,0008	20,60	$1,6 \cdot 10^{-22}$
Нейротрансмиссия	4	0,011	0,0001	88,74	$3,0 \cdot 10^{-57}$
D58 Другие наследственные гемолитические анемии	4	0,011	0,0006	19,23	$5,4 \cdot 10^{-14}$
Гипероксалурия	3	0,008	0,0000	173,05	$3,2 \cdot 10^{-69}$
D72 Другие нарушения белых кровяных клеток	2	0,005	0,0000	288,41	$8,6 \cdot 10^{-62}$
D89 Другие нарушения иммунитета	2	0,005	0,0002	26,22	$1,1 \cdot 10^{-09}$

**Примечание:**  $n_1$  — число  $V_6$ -зависимых белков, соответствующих заболеванию/симптому;  $v_1$  — частота встречаемости заболевания/симптома в выборке  $V_6$ -зависимых белков;  $v_0$  — общая частота встречаемости в протеоме; О.Ш. — отношение шансов ( $v_1/v_0$ );  $P(\chi^2)$  — достоверность ассоциации. Заболевания/симптомы в таблице упорядочены в соответствии со значениями  $n_1$ .

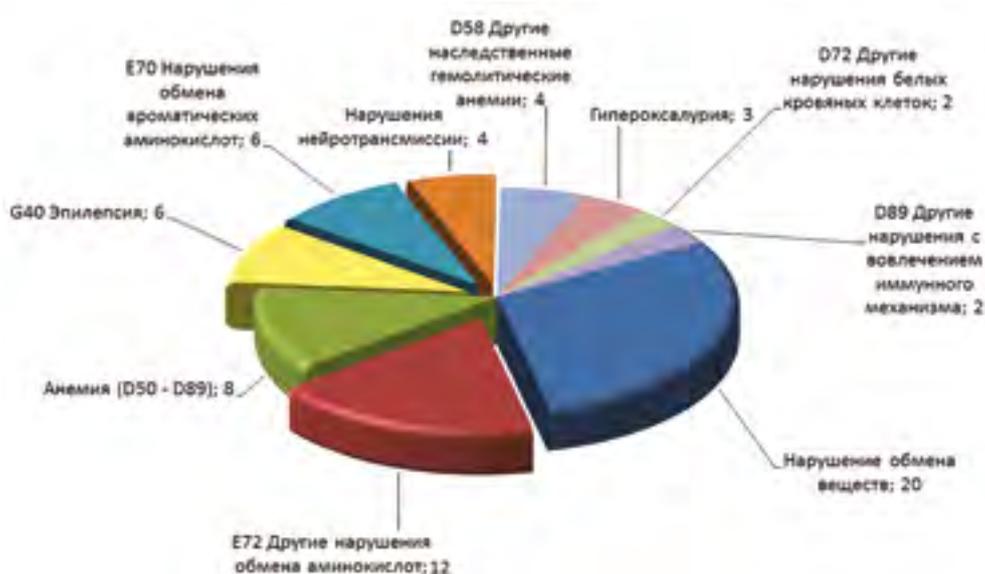


Рис. 5. Заболевания в номенклатуре МКБ-10, специфически ассоциированные с  $V_6$ -зависимыми белками протеома человека. Приведены числа соответствующих белков

**Анализ нейробиологических и клинических эффектов витамин- $V_{12}$ -зависимых белков**

Анализ биологических ролей 24 витамин- $V_{12}$ -зависимых белков, аннотированных в соответствии с международной номенклатурой Gene Ontology (GO) позволил установить биологические роли белков, ассоциированные с эффектами витамина  $V_{12}$  (табл. 4). При этом важно отметить, что цианкобаламин является кофактором всего двух ферментов — метилмалонил-КоА мутазы митохондрий (участвует в деградации аминокислот, жирных кислот, холестерина в цикле Кребса) [4] и метионин синтетазы (обезвреживает гомоцистеин). Остальные белки либо вовлечены в

транспорт, биотрансформации и выведение производных витамина  $V_{12}$ , либо витамин  $V_{12}$  непосредственно влияет на экспрессию этих белков.

Анализ перечисленных в таблице биологических ролей  $V_{12}$ -зависимых белков показал, что витамин  $V_{12}$  оказывает следующие воздействия на организм:

- **Метаболизм жиров** (метаболизм липопротеинов, метаболизм холестерина, катаболизм жирных кислот с короткой цепью, пищеварение). Нарушение активности соответствующих белков клинически выражается формированием про-атеросклеротического липидного профиля.

Биологические роли  $V_{12}$ -зависимых белков. Биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой Gene Ontology (GO)

Биологическая роль	$n_1$	$v_1$	$v_0$	$P(\chi^2)$
Метаболизм кобаламина	20	0,833	0,000	1,3E-50
Межклеточное пространство	8	0,333	0,065	0,000181
Пищеварение	4	0,167	0,000	1,31E-09
Связывание ФАД	2	0,083	0,004	0,003859
Метаболизм липопротеинов	2	0,083	0,004	0,003859
Метилирование ДНК	2	0,083	0,000	6,56E-05
Катаболизм жирных кислот с короткой цепью	2	0,083	0,000	6,56E-05
Клеточный ответ на оксид азота NO	1	0,042	0,000	0,011972
Переработка гомоцистеина	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм фолатов	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм витамина D	1	0,042	0,000	0,011972
Регенерация аксонов	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм холестерина	1	0,042	0,008	—
Процесс биосинтеза гема	1	0,042	0,000	0,011972
Метаболизм глутатиона	1	0,042	0,000	0,011972
Метилмалонил-КоА мутаза	1	0,042	0,000	0,011972
Дифференцировка гемопоэтических клеток-предшественников	1	0,042	0,008	—

**Примечание:**  $n_1$  — число  $V_{12}$ -зависимых белков с данной биологической ролью;  $v_1$  — частота встречаемости биологической роли в выборке  $V_{12}$ -зависимых белков;  $v_0$  — общая частота встречаемости биологической роли во всём протеоме; О.Ш. — отношение шансов ( $v_1/v_0$ );  $P(\chi^2)$  — достоверность ассоциации. Биологические роли в таблице упорядочены в соответствии со значением числа  $V_{12}$ -зависимых белков ( $n_1$ ).

• **Кроветворение** (дифференцировка гемопоэтических клеток-предшественников, метилирование ДНК, переработка гомоцистеина, метаболизм кобаламина, метаболизм фолатов). Нарушение активности соответствующих белков соответствует формированию  $V_{12}$ -зависимой анемии.

• **Нейропротекторный и нейротрофический эффекты** (ответ на повреждение аксонов, регенерация аксонов, клеточный ответ на оксид азота NO, метаболизм глутатиона). При дефиците витамина  $V_{12}$  активность соответствующих белков нарушается, что снижает выживаемость нейронов и способствует ишемизации нервной ткани.

• **Метаболизм микронутриентов** (метаболизм кобаламина, метаболизм фолатов, метаболизм витамина D, биосинтез гема). Нарушение активности соответствующих белков будет приводить к снижению биологической активности не только витамин- $V_{12}$ -зависимых белков, но и нарушениям экспрессии многочисленных фолат-зависимых витамин-D-зависимых генов.

Анализ реактомных ролей  $V_{12}$ -зависимых белков подтвердил сделанные выше выводы и, также, указал на возможный антибактериальный эффект витамина  $V_{12}$  (синтез антимикробного пептида альфа-дефенсина, рис. 6).

Дефицит активности витамин- $V_{12}$ -зависимых белков, особенно во внутриутробном периоде, приводит к весьма драматическим последствиям. С нарушениями

активации  $V_{12}$ -зависимых белков протеома человека ассоциирован целый спектр врождённых заболеваний. Так, дефицит активности  $V_{12}$ -зависимых белков связан, в частности, с аномалиями развития (F78 Другие нарушения развития интеллекта, Q21 Врождённые аномалии перегородок сердца, G60 Наследственная и идиопатическая невропатия) и такими патологиями, как E72 Другие нарушения аминокислотного обмена, E71 Болезнь «кленового сиропа мочи», метаболическими нарушениями (ацидемия, ацидурия, гомоцистинурия, избыток метилмалоновой кислоты), I42 Кардиомиопатия, K86 Другие болезни поджелудочной железы, E80 Нарушения порфиринового и билирубинового метаболизма, D51 Витамин  $V_{12}$ -дефицитная анемия (рис. 7).

**Анализ молекулярных механизмов синергидного действия витаминов  $V_1$ ,  $V_6$ ,  $V_{12}$**

В неврологии традиционно используются витамины группы B, особенно в комбинации «витамины  $V_1$ ,  $V_6$  и  $V_{12}$ ». Такая комбинация возникла не случайно, а основана на долговременной клинической практике лечения полинейропатии. Проведённый в настоящей работе анализ синергидных биологических ролей  $V_1$ ,  $V_6$ ,  $V_{12}$ -зависимых белков в номенклатуре Gene Ontology (GO) показал, что «тройственный синергизм»  $V_1 + V_6 + V_{12}$  необходим, прежде всего, для поддержания функции различных компартментов клетки (митохондрий, клеточных мембран, пероксисом, ядра



Рис. 6. Аннотации B<sub>12</sub>-зависимых белков протеома человека в базе данных REACTOME. Приведены числа соответствующих белков



Рис. 7. Заболевания, ассоциированные с дефицитом активности B<sub>12</sub>-зависимых белков. Приведены числа соответствующих белков

клетки) и синтеза АТФ. Парный синергизм B<sub>1</sub> + B<sub>6</sub> необходим для катаболизма аминокислот, глюкозы, жирных кислот, синтеза белка на рибосоме и синтеза миелиновой оболочки нейронов (табл. 5).

Реактомный анализ показал, что синергидное сочетание витаминов B<sub>1</sub> и B<sub>6</sub> необходимо для метаболизма аминокислот и углеводов, а синергидное сочетание B<sub>6</sub> + B<sub>12</sub> — для биосинтеза гема и метаболизма липидов (табл. 6).

