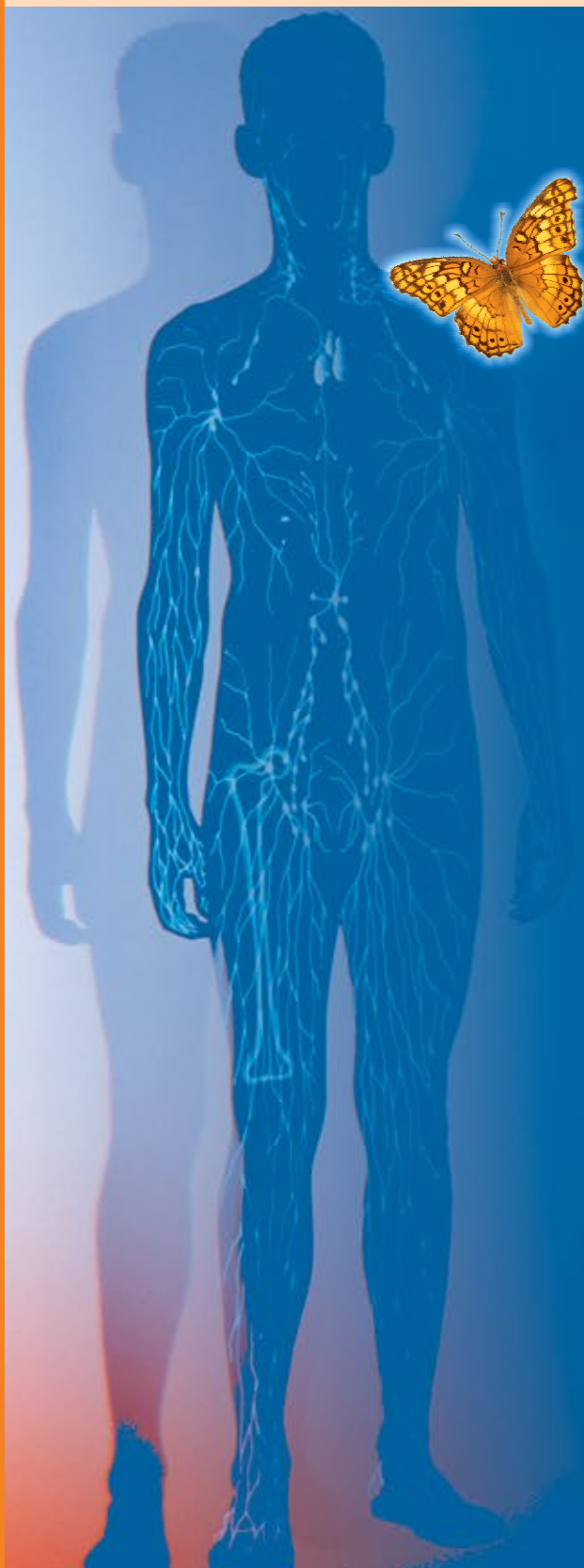


ФАРМАКОКИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА





Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

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

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

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

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

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

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 Куанталиевич

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

д.м.н., профессор, Москва

Тюрников Иван Николаевич

член-корр. РАН, д.м.н.,

профессор, Волгоград

Чистяков

Виктор Владимирович

д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

Белоусов

Дмитрий Юрьевич

Ответственный за выпуск

журнала

+7 (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-ok.ru

Жук Елена Владимировна

Дизайн и верстка

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 01.11.2016 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.PharmacoKinetica.ru

www.ClinVest.ru

www.Clinical-Pharmacy.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Фармакокинетика и Фармакодинамика

Качественная клиническая практика

Клиническая фармация

Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.Izdat-Ok.ru

Центр Фармакоэкономических исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

ПОИСК НОВЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Поиск селективных блокаторов цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типа в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещенных циклических аминокислот
Крыжановский С.А., Мокров Г.В., Григорьевич О.С., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Лихошерстов А.М., Гудашева Т.А. 3

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

Влияние гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге при экспериментальном паркинсоническом синдроме
Иванова Е.А., Капица И.Г., Золотов Н.Н., Вальдман Е.А., Непоклонов А.В., Колясникова К.Н., Воронина Т.А. 9

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Аскорбат лития улучшает адаптацию к стрессу на моделях *in vitro* и *in vivo*
Громова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Остренко К.С., Пронин А.В., Стельмащук Е.В., Хаспеков Л.Г. 13

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Оценка взаимосвязи между фармакокинетикой и фармакодинамикой тропоксина у крыс
Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Новицкий А.А., Ганьшина Т.С., Горбунов А.А., Мирзоян Р.С. 21

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Изучение нейрорепротекторных свойств соединения с нейрорепротекторной активностью димерного дипептидного миметика 4-ой петли фактора роста нервов человека, ГК-2h
Котельникова С.О., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Крайнева В.А., Воронина Т.А. 26

Нейропротективные свойства производного фурана – соединения ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта
Литвинова С.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Кутепова И.С., Жмуренко Л.А. 31

Димерные дипептидные миметики 3-й и 4-й петель фактора роста нервов активны на модели ишемического инсульта
Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. 34

Сравнительное изучение кардиопротекторного действия триметазидина и фабомотизола гидрохлорида у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в условиях продолжающегося потребления этанола
Цорин И.Б., Мирошкина И.А., Ионова Е.О., Надорова А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Сорокина А.В., Колик Л.Г., Дурнев А.Д., Крыжановский С.А. 38

ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ

Изучение противопаркинсонического, противовоспалительного и анальгетического действия метаболита гимантана АДК-1058 в сравнении с гимантаном
Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Авдюнина Н.И. 42

Хемореактомное моделирование эффектов аскорбата, никотината, оксibuтирата, комената и карбоната лития
Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Громова О.А., Расташанский В.А., Федотова Л.Э. 47

ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Исследование хронической токсичности и противовоспалительных свойств препарата Дилепт
Алексеева С.В., Сорокина А.В., Мирошкина И.А., Кузнецова О.С., Коваленко Л.П., Дурнев А.Д. 58

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№3
2016



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

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

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

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

Chistyakov Viktor

Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

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

Afanasyeva Elena

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

Zhuk Elena

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

Signed in print 01.11.2016

Typography: LLC «MEDIACOLOR», www.mediacolor.ru

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiskay, 8
FGBI «Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusova» RAS
Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Journal «Pharmacokinetics and Pharmacodynamics» is a supplement to the journal «Good Clinical Practice». Journal «Good Clinical Practice» registered by Russian Committee for Press 28.05.2001 Certificate of registration of mass media PI №77-9142. Copyright 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.PharmacoKinetica.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics
Good Clinical Practice
Clinical Pharmacy
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.Izdat-OKI.ru

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OGI

CONTENTS

SCREENING FOR NEW PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Search selective blockers of the zinc-dependent metalloproteinases 2nd and 9th type among the benzoylamino (phenylsulfonyl) amino-substituted cyclic aminoacids derivatives
Kryzhanovskii S.A., Mokrov G.V., Grigorkevich O.S.,
Tsorin I.B., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B.,
Likhoshesterov A.M., Gudasheva T.A. 3

MECHANISM OF ACTION RESEARCH

Effects of Hemantane upon the level of lipid peroxidation in brain in experimental parkinsonian syndrome
Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Zolotov N.N., Valdman E.A.,
Nepoklonov A.V., Kolyasnikova K.N., Voronina T.A. 9

PRECLINICAL STUDIES

Lithium ascorbate improves adaptation to stress on models *in vitro* and *in vivo*
Gromova O.A., Torshin I.Yu., Sardaryan I.S., Ostrenko K.S.,
Pronin A.V., Stel'mashuk E.V., Khaspekov L.G. 13

PHARMACOKINETICS STUDIES

Assessment of pharmacokinetics-pharmacodynamics relationship of tropoxine in rats
Zherdev V.P., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Novitskiy A.A.,
Ganshina T.S., Gorbunov A.A., Mirzoyan R.S. 21

PHARMACODYNAMICS STUDIES

Study of neuropsychotropic properties of substance with neuroprotective activity dimeric dipeptide mimetic of human NGF, GK-2h
Kotelnikova S.O., Garibova T.L., Gudasheva T.A.,
Kraineva V.A., Voronina T.A. 26

Neuroprotective properties furan compounds GIZH-276 on the model of hemorrhagic stroke
Litvinova S.A., Zolotov N.N., Voronina T.A.,
Kutepova I.S., Zhmurenko L.A. 31

Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor loops 3 and 4 are active in a model of ischemic stroke
Povarnina P.Y., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. 34

Comparative study of the trimetazidine and fabomotizole hydrochloride cardioprotective effect in rats with established alcoholic cardiomyopathy with the continued ethanol consumption
Tsorin I.B., Miroshkina I.A., Ionova E.O., Nadorova A.V.,
Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Sorokina A.V.,
Kolik L.G., Durnev A.D., Kryzhanovskii S.A. 38

PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METABOLITES STUDIES

Investigation of antiparkinsonian, anti-inflammatory and analgesic effects of ADK-1058, a metabolite of hemantane, in comparison with hemantane
Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A.,
Valdman E.A., Avdiunina N.I. 42

Chemoreactome modeling the effects of anions of lithium salts ascorbate, nicotinate, hydroxybutyrate kometana and lithium carbonate
Torshin I.Yu., Sardaryan I.S., Gromova O.A.,
Rastashanskaya V.A., Fedotova L.E. 47

SAFETY STUDIES

Experimental study of chronic toxicity and anti-inflammatory properties of the drug Dilept
Aleksieva S.V., Sorokina A.V., Miroshkina I.A.,
Kuznestova O.S., Kovalenko L.P., Durnev A.D. 58

CONTENTS

Поиск селективных блокаторов цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типа в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот

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

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

Резюме. Цель настоящего исследования – поиск в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот биологически активных соединений, обладающих свойствами блокаторов, цинк-зависимых металлопротеиназ 2-го и 9-го типа, которые, как известно, играют ключевую роль в патогенезе раннего постинфарктного ремоделирования миокарда. При изучении влияния вновь синтезированных соединений на уровень экспрессии металлопротеиназы-9 в крови крыс с острым инфарктом миокарда было отобрано соединение-лидер – 1-({4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил}сульфонил-L-пролин, – которое эффективно блокирует повышения уровня этого фермента в крови. При помощи эхокардиографии показано, что отобранное соединение-лидер по своей способности препятствовать развитию ремоделирования миокарда в острейшую фазу экспериментального инфаркта миокарда, как минимум, не уступает эталонному ингибитору металлопротеиназ – доксициклину.

Ключевые слова: металлопротеиназы 2-го и 9-го типа, постинфарктное ремоделирование миокарда, производные бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот

Search selective blockers of the zinc-dependent metalloproteinases 2nd and 9th type among the benzoylamino (phenylsulfonyl) amino-substituted cyclic aminoacids derivatives

Kryzhanovskii S.A., Mokrov G.V., Grigorkevich O.S., Tsorin I.B., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Likhosherstov A.M., Gudasheva T.A.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The purpose of this study – search among the benzoylamino (phenylsulfonyl) amino-substituted cyclic aminoacids derivatives biologically active compounds exhibiting properties of the zinc-dependent metalloproteinases 2nd and 9th type blockers which is known to play a key role in the pathogenesis of the myocardium early post-infarction remodeling. In studying the effect of newly synthesized compounds on metalloproteinase-9 levels in blood of rats with acute myocardial infarction were selected compound leader: 1-({4-[(4-chlorobenzoyl)amino]phenyl}sulfonyl-L-proline, which effectively blocked the increase of this enzyme level. Using echocardiography it was demonstrated that the selected compound-leader prevents the myocardial remodeling development in the acute phase of experimental myocardial infarction, at least not inferior to the reference inhibitor of metalloproteinases – doxycycline.

Keywords: metalloproteinases 2nd- and 9th-type, post-infarction myocardial remodeling, derivatives of the benzoylamino (phenylsulfonyl) amino-substituted cyclic aminoacids

Автор, ответственный за переписку:

Крыжановский Сергей Александрович – д.м.н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495)601-21-85; e-mail: SAK-538@yandex.ru

Введение

Известно, что в условиях острого трансмурального инфаркта миокарда в результате гибели большого количества сократительных кардиомиоцитов в ишемизированном миокарде происходит существенная структурная перестройка, приводящая к значительным изменениям размеров, геометрии и функции левого желудочка сердца. Этот патологический процесс хорошо изучен как в эксперименте [9, 13, 20], так в клинике [6, 10, 19] и носит название «раннее постинфарктное ремоделирование сердца». Полагают, что одну из ключевых ролей в этом процессе играют матриксные металлопротеиназы (ММП) — энзимы, вовлекающие межклеточный матрикс миокарда в процесс структур-

но-функционального ремоделирования посредством деградации цепей коллагена [7, 18]. В этом плане наибольший интерес представляют цинк-зависимые матриксные металлопротеиназы 2-го и 9-го типов (желатиназы) — ММП-2 и ММП-9, поскольку известно, что, с одной стороны, они имеют тропность к коллагену I и III типа, составляющему основу межклеточного матрикса миокарда, а с другой стороны, показано, что находящийся в очаге ишемии коллаген подвергается конформационным изменениям, в результате чего его трёхмерная спираль начинает «раскручиваться», и он переходит в одномерную фрагментированную цепочку, представляющую собой желатин, который и является акцептором действия ММП-2 и ММП-9 [1, 17]. Не менее важно и то, что эти ММП, помимо

на четыре группы: 1-я — ложнооперированные ($n=6$); 2-я — контроль = острый инфаркт миокарда ($n=12$); 3-я — доксициклин + острый инфаркт миокарда ($n=9$); 4-я — соединение-лидер (Ia) + острый инфаркт миокарда ($n=6$). Экспериментальный инфаркт миокарда воспроизводили по методу Селье. После торако- и перикардотомии под переднюю ветвь левой коронарной артерии на 0,5–1 мм ниже её выхода из-под ушка сердца проводили лигатуру. У ложнооперированных животных лигатура оставалась под коронарной артерией на протяжении всего эксперимента, а у животных 2-й, 3-й и 4-й групп производили одномоментную перевязку коронарной артерии. Величину ремоделирования миокарда в 1-й и 2-й группах и влияние на неё изучаемых соединений оценивали при помощи эхокардиографии, как было описано ранее [2]. Животным 3-й группы внутривенно через зонд вводили доксициклин (40 мг/кг/сут в 0,5 мл физиологического раствора) в течение 3 дней, предшествующих эксперименту. Животным 4-й группы по аналогичной схеме и в том же объёме растворителя вводили соединение-лидер (30 мг/кг/сут). Животные 1-й и 2-й групп по аналогичной схеме получали

0,5 мл физиологического раствора. Статистическую обработку данных производили следующим образом: нормальность распределения выборок определяли с помощью критерия Шапиро Уилка. Так как выборки имели нормальное распределение, для определения статистической значимости изменений использовали однофакторный дисперсионный анализ и дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену Кейлсу. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Данные в таблице представлены в виде средних арифметических и их стандартных ошибок, а в тексте и фигурах — только в виде средних арифметических.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов изучения влияния бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот на уровень ММП-9 в крови в условиях ишемии миокарда свидетельствует о том, что только соединение Ia значимо ($p=0,022$) по сравнению с контролем понижает этот показатель (рис. 2) и по своей активности, как минимум, не уступает эталонному

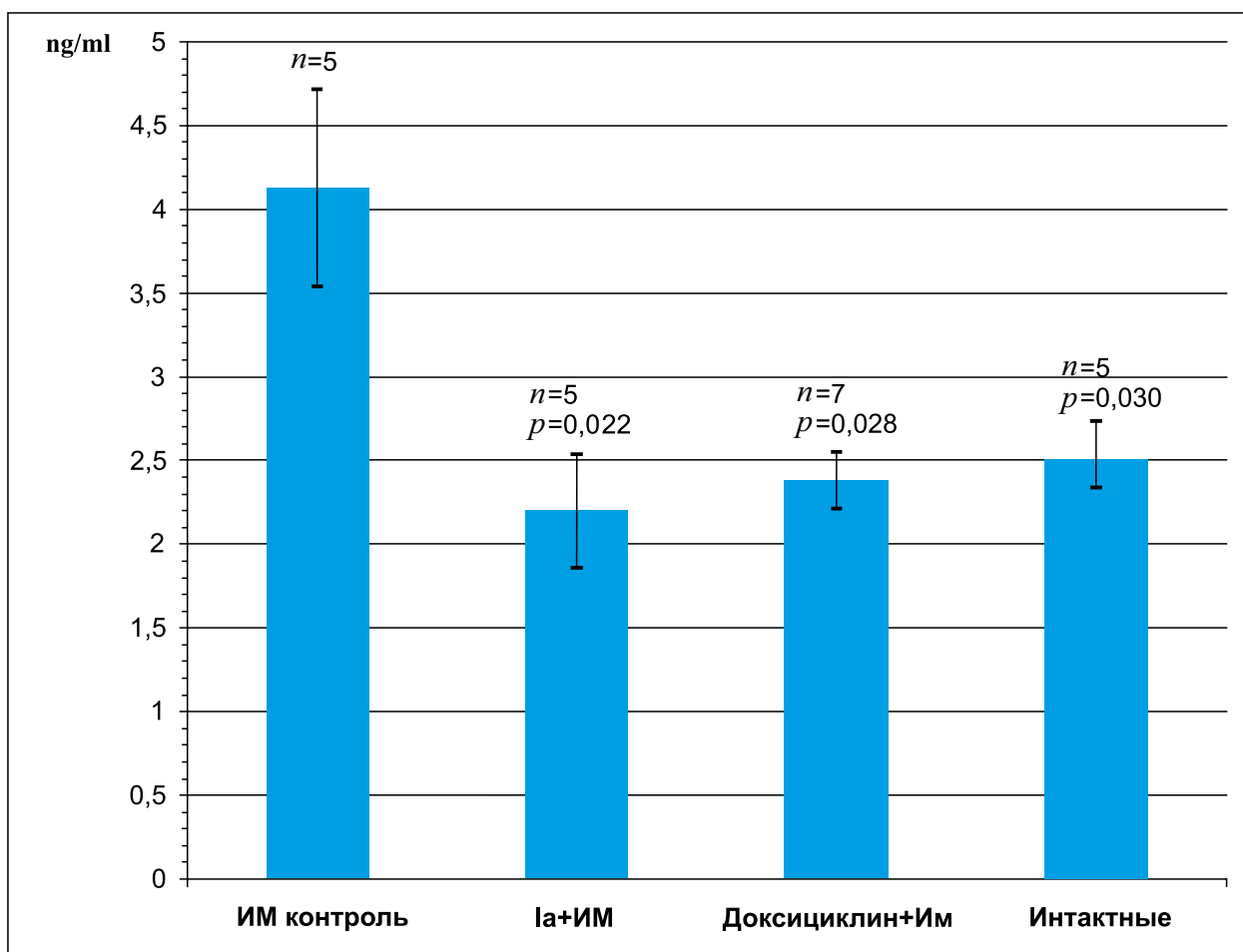


Рис. 2. Влияние соединения Ia на уровень ММП-9 в плазме крови крыс с острым инфарктом миокарда (ИМ).

Примечание: ИМ контроль — острый инфаркт миокарда; Ia+ИМ — соединение Ia+инфаркт миокарда; ДЦ+ИМ — эталонный препарат доксициклин+ инфаркт миокарда

Таблица 1

Влияние доксициклина и соединения Ia на показатели кардиогемодинамики крыс в условиях 60-минутной окклюзии коронарной артерии

Показатель	Группа животных	n	Исходный уровень	Время после окклюзии коронарной артерии, мин					
				3	10	20	30	45	60
КСР, мм	ОИМ	12	1,98±0,12	3,11±0,19 $p_2<0,0001$	3,83±0,15 $p_2<0,0001$	3,84±0,16 $p_2<0,0001$	3,61±0,16 $p_2<0,0001$	3,36±0,15 $p_2<0,0001$	3,24±0,15 $p_2<0,0001$
	ЛО	6	1,86±0,14 $p=0,534$	1,93±0,07 $p=0,001$ $p_2=0,876$	2,02±0,10 $p=0,0002$ $p_2=0,910$	2,01±0,08 $p=0,0002$ $p_2=0,864$	1,90±0,09 $p=0,0002$ $p_2=0,782$	1,81±0,09 $p=0,0002$ $p_2=0,959$	1,85±0,06 $p=0,0002$ $p_2=0,974$
	Доксициклин + ОИМ	9	1,77±0,10 $p=0,100$ $p_1=0,143$	2,65±0,16 $p=0,241$ $p_1=0,016$ $p_2<0,0001$	2,75±0,15 $p=0,007$ $p_1=0,0005$ $p_2<0,0001$	2,80±0,11 $p=0,004$ $p_1=0,0005$ $p_2<0,0001$	2,83±0,12 $p=0,019$ $p_1=0,0003$ $p_2<0,0001$	2,89±0,11 $p=0,038$ $p_1=0,0002$ $p_2<0,0001$	2,75±0,12 $p=0,034$ $p_1=0,001$ $p_2<0,0001$
	Ia + ОИМ	6	1,84±0,07 $p=0,128$ $p_1=0,243$	2,59±0,16 $p=0,845$ $p_1=0,001$ $p_2<0,0001$	2,80±0,19 $p=0,008$ $p_1=0,0004$ $p_2<0,0001$	2,87±0,21 $p=0,007$ $p_1=0,0004$ $p_2<0,0001$	2,82±0,09 $p=0,007$ $p_1=0,0007$ $p_2<0,0001$	2,80±0,05 $p=0,037$ $p_1=0,0002$ $p_2<0,0001$	2,69±0,08 $p=0,050$ $p_1=0,0008$ $p_2<0,0001$
ФВ, %	ОИМ	12	88,4±1,2	67,0±1,6 $p_2<0,0001$	57,4±1,7 $p_2<0,0001$	58,0±1,7 $p_2<0,0001$	63,4±1,6 $p_2<0,0001$	64,8±1,6 $p_2<0,0001$	67,9±1,3 $p_2<0,0001$
	ЛО	6	90,4±1,1 $p=0,253$	90,7±0,9 $p=0,0002$ $p_2=0,999$	90,2±1,1 $p=0,0002$ $p_2=0,997$	90,3±0,9 $p=0,0002$ $p_2=0,963$	91,5±0,8 $p=0,0002$ $p_2=0,999$	91,3±1,0 $p=0,0002$ $p_2=0,996$	90,4±1,2 $p=0,0002$ $p_2=0,983$
	Доксициклин + ОИМ	9	91,4±0,7 $p=0,297$ $p_1=0,807$	71,6±2,8 $p=0,378$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	69,9±2,0 $p=0,0006$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	69,5±0,8 $p=0,002$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	68,0±1,7 $p=0,083$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	69,4±1,8 $p=0,100$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	72,6±1,5 $p=0,107$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$
	Ia+ОИМ	6	90,5±0,8 $p=0,456$ $p_1=0,965$ $p_2<0,0001$	68,7±2,3 $p=0,616$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	67,2±1,5 $p=0,002$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	68,9±2,1 $p=0,001$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	70,8±1,5 $p=0,020$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	70,9±2,2 $p=0,078$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$	72,3±1,4 $p=0,063$ $p_1=0,0001$ $p_2<0,0001$

Примечание: p – вероятность ошибки I рода по отношению к контролю с инфарктом миокарда; p_1 – по отношению к ложнооперированному контролю; p_2 – по отношению к исходному уровню.

препарату доксициклину. Выбор доксициклина в качестве эталонного препарата основан на том, что тетрациклины, в частности доксициклин, помимо собственно антибактериальной активности, обладают рядом плеiotропных эффектов, в том числе и способностью блокировать гиперпродукцию ММП-2 и ММП-9 в ишемизированном миокарде и тем самым препятствовать раннему постинфарктному ремоделированию миокарда [4, 8]. Не менее важно и то, что доксициклин является первым лекарственным средством, обладающим свойствами ингибитора ММП, которое было разрешено FDA к применению в клинике по этим показаниям [15].

В следующей серии экспериментов оценивали способность соединения-лидера (Ia) препятствовать ремоделированию миокарда в острейшую фазу экспериментального инфаркта миокарда. Показано, что одномоментная перевязка коронарной артерии в контрольной группе животных повлекла за собой выраженные изменения систолической функции левого желудочка. На третьей минуте после окклюзии коронарного сосуда конечно-систолический размер (КСР) левого желудочка увеличился с 1,98 до 3,11 мм;

фракция выброса (ФВ) уменьшилась с 88,40 до 67,00%. Фракция укорочения (ФУ) снизилась с 53,17 до 32,27%. Этот процесс динамически нарастает во времени и достигает своего максимума в период с 10-й по 20-ю минуту после перевязки. Так, например, к 20-й минуте КСР увеличился с 1,98 до 3,84 мм, а ФВ уменьшилась с 88,4 до 58,0%. В период с 30-й по 60-ю минуту от момента перевязки коронарной артерии отмечено постепенное относительное улучшение показателей, характеризующих систолическую функцию левого желудочка, однако все они статистически значимо отличались от исходного уровня (табл. 1).