Анализ заболеваний, ассоциированных с дефицитами активности B<sub>1</sub>, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub>-зависимых белков

показал, что «тройственный синергизм» необходим для профилактики анемии (в т. ч. мегалобластной), врождённых аномалий развития, нарушений метаболизма аминокислот, нарушений обмена фолатов и гомоцистеина (табл. 7). Синергидное сочетание «B<sub>1</sub> + B<sub>12</sub>» профилактирует расстройства метаболизма аминокислот с разветвлённой цепью и липидов (диагнозы группы E71); синергидное сочетание «B<sub>1</sub> + B<sub>6</sub>» важно для профилактики дистрофии мышц, энцефалопатии, E74 Других нарушений углеводного обмена. Синергидное сочетание «B<sub>6</sub> + B<sub>12</sub>» важно для

Таблица 5

Синергидные биологические роли  $V_1$ ,  $V_6$ ,  $V_{12}$ -зависимых белков

GO номер	GO-функция	$n_1$	$n_6$	$n_{12}$
GO:0005759	Митохондриальный матрикс	9	18	3
GO:0005739	Митохондрия	9	32	5
GO:0016021	Компонент клеточной мембраны	6	8	5
GO:0005829	Цитозоль	3	33	6
GO:0000287	Связывание иона магния	3	4	1
GO:0005777	Пероксисома	2	3	1
GO:0005654	Ядро клетки	2	10	1
GO:0005524	Связывание АТФ	1	5	2
GO:0002244	Гемопоз	1	0	1
GO:0009083	Катаболизм аминокислот с разветвленной цепью	3	2	0
GO:0006006	Метаболизм глюкозы	3	1	0
GO:0043209	Миелиновая оболочка	2	3	0
GO:0006554	Катаболизм лизина	1	3	0
GO:0006103	Метаболизм 2-оксоглутарата	1	6	0
GO:0006098	Пентозофосфатный шунт	1	1	0
GO:0003735	Структурный компонент рибосомы	1	4	0
GO:0001561	Альфа-окисление жирных кислот	1	1	0

**Примечание:** биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой Gene Ontology (GO).  $n_1$ ,  $n_6$ ,  $n_{12}$  — числа  $V_1$ -,  $V_6$ ,  $V_{12}$ -зависимых белков, соответственно.

Таблица 6

Синергидные реактомные роли  $V_1$ ,  $V_6$ ,  $V_{12}$ -зависимых белков

REACTOME	Реактомная функция	$n_1$	$n_6$	$n_{12}$
HSA-71336	Пентозофосфатный шунт	1	1	0
HSA-189451	Биосинтез гема	0	2	1
HSA-194223	Транспорт ЛПВП липидов	0	1	2
HSA-71064	Катаболизм лизина	1	3	0
HSA-389661	Метаболизм глиоксилата и деградация глицина	7	2	0
HSA-70895	Катаболизм аминокислот с разветвлённой цепью	3	2	0

**Примечание:** биологические роли приведены в соответствии с номенклатурой базы данных REACTOME (GO).  $n_1$ ,  $n_6$ ,  $n_{12}$  — числа  $V_1$ -,  $V_6$ ,  $V_{12}$ -зависимых белков, соответственно.

профилактики наследственной и идиопатической невропатии (G60), нарушений метаболизма порфирина и билирубина (E80) и нарушений эритропоэза, приводящих к анемии.

Наиболее известным и крайне важным направлением тройственного синергидного действия витаминов  $V_1$ ,  $V_6$ ,  $V_{12}$  является регуляция процессов воспаления, осуществляемая, в частности, посредством **обезвреживания гомоцистеина**. Обычно, повышенные уровни гомоцистеина связывают только с недостатком активных фолатов в пище. Однако повышенный гомоцистеин является и результатом дефицита других витаминов группы В (прежде всего,  $V_6$  и  $V_{12}$ ) [5]. В крупномасштабном исследовании 10 601 здоровых добровольцев (средний возраст 56 лет) были проанализированы эффекты всех известных витаминов  $V_6$ , фолатов, кобаламина, рибофлавина на уровни общего гомоцистеина. Было установлено, что более высоким

концентрациям пиридоксаль-5-фосфата крови соответствовали более низкие уровни гомоцистеина [6].

Весьма интересным результатом проведённого анализа является установление молекулярных механизмов тройственного синергидного действия витаминов  $V_1$ ,  $V_6$ ,  $V_{12}$  на **поддержание миелиновой оболочки нейронов** (код GO:0043209 по номенклатуре GO). Так, миелиновая и митохондриальные фракции нервов содержат значительные количества тиамина [7]. Активность тиамин-зависимых ферментов важна для поддержания нейронального синтеза АТФ и синтеза миелиновых оболочек [8].

В частности, **тиамин** необходим для поддержания активности таких целевых  $V_1$ -зависимых ферментов как *пируват дегидрогеназы митохондрий* (субъединица E1, ген PDHA1) и транскетолазы (ген ТКТ). У пациентов с митохондриальной энцефаломиелопатией отмечено снижение активности *пируват дегидроге-*

Генетически-обусловленные заболевания в номенклатуре МКБ-10 и соответствующие синдромы, ассоциированные с сочетанными дефицитами  $V_1$ ,  $V_6$ ,  $V_{12}$ -зависимых белков

Синдром/заболевание	$n_1$	$n_6$	$n_{12}$
Анемия	3	8	2
Аномалии развития	2	9	2
Нарушения метаболизма аминокислот	2	9	14
Нарушения обмена фолатов	1	3	1
E71 Болезнь «кленового сиропа мочи»	2	0	2
E71 Расстройства метаболизма аминокислот с разветвленной цепью и липидов	2	0	6
Дистрофия мышц	2	2	0
E74 Другие нарушения углеводного обмена	4	2	0
Энцефалопатия	4	2	0
E72 Другие нарушения аминокислотного обмена	0	12	10
E80 Болезни нарушения порфирина и билирубина	0	2	2
Эритропоэз	0	2	2
G60 Наследственная и идиопатическая невропатия	0	2	2

Примечание:  $n_1$ ,  $n_6$ ,  $n_{12}$  — числа  $V_1$ -,  $V_6$ ,  $V_{12}$ -зависимых белков, соответственно.

назы, причём стимуляция активности этого фермента приводила к уменьшению повреждения миелиновых оболочек (по данным МРТ) и улучшению неврологического состояния пациентов [9]. Сниженная активность транскетолазы нарушает метаболизм аксонов и миелин-синтезирующих клеток ЦНС [10].

**Витамин  $V_6$**  и синтезируемый на его основе кофактор **пиридоксаль-5-фосфат (ПЛФ)** взаимосвязаны с биологическими активностями таких белков, как альбумин (ген PRO1341), и ферментами аспартат аминотрансфераза (ген GOT2) и глутамин синтетаза (ген GLUL). *Альбумин сыворотки* крови является белком-транспортёром кофактора ПЛФ и является существенным компонентом белковой фракции миелина [11]. Витамин  $V_6$  тормозит гликирование альбумина и, кроме того, необходим для регуляции экспрессии гена альбумина [12].

ПЛФ-зависимый фермент *митохондриальная аспартат аминотрансфераза* катализирует трансаминирование кинуренина (метаболит L-триптофана) с образованием кинуреновой кислоты. Фермент также усиливает всасывание длинноцепочечных жирных кислот, что принципиально необходимо для синтеза миелиновой оболочки [13].

Низкая обеспеченность организма **витаминами  $V_6$  и  $V_{12}$**  приводит к нарушениям метилирования ДНК, что снижает экспрессию гена глутамин синтетазы [14]. Сниженные уровни и активность фермента приводят к падению уровней нейротрофического фактора мозга и увеличивает апоптоз клеток, миелинизирующих аксоны в ЦНС [15]. При моделировании экспериментального аллергического энцефаломиелита обнаружен повышенный оксидантный стресс в сочетании со сниженной активностью фермента глутамин синтетазы [16].

## Заключение

В неврологической практике комбинация витаминов  $V_1$ ,  $V_6$  и  $V_{12}$  используется для лечения демиелинизирующих заболеваний уже более 40 лет. В течение последних 20 лет данное сочетание витаминов используется для обезвреживания гомоцистеина. Однако как показывают результаты настоящего исследования, синергизм витаминов  $V_1$ ,  $V_6$  и  $V_{12}$  не ограничивается только лечением демиелинизирующих заболеваний и гипергомоцистеинемии.

Так, «тройственный синергизм» необходим для профилактики анемии (в т. ч. мегалобластной), врождённых аномалий развития, нарушений метаболизма аминокислот и фолатов. Парное синергидное сочетание « $V_1 + V_{12}$ » профилактирует расстройства метаболизма аминокислот с разветвлённой цепью и липидов (диагнозы группы E71). Синергидное сочетание « $V_1 + V_6$ » важно для профилактики дистрофии мышц, энцефалопатии, нарушений углеводного обмена. Синергидное сочетание « $V_6 + V_{12}$ » важно для профилактики наследственной и идиопатической невропатии (G60), нарушений метаболизма порфирина и билирубина (E80) и нарушений эритропоэза, приводящих к анемии.

Таким образом, результаты протеомного анализа позволяют утверждать, что препараты, в которые входят все три витамина, будут обладать существенно большим клиническим потенциалом, чем парные сочетания витаминов и, тем более, моноформы витаминов. Следует отметить, что, вопреки широко распространяемому заблуждению о том, что витамин  $V_{12}$  якобы «вызывает рак», сочетание фолатов с витамином  $V_{12}$  улучшают выживание пациентов с опухолями, проходящих курс химиотерапии антифолатным препаратом

пеметрекседом [17]. Такие производные витамина В<sub>12</sub>, как нитрозилкобаламин [18] и метилкобаламин [19], вообще проявляют выраженные противоопухолевые эффекты, инициируют апоптоз раковых клеток (тем самым тормозя рост опухолей) и повышают выживаемость.

Синергидное сочетание витаминов В<sub>1</sub>, В<sub>6</sub> и В<sub>12</sub> представлено в препарате «Нейробион» (тиамина дисульфид — 100 мг, пиридоксина гидрохлорид — 200 мг, цианокобаламина — 200 мкг) показало свою

эффективность при лечении люмбаго с ишиасом (М54.4), межреберной невралгии (G58.0), поражения лицевого нерва (G51), невралгии тройничного нерва (G50.0) и др. В соответствии с результатами настоящего исследования спектр клинических применений Нейробиона значительно шире и включает, по меньшей мере, терапию мегалобластной анемии, идиопатической невралгии и энцефалопатий, связанных с нарушениями метаболизма аминокислот (что типично, например, для алкогольной энцефалопатии).