В группе животных ($n=9$), получавших доксициклин (40 мг/кг, *per os*), одномоментная перевязка коронарной артерии также влекла за собой снижение систолической функции левого желудочка сердца, однако в первые 20 мин от момента начала ишемии интенсивность этого процесса была статистически значимо ниже (табл. 1, рис. 3, 4). Так, например, к 20-й минуте ишемии у контрольных животных КСР увеличивался с 1,98 до 3,84 мм, т. е. практически в 2 раза, тогда как у животных, получавших доксициклин, увеличение КСР составило менее 60% (соответственно,

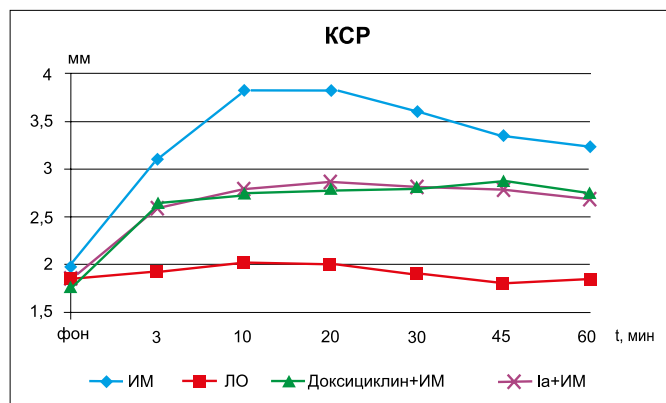


Рис. 3. Влияние соединения Ia на динамику изменения конечно-систолического размера (КСР) у крыс в острой фазе инфаркта миокарда.

Примечание: ИМ — острый инфаркт миокарда (контроль); ЛО — ложнооперированные животные; ДЦ+ИМ — эталонный препарат доксициклин+инфаркт миокарда; Ia+ИМ — соединение Ia+инфаркт миокарда

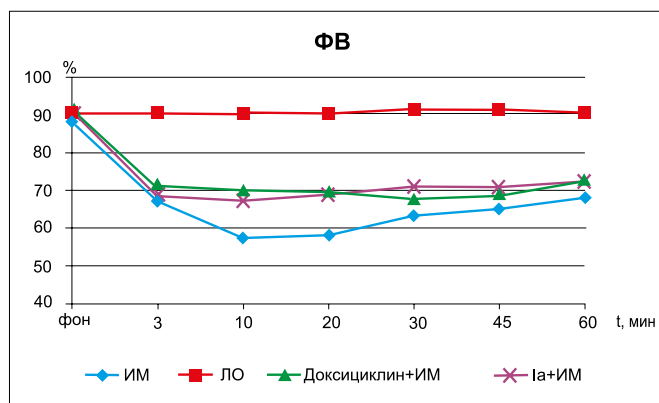


Рис. 4. Влияние соединения Ia на динамику изменения фракции выброса (ФВ) у крыс в острой фазе инфаркта миокарда.

Примечание: ИМ — острый инфаркт миокарда (контроль); ЛО — ложнооперированные животные; ДЦ+ИМ — эталонный препарат доксициклин+инфаркт миокарда; Ia+ИМ — соединение Ia+инфаркт миокарда

с 1,77 до 2,80 мм) — различия статистически значимы ($p=0,004$) (табл. 1, рис. 3). К этому моменту у контрольных животных ФВ снизилась с 88,4 до 58,0%, т. е. на 34%, а у животных, получавших доксициклин — менее чем на 25% (соответственно, с 91,4 до 69,5%) — различия статистически значимы ($p=0,002$) (табл. 1, рис. 4). Начиная с 30-й минуты ишемии, показатели, характеризующие систолическую функцию левого желудочка сердца, в группе животных, получавших доксициклин, статистически значимо не отличались от таковых, зарегистрированных в это же время в контрольной группе.

В группе животных ($n=6$), получавших соединение Ia (30 мг/кг, *per os*), одномоментная перевязка коронарной артерии, так же как в контроле и в группе животных, получавших доксициклин, влекла за собой снижение систолической функции левого желудочка сердца, однако в первые 20 минут от момента начала ишемии интенсивность этого процесса была статистически значимо ниже, чем в контроле (табл. 1, рис. 2-3). Так, например, к 20-й минуте ишемии у контрольных животных КСР увеличивался с 1,98 до 3,84 мм, т. е. практически в 2 раза, тогда как у животных, получавших соединение Ia, увеличение КСР составило, так же как и в случае доксициклина, менее 60% (соответственно, с 1,84 до 2,87 мм),

различия статистически значимы ($p=0,007$) (табл. 1, рис. 2). К этому моменту у контрольных животных ФВ снизилась с 88,4 до 58,0%, т. е. на 34%, а у животных, получавших соединение Ia — менее чем на 25% (соответственно, с 90,5 до 68,9%) — различия статистически значимы ($p=0,001$) (табл. 1, рис. 3). Если различия в показателях, отражающих систолическую функцию сердца в период максимального падения сократимости миокарда (10–20-я минуты ишемии) между контрольной группой и группой животных, получавших соединение Ia, статистически значимы, то различия в величине КСР и ФВ между группами, получавшими доксициклин и соединение Ia, практически отсутствуют: соответственно $p=0,840$ и $p=0,587$.

Таким образом, в ряду бензоиламино(фенилсульфонил)-замещённых циклических аминокислот выявлено соединение — лидер: 1-(4-[(4-хлорбензоил)амино]фенил)сульфонил-L-пролин, — которое по своей способности как препятствовать раннему постинфарктному ремоделированию миокарда, так и подавлять экспрессию ММП-9, как минимум, не уступает эталонному ингибитору металлопротеиназ доксициклину. Полученные данные составляют основу для дальнейшего фармакологического изучения соединения-лидера.

Литература

1. Гасанов А.Г., Бершова Т.В. Роль изменений внеклеточного матрикса при возникновении сердечно-сосудистых заболеваний. Биомед. химия. 2009; 55: 2: 155–168.
2. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Столярук В.Н., Сорокина А.В., Вититнова М.Б., Мирошкина И.А. Доказательство валидности эхокардиографии в модельных экспериментах

на мелких животных. Бюл. эксп. биол. и медицины. 2016; 161: 3: 416–420.

3. Ali M.A., Fan X., Schulz R. Cardiac sarcomeric proteins: novel intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in heart disease. Trends Cardiovasc. Med. 2011; 21: 4: 112–118.
4. Bench T.J., Jeremias A., Brown D.L. Matrix metalloproteinase inhibitor with tetracyclines for the treatment of coronary artery disease. Pharmacol. Res. 2011; 64: 561–566.

5. Bencsik P., Pálóczi J., Kocsis G.F., Pipis J., Beleczi I., Varga Z.V., Csonka C., Görbe A., Csont T., Ferdinandy P. Moderate inhibition of myocardial matrix metalloproteinase-2 by ilomastat is cardioprotective. *Pharmacol. Res.* 2014; 80: 36–42.
6. Chang S.A., Chang H.J., Choi S.I., Chun E.J., Yoon Y.E., Kim H.K., Kim Y.J., Choi D.J., Sohn D.W., Helm R.H., Lardo A.C. Usefulness of left ventricular dyssynchrony after acute myocardial infarction, assessed by a tagging magnetic resonance image derived metric, as a determinant of ventricular remodeling. *Am.J. Cardiol.* 2009; 104: 1: 19–23.
7. Gallagher G.L., Jackson C.J., Hunyor S.N. Myocardial extracellular matrix remodeling in ischemic heart failure. *Front. Biosci.* 2007; 12: 1410–1419.
8. Griffin M.O., Fricovsky E., Ceballos G., Villarreal F. Tetracyclines: a pleotropic family of compounds with promising therapeutic properties. Review of the literature. *Am.J. Physiol. Cell. Physiol.* 2010; 299: 539–548.
9. Henderson K.K., Danzi S., Paul J.T., Leya G., Klein I., Samarel A.M. Physiological replacement of T3 improves left ventricular function in an animal model of myocardial infarction-induced congestive heart failure. *Circ. Heart Fail.* 2009; 2: 3: 243–252.
10. Hori M., Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 2009; 81: 3: 457–464.
11. Hughes B.G., Fan X., Cho W.J., Schulz R. MMP-2 is localized to the mitochondria-associated membrane of the heart. *Am.J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014; 306: 5: H764–H770.
12. Hughes B.G., Schulz R. Targeting MMP-2 to treat ischemic heart injury. *Basic Res Cardiol* 2014; 109(4):424.
13. Jugdutt B.J. The dog model of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Card. Fail.* 2002; 8: 6 Suppl: S472–S475.
14. Kandasamy A.D., Chow A.K., Ali M.A., Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc. Res.* 2010; 85: 3: 413–423.
15. Lindsey M.L. Matrix Metalloproteinase-9 Post Myocardial Infarction: Breakdowns and Breakthroughs. *Global J. Hum. Anat. Physiol. Res.* 2014; 1: 6–9.
16. Moshal K.S., Rodriguez W.E., Sen U., Tyagi S.C. Targeted deletion of MMP-9 attenuates myocardial contractile dysfunction in heart failure. *// Physiol. Res.* — 2008. — Vol. 57, № 3. — P. 379–384.
17. Shamhart P.E., Meszaros J.G. Non-fibrillar collagens: key mediators of post-infarction cardiac remodeling? *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2010; 48: 3: 530–537.
18. Spinale F.G. Myocardial matrix remodeling and the matrix metalloproteinases: Influence on cardiac form and function. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 1285–1342.
19. Tiyyagura S.R., Pinney S.P. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: past, present, and future. *Mt. Sinai J. Med.* 2006; 73: 6: 840–851.
20. Zhou S.X., Zhou Y., Lei J., Zhang Y.L. Effects of oxidative stress on ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2008; 28: 11: 2030–2034.

Влияние гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге при экспериментальном паркинсоническом синдроме

*Иванова Е.А., Капица И.Г., Золотов Н.Н., Вальдман Е.А., Непоклонов А.В.,
Колясникова К.Н., Воронина Т.А.*

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

Резюме. На двух моделях паркинсонического синдрома (ПС), индуцированного 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридином (МФТП) у мышей C57BL/6 и 6-гидроксидофамином (6-ГОДА) у крыс, показана способность нового противопаркинсонического препарата гимантана в эффективной дозе 10 мг/кг при двух режимах введения (5 дней до нейротоксина МФТП и совместно с ним в течение 5 дней, а также при введении в течение 21 дня на фоне развивающегося 6-ГОДА индуцированного ПС) ослаблять вызываемую нейротоксинами активацию перекисного окисления липидов. Введение гимантана приводило к снижению уровней малонового альдегида и диеновых конъюгатов во фронтальной коре и стриатуме. Полученные данные согласуются с ранее установленными антиоксидантными свойствами гимантана.

Ключевые слова: гимантан, модели паркинсонического синдрома, МФТП, 6-ГОДА, перекисное окисление липидов, малоновый альдегид, диеновые конъюгаты

Effects of Hemantane upon the level of lipid peroxidation in brain in experimental parkinsonian syndrome

*Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Zolotov N.N., Valdman E.A., Nepoklonov A.V.,
Kolyasnikova K.N., Voronina T.A.*

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. In two animal models of parkinsonian syndrome – induced by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in C57BL/6 mice and 6-hydroxydopamine (6-OHDA) in rats novel antiparkinsonian drug hemantane was shown to reduce the increase of brain level of lipid peroxidation caused by both neurotoxins. In prefrontal cortex and striatum of mice which were treated with hemantane 10 mg/kg 5 days before MPTP and 5 days together with MPTP and in rats which received hemantane during 21 days after 6-OHDA injection in medial forebrain bundle the levels of malondialdehyde and conjugated dienes were significantly lower than in untreated animals. The data obtained is consistent with antioxidant properties of hemantane.

Keywords: hemantane, experimental parkinsonian syndrome, MPTP, 6-OHDA, lipid peroxidation, malondialdehyde, conjugated dienes

Автор, ответственный за переписку:

Вальдман Елена Артуровна — д.м.н., профессор, ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, Балтийская ул. 8; evaldman@mail.ru

Введение

Болезнь Паркинсона — распространённое нейродегенеративное заболевание, поиск средств патогенетической терапии которого остаётся крайне актуальным.

Гимантан — новый оригинальный препарат, созданный в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, обладает выраженной противопаркинсонической активностью, доказанной на экспериментальных моделях [1–3], и подтверждённой в клинике у больных с начальными стадиями болезни Паркинсона [4].

Установлен комплексный механизм действия гимантана. Препарат оказывает влияние на несколько известных звеньев патогенеза болезни Паркинсона. Гимантан модулирует дофаминергическую нейротрансмиссию [5], является блокатором ионных каналов глутаматных рецепторов NMDA подтипа [6], ингибирует MAO-B

[7], обладает противовоспалительной активностью [8].

Одной из установленных причин прогрессирующей гибели дофаминергических нейронов при болезни Паркинсона являются повреждения, вызванные оксидативным стрессом. Подтверждение роли свободных радикалов в развитии нигральной дегенерации при БП получено в экспериментальных исследованиях и при изучении чёрной субстанции умерших от болезни Паркинсона, где установлено наличие как оксидативного стресса (снижение уровня глутатиона), так и оксидативных повреждений (увеличение перекисного окисления липидов и повреждений ДНК) [9].

Цель исследования

Целью настоящего исследования явилась оценка эффектов гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в структурах головного мозга

на двух моделях паркинсонического синдрома — у мышей C57BL/6 с МФТП-индуцированным ПС и крыс с 6-ГОДА индуцированным ПС.

Методы

Моделирование паркинсонического синдрома у мышей линии C57BL/6 проводили путём системного введения МФТП. Эксперименты проводили на мышках-самцах линии C57BL/6 массой 20–22 г. МФТП вводили в дозе 20 мг/кг один раз в сутки 5 дней. Гимантан 10 мг/кг вводили внутривентриально 5 дней до начала введения МФТП, затем вместе с МФТП. Животным контрольных групп вводили по этой схеме только физиологический раствор, МФТП и физиологический раствор или физиологический раствор и гимантан. Животных декапитировали через 24 ч после последней инъекции и извлекали стриатум и фронтальную кору.

Паркинсонический синдром у крыс вызывали введением нейротоксина 6-ГОДА (12 мкг) в средний переднемозговой пучок (MFB) левого полушария головного мозга по стереотаксическим координатам. Контрольную группу животных (ложно оперированные животные) подвергали такой же операции с введением физиологического раствора. Через 15 дней после введения 6-ГОДА отбирались животные со сформировавшимся паркинсоническим синдромом по результатам тестирования в тесте «цилиндр», позволяющем выявить нарушения двигательной функции на контралатеральной стороне введения нейротоксина конечности [10]. Отобранные животные были разделены на 2 группы, которым на протяжении 21 дня ежедневно внутрь вводили гимантан в дозе 10 мг/кг или физиологический раствор. На 21-й день животных декапитировали, извлекали структуры мозга — фронтальную кору и стриатум.

Определение продуктов перекисидации липидов в гомогенатах структур мозга мыши. Гомогенат (5% масса/объём) готовили из точных навесок ткани соответствующей структуры мозга и 19 объёмов забуференного фосфатом физиологического раствора, содержащего 0,1 ммоль/л ионола (Fluka, Швейцария)

при помощи ультразвукового дезинтегратора УЗДГН-1 при 22 кГц в течение 5 с при температуре 0 °С.

Определение диеновых конъюгатов (ДК). К 50 мкл гомогената добавляли 1 000 мкл смеси для экстракции (н-гептан-пропанол-2 = 1:1, по объёму). Образцы интенсивно встряхивали 2 раза по 10 сек на встряхивателе типа Вортекс. Образцы центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин. К 900 мкл супернатанта добавляли 100 мкл воды для разделения фаз и интенсивно встряхивали 2 раза по 10 с и центрифугировали при 3 000 об/мин в течение 10 мин. Отбирали по 300 мкл верхней гептановой фазы и добавляли по 1 200 мкл 95% этанола. Оптическую плотность образцов определяли на спектрофотометре DU-50 (Beckman-Coulter, США) в полумикрокувете при 233 нм. Расчёт количества ДК проводили на основании значения коэффициента молярной экстинкции $2,2 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Все измерения проводили в 3 параллелях.

Определение малонового диальдегида (МДА). К 50 мкл гомогената добавляли 20 мкл 0,485 М соли Мора и инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Затем к образцам добавляли 1 030 мкл 0,9% раствора 2-тиобарбитуровой кислоты (Serva, Германия) в 50% уксусной кислоте, интенсивно встряхивали и инкубировали при 80 °С в течение 60 мин. После охлаждения измеряли оптическую плотность образцов на спектрофотометре DU-50 (Beckman-Coulter, США) в полумикрокувете при 532 нм. Расчёт количества МДА проводили на основании значения коэффициента молярной экстинкции $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Все измерения проводили в 3 параллелях

Результаты

Введение МФТП в дозе 20 мг/кг один раз в сутки в течение 5 дней вызывало достоверное повышение уровня МДА и ДК в стриатуме и ДК в коре мышей линии C57BL/6 по сравнению с группой, которой вводился физиологический раствор.

Предварительное до МФТП (5 дней) и затем на фоне МФТП (5 дней) введение гимантана в дозе 10 мг/кг в сутки предотвращало повышение уровня продуктов

Таблица 1

Влияние МФТП и гимантана на уровень продуктов ПОЛ — малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) в коре и стриатуме мышей C57BL/6

Группы	ДК (мкмоль/мг)		МДА (мкмоль/мг)	
	Кора	Стриатум	Кора	Стриатум
Физ. раствор	2,25±0,4	2,14±0,66	13,23±3,47	12,25±2,37
Физ. раствор + гимантан	2,1±0,44	2,31±0,57	8,92±0,99*	10,72±1,31
МФТП + физ. р-р.	4,4±0,78**	5,37±1,05**	14,39±2,16	16,16±1,96**
Гимантан + МФТП	3,54±1,19	3,66±0,73##	10,67±1,42##	12,47±2,66#

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ в сравнении с группой «физ. р-р»; # — $p < 0,05$; ## — $p < 0,01$ в сравнении группой «МФТП».

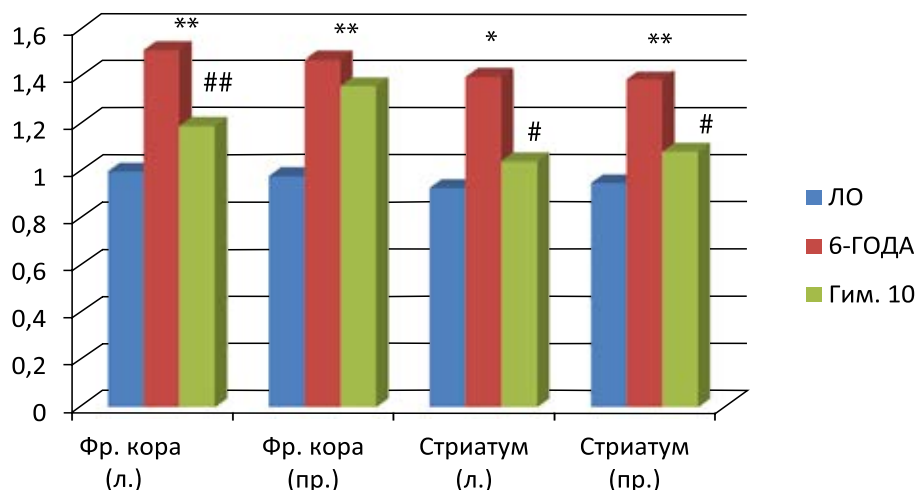


Рис. 1. Влияние гинмантана на содержание малонового диальдегида (МДА) во фронтальной коре и стриатуме крыс с 6-ГОДА индуцированным паркинсоническим синдромом.

Примечание: * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой ложно оперированных крыс; # — $p < 0,05$, ## — $p < 0,01$ по сравнению с группой крыс с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом без применения препаратов; ЛО — группа ложно оперированных животных; 6-ГОДА — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом; Гим 10 — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом, получавших внутрь гинмантан в дозе 10 мг/кг

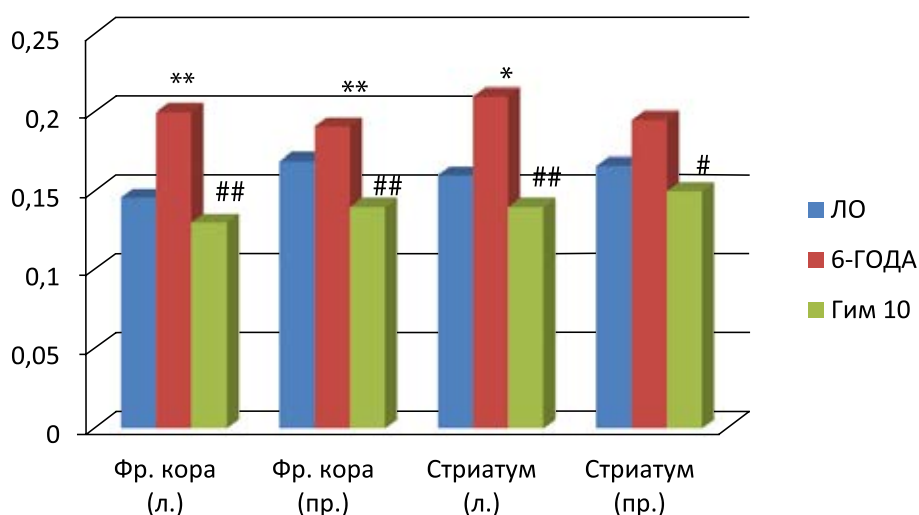


Рис. 2. Влияние гинмантана на содержание диеновых конъюгатов (ДК) во фронтальной коре и стриатуме крыс с 6-ГОДА индуцированным паркинсоническим синдромом.

Примечание: * — $p < 0,05$; ** — $p < 0,01$ по сравнению с группой ложно оперированных крыс; ## — $p < 0,01$ по сравнению с группой крыс с 6-ГОДА-индуцированным паркинсоническим синдромом без применения препаратов; ЛО — группа ложно оперированных животных; 6-ГОДА — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом; Гим 10 — группа крыс с индуцированным 6-ГОДА паркинсоническим синдромом, получавших внутрь гинмантан в дозе 10 мг/кг

ПОЛ в исследованных структурах. Уровни МДА и ДК в стриатуме и МДА в коре были достоверно ниже по сравнению с группой животных, которым вводился только нейротоксин МФТП (табл. 1).

На модели индуцированного 6-ГОДА ПС было зарегистрировано достоверное увеличение уровня МДА в обеих изученных структурах головного мозга крыс как на стороне введения 6-ГОДА, так и на контралатеральной стороне (рис. 1). Содержание ДК было достоверно выше во фронтальной коре и левом стриатуме по сравнению с группой ложно оперированных крыс (рис. 2).

У животных, которым вводили гинмантан 10 мг/кг в течение 21 дня, уровень МДА в стриатуме и фронтальной левой коре был достоверно ниже, чем у нелеченных (см. рис. 1), а содержание ДК ниже во всех изученных структурах по сравнению с группой крыс, у которых развивался 6-ГОДА индуцированный ПС без лечения гинмантаном (см. рис.2).

Механизмы нейротоксического действия 6-ГОДА и МФТП включают образование активных форм кислорода (АФК), вызывающих каскад процессов, приводящих к развитию апоптоза [11, 12].

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что гимантан в эффективной дозе 10 мг/кг при двух режимах введения (5 дней до нейротоксина МФТП и совместно с ним в течение 5 дней, а также при введении в течение 21 дня) на фоне развивающегося 6-ГОДА индуцированного ПС способен ослаблять вызываемую нейротоксинами активацию ПОЛ. Полученные данные согласуются с ранее установленными антиоксидантными свойствами гимантана в бесклеточной среде [3].

К настоящему времени накоплен большой объем научных данных, подтверждающих, что воспаление, митохондриальная дисфункция, образование свободных радикалов и оксидативный стресс, нарушение защиты нейротрофическими факторами вносят вклад

в развитие дегенерации nigrostriatalных нейронов. Роль каждого из факторов доказана, однако первостепенность какого-либо из них не определена до сих пор. Поэтому наиболее адекватным подходом к разработке средств предупреждения или замедления развития заболевания, т. е. нейропротекторных препаратов, является поиск препаратов с поликомпонентным механизмом действия или подбор комбинаций препаратов, влияющих на ключевые звенья процесса нейродегенерации. Наличие антиоксидантной активности в спектре эффектов гимантана подтверждает перспективность его дальнейшего изучения в качестве средства патогенетической терапии болезни Паркинсона.