### Литература

1. *Torshin I.Y., Gromova O.A.* Magnesium and pyridoxine: fundamental studies and clinical practice. Nova Science Publ.; 2011; 196.
2. *Рябов В.Г., Громова О.А.* Витамины, макро- и микроэлементы. ГэотарМед, М.: 2008; 674.
3. *Torshin I.Yu.* Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA, 2009, In “Bioinformatics in the Post-Genomic Era” series, ISBN 1-60692-217-0.
4. *Forny P., Froese D.S., Suormala T., Yue W.W., Baumgartner M.R.* Functional characterization and categorization of missense mutations that cause methylmalonyl-CoA mutase (MUT) deficiency. *Hum Mutat.* 2014 Dec; 35 (12): 1449–58.
5. *Ambrosch A., Dierkes J., Lobmann R., Kuhne W., Konig W., Luley C., Lehnert H.* Relation between homocysteinaemia and diabetic neuropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2001; 18 (3): 185–192.
6. *Midtun O., Hustad S., Schneede J., Vollset S.E., Ueland P.M.* Plasma vitamin B-6 forms and their relation to transsulfuration metabolites in a large, population-based study. *Am J Clin Nutr.* 2007; 86 (1): 131–138.
7. *Bettendorff L., Wins P., Lesourd M.* Subcellular localization and compartmentation of thiamine derivatives in rat brain. *Biochim Biophys Acta.* 1994; 1222 (1): 1–6.
8. *Fournier H., Butterworth R.F.* Effects of maternal thiamine deficiency on the development of thiamine-dependent enzymes in regions of the rat brain. *Neurochem Int.* 1989; 15 (4): 439–444.
9. *Kimura S., Ohtuki N., Nezu A., Tanaka M., Takeshita S.* Clinical and radiologic improvements in mitochondrial encephalomyelopathy following sodium dichloroacetate therapy. *Brain Dev.* 1997; 19 (8): 535–540.
10. *Sterzel R.B., Semar M., Lonergan E.T., Treser G., Lange K.* Relationship of nervous tissue transketolase to the neuropathy in chronic uremia. *J Clin Invest.* 1971; 50 (11): 2295–2304.
11. *Roomi M.W., Ishaque A., Khan N.R., Eylar E.H.* Glycoproteins and albumin in peripheral nerve myelin. *J Neurochem.* 1978; 31 (1): 375–379.
12. *Oka T., Komori N., Kuwahata M., Okada M., Natori Y.* Vitamin B<sub>6</sub> modulates expression of albumin gene by inactivating tissue-specific DNA-binding protein in rat liver. *Biochem J.* 1995; 309 (Pt 1): 243–248.
13. *Isola L.M., Zhou S.L., Kiang C.L., Stump D.D., Bradbury M.W., Berk P.D.* 3T3 fibroblasts transfected with a cDNA for mitochondrial aspartate aminotransferase express plasma membrane fatty acid-binding protein and saturable fatty acid uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92 (21): 9866–9870.
14. *Almeida M.R., Mabasa L., Crane C., Park C.S., Venancio V.P., Bianchi M.L., Antunes L.M.* Maternal vitamin B<sub>6</sub> deficient or supplemented diets on expression of genes related to GABAergic, serotonergic, or glutamatergic pathways in hippocampus of rat dams and their offspring. *Mol Nutr Food Res.* 2016; 60 (7): 1615–24 doi.
15. *Rai N.K., Ashok A., Rai A., Tripathi S., Nagar G.K., Mitra K., Bandyopadhyay S.* Exposure to As, Cd and Pb-mixture impairs myelin and axon development in rat brain, optic nerve and retina. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 273 (2): 242–58 doi.
16. *Castegna A., Palmieri L., Spera I., Porcelli V., Palmieri F., Fabis-Pedrini M.J., Kean R.B., Barkhouse D.A., Curtis M.T., Hooper D.C.* Oxidative stress and reduced glutamine synthetase activity in the absence of inflammation in the cortex of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Neuroscience.* 2011; 185: 97–105 doi.
17. *Yang T.Y., Chang G.C., Hsu S.L., Huang Y.R., Chiu L.Y., Sheu G.T.* Effect of folic acid and vitamin B12 on pemetrexed antifolate chemotherapy in nutrient lung cancer cells. *Biomed Res Int.* 2013;2013:389046. doi: 10.1155/2013/389046.
18. *Bauer J.A., Morrison B.H., Grane R.W., Jacobs B.S., Dabney S., Gamero A.M., Carnevale K.A., Smith D.J., Drazba J., Seetharam B., Lindner D.J.* Effects of interferon beta on transcobalamin II-receptor expression and antitumor activity of nitrosylcobalamin. *J Natl Cancer Inst.* 2002 Jul 3; 94 (13): 1010–9.
19. *Shimizu N., Hamazoe R., Kanayama H., Maeta M., Koga S.* Experimental study of antitumor effect of methyl-B12. *Oncology.* 1987; 44 (3): 169–73.

# Клиническая фармакокинетика оригинального дипептидного анксиолитика ГБ-115

Жердев В.П.<sup>1</sup>, Колыванов Г.Б.<sup>1</sup>, Литвин А.А.<sup>1</sup>, Смирнов В.В.<sup>2</sup>, Колик Л.Г.<sup>1</sup>,  
Раскин С.Ю.<sup>1</sup>, Ивашкина Н.Ю.<sup>3</sup>, Гудашева Т.А.<sup>1</sup>, Середенин С.Б.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

<sup>2</sup> – ФГБОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России, г. Москва

<sup>3</sup> – АО «Малуна-Фарм», г. Москва

**Резюме.** На здоровых добровольцах проведено фармакокинетическое исследование нового оригинального дипептидного анксиолитика ГБ-115, разработанного на основе эндогенного тетрапептида холецистокинина. ГБ-115 назначали в виде таблеток при однократном применении возрастающих доз 1, 3, 7, 11 и 15 мг. Установлено, что в зависимости от дозы ГБ-115 определялся в плазме крови всех добровольцев в течение 2–6 ч после приёма лекарственного средства. ГБ-115 быстро всасывался в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта добровольцев, величины  $C_{\max}/AUC_{0-T}$  для доз 3–15 мг в среднем составляли 0,482–0,552 ч<sup>-1</sup>. ГБ-115 хорошо распределялся в тканях и жидких средах организма и достаточно быстро выводился из плазмы крови. Среднее значение периода полувыведения препарата изменялось в диапазоне 0,6–1,0 ч. Величины  $C_{\max}$  в среднем изменялись от 7,29±2,83 нг/мл (доза 1 мг) до 44,02±13,23 нг/мл (доза 15 мг). Величина кажущегося объёма распределения ГБ-115 после приёма в дозах 1–15 мг составляла в среднем 2,47 л/кг. На основании полученных результатов, можно говорить о том, что при возрастании дозы ГБ-115 с 1 до 15 мг происходит прямо пропорциональное увеличение дозозависимых фармакокинетических параметров, что указывает на линейный характер фармакокинетики ГБ-115 в изученном диапазоне доз.

**Ключевые слова:** таблетки ГБ-115, высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия, клиническая фармакокинетика

## Clinical pharmacokinetics of a new original dipeptide anxiolytic GB-115

Zherdev V.P.<sup>1</sup>, Kolyvanov G.B.<sup>1</sup>, Litvin A.A.<sup>1</sup>, Smirnov V.V.<sup>2</sup>, Kolik L.G.<sup>1</sup>, Raskin S.Yu.<sup>1</sup>, Ivashkina N.Yu.<sup>3</sup>, Gudasheva T.A.<sup>1</sup>, Seredenin S.B.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

<sup>2</sup> – I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

<sup>3</sup> – «Maluna-Pharm», Moscow

**Resume.** Pharmacokinetic study of a new original anxiolytic drug GB-115, developed on the basis of endogenous tetrapeptide cholecystokinin, in healthy volunteers was performed. Volunteers were received drug as single 1, 3, 7, 11 or 15 mg tablets. The parent drug in the human blood plasma was detected within 2–6 hours after ingestion.  $C_{\max}/AUC_{0-T}$  for doses 3–15 mg were averaged 0,482–0,552 h<sup>-1</sup>.  $C_{\max}$  were averaged from 7,29±2,83 ng/ml (for dose 1 mg) to 44,02±13,23 ng/ml (for dose 15 mg). Half-life of the drug is changed in the range of 0,6–1,0 h.  $V_d/F$  amounted to an average of 2,47 l/kg. Summarizing the obtained results it can be concluded that consistent, linear increase in the dose of GB-115 from 1 to 15 mg there is an increase in dose-dependent pharmacokinetic parameters. In the studied range of doses pharmacokinetics of GB-115 was linear.

**Keywords:** tablets of GB-115, High-Performance Liquid Chromatography/Mass-Spectroscopy, clinical pharmacokinetics

Автор, ответственный за переписку:

Раскин Сергей Юрьевич – научный сотрудник лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; +7 (495) 601-21-57; e-mail: sergeyforever@gmail.com

## Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» создан новый ретропептидный аналог эндогенного тетрапептида холецистокинина — амид N-фенил-гексаноил-глицил-L-триптофана (шифр ГБ-115) с выраженной анксиолитической активностью, доказанной на моделях тревожности в опытах *in vivo* при парентеральном и пероральном способах введения [3, 6]. Соединение ГБ-115 принадлежит к труднорастворимым веществам, что определяет отсутствие корреляции дозы и фармакологической активности, обусловленное низкой биодоступностью. Для повышения растворимости ГБ-115 с использованием сверхкритической флюидной технологии была

проведена микронизация субстанции ГБ-115, что позволило уменьшить размер частиц до 10 мкм [10]. При сопоставлении фармакокинетики и фармакологической активности ГБ-115 в виде кристаллической и микронизированной субстанций у беспородных крыс показано, что микронизация способствовала значительному повышению биодоступности [4, 7]. Далее, при анализе соотношения фармакокинетика–фармакодинамика ряда фармацевтических композиций, приготовленных на основе микронизированной субстанции, была отобрана наиболее оптимальная композиция, обладающая лучшими фармакокинетическими параметрами и выраженной анксиолитической активностью, что позволило рекомендовать её для создания твёрдой лекарственной формы [5]. Иссле-

дование фармакокинетики ГБ-115 в плазме крови кроликов после однократного введения таблеток, приготовленных на основе микронизированной субстанции, показало, что относительная биодоступность таблеток ГБ-115 в среднем составила  $128,18 \pm 36,07\%$  по сравнению с субстанцией [8].