Литература

1. Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Противопаркинсоническая активность нового производного адамантана. Экспериментальная и клиническая фармакология. 1999; 4: 3–7.
2. Капица И.Г., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Изучение эффектов инъекционной формы гимантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2012; 2: 10–17.
3. Вальдман Е.А. Разработка фармакологического средства патогенетической терапии паркинсонизма на основе анализа механизмов действия производных аминадамантана. Автореф. дисс. мед.наук. М.: 2001; 44.
4. Катунина Е.А., Петрухова А.В., Вальдман Е.А., Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Саядян Х.С. Возможность применения гимантана при лечении болезни Паркинсона. Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2008; 108: 6: 24–27.
5. Абаимов Д.А., Зимин И.А., Ковалёв Г.И. Влияние гимантана на основные подсистемы дофаминовых рецепторов стриатума крыс ex vivo. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2008; 71: 1: 18–21.
6. Елианская М.В., Вальдман Е.А., Соболевский А.И., Ходоров Б.И. Взаимодействие потенциального противопаркинсонического средства производного адамантана с ионными каналами глутаматных рецепторов MNDA подтипа. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2001; 64: 1: 18–21.

7. Вальдман Е.А., Капица И.Г., Неробкова Л.Н., Аксенова Л.Н., Бунеева О.А., Медведев А.Е. Влияние длительного введения мышам изатина и гимантана на чувствительность моноаминоксидазы Б мозга к ингибированию деприлом in vivo и in vitro. Биомедицинская химия. 2004; 50: 5: 509–514.
8. Иванова Е.А., Капица И.Г., Непоклонов А.В., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом. Химико-фармацевтический журнал. 2013; 47: 10: 12–15.
9. Zhang J., Perry G., Smith M.A., Robertson D., Olson S.J., Graham D.G., Montine T.J. Parkinson's disease is associated with oxidative damage to cytoplasmic DNA and RNA in substantia nigra neurons. Neuroscience. 1999; 94: 1238–1299.
10. Schallert T. and Jones T.A. «Exuberant» neuronal growth after brain damage in adult rats: The essential role of behavioral experience. Journal of Neural Transplantation & Plasticity. 1993; 4: 193–198.
11. Latchoumycandane C., Anantharam V., Jin H., Kanthasamy A. Dopaminergic neurotoxicant 6-OHDA induces oxidative damage through proteolytic activation of PKCδ in cell culture and animal models of Parkinson's disease. Toxicology and applied Pharmacology. 2011; 256 (3): 314–323.
12. Kanthasamy A., Jin H., Mehrotra S., Mishra R., Kanthasamy A., Rana A. Novel Cell Death Signaling Pathways in Neurotoxicity Models of Dopaminergic Degeneration: Relevance to Oxidative Stress and Neuroinflammation in Parkinson's Disease. Neurotoxicology. 2010; 31 (5): 555–561.

Аскорбат лития улучшает адаптацию к стрессу на моделях *in vitro* и *in vivo*

Громова О.А.¹, Торшин И.Ю.², Сардарян И.С.³, Остренко К.С.⁴,
Пронин А.В.¹, Стельмашук Е.В.⁵, Хаспеков Л.Г.⁵

¹ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

² – БАОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Москва

³ – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

⁴ – ФГБНУ «ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных», Калужская обл., г. Боровск

⁵ – ФГБНУ «Научный Центр Неврологии», г. Москва

Резюме. В настоящей работе представлены результаты исследований *in vitro* и *in vivo* воздействия аскорбата лития на адаптацию к стрессу. Представлены результаты исследований нейрцитологических и экспериментальных моделей стресса. Установлен нейропротекторный эффект аскорбата лития на модели глутаматного стресса в культуре зернистых нейроцитов мозжечка. Эксперименты на моделях транспортного и иммобилизационного стресса подтвердили адаптогенное воздействие аскорбата лития.

Ключевые слова: стресс, глутаматная модель, адаптогены, аскорбат лития

Lithium ascorbate improves adaptation to stress on models *in vitro* and *in vivo*

Gromova O.A.¹, Torshin I.Yu.², Sardaryan I.S.³, Ostrenko K.S.⁴,

Pronin A.V.¹, Stel'mashuk E.V.⁵, Khaspekov L.G.⁵

¹ – FSBI HPE «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo

² – Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

³ – FSBI HPE «St. Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

⁴ – All-Russian research institute of physiology, biochemistry and food of animals

⁵ – Russian Academy of Sciences, Moscow

Abstract. The paper presents the results of studies of lithium ascorbate on the models of stress *in vitro* and *in vivo*. The results show significant neuroprotective effect of lithium ascorbate on the model of glutamate stress in the culture of grainy neurocytes. Experiments on models of transport and immobilization stress confirmed the adaptogenic effects of lithium ascorbate.

Keywords: stress, glutamate models, adaptogens, lithium ascorbate

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России, 153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

В норме, адаптация к неблагоприятной окружающей среде вызывает мобилизацию адаптационных возможностей и организм, таким образом, «сопротивляется» воздействию «вызовов» окружающей среды, т. е. неблагоприятных внешних факторов (стрессорам). Когда вследствие тех или иных причин адаптация организма к стрессорам нарушается наступает т. н. «стадия истощения» («дистресс»), хронизация которой стимулирует развитие различных патологий [1].

В частности, хронический стресс снижает жизнеспособность нейронов и способствует развитию нейродегенеративной патологии. Даже умеренный хронический стресс приводит к снижению синаптической передачи, повышает накопление бета-амилоида и гиперфосфорилирование тау-белка [2–4] — т. е. к характерным молекулярно-физиологическим признакам нейродегенерации. Например, в работе [5] было показано, лёгкий, но непредсказуемый хронический стресс, стимулирует гиперфосфорилирование тау-белка. Отметим, что эти эффекты осуществляются на фоне избыточной активации NMDA (глутаматных) рецепторов, что приводит к т. н. «эксайтотоксичности» и гибели нейронов [6].

Дефицит лития способствует развитию хронического стресса. Литий является эссенциальным микроэлементом, необходимым для нормального функционирования нервной системы. Значительный массив данных по клинической и экспериментальной фармакологии указывает на нейротрофические и нейропротекторные эффекты лития. Литий способствует повышению скорости роста нейронов и повышению устойчивости к окислительному стрессу [7], улучшению пространственной памяти, предотвращает негативное влияние хронического стресса на пространственную память [8]. Применение препаратов лития повышает синтез нейротрофических факторов мозга (BDNF, NGF) и, также, останавливает процессы предотвращает гибель нейронов через модуляцию

каскадов апоптоза PI3K/Akt/GSK3 (25-МФ). Клинические исследования показывают, что литиевая терапия вызывает увеличение объема серого вещества [9–11].

В настоящей работе представлены результаты исследований эффектов воздействия аскорбата лития на выживаемость нейронов в культуре в условиях глутаматного стресса и

экспериментальных исследований, указывающих на адаптогенные свойства этой формы органического лития.

Материалы и методы

Экспериментальные исследования

Основной задачей экспериментального исследования являлась оценка эффективности субстанции аскорбата лития на моделях стресса при парентеральном введении препарата в различных дозировках. Воздействие стресса *in vitro* изучено на клеточных моделях в культурах зернистых нейроцитов в условиях глутаматного стресса и *in vivo* на 2-х месячных крысах линии Вистар в условиях транспортного и иммобилизационного стресса.

Было сформировано 5 групп, по 36 животных в каждой. Группы подобраны по принципу парных аналогов. За 7 сут до начала эксперимента животные выдерживались в карантине. Крысы всех групп содержались в стандартных условиях вивария, в клетках по 18 животных. Корм — премикс ПЛЖ (в соответствии с ГОСТ Р 50258–92), подстилка мелкая сухая стружка. 1-я группа — модель стресса, контроль (крысы получают воду); 2-я группа — модель стресса, аскорбат лития в дозе 120 мг/кг веса животного; 3-я группа — модель стресса, аскорбат лития в дозе 60 мг/кг; 4-я группа — модель стресса, дозировка аскорбата лития 30 мг/кг; 5-я группа — интактные крысы (без модели стресса).

Аскорбат лития вводился животным со 2-й по 4 группу в виде раствора посредством зондирования, в качестве растворителя используется вода для инъекций («Буфус Новосибирхимфарм»), объем введения — 1,5 мл. Раствор вводится в одно время через 2 часа после утреннего кормления. В 5-й группе применялся препарат в виде капсул.

В группах 2–4 препарат принимался в течение 3-х недель. Каждую неделю, для определения стресс-протекторного свойства соли аскорбата лития применялись стандартные стресс тесты для доклинического исследования новых лекарственных веществ: тест на подвешивание и тест на имитацию транспортного стресса.

Тест на подвешивание. Животное подвешивалось на 24 часа. После этого производился отбор цельной крови, кровь из подъязычных сосудов. Полученную цельную кровь помещали в две пробирки. Для исследования количества эозинофилов по методу Дункера использовали цельную кровь. Для определения биохимического состава крови использовалась сыворотка. В качестве биохимических показателей определились

адреналин, норадреналин. Данные показатели являются специфическими маркерами выявления воздействия стресс-факторов различной этиологии. После помещения репрезентативных животных ($n=6$) в эксикатор с диэтиловым эфиром проводилась спинальная декапитация на предмет обследования брюшной полости и подсчета количества язв на внутренней поверхности желудка.

Тест на имитацию транспортного стресса. Производился отбор 5 животных из каждой группы. В качестве модели для имитации транспортного стресса использовали Шейкер вращающий универсальный Unimax-1010. Скорость вращения 120 оборотов в минуту в течение 240 минут. На площадке закреплялась клетка, в которую помещались 5 голов животных. Крысы находились в клетке в свободном состоянии. Наблюдали изменение реакции животных при продолжительном введении препарата. Были проведены три последовательности эксперимента с периодичностью 7 дней. Продолжительность теста 240 минут. По окончании теста на основании методик, описанных выше проводилось изучение состояния организма животных. Также, определялись ферменты в сыворотке крови: аланинаминотрансфераза (АЛТ); аспартатаминотрансфераза (АСТ), креатинин.

Тест открытое поле (ОП). В тесте регистрировали горизонтальную и вертикальную двигательную активность, груминг, обнюхивание отверстий, дефекацию. Кроме того, в ОП мы наблюдали за отклонениями в моторной сфере, такими как шаткость походки, тремор и т. п.

Горизонтальная двигательная активность (ГДА) животных в ОП включает побежки по разным траекториям, вплоть до кружения вокруг одного места. Основным критерием для идентификации данной формы поведения является участие в перемещении животного всех четырех лап. Регистрируют ГДА на периферии, в 2/3 и в центре арены.

Вертикальная двигательная активность (ВДА) животных в ОП представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние упираются в стенку поля (англ. «climbing») или остаются на весу (англ. «rearing»).

Обследование отверстий (находящихся в полу арены) представляет собой обнюхивание краев отверстий или засовывание головы внутрь отверстий до уровня глаз.

Груминг животных в ОП можно условно разделить на две категории: короткий и длительный. Короткий груминг характеризуется 1–2 быстрыми круговыми движениями лап вокруг носа и небольшой области около него, а длительный — умыыванием области глаз, заведением лап за уши и переходом на умыывание всей головы, лап, боков, туловища, аногенитальной области, хвоста. Целесообразно отдельно обсчитывать число актов короткого и длительного груминга за тестовый период.

Уровень дефекации считается индексом «эмоциональности» животного. Для определения уровня дефекации (и, соответственно, эмоциональности) многие исследователи подсчитывают число болюсов, оставленных животным во время пребывания в экспериментальной установке.

Исследования на нейронах в культуре

В работе использовались 7–8-суточные культуры, полученные методом ферментно-механической диссоциации клеток мозжечка 7-дневных крыс по ранее описанной методике [12]. Крысы, подвергались летальной дозе эфирного наркоза, после чего 5 мин стерилизовались 70% спиртом. Далее у животного быстро вскрывали череп, извлекали мозжечок и переносили его в пластиковую чашку Петри, заполненную фосфатным буфером, лишённым ионов кальция и магния. Фрагменты ткани инкубировали 15 мин при 37 °С в фосфатном буфере, содержащем 0,05% трипсина, 0,02% ЭДТА и 0,8% глюкозы. После инкубации ткань промывали в двух сменах фосфатного буфера и один раз средой культивирования, далее подвергали механической диссоциации в питательной среде для культивирования. В состав питательной среды входит 90% минимальной среды «Игла», 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 5 мМ KCl и 10 мМ буфера HEPES, pH 7,2–7,4.

Суспензию клеток центрифугировали 1 мин при 1 000 об/мин, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в питательной среде. Культивирование производили в 96-луночных пластиковых планшетах, покрытых полиэтиленгликолем или полилизинном, в питательной среде, где уровень хлорида калия доведён до 25 мМ. В каждую ячейку планшета добавляют по 0,1 мл суспензии клеток.

Культивирование производили 7–8 сут в CO₂-инкубаторе, заполненном газовой смесью (95% воздуха+5% CO₂), при температуре 35,5 °С и относительной

влажности 98%. К этому сроку культивированные зернистые нейроны (КЗН) достигают своей морфологической и нейрохимической зрелости. Состояние культур контролировали ежедневно и на каждом этапе эксперимента путем визуального просмотра в инвертированном микроскопе при фазовом контрасте.

Аскорбат лития, готовился из нового сухого вещества непосредственно перед внесением в среду культивирования. Аскорбат лития взвешивали, растворяли в PBS, стерилизовали фильтрацией. Вещество добавляли в среду культивирования на 2 сут *in vitro* на весь срок культивирования (до 7 сут). Исходя из концентрации вещества в пробирке (10 мМ), его минимально возможное разведение для добавления к культурам 1:10 чтобы сохранить необходимые свойства питательной среды, т. е. 1 мМ. 96-луночные пластиковые планшеты дают возможность тестировать сразу 4 различные концентрации образцов. Были выбраны следующие концентрации: 0,1, 0,2, 0,5 и 1,0 мМ.

Количественную оценку выживаемости клеток производили с помощью прямого подсчёта живых нейронов нейронах с нормальной морфологией на фиксированных препаратах, окрашенных трипановым синим [13, 14]. Клетки-зерна легко идентифицировать прижизненно как небольшие, 7–10 мкм в диаметре, округлые или овальные нейроны. При окраске фиксированных культур трипановым синим хорошо видны ядра КЗН, занимающие большую часть тел нейронов и окруженные тонким ободком цитоплазмы (рис. 1).

На каждую точку брали по 3 культуры, в каждой из которых фотографировали и просчитывали по 5 последовательных полей зрения (как минимум 45 полей зрения из 9-и культур 3-х независимых экспериментов). Количество нейронов с неизменной морфологией в контрольных культурах принимали за 100% выживаемости. Для статистического анализа использовали тест ANOVA с поправками Бонферрони/Даннетта и непараметрический тест Колмогорова-Смирнова,

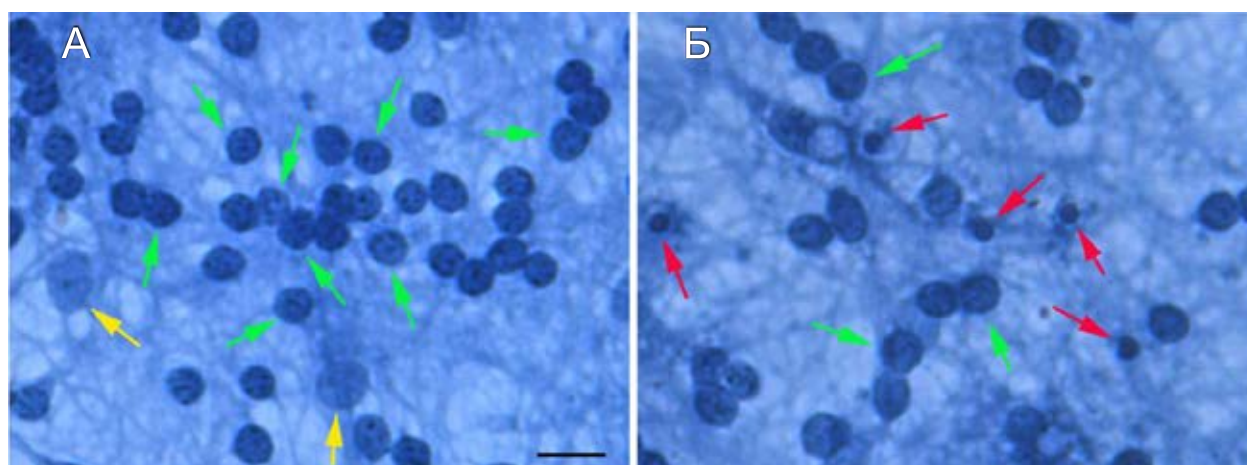


Рис. 1. Первичная диссоциированная фиксированная культура клеток мозжечка, окрашенная трипановым синим.

Примечание: А — контроль, Б — обработка 24 часа глутаматом. Зеленые стрелки указывают на зернистые нейроны с нормальной морфологией, жёлтые — на ядра глиальных клеток, красные показывают пикнотические ядра погибших нейронов. Масштаб 15 мкм

который отличается высокой чувствительностью и который применим к анализу выборок чисел вне зависимости от выполнимости условия нормальности распределения. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Было выполнено моделирование повреждения культур нейронов глутаматом (Sigma, USA, N.G-1626). Глутамат оказывал дозозависимый токсический эффект (рис. 2). Выбор концентрации (из 3-х использованных) проводили в каждом опыте таким образом, чтобы выживаемость КЗН составляла 30–80% от контроля. Именно такая выживаемость позволяет выявлять действие различных веществ на процесс гибели клеток. При выживаемости менее 30 или более 80% нейропротекторные эффекты могут не проявиться.

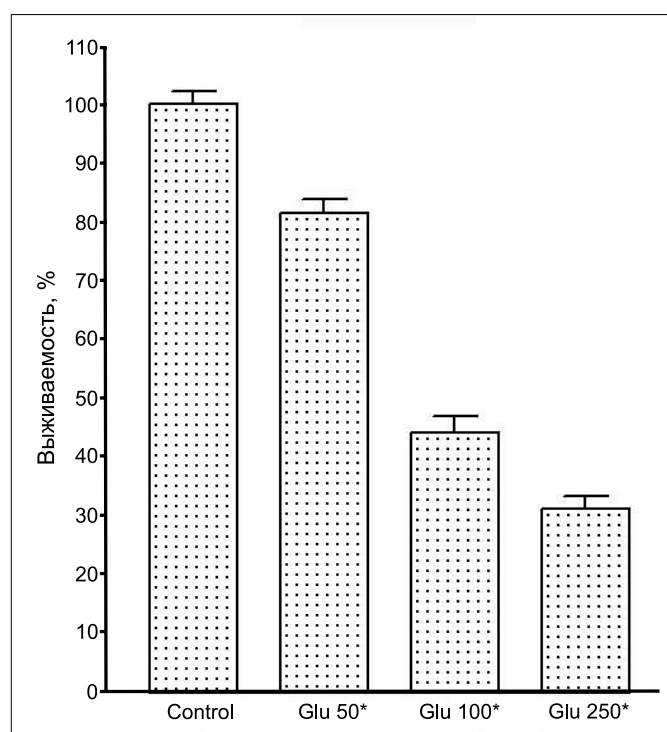


Рис. 2. Влияние глутамата на выживаемость культур (подсчет морфологически неизмененных нейронов на фиксированных окрашенных трипановым синим препаратах)

В дальнейших исследованиях использовали подсчет клеток при действии предполагаемых нейропротекторов, добавляя в питательную среду подобранные токсические концентрации глутамата (100–500 мкМ).

Результаты и обсуждение

Нейроцитологические исследования глутаматной модели стресса

Установлено, что в исследованном диапазоне концентраций (0,1...1,0 ммоль/л) аскорбат лития нетоксичен для нейронов в культуре. Более того, было достоверно подтверждено нейропротекторное

действие аскорбата лития на модели глутаматной нейротоксичности.

Анализ эмпирических функций распределения средних чисел выживших клеток посредством теста Колмогорова-Смирнова показал, что достоверных различий между распределениями чисел клеток при различных концентрациях аскорбата лития (добавляемого к нейронам без использования глутаматной модели стресса) не установлено (рис. 3). Таким образом, в исследованном диапазоне концентраций аскорбат лития не токсичен при непосредственном воздействии на нейроны.

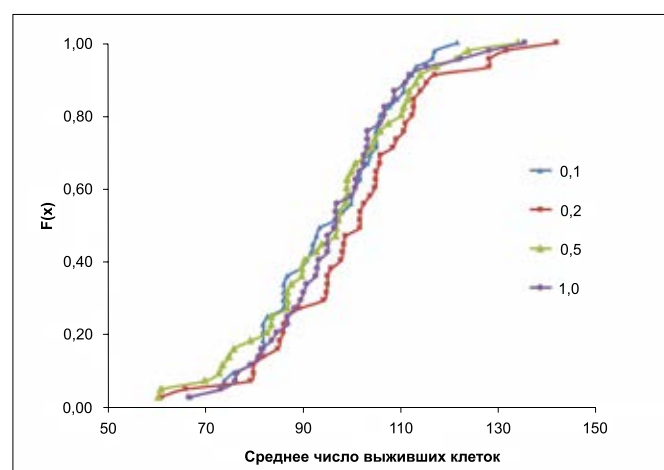


Рис. 3. Эмпирические функции распределения чисел выживших нейронов при различных концентрациях аскорбата лития (ммоль/л), без глутаматной модели стресса.

Примечание: Достоверных отличий не обнаружено



Рис. 4. Эмпирические функции распределения чисел выживших нейронов при различных концентрациях аскорбата лития (ммоль/л) в глутаматной модели стресса (100 мкМ глутамата).

Примечание: Установлены достоверные отличия (тест Колмогорова-Смирнова) для всех использованных концентраций по сравнению с глутаматной моделью без добавления аскорбата лития («Glu»). Указаны значения максимального отклонения «d», на основе которого рассчитывается статистическая достоверность отличий между функциями распределения

Анализ функций распределения средних чисел выживших нейронов (посредством теста Колмогорова-Смирнова) при создании глутаматной модели стресса показал, что результаты экспериментов при всех концентрациях аскорбата лития достоверно отличались от контроля (глутаматная модель нейронального стресса без добавления аскорбата лития, рис. 4). Так, даже использование самой низкой концентрации аскорбата лития, 0,1 ммоль/л, приводило к достоверному отличию ($d=0,19$, $p=0,049$), а при возрастании концентрации выраженность отличий возрастала (значения максимального отклонения « d » возрастали, значения « p » — падали). Более того, для самой высокой концентрации аскорбата лития (1,0 ммоль/л) отличия между глутаматной моделью и интактным контролем были на грани статистической значимости ($d=0,17$, $p=0,059$). Таким образом, аскорбат лития достоверно повышает выживаемость нейронов при глутаматном стрессе, причём во всём исследованном диапазоне концентраций соли лития (0,1...1,0 ммоль/л).

Анализ полученных данных с использованием теста ANOVA показал, что выживание нейронов достоверно повышалось, в среднем, на +12% при цитотоксическом действии глутамата после выращивания клеток с аскорбатом лития при концентрации в 0,2 мМ, причём был отмечен дозозависимый эффект ($p<0,01$, рис. 5).

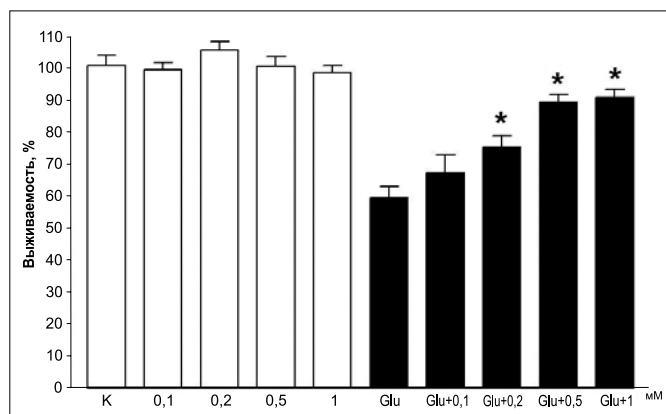


Рис. 5. Нейропротекторное действие аскорбата лития на выживаемость культур нейронов при цитотоксическом действии глутамата.

Примечание: * $p<0,01$, по сравнению с глутаматом без добавок, $n=30$, где n — количество просчитанных полей зрения. Белые «столбики» — эксперименты в отсутствие глутамата, чёрные — на фоне 100 мкМ глутамата

Также, было проведено исследование нейропротекторных свойств аскорбата лития при условии, что вещество добавлялось всего за 3 ч до воздействия глутамата. В соответствии с результатами теста ANOVA установлено защитное действие, хотя и более слабое — выживаемость нейронов достоверно повышалась на 8% при концентрации аскорбата лития в 0,5 мМ (рис. 6).

На рис. 7 приведены примеры фотографий нейронов в культуре, на основе которых проводились

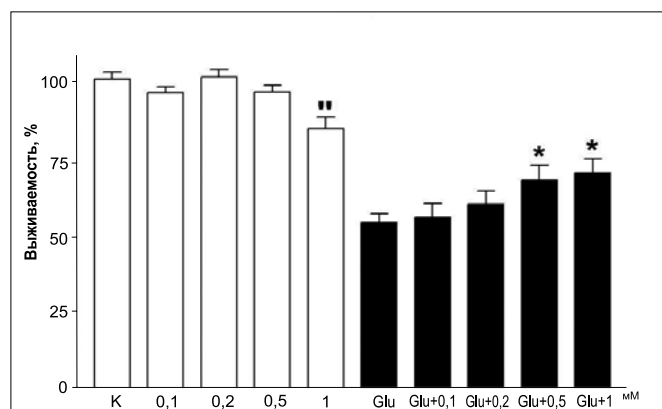


Рис. 6. Воздействие аскорбата лития, добавленного за 3 ч до глутамата на выживаемость культур.