*Цель настоящего исследования* – изучить фармакокинетику разработанной таблетированной лекарственной формы ГБ-115 после однократного приёма в дозах 1, 3, 7, 11 и 15 мг на здоровых добровольцах.

### Материал и методы

Фармакокинетика таблетированной формы ГБ-115 изучена в рамках проводимого открытого клинического исследования I фазы препарата по стандартизованному протоколу на 15 добровольцах после однократного приёма внутрь в дозах 1, 3, 7, 11, 15 мг.

Для этого добровольцев разделили на пять групп: 1-я группа – 3 человека, доза ГБ-115 – 1 мг (№/№ 01, 04, 06); 2-я группа – 3 человека, доза ГБ-115 – 3 мг (№/№ 07, 11, 12), 3-я группа – 3 человека, доза ГБ-115 – 7 мг (№/№ 08, 09, 13), 4-я группа – 3 человека, доза ГБ-115 – 11 мг (№/№ 15, 16, 18) и 5-я группа – 3 человека, доза ГБ-115 – 15 мг (№/№ 19, 20, 22). Каждому добровольцу на 8 ч в локтевую вену устанавливали кубитальный катетер. После установки катетера до приёма препарата отбирали контрольную пробу крови («К-проба»). Образцы крови (10,0 мл) отбирали и переносили в гепаринизированные конические поли-

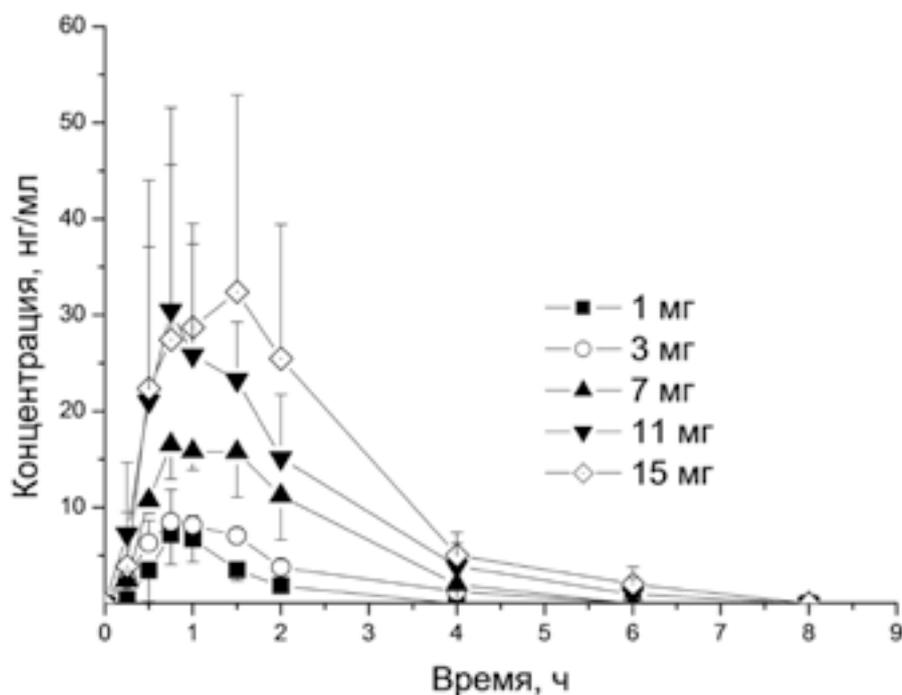
этиленовые пробирки. Отбор образцов крови осуществлялся в дискретные интервалы времени через: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0 и 8,0 ч. Количественное определение ГБ-115 проводилось с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией [8].

Полученные данные подвергали математической статистической обработке. В таблице, где приведены фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток ГБ-115 в дозах от 1 до 15 мг, представлены средние арифметические значения ( $\bar{x}$ ), соответствующие им стандартные отклонения (SD), коэффициенты вариации (C.V.%). Для расчётов фармакокинетических параметров был использован модельно-независимый метод [1].

### Результаты и обсуждение

Хромато-масс-спектрометрический анализ всех образцов плазмы крови добровольцев показал, что в анализируемых образцах присутствует характеристический молекулярный ион, соответствующий неизменённой молекуле ГБ-115, с  $m/z = 435,5$  (протонированный ион). Поэтому дальнейший анализ проб плазмы крови проводили по данному характеристическому иону.

На рис. 1 представлены усреднённые фармакокинетические профили ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного перорального приёма таблеток ГБ-115 в дозах 1, 3, 7, 11 и 15 мг.



**Рис. 1.** Усреднённые фармакокинетические профили ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного приёма различных доз таблеток ГБ-115 ( $\pm$ SD;  $n = 3$  для каждой дозы)

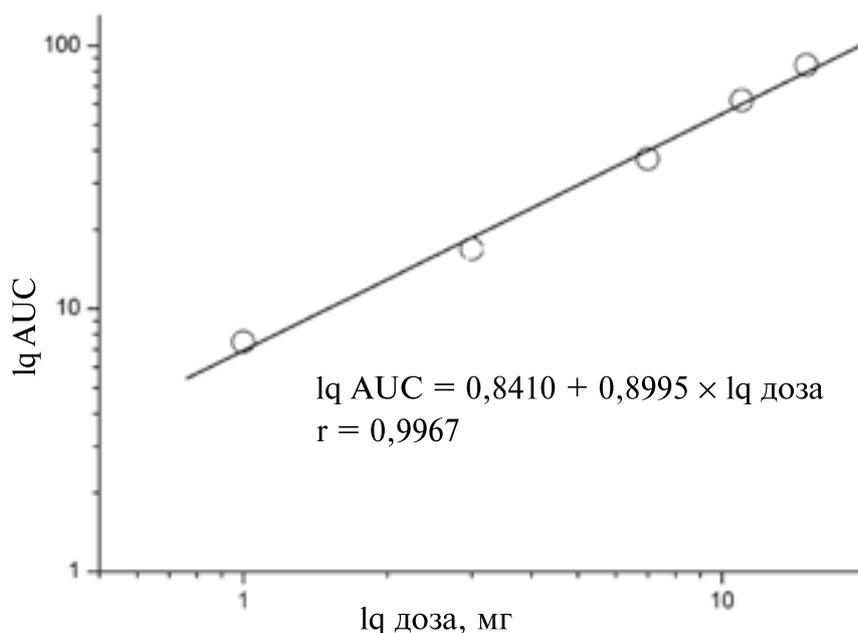
Фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного перорального приёма различных доз таблеток ГБ-115

№	$C_{\max}$ , нг/мл	$T_{\max}$ , ч	$AUC_{0-T}$ , мкг/мл × ч	$AUC_{0-\infty}$ , мкг/мл × ч	$AUC_{T-\infty}$ , %	$k_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , ч	MRT, ч	Cl/F, л/ч/кг	Vd/F, л/кг
<b>1 мг</b>										
01	4,54	1,00	4,63	5,77	19,76	1,1981	0,58	1,44	2,919	2,43
04	10,19	0,75	10,85	12,24	11,36	1,3870	0,50	1,18	1,355	0,98
06	7,13	0,75	6,97	12,21	42,92	1,0814	0,64	1,16	1,688	1,56
$\bar{x}$	<b>7,29</b>	<b>0,83</b>	<b>7,48</b>	<b>10,07</b>	<b>24,68</b>	<b>1,2222</b>	<b>0,57</b>	<b>1,26</b>	<b>1,987</b>	<b>1,65</b>
SD	<b>2,83</b>	<b>0,14</b>	<b>3,14</b>	<b>3,73</b>	<b>16,34</b>	<b>0,1542</b>	<b>0,07</b>	<b>0,16</b>	<b>0,824</b>	<b>0,73</b>
CV%	<b>38,81</b>	<b>17,32</b>	<b>41,98</b>	<b>37,00</b>	<b>66,24</b>	<b>12,62</b>	<b>12,25</b>	<b>12,40</b>	<b>41,47</b>	<b>44,24</b>
<b>3 мг</b>										
07	8,57	1,00	16,68	18,33	9,00	0,6975	0,99	1,86	1,893	2,71
11	7,02	1,00	13,83	18,29	24,38	0,6348	1,09	1,85	3,099	4,88
12	12,32	0,75	20,07	27,49	26,99	0,6226	1,11	1,56	1,590	2,55
$\bar{x}$	<b>9,30</b>	<b>0,92</b>	<b>16,86</b>	<b>21,37</b>	<b>20,13</b>	<b>0,6516</b>	<b>1,06</b>	<b>1,76</b>	<b>2,194</b>	<b>3,38</b>
SD	<b>2,73</b>	<b>0,14</b>	<b>3,12</b>	<b>5,30</b>	<b>9,72</b>	<b>0,0402</b>	<b>0,06</b>	<b>0,17</b>	<b>0,798</b>	<b>1,30</b>
CV%	<b>29,29</b>	<b>15,75</b>	<b>18,53</b>	<b>24,80</b>	<b>48,30</b>	<b>6,17</b>	<b>6,05</b>	<b>9,70</b>	<b>36,37</b>	<b>38,46</b>
<b>7 мг</b>										
08	14,77	1,00	28,75	31,59	8,99	0,6979	0,99	1,86	3,382	4,85
09	21,04	1,50	46,53	48,98	5,00	0,9152	0,76	1,78	2,245	2,45
13	17,89	0,75	36,09	38,32	5,82	0,7332	0,95	1,77	2,657	3,62
$\bar{x}$	<b>17,90</b>	<b>1,08</b>	<b>37,12</b>	<b>39,63</b>	<b>6,60</b>	<b>0,7821</b>	<b>0,90</b>	<b>1,80</b>	<b>2,761</b>	<b>3,64</b>
SD	<b>3,14</b>	<b>0,38</b>	<b>8,93</b>	<b>8,77</b>	<b>2,11</b>	<b>0,1166</b>	<b>0,12</b>	<b>0,05</b>	<b>0,576</b>	<b>1,20</b>
CV%	<b>17,51</b>	<b>35,25</b>	<b>24,07</b>	<b>22,13</b>	<b>31,90</b>	<b>14,91</b>	<b>13,65</b>	<b>2,74</b>	<b>20,86</b>	<b>32,97</b>
<b>11 мг</b>										
15	54,57	0,75	98,46	103,81	5,15	0,5460	1,27	2,08	1,346	2,47
16	18,17	1,00	35,36	38,86	9,01	0,6972	0,99	1,86	4,444	6,37
18	23,57	1,50	52,12	54,86	4,99	0,9151	0,76	1,79	2,574	2,81
$\bar{x}$	<b>32,10</b>	<b>1,08</b>	<b>61,98</b>	<b>65,84</b>	<b>6,38</b>	<b>0,7194</b>	<b>1,01</b>	<b>1,91</b>	<b>2,788</b>	<b>3,88</b>
SD	<b>19,64</b>	<b>0,38</b>	<b>32,69</b>	<b>33,84</b>	<b>2,27</b>	<b>0,1856</b>	<b>0,26</b>	<b>0,15</b>	<b>1,560</b>	<b>2,16</b>
CV%	<b>61,19</b>	<b>35,25</b>	<b>52,73</b>	<b>51,39</b>	<b>35,58</b>	<b>25,79</b>	<b>25,37</b>	<b>7,92</b>	<b>55,95</b>	<b>55,67</b>
<b>15 мг</b>										
19	55,89	1,50	115,53	122,47	5,67	0,5925	1,17	2,38	1,367	2,31
20	46,46	0,75	71,73	73,12	1,90	0,7289	0,95	1,56	3,734	5,12
22	29,72	2,00	65,88	67,12	1,85	0,8381	0,83	2,18	2,828	3,37
$\bar{x}$	<b>44,02</b>	<b>1,42</b>	<b>84,38</b>	<b>87,57</b>	<b>3,14</b>	<b>0,7198</b>	<b>0,98</b>	<b>2,04</b>	<b>2,643</b>	<b>3,60</b>
SD	<b>13,25</b>	<b>0,63</b>	<b>27,13</b>	<b>30,37</b>	<b>2,19</b>	<b>0,1231</b>	<b>0,17</b>	<b>0,43</b>	<b>1,194</b>	<b>1,42</b>
CV%	<b>30,11</b>	<b>44,41</b>	<b>32,16</b>	<b>34,68</b>	<b>69,77</b>	<b>17,09</b>	<b>17,54</b>	<b>20,96</b>	<b>45,17</b>	<b>39,44</b>

Из рис. 1 видно, что снижение концентраций исследуемого лекарственного вещества носит монофазный характер. В зависимости от дозы ГБ-115 определялся в плазме крови всех 15 добровольцев в течение 2–6 ч после однократного приёма лекарственного средства.

В таблице представлены фармакокинетические параметры ГБ-115 в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток ГБ-115 в дозах от 1 до 15 мг.

Как видно из таблицы, большинство рассчитанных фармакокинетических параметров представляют собой сильно варьируемые величины. Так, коэффициент вариации (С.В.%) для  $C_{\max}$  (максимальная концентрация) колебался от 17,51% для дозы 7 мг до 61,19% для дозы 11 мг. С.В.%  $T_{\max}$  (время достижения максимальной концентрации) для дозы 3 мг составил 15,75% и для дозы 15 мг – 44,41%. Фармакокинетические параметры независимые от дозы –  $k_{el}$  (константа скорости элими-



**Рис. 2.** Проверка гипотезы линейности фармакокинетики ГБ-115 в плазме крови добровольцев по изменению значения  $AUC_{0-T}$  в зависимости от дозы

нации из плазмы крови),  $T_{1/2}$  (период полувыведения), MRT (среднее время удержания в организме) были менее вариабельны. Так,  $C.V.\%$  MRT изменялся от 2,74% для дозы 7 мг до 20,96% для дозы 15 мг.

Анализ фармакокинетических параметров показал, что ГБ-115 быстро всасывается в системный кровоток из желудочно-кишечного тракта добровольцев. Так, время достижения  $C_{max} - T_{max}$  ГБ-115 в плазме крови в среднем изменялось от  $0,83 \pm 0,14$  ч (доза 1 мг) до  $1,42 \pm 0,63$  ч (доза 15 мг). Изучаемое соединение всасывается из желудочно-кишечного тракта после однократного перорального приёма различных доз таблеток ГБ-115 (3, 7, 11 и 15 мг) примерно с одинаковой скоростью ( $C_{max}/AUC_{0-T}$  ( $ч^{-1}$ ) – параметр, характеризующий скорость всасывания препарата в системный кровоток). Величины  $C_{max}/AUC_{0-T}$  составили  $0,482 - 0,552$   $ч^{-1}$ . Исключение составляет величина  $C_{max}/AUC_{0-T}$  после однократного перорального приёма таблеток ГБ-115 в дозе 1 мг ( $0,975$   $ч^{-1}$ ).

Величины  $C_{max}$  в среднем изменялись от  $7,29 \pm 2,83$  нг/мл (доза 1 мг) до  $44,02 \pm 13,23$  нг/мл (доза 15 мг). При этом индивидуальные значения  $T_{max}$  колебались от 0,75 до 2,0 ч.

ГБ-115 достаточно быстро выводится из плазмы крови. Так, период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) исследуемого вещества в среднем колебался от  $0,57 \pm 0,07$  ч для дозы 1 мг до  $1,06 \pm 0,06$  ч для дозы 3 мг.

Площадь под фармакокинетической кривой ( $AUC_{0-T}$ ) ГБ-115 возрастала с увеличением дозы: для дозы 1 мг –  $7,48 \pm 3,14$ ; 3 мг –  $16,86 \pm 3,12$ ; 7 мг –  $37,12 \pm 8,93$ ; 11 мг –  $61,98 \pm 32,69$  и для 15 мг –  $84,38 \pm 27,13$  нг/мл $\times$ ч.

Обобщая полученные результаты, можно говорить о том, что при последовательном, линейном увеличении дозы ГБ-115 с 1 до 15 мг происходит увеличение дозозависимых фармакокинетических параметров. Данный тезис подтверждается рис. 2, где представлена графическая зависимость логарифма исследуемых доз ( $lg$  доза – ось абсцисс) от логарифма площади под фармакокинетической кривой ( $lg$  AUC – ось ординат). Из уравнения на рис. 2 видно, что показатель  $b$ , характеризующий наклон кривой, приближается к 1 (0,8995).

Общий плазменный клиренс ( $Cl/F$ ) ГБ-115 в диапазоне доз 1–15 мг изменялся от  $1,987 \pm 0,824$  до  $2,788 \pm 1,560$  л/ч/кг.

Параметром, характеризующим степень проникновения лекарственного вещества в ткань, является кажущийся объём распределения ( $V_d/F$ ). Его величина для ГБ-115 после перорального введения в дозах 1–15 мг составила в среднем 2,47 л/кг. Кажущийся объём распределения обычно неэквивалентен анатомическому объёму, а отражает распределение препарата и степень его связывания в организме. Так, если препарат связывается преимущественно белками крови,  $V_d/F$  будет меньше, чем реальный объём жидкости. С другой стороны, преимущественное связывание препарата во внесосудистом пространстве приводит к превышению значения  $V_d/F$  над реальным объёмом жидкости [9, 12]. В нашем случае расчёт величин  $V_d/F$  дал значительно большие результаты, указывающие, что ГБ-115 распределяется во всех жидких средах организма и, возможно, накапливается в тканях.

Сравнение дозозависимых фармакокинетических параметров ГБ-115 и других дипептидных препаратов, таких как дилепт, ноопепт, у добровольцев, выявило следующие различия: дилепт достигает максимальной концентрации в плазме крови в среднем через 0,4 ч после приёма препарата, для ноопепта этот параметр составил в среднем 0,5 ч [2, 11]. В то же время для ГБ-115 средняя величина  $T_{max}$  составила 0,85 ч.

Сопоставление величин параметров, характеризующих скорость выведения, показало, что  $T_{1/2el}$  дилепта в 3 раза превышал аналогичный параметр, полученный для ГБ-115 (1,9 и 0,6 ч, соответственно). MRT дилепта у добровольцев было в 1,7 раза больше, чем после однократного приёма таблеток ГБ-115 (3,1 и 1,8 ч, соответственно). Таким образом, лекарственные средства, относящиеся к группе дипептидов, достаточно быстро всасываются из ЖКТ добровольцев и в то же время продолжительно циркулируют в системном кровотоке.

### Литература

1. Агафонов А.А., Пиотровский В.К. Программа M-ind системы параметров фармакокинетики модельно-независимым методом статистических моментов. Хим.-фарм. журн. 1991; 25: 10: 16–19.
2. Бойко С.С., Коротков С.А., Жердев В.П., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Воронина Т.А. Межвидовые различия фармакокинетики дилепта. Экспер. и клин. фармакол. 2004; 67: 1: 40–43.
3. Гудашева Т.А., Лезина В.П., Кирьянова Е.П., Деева О.А., Колик Л.Г., Середенин С.Б. Исследование биологически активной конформации ГБ-115, дипептидного аналога холецистокинина-4. Биоорг. химия. 2013; 39: 3: 293.
4. Жердев В.П., Бойко С.С., Блынская Е.В., Турчинская К.Г., Гудашева Т.А., Иванникова Е.В. Доклиническое изучение фармакокинетики нового анксиолитика дипептидной структуры ГБ-115. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2015; 1: 52–59.
5. Жердев В.П., Бойко С.С., Константинопольский М.А., Раскин С.Ю., Алексеев К.В., Гудашева Т.А., Мартыанов В.А., Колик Л.Г. Фармакокинетика и фармакодинамика фармацевтических композиций дипептидного анксиолитика ГБ-115. Хим.-фарм. журн. 2016; 50: 5: 42–46.
6. Колик Л.Г., Константинопольский М.А., Рыбина И.В., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность дипепти-

### Выводы

1. На 15 добровольцах изучена фармакокинетика ГБ-115 после однократного приёма таблеток ГБ-115 в дозах 1, 3, 7, 11 и 15 мг. Лекарственное вещество быстро всасывается в системный кровоток. Величины  $C_{max}/AUC_{0-T}$  для доз 3–15 мг в среднем составили 0,482 – 0,552 ч<sup>-1</sup>. Величина кажущегося объёма распределения ГБ-115 после приёма доз 1–15 мг составила в среднем 2,47 л/кг, что указывает на его хорошее распределение в тканях и жидкостях организма; ГБ-115 достаточно быстро выводится из плазмы крови, на что указывает среднее значение периода полувыведения препарата (0,6–1,0 ч).

2. В изученном диапазоне доз фармакокинетика ГБ-115 имеет линейный характер.

да ГБ-115 при пероральном введении. Бюл. exper. биол. и мед. 2013; 155: 2: 163–166.