Примечание: $n=15$, где n — количество просчитанных полей зрения. Белые столбики в отсутствие глутамата, чёрные — на фоне 100 мкМ глутамата

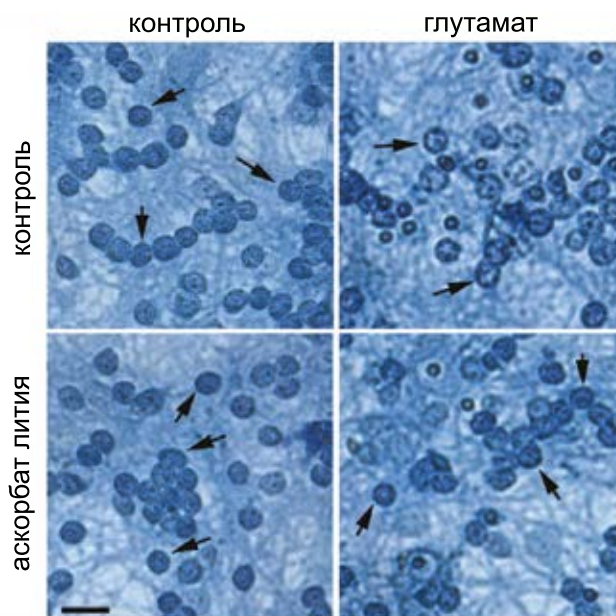


Рис. 7. Нейропротекторное действие аскорбата лития при глутаматной модели стресса (100 мкМ глутамата, 24 ч).

Примечание: Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс указаны стрелками. Нейроны, прошедшие апоптоз выглядят как круги темного оттенка с меньшим радиусом, чем выжившие нейроны. Окраска фиксированных культур трипановым синим. Масштабная планка — 15 мкм

подсчёты числа выживших нейронов. Очевидно, что добавление аскорбата лития в среду, на которой выращиваются нейроны, приводит к увеличению числа выживших нейронов с нормальной морфологией.

Исследование эффектов аскорбата лития именно на глутаматной модели важно именно потому, что стресс приводит к гиперактивации потока сигналов через глутаматные NMDA рецепторы и стимулирует развитие нейродегенеративных изменений. Взаимосвязь между стрессом и молекулярно-физиологическими показателями нейродегенеративных процессов была изучена, например, на модели непредсказуемого хронического стресса [5].

В эксперименте, хронический стресс (иммобилизация) в течение 4-х недель приводил к гиперфосфорилированию тау-белка. Другими признаками нейродегенерации являлось снижение уровней структурных нейрональных белков — белка, ассоциированного с микротрубочками (*map2*) и гамма-синуклеина (SNCG). Идентификация гиперфосфорилированного тау-белка в образцах гиппокампа с использованием антител подтвердила данные иммуногистохимии и указала на повышенный уровень гиперфосфорилированного тау-белка при стрессе по сравнению с контрольной группой (рис. 8) [5].

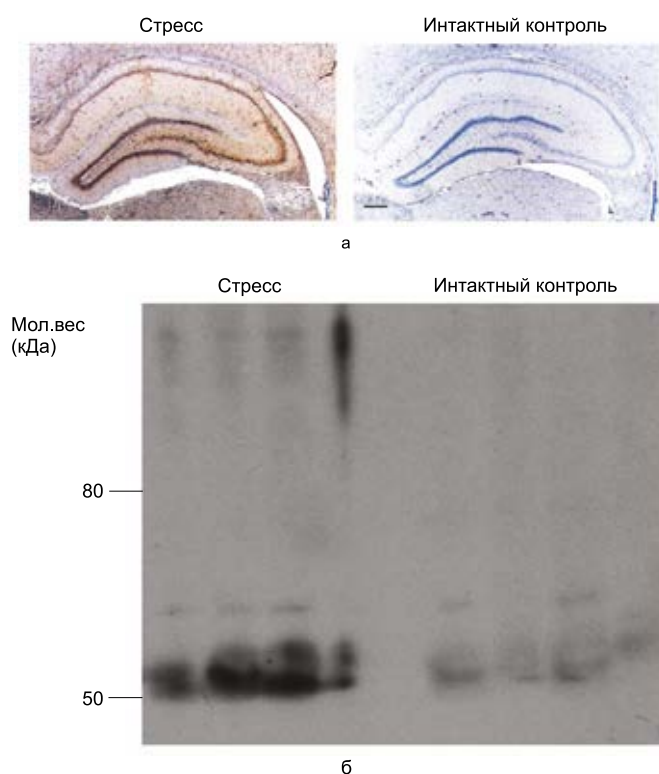


Рис. 8. Гиперфосфорилирование тау-белка в гиппокампе крыс в условиях хронического стресса.

Примечание: а — Иммуногистохимическое обнаружение гиперфосфорилированного тау-белка (анти-PHF) в гиппокампе крыс по сравнению с контролем. Окрашивание ядер гематоксилином (масштаб 200 мкм); б — Обнаружение гиперфосфорилированного тау-белка в гиппокампе крыс с использованием антител (иммуноблот) по сравнению с контрольной группой

Адаптогенные и стресс-протекторные свойства аскорбата лития в экспериментальных моделях стресса

В течение эксперимента производили взвешивание животных (табл. 1). В то время, как масса в контрольной группе наблюдалась отрицательная динамика, в интактной группе и в группах на аскорбате лития наблюдалось достоверное увеличение массы тела животных. Адекватная реакция организма на стрессы различной этиологии, накопление энергетического запаса организма приводит к повышенному увеличению мышечной ткани, без резкого увеличения подкожной клетчатки (жировой ткани), т. е. животное растёт и развивается, несмотря на воздействия стресса.

В ходе *теста на подвешивание* отмечено выраженное снижение числа язв желудка, количество которых указывает на выраженность стресса. При этом, более длительный приём препарата приводил к более выраженному снижению числа язв (табл. 2), что указывает на существенное снижение хронического стресса (дистресса) при приёме аскорбата лития.

Число эозинофилов в цельной крови и уровни катехоламинов адреналина и норадреналина являются специфическими маркерами выявления воздействия стресс-факторов различной этиологии. С возрастанием дистресса уровни эозинофилов падают (эозинопения — характерный биомаркер стресса), а уровни адреналина и норадреналина возрастают (т. к. стресс стимулирует секрецию катехоламинов симпатическими ядрами и корой надпочечников). Действительно, применение аскорбата лития существенно способствовало сохранению пула эозинофилов (табл. 3) и снижению гормонов стресса, адреналина и норадреналина (табл. 4).

Модель транспортного стресса. Транспортный стресс не является естественным для животных, поэтому реакция животных на него ярко выражена. В настоящей серии экспериментов, использование аскорбата лития показало высокую эффективность при воздействии транспортного стресса. В целом, при приёме аскорбата лития, животные старались снизить неблагоприятное воздействия и адаптироваться к меняющимся условиям: пытались найти место наименее подверженное колебаниям, группировались

Таблица 1

Динамика изменение массы тела у крыс опытных ($n=36$) и контрольной ($n=36$) групп

№ группы	Масса животных				
	1-й день	7-й день	14-й день	21-й день	Изменение массы, %
1	123,6±0,7	123,0±0,3	122,3±0,8	121,0±1,2	-2,2%
2	122,1±0,3	128,3±0,2	134,8±0,9	143,3±4,8	+17 %
3	121,5±0,6	124,9±0,5	135,4±0,5	141,7±5,6	+16 %
4	123,8±0,2	127,4±0,6	138,8±0,6	143,6±3,1	+15 %
5	124,9±0,3	131,3±0,9	137,0±0,8	146,6±5,0	+17%

Примечание: Группы: 1 — контрольная группа; 2 — 120 мг/кг аскорбата лития; 3 — 60 мг/кг аскорбат лития; 4 — 30 мг/кг аскорбат лития; 5 — интактная группа. Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 2

Количество выявленных язв в желудке при проведении теста на подвешивание

№ группы	Количество язв в желудке		
	7 день	14 день	21 день
1	23,5±0,9	21,2±0,2	21,2±0,2
2	4,0±0,5	2,5±1,1	2,1±0,7
3	4,1±0,8	2,6±0,4	2,4±0,5
4	4,5±0,9	2,4±0,2	1,9±0,4
5	1,0±0,1	1,5±0,5	1,0±0,5

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 3

Определение эозинофилов в цельной крови по Дункеру при проведении теста на подвешивание

№ группы	Количество эозинофилов к цельной крови		
	7 день	14 день	21 день
1	311±58	285±15	291±2
2	768±67	885±38	911±82
3	791±12	866±94	910±41
4	764±65	897±72	954±97
5	953±29	975±5	981±54

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 4

Определение адреналина и норадреналина в сыворотке крови при проведении теста на подвешивание

№ групп	Уровни адреналина и норадреналина в сыворотке крови					
	7 день введения		14 день введения		21 день введения	
	Адреналин мкг/л	Норадреналин мкг/л	Адреналин мкг/л	Норадреналин мкг/л	Адреналин мкг/л	Норадреналин мкг/л
1	27±3,9	68,6±1,5	28,3±1,2	68,9±9,41	27,7±2,46	70,5±3,54
2	7,6±0,38	20,2±5,67	8,7±3,82	20,3±4,83	9,6±3,28	18,4±5,27
3	7,9±0,21	22,1±1,98	7,1±1,19	20,3±3,49	7,3±2,14	19,3±6,13
4	8,1±0,52	24,3±2,2	6,9±2,77	18,2±5,28	6,9±0,97	17,9±0,95
5	6,7±0,65	18,6±1,95	6,1±0,51	17,9±0,85	6,4±2,42	17,2±0,56

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

вместе так, чтобы колебания группы компенсировали колебания аппарата.

Исследованные показатели адаптогенности подтверждают приведенные выше заключения, основанные на наблюдениях экспериментатора. Так, приём аскорбата лития был достоверно ассоциирован с сохранением пула эозинофилов (табл. 5), более высоким уровнями аланинаминотрансфераз (АЛТ) и креатинина, что указывает на меньшую степень воздействия стресса на печень (табл. 6).

Таблица 5

Определение эозинофилов в цельной крови по Дункеру (модель транспортного стресса)

№ группы	Количество эозинофилов к цельной крови		
	7 день введения	14 день введения	21 день введения
1	428±11	401±81	425±69
2	856±42	901±16	907±43
3	822±87	919±41	922±93
4	794±69	921±91	928±107
5	978±51	991±6	979±38

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таблица 6

Влияние аскорбата лития на аланин аминотрансферазу и креатинин в крови (модель транспортного стресса)

№ групп	7 день		14 день		21 день	
	АЛТ	Креатинин	АЛТ	Креатинин	АЛТ	Креатинин
1	13,2±5,97	19,4±2,45	13,5±4,84	17,9±5,31	14,0±4,91	19,1±2,12
2	32,4±7,75	39,8±6,13	31,7±7,32	47,8±1,46	30,1±7,42	42,1±2,97
3	31,0±3,15	39,6±7,98	33,1±2,84	48,3±8,27	32,4±6,37	45,6±2,73
4	29,8±8,45	36,5±3,84	32,1±9,10	48,1±3,82	31,7±3,14	46,3±3,26
5	36,3±2,64	48,8±4,50	38,1±1,49	50,1±4,86	36,9±3,87	49,2±4,61

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p<0,05$) в соответствии с t -критерием.

Таким образом, на основании совокупности полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что при пероральном введении водных растворов аскорбата лития происходит быстрая (т. е. уже в течение первых 7 сут эксперимента) адаптация организма в модели стресса на подвешивание. При этом, доза аскорбата лития в 30 мг/кг веса не уступает существенно по эффективности более высоким дозам (60–120 мг/кг).

Влияние разных доз аскорбата лития на нервно-психическое возбуждение, обусловленное дистрессом

В качестве определения нервно-психического возбуждения у крыс использовалась тест-система «открытое поле». Под нервно-психическим возбуждением подразумевается характер и интенсивность передвижения животного в манеже. Она зависит от действия различных факторов стресса (например, непривычная для животного обстановка) в сочетании с естественной исследовательской активностью и используется для диагностики функционального состояния нервной системы при воздействии естественных и экспериментальных факторов внешней среды.