7. Колик Л.Г., Жердев В.П., Бойко С.С., Константинопольский М.А., Раскин С.Ю., Гудашева Т.А., Мартыанов В.А., Середенин С.Б. Экспериментальная фармакокинетика и фармакодинамика субстанций дипептидного анксиолитика ГБ-115. Экспер. и клин. фармакол. 2015; 78: 11: 30–34.

8. Раскин С.Ю., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Смирнов В.В., Бочков П.О., Шевченко Р.В., Жердев В.П. Фармакокинетическая оценка таблетированной лекарственной формы нового дипептидного анксиолитика ГБ-115. Биофарм. журн. (в печати).

9. Сергиенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. М.: Издательство РАМН, 2003; 208.

10. Турчинская К.Г. Разработка состава и технологии лекарственных форм амида N-(6-фенилгексаноил)гексил-L-триптофана. Автореф. канд. фарм. наук. М.: 2015.

11. Шевченко Р.В., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Бойко С.С., Жердев В.П., Сереброва С.Ю., Ивашкина Н.Ю., Незнамов Г.Г., Сюняков С.А. Клиническая фармакокинетика нового антипсихотического средства дилепта. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2013; 76: 6: 35–37.

12. Rowland M., Tozer T.N. Clinical Pharmacokinetics. Concepts and applications. Third ed. A Lea and Febiger Book, 1995, p. 601.

# Исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением

Хохлов А.Л.<sup>1,2</sup>, Джурко Ю.А.<sup>2</sup>, Шитов Л.Н.<sup>1,2</sup>, Яичков И.И.<sup>1,2</sup>, Шитова А.М.<sup>2</sup>, Хозова Л.А.<sup>2</sup>, Мирошников А.Е.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ, г. Ярославль

<sup>2</sup> – ООО «Квинта-Аналитика Ярославль», г. Ярославль

**Резюме.** Было проведено исследование фармакокинетики мебеверина в форме капсул с пролонгированным высвобождением на 24 здоровых добровольцах. Известно, что данное лекарственное вещество полностью метаболизируется на пресистемном этапе. Поэтому измерялись фармакокинетические параметры только его основных метаболитов – мебевериновой кислоты и деметилированной мебевериновой кислоты. Для определения концентрации данных метаболитов в плазме крови разработана биоаналитическая методика с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием.

**Ключевые слова:** мебеверин, мебевериновая кислота, деметилированная мебевериновая кислота, фармакокинетика, ВЭЖХ-МС/МС

## Pharmacokinetic study of prolonged release capsules of mebeverine

Khokhlov A.L.<sup>1,2</sup>, Dzjurko Yu.A.<sup>2</sup>, Shitov L.N.<sup>1,2</sup>, Yaichkov I.I.<sup>1,2</sup>, Shitova A.M.<sup>2</sup>, Khozova L.A.<sup>2</sup>, Miroshnikov A.E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – The Yaroslavl State Medical University, Yaroslavl

<sup>2</sup> – Quinta-Analytica Yaroslavl LLC, Yaroslavl

**Resume.** Pharmacokinetic study of prolonged release capsules of mebeverine was carried out on 24 volunteers. It is known that the drug substance is completely metabolized due to first-pass effect. Therefore, pharmacokinetic parameters of the main metabolites – mebeverine acid and desmethyl mebeverine acid were measured. Bioanalytical method was developed to measurement of concentrations of these metabolites in blood plasma by using HPLC-MS/MS.

**Keywords:** mebeverine, mebeverine acid, desmethyl mebeverine acid, pharmacokinetic, HPLC-MS/MS

Автор, ответственный за переписку:

Яичков Илья Игоревич – аспирант кафедры клинической фармакологии с курсом ИПДО ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» МЗ РФ; 150043, г. Ярославль, ул. Автозаводская, д. 29, кв. 97; +7 (910) 977-74-98; e-mail: [ilya\\_1993\\_08@mail.ru](mailto:ilya_1993_08@mail.ru)

## Введение

Мебеверин является миотропным спазмолитиком, механизм действия которого основан на блокаде быстрых натриевых и медленных кальциевых каналов на мембране миоцита, что замедляет её деполяризацию и препятствует сокращению мышечных волокон. Он обладает высокой селективностью в отношении гладкомышечных клеток желудочно-кишечного тракта, поэтому его используют, в основном, при спазмах различных отделов пищеварительной системы. Данный препарат обеспечивает как надёжный антиспастический эффект, так и препятствует развитию атонии (прокинетическое действие) [1].

Мебеверин, являющийся сложным эфиром, быстро гидролизует на этапе пресистемной элиминации ферментами-эстеразами до 3,4-диметоксибензойной (вератровой) кислоты и мебеверинового спирта. Основными метаболитами данного препарата являются мебевериновая кислота (МК) и деметилмебевериновая кислота (ДММК) (рис. 1) [2].

Период полувыведения ДММК при приёме капсул с пролонгированным высвобождением, по данным

[1, 3], составляет 5–6 ч, максимальная концентрация в крови ( $C_{max}$ ) после однократного приёма составляет – 679 нг/мл, после двукратного приёма — 804 нг/мл, время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ ) около 2,92 ч. Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» от нуля до последнего отбора крови ( $AUC_{0-t}$ ) для ДММК, согласно [3], равна 4 552 нг × ч/мл, константа элиминации равна 0,147 ч<sup>-1</sup>. Значения фармакокинетических параметров для МК не опубликованы. Поэтому получение новых данных о фармакокинетике мебеверина в форме капсул с модифицированным высвобождением является актуальным.

Известны методики количественного определения метаболитов мебеверина в плазме крови методами ВЭЖХ и ВЭЖХ-МС/МС [2–6]. Недостатками данных методик является длительная пробоподготовка с использованием твёрдофазной и жидкостно-жидкостной экстракции и низкая чувствительность.

В связи с этим целью данной работы является изучение фармакокинетики лекарственного препарата мебеверина в форме капсул (Дюспаталин) и разработка новой чувствительной и экспрессной биоаналитиче-

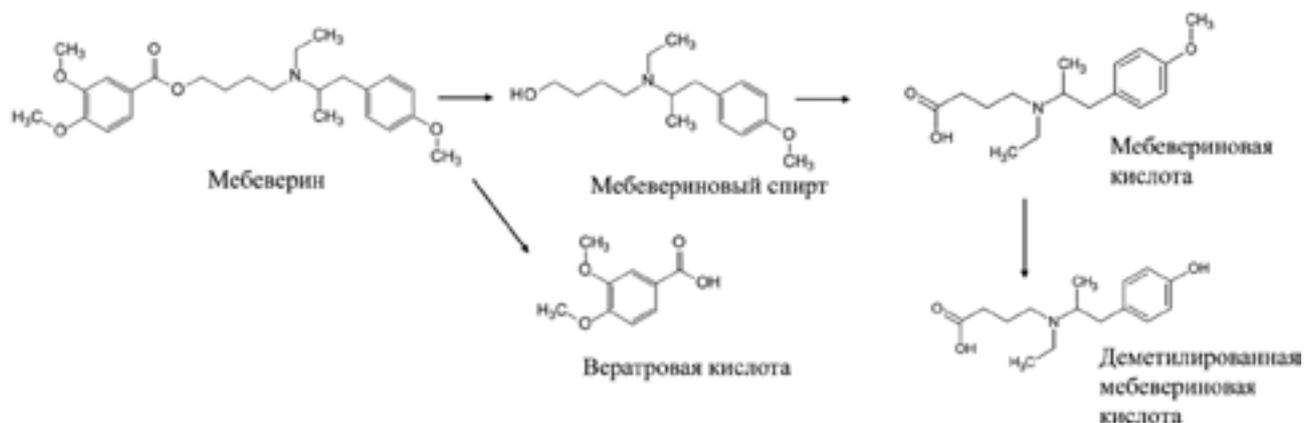


Рис. 1. Схема метаболизма мебеверина

ской методики для определения концентрации его метаболитов в плазме крови методом ВЭЖХ-МС/МС.

### Материалы и методы

Для измерения концентраций метаболитов мебеверина в плазме крови использовалась ВЭЖХ-МС/МС-система, оснащённая трёхквadrупольным масс-спектрометрическим детектором Thermo Scientific TSQ Quantum Ultra. Подготовка проб осуществлялась методом осаждения белков; процедуры пробоподготовки включали внесение в образцы внутренних стандартов – мебевериновой кислоты-D5 (МК-D-5) и деметилированной мебевериновой кислоты-D5 (ДММК-D5) (рис. 2). Разделение

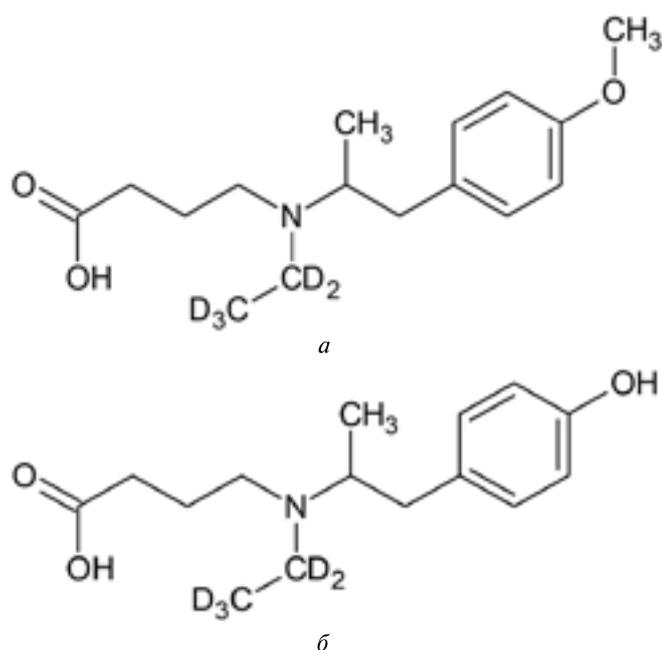


Рис. 2. Структурные формулы изотопно-меченных внутренних стандартов для определения мебевериновой кислоты (а) и деметилированной мебевериновой кислоты (б)

компонентов биологической матрицы проводили на двух хроматографических колонках Phenomenex Luna 5uC8, (150 × 4,6 мм, 5 мкм) и Phenomenex Luna 5uC8, (150 × 4,6 мм, 5 мкм) с использованием подвижной фазы на основе ацетонитрила и формиатного буферного раствора при градиентном режиме элюирования. Масс-спектрометрический детектор работал в режиме регистрации положительных ионов последующим MRM-переходам: для МК m/z – 280→121, для ДММК m/z – 266,2→107, для МК-D5 m/z – 285→121, для ДММК-D5 m/z – 271→107. Время анализа составило 6 мин.

Валидация аналитической методики выполнялась в соответствии с требованиями руководств ЕМЕА [7], FDA [8] и Руководства по экспертизе лекарственных средств НЦЭСМП (Т.1) [9]. Полученные результаты валидационных тестов представлены в табл. 1, они отвечают всем установленным критериям приемлемости. Определение концентраций обоих аналитов проводилось в диапазоне от 10 до 2 000 нг/мл. Были использованы следующие калибровочные точки: 10, 50, 200, 500, 750, 1 000, 1 500, 2 000 нг/мл. Содержание определяемых веществ в образцах контроля качества составило 10, 30, 400, 800, 1 600, 2 000 нг/мл.

### Исследование фармакокинетики

Исследование фармакокинетики препарата Дюспаталин проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика», нормативных документов FDA [10] и ЕМЕА [11], а также в соответствии с этическими принципами, изложенными в Хельсинкской Декларации [12].

В популяцию для оценки фармакокинетических параметров было включено 24 испытуемых в возрасте от 18 до 45 лет, в том числе 13 женщин и 11 мужчин европейской расы, отобранных согласно критериям включения и не включения. В скрининге приняло участие 37 кандидатов. Средний возраст добровольцев составил 25,8±7,1 лет, рост – 171,5±9,4 см, масса – 68,1±10,5 кг, ИМТ – 23,3±2,8 кг/м<sup>2</sup>.

Валидационные характеристики разработанной методики

№ п/п	Валидационный параметр	Результаты		
1	Селективность	Анализ 6 образцов бланковой плазмы крови (полученной из разных источников) и плазмы, содержащей определяемые вещества показал, что интерференция в области времени удерживания аналитов не превышала 20% от уровня LLOQ, а в области времени удерживания внутренних стандартов – не превышала 5% от их концентрации (рис. 3)		
2	Нижний предел количественного определения (LLOQ)	МК	10 нг/мл (точность 101,39% от теоретической, прецизионность (CV*) – 15,75%)	
		ДММК	10 нг/мл (точность 108,22% от теоретической, прецизионность (CV) – 9,34%)	
3	Линейность	МК	Диапазон концентраций: 10–2 000 нг/мл. Коэффициент корреляции калибровочной кривой ( $r^2$ ): 0,9987–0,9999	
		ДММК	Диапазон концентраций: 10–2 000 нг/мл. Коэффициент корреляции калибровочной кривой ( $r^2$ ): 0,9965–0,9999	
4	Прецизионность и точность	МК	Точность от 101,39% до 107,42%; CV от 6,31% до 15,75%	
		ДММК	Точность от 108,09 до 110,48%; CV от 4,01% до 9,34%	
5	Степень извлечения	МК	91,48 %	
		ДММК	91,98%	
6	Отсутствие влияния разведения (двукратное разведение образцов с концентрацией аналитов 3 200 нг/мл)	МК	Точность – 112,23%	
		ДММК	Точность – 110,58%.	
7	Эффект влияния матрицы	МК	NMF** находился в диапазоне от 1,053 до 1,063; CV от 2,24 до 3,23%	
		ДММК	NMF** находился в диапазоне от 1,060 до 1,127; CV от 2,89 до 2,95%	
8	Стабильность	Краткосрочная (24 ч)	МК	97,81% от номинальной концентрации
			ДММК	98,46% от номинальной концентрации
		Долгосрочная (28 дней)	МК	105,45% от номинальной концентрации
			ДММК	110,33% от номинальной концентрации
		При замораживании/размораживании	МК	110,79% от номинальной концентрации
			ДММК	110,98% от номинальной концентрации

Примечание: \* – Коэффициент вариации; NMF\*\* – нормализованный фактор матрицы.

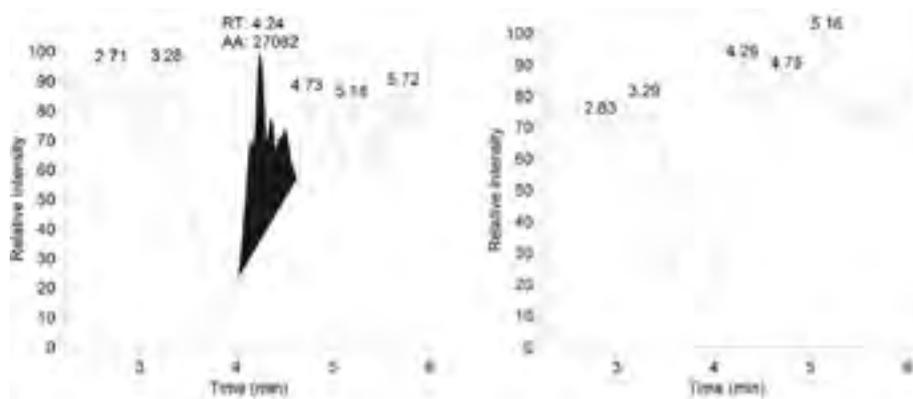
Отбор образцов крови осуществлялся до приёма препарата и через 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 5; 6; 8; 10; 12 и 24 ч после приёма препарата через локтевые катетеры [3, 13]. Плазму немедленно отделяли центрифугированием и замораживают при температуре не выше – 20 °С. В связи с быстрым пресистемным метаболизмом лекарственного вещества определялись концентрации двух основных метаболитов – мебевериновой кислоты и деметилмебевериновой кислоты [1–6].

Для исследования использовался препарат Дюспаталин в форме капсул пролонгированного действия в дозировке 200 мг производства «Эбботт Хелскеа САС» (Франция) (серия 10215, годен до 04.2017).

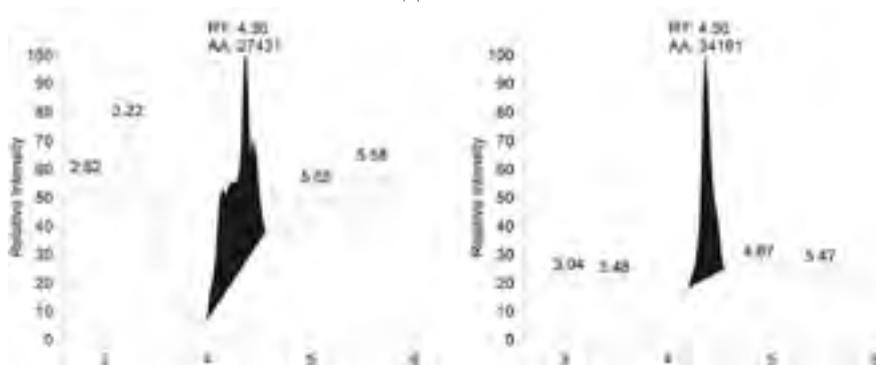
Статистическая обработка полученных результатов проводилась с помощью пакетов программного обеспечения Rv. 3.2.1, модуль Bear (Lee, Hsin-yaandLee, Yungjin (2014). bear: Data Analysis Tool for Average Bioequivalence and Bioavailability.Rpackage

version 2.6.4) и StatSoft STATISTICA v.12. Рассчитывались следующие фармакокинетические параметры:

- максимальное измеренное значение концентрации метаболитов в плазме крови ( $C_{max}$ );
- время достижения максимальной концентрации ( $T_{max}$ );
- площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время» от нуля до последнего отбора крови ( $AUC_{0-t}$ ), при котором концентрация метаболитов равна или выше нижнего LLOQ методики;
- площадь под фармакокинетической кривой, начиная с нулевого значения времени до бесконечности ( $AUC_{0-\infty}$ );
- отношение значений  $AUC_{0-t}$  к  $AUC_{0-\infty}$  – относительная скорость всасывания ( $C_{max}/AUC$ );
- константа скорости терминальной элиминации ( $K_{el}$ );

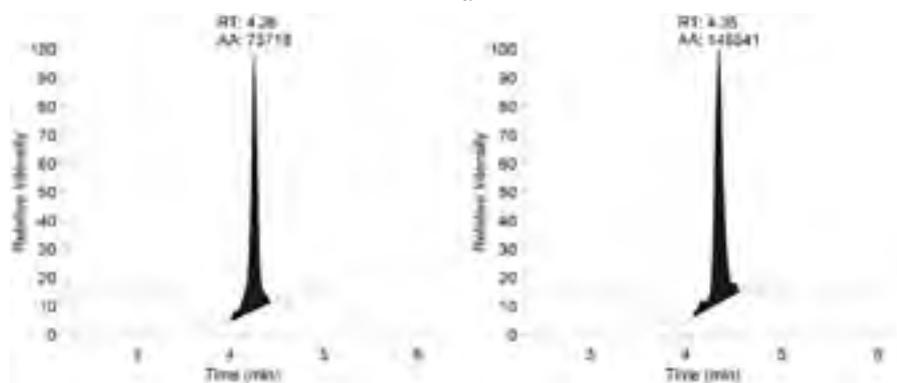


ДМКК МК

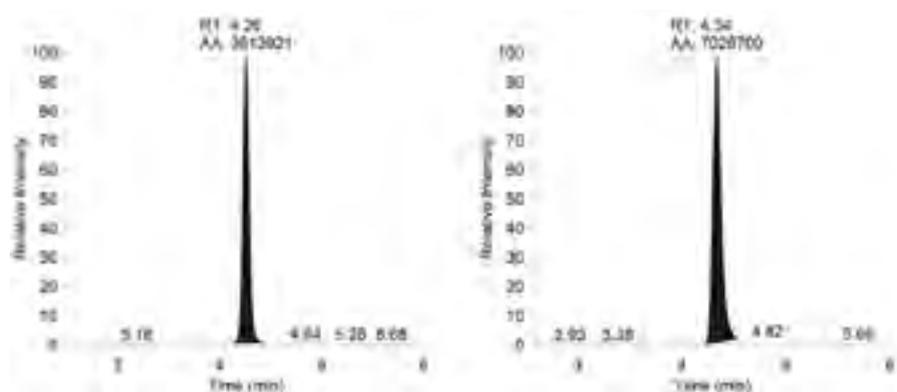


ДМКК-D5 МК-D5

*a*



ДМКК МК



ДМКК-D<sub>5</sub> МК-D<sub>5</sub>

*б*

Рис. 3. Примеры хроматограмм: бланковой плазмы и плазмы с добавлением аналитов (*a*) на уровне LLOQ и внутренних стандартов (*б*)

- период полувыведения метаболитов ( $T_{1/2}$ );
- среднее время удержания метаболитов в крови (MRT).

Полученные результаты представлены в табл. 2 и проиллюстрированы на рис. 4. Среднее значение соотношения  $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$  для мебевериновой кислоты равнялись 88,51%, для деметилированной мебеверино-

вой кислоты – 86,26%, что указывает на достаточную длительность наблюдения. Средние значения максимальных концентраций МК и ДММК, определяемых в плазме крови добровольцев, составили  $62,52 \pm 35,01$  и  $291,81 \pm 125,92$  нг/мл, соответственно, средние значения  $AUC_{0-t}$  –  $293,94 \pm 151,78$  и  $2191,85 \pm 542,94$  нг × ч/мл, соответственно, средние значения  $T_{max}$  –  $3,27 \pm 1,03$  и

Таблица 2

Фармакокинетические параметры метаболитов мебеверина

Мебевериновая кислота									
	$C_{max}$ , нг/мл	$T_{max}$ , ч	$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ , %	$C_{max}/AUC_{0-t}$ , ч <sup>-1</sup>	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	MRT, ч
Mean±SD*	$62,52 \pm 35,01$	$3,27 \pm 1,03$	$293,94 \pm 151,78$	$365,85 \pm 140,49$	$82,34 \pm 11,61$	$0,2238 \pm 0,0598$	$0,27584 \pm 0,08426$	$2,87 \pm 1,39$	$5,82 \pm 1,57$
Min	22,3	1,5	54,03	110,01	47,43	0,1649	0,08683	1,61	4,27
Max	173,5	5	601,03	649,49	96,04	0,4128	0,43138	7,98	11,45
CV, %	56,00	31,55	51,64	38,40	14,10	26,72	30,55	48,38	26,91
Деметилированная мебевериновая кислота									
	$C_{max}$ , нг/мл	$T_{max}$ , ч	$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ , %	$C_{max}/AUC_{0-t}$ , ч <sup>-1</sup>	$K_{el}$ , ч <sup>-1</sup>	$T_{1/2}$ , ч	MRT, ч
Mean±SD	$291,81 \pm 125,92$	$3,19 \pm 1,48$	$2191,85 \pm 542,94$	$2551,74 \pm 546,96$	$86,26 \pm 11,62$	$0,1339 \pm 0,0497$	$0,11605 \pm 0,06657$	$7,52 \pm 3,31$	$11,2 \pm 4,25$
Min	114,6	1,5	1081,45	1388,65	40,34	0,0838	0,04631	2,33	5,34
Max	607,4	8	3262,43	3547,35	95,84	0,2969	0,29771	14,97	22,49
CV, %	43,15	46,44	24,77	21,43	13,47	37,15	57,36	44,04	37,97

Примечание: Mean±SD\* – среднее значение ± стандартное отклонение.

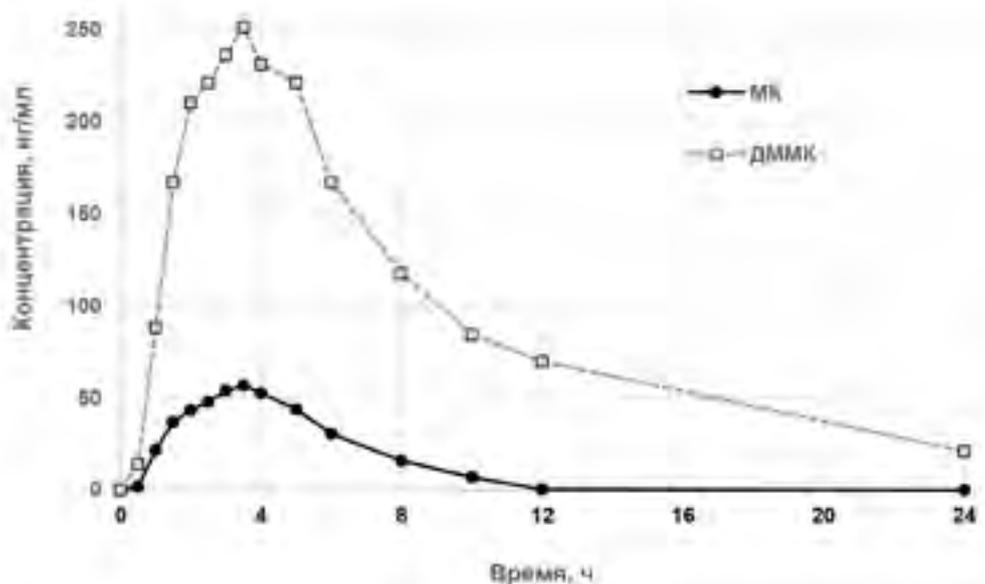


Рис. 4. Усреднённый фармакокинетические профили концентрации мебевериновой и деметилированной мебевериновой кислот в плазме крови добровольцев после однократного приёма капсул Дюспаталин в дозировке 200 мг

3,19±1,48 ч, соответственно. Таким образом, время наступления максимальной концентрации для обоих метаболитов было практически одинаковым, при этом максимальная концентрация в плазме,  $AUC_{0-t}$  у ДММК значительно выше, чем у МК. Это может свидетельствовать о том, что большая часть МК сразу после окисления мебеверинового спирта подвергается деметилированию.

Рассчитанные фармакокинетические параметры ДММК существенно отличаются от данных ранее опубликованных исследований (табл. 3) [1–3]. Так,

Таблица 3

Сравнение полученных значений фармакокинетических параметров ДММК с данными литературы [1, 3]

Параметр	Полученное значение	Опубликованное значение
$C_{max}$ , нг/мл	291,81±125,92	679
$T_{max}$ , ч	3,19±1,48	2,92
$AUC_{0-t}$ , нг×ч/мл	2191,85±542,94	4553
$AUC_{0-\infty}$ , нг×ч/мл	2551,74±546,96	4863
$K_{el}$	0,11605±0,06657	0,147
$T_{1/2}$ , ч	7,52±3,31	4,91

### Литература

1. *Brittain H.G.* Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients, Vol. 25. California: Academic press, 1998.
2. *Stockis A., Guelen P.J.M., de Vos D.* Identification of Mebeverine Acid as the Main Circulating Metabolite of Mebeverine in Man. *J Pharm Biomed Anal.* 2002; 29: 335–340.
3. *Winsemius A., Meuwisen I.M., Boon C., van der Laan A., Brekle A., de Vries M.* A pharmacokinetic comparison of the modified release capsule and a plain tablet formulation of mebeverine. *Int J Clin Pract.* 2002; 9 (56): 659–662.
4. *Elliott S., Burgess V.* Investigative implications of the Instability and Metabolism of Mebeverine. *J Anal Tox.* 2006; 30: 91–97.
5. *Bergeron M., Bergeron A., Amsterdam P., Furtado M., Garofolo F.* Use of polarity switching for the simultaneous bioanalysis of analytes with three orders of magnitude difference in concentration by HPLC-MS/MS. *Bioanal.* 2013; 5 (15): 1911–1918.
6. *Khatri C.A., Phanikummar Ch V., Jayaveera K., Reddy K.Y.* Development and Validation of Bioanalytical Method for Simultaneous Quantification of Veratric Acid, Mebeverine Acid and Desmethyl Mebeverine Acid in Human Edta Plasma by Using LC-MS/MS. *J Pharm Chem.* 2012; 4 (6): 11–18.

полученные средние значения  $C_{max}$ ,  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  приблизительно в 2 раза ниже, а измеренный период полувыведения на 2 ч дольше, чем по данным литературы. Это может быть связано с высокой межсубъектной вариабельностью и влиянием ситуационных факторов на процесс гидролиза лекарственного вещества на пресистемном этапе.

### Выводы

Таким образом, разработана и валидирована новая экспрессная, точная и чувствительная ВЭЖХ-МС/МС-методика количественного определения основных метаболитов мебеверина в плазме крови человека, отвечающая всем необходимым требованиям, изложенным в руководствах ЕМЕА, FDA и НЦЭСМП. Предел количественного определения для МК и ДММК составил 10 нг/мл. В результате проведенного с использованием данной методики исследования фармакокинетики капсул в дозировке 200 мг были получены новые данные о фармакокинетических параметрах мебевериновой и деметилмебевериновой кислот, которые могут быть использованы для разработки дизайна исследований биоэквивалентности.

7. Guideline on validation of bioanalytical methods (draft), European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use; 2010.

8. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U. S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), U. S. Government Printing Office, Washington, DC; 2013.

9. *Миронов А.Н., ред.* Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2013.

10. Food and Drugs Administration Guidance for Industry: Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms Based on Biopharmaceutics Classification System Rockville, MD: U.S. Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research; 2015.

11. Guidance on the investigation of bioequivalence, European Medicines Agency, Committee for medicinal products for human use; 2010.

12. Declaration of Helsinki of the AMM-Ethical Principles for Medical Research in humans, World Medical Assembly, 64th General Assembly; 2013.

13. *Хохлов А.Л., Лилеева Е.Г., Сеницина О.А., Спешилова С.А., Демарица С.М., Шитов Л.Н.* Проблемы проведения биоаналитической части исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в России. *Фармакокинетика Фармакодинамика.* 2014; 1: 37–43.



**Маркет Аксес Солюшенс** — это комплекс услуг по продвижению лекарственных средств, медицинского оборудования и медицинских технологий



### Миссия:

Выявляя и продвигая новые медицинские технологии, повышать качество оказания медицинской помощи и эффективность системы здравоохранения

### Фокус:

- Формирование уникального восприятия ценности продукта
- Позиционирование продукта на рынке
- Определение целевых областей применения
- Эффективное взаимодействие PR

### Наши услуги:

- Анализ рынка и системы здравоохранения
- Маркетинговые исследования
- Разработка стратегии
- Регуляторные задачи
- Клинические исследования
- Оценка медицинских технологий
- Определение ценовой политики и целевого финансирования
- Построение эффективных бизнес-процессов для фармацевтических компаний



**Мы всегда рады сотрудничеству:**

☎ +7 (495) 664-32-70

✉ [info@marketaccess.ru](mailto:info@marketaccess.ru)

🌐 [www.Market-Access-Solutions.ru](http://www.Market-Access-Solutions.ru)