Таблица 7

Влияние аскорбата лития на поведение крыс в тесте «открытое поле»

№ группы	Вертикальная двигательная активность	Горизонтальная двигательная активность	Кол-во заглядываний в отверстие	Число актов груминга	Кол-во выходов в центральную зону	Кол-во болюсов
1	7,21±2,75	3,48±0,75	2,96±0,42	23,47±2,38	0,9±0,42	6,46±0,16
2	29,46±3,74	6,75±0,68	9,98±0,96	8,44±4,76	2,84±0,14	2,54±0,68
3	27,32±2,87	6,18±0,42	9,32±3,13	9,43±4,12	3,12±2,17	2,12±0,48
4	17,24±4,86	5,56±1,24	4,76±2,41	17,25±3,61	1,21±1,82	5,14±0,23

Примечание: Отличия между группами на аскорбате лития и группой контроля (1-я группа) были статистически достоверны ($p < 0,05$) в соответствии с t -критерием.

Аскорбат лития принимался на протяжении 5 дней, затем животные помещались в открытое поле. Результаты экспериментов показали, что аскорбат лития дозозависимо улучшал показатели состояния животных в тесте «открытое поле» (табл. 7): улучшались показатели двигательной и исследовательской активности, и, в целом, снижалась выраженность дистресса.

Заключение

Возникновение стресса неразрывно связано с гиперактивацией глутаматных рецепторов, что при хроническом стрессе стимулирует развитие нейродегенеративных изменений в ЦНС. В настоящем исследовании показано, что аскорбат лития проявляет нейропротекторное и адаптогенное воздействие в различных моделях стресса. Установлено, что в изученных концентрациях аскорбат лития нетоксичен для нейро-

нов в культуре. Более того, добавление аскорбата лития в среду, на которой выращиваются нейроны на модели глутаматной нейротоксичности, приводит к увеличению числа выживших нейронов с нормальной морфологией. Нейропротекторное действие аскорбата лития отмечено во всём диапазоне исследованных концентраций (0,1...1,0 ммоль/л). В эксперименте, применение аскорбата лития существенно способствовало сохранению пула эозинофилов, снижению гормонов адреналина и норадреналина в крови и более высоким показателям адаптации животных в тестах на подвешивание, модели транспортного стресса и в тесте «открытое поле».

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках диссертационного исследования.

Литература

1. Селье Г. Стресс без дистресса, Москва, Прогресс, 1979, 123 С.
2. Hemanth Kumar B.S., Mishra S.K., Rana P., Singh S., Khushu S. Neurodegenerative evidences during early onset of depression in CMS rats as detected by proton magnetic resonance spectroscopy at 7 T. Behav Brain Res. 2012 Jun 15;232(1):53–9. doi: 10.1016/j.bbr.2012.03.011.
3. Cuadrado-Tejedor M., Ricobaraza A., Del Rio J., Frechilla D., Franco R., Pérez-Mediavilla A., Garcia-Osta A. Chronic mild stress in mice promotes cognitive impairment and CDK5-dependent tau hyperphosphorylation. Behav Brain Res. 2011 Jul 7;220(2):338–43. doi: 10.1016/j.bbr.2011.01.005.
4. Qiao H., An S.C., Ren W., Ma X.M. Progressive alterations of hippocampal CA3-CA1 synapses in an animal model of depression. Behav Brain Res. 2014 Dec 15;275:191–200. doi: 10.1016/j.bbr.2014.08.040.
5. AbdAlla S., El-Hakim A., Abdelbaset A., Elfaramawy Y., Qitterer U. Inhibition of ACE Retards Tau Hyperphosphorylation and Signs of Neuronal Degeneration in Aged Rats Subjected to Chronic Mild Stress. Biomed Res Int. 2015;2015:917156. doi: 10.1155/2015/917156.
6. Hynd M.R., Scott H.L., Dodd P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. Neurochem Int. 2004 Oct;45(5):583–95.
7. Allagui M.S., Nciri R., Rouhaud M.F., Murat J.C., El Feki A., Croute F., Vincent C. Long-term exposure to low lithium concentrations stimulates proliferation, modifies stress protein expression pattern and enhances resistance to oxidative stress in SH-SY5Y cells. Neurochem Res. 2009;34(3):453–62 Epub 2008 Au.
8. Sharifzadeh M., Aghsami M., Gholizadeh S., Tabrizian K., Soodi M., Khalaj S., Ranjbar A., Hosseini-Sharifabad A., Roghani A., Karimfar M.H. Protective effects of chronic lithium treatment against spatial memory retention deficits induced by the protein kinase AII inhibitor H-89 in rats. Pharmacology. 2007;80(2–3):158–65
9. Moore G.J., Bebchuk J.M., Wilds I.B., Chen G., Manji H.K. Lithium-induced increase in human brain grey matter. Lancet. 2000;356(9237):1241–1242.
10. Lyoo I.K., Dager S.R., Kim J.E., Yoon S.J., Friedman S.D., Dunner D.L., Renshaw P.F. Lithium-induced gray matter volume increase as a neural correlate of treatment response in bipolar disorder: a longitudinal brain imaging study. Neuropsychopharmacol 2010;35(8):1743–50.
11. Sassi R.B., Nicoletti M., Brambilla P., Mallinger A.G., Frank E., Kupfer D.J., Keshavan M.S., Soares J.C. Increased gray matter volume in lithium-treated bipolar disorder patients. Neurosci Lett. 2002;329(2):243–245.
12. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Викторов И.В. Нейропротекторные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидативном стрессе in vitro. //Бюлл. эксперим. биол. мед. 2000. т. 130. № 10. с. 418–421.
13. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Исаев Н.К. Влияние глутамата на гибель культивированных зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и химической гипоксией. Биохимия. — 2010. — т. 75. в. 8. с. 1150–1156.
14. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В., Пронин А.В., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., Генрихс Е.Е., Демидов В.И., Волков А.Ю., Хаспеков Г.Л., Александрова О.П. Фармакокинетический и фармакодинамический синергизм между нейропептидами и литием в реализации нейротрофического и нейропротективного действия церебролизина. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2015. — № 3. с. 65–72.

Оценка взаимосвязи между фармакокинетикой и фармакодинамикой тропоксина у крыс

**Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Новицкий А.А., Ганьшина Т.С.,
Горбунов А.А., Мирзоян Р.С.**

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

Резюме. Представлены результаты доклинического фармакодинамического и фармакокинетического исследования после однократного внутривенного введения нового оригинального противомигренозного препарата тропоксина на крысах. Тропоксин в значительной степени ослабляет констрикторные реакции сосудов мозга крыс, серотонина, и агониста 5HT_{2B/2C} рецепторов. Выявлена прямая зависимость между падением концентраций тропоксина в плазме крови крыс и изменениями мозгового кровотока на фоне введения серотонина и мета-хлорфенилпиперазина.

Ключевые слова: тропоксин, высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия, фармакокинетика—фармакодинамика, мигрень

Assessment of pharmacokinetics-pharmacodynamics relationship of tropoxine in rats

Zherdev V.P., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Novitskyi A.A., Ganshina T.S., Gorbunov A.A., Mirzoyan R.S.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. Results of preclinical pharmacodynamic and pharmacokinetic study of tropoxine (a new original antimigraine drug) after single intravenous administration in rats were presented. Tropoxine in significant extent suppresses constricting reactions of rat brain vessels, serotonin, and agonist of 5HT_{2B/2C} receptors. Direct relationship between tropoxine concentrations decreasing in the rat blood plasma and changing of the brain circulation associated with serotonin and m-chlorphenylpiperazine.

Keywords: tropoxine, HPLC-MS, pharmacokinetics—pharmacodynamics, migraine

Автор, ответственный за переписку:

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

Введение

К наиболее распространённым хроническим нейроваскулярным заболеваниям относится мигрень, которая поражает от 11 до 30% населения разных стран в наиболее работоспособном возрасте. В современном мире количество пациентов с данным заболеванием ежегодно растёт, а имеющиеся в распоряжении неврологов фармакологические препараты не лишены существенных побочных эффектов [1, 7, 8, 10].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» разработано лекарственное средство из группы производных оксима тропинона, обладающее противомигренозной антисеротониновой активностью — тропоксин [2–4]. При создании новых лекарственных средств необходимым этапом является изучение их фармакодинамики и фармакокинетики на доклиническом уровне. Результаты этих исследований в ряде случаев позволяют установить взаимосвязь между ними, что в дальнейшем может быть использовано для переноса данных с животных на человека.

Поэтому целью настоящей работы явилось изучение фармакодинамики и фармакокинетики тропоксина у крыс и выявление взаимосвязей между ними.

Материалы и методы

По химическому строению молекула тропоксина представляет собой 3-(3,4,5-триметоксибензоилоксиимино)-8-метил-8-азабицикло- [1, 2, 3] октана гидрохлорид. В работе использована субстанция тропоксина, синтезированная в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Фармакодинамику и фармакокинетику тропоксина после внутривенного (в/в) введения изучали на нелинейных крысах-самцах, полученных из питомника «Столбовая» (Московская область). Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при 12-часовом световом режиме, на стандартной диете. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директива 86/609/ЕЕС) и правилами работы с животными, утверждёнными этической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Фармакологические свойства тропоксина изучали на 30 наркотизированных (хлоралгидрат 350–400 мг/кг, внутрибрюшинно) нелинейных крысах массой 250–300 г.

Состояние мозгового кровообращения у животных оценивали с помощью ультразвукового флоуметра

и лазерного доплеровского флоуметра фирмы «Transonic System Inc.» (США). Одновременно в экспериментах регистрировали изменения артериального давления в бедренной артерии. Запись показателей кровотока и артериального давления производили на полиграфе «ВЮРАК» США, соединённым с персональным компьютером [5].

Для изучения антисеротониновых свойств исследуемых веществ в работе оценивали констрикторные реакции внутренней сонной артерии у наркотизированных крыс в условиях искусственной вентиляции лёгких в ответ на введение серотонина (5НТ, 20 мкг/кг, в/в; «Sigma Aldrich», ФРГ) или избирательного агониста 5НТ_{2B/2C}-рецепторов мета-хлорфенилпиперазина (0,1 мг/кг, «Sigma Aldrich», ФРГ).

Тропоксин вводили в/в в дозе 10 мг/кг, что соответствует примерно 10% его ЛД₅₀ (78 мг/кг). Исследуемые вещества вводили в бедренную вену животных.

Фармакокинетику тропоксина после в/в введения изучали на нелинейных крысах-самцах массой 200±20 г. Содержание тропоксина определяли в плазме крови крыс через 0,0; 0,33, 0,5, 0,66, 0,83, 1,0, 1,33, 1,5, 2, 4, 6 и 7 ч после введения препарата.

Отбор образцов крови производили в пробирки, обработанные ЭДТА. Плазму крови немедленно отделяли центрифугированием при 2500 об/мин в течение 10 мин. Плазма крови отбиралась пипеткой в пластиковые криопробирки и замораживалась при температуре не выше -18 °С.

Для определения тропоксина в биоматериале разработана и валидирована методика высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием, позволяющая после жидкость-жидкостной экстракции детектировать 2,5 нг/мл исследуемого вещества. Методика была линейна в диапазоне 5–1000 нг/мл. Степень извлечения

тропоксина из плазмы крови составила в среднем $82,06 \pm 5,36\%$.

Статистическую обработку данных проводили с использованием программ «Biostat» и «Statistika» v. 8.0 («Statistika Inc.», США). Средние данные в тексте представлены в виде медианы или средней арифметической и её стандартной ошибки ($M \pm m$). Результаты рассматривали как значимые при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Цереброваскулярная антисеротониновая активность тропоксина

Проведённые опыты позволили установить, что серотонин (20 мкг/кг, в/в) в большинстве случаев на первой минуте после введения вызывает уменьшение объёмной скорости мозгового кровотока в системе внутренней сонной артерии в среднем на 40,0% ($n=10$). Через 5–7 мин после инъекции 5НТ наблюдается восстановление исходного уровня мозгового кровотока. Уменьшение притока крови в мозг в большинстве опытов сопровождается понижением уровня артериального давления. Тропоксин (10 мг/кг, в/в) в этих условиях существенно ослабляет изменения, вызванные серотонином. Через 20, 30, 40 и 50 мин после введения тропоксина уменьшение притока крови в мозг под влиянием серотонина составляет 27,8%, 29,4%, 31,5% и 32,1%, соответственно (контроль: 40,0%; $p \leq 0,05$, рис. 1). К 60-й мин после введения тропоксина реакция мозгового кровотока на серотонин восстанавливается и составляет 41,8%.

В серии опытов изучали влияние тропоксина на введение агониста 5НТ_{2B/2C}-рецепторов- m-CPP, который, согласно данным литературы [1, 6, 9], провоцирует приступ головной боли у больных мигренью, вызывает увеличение пропотевания альбуминов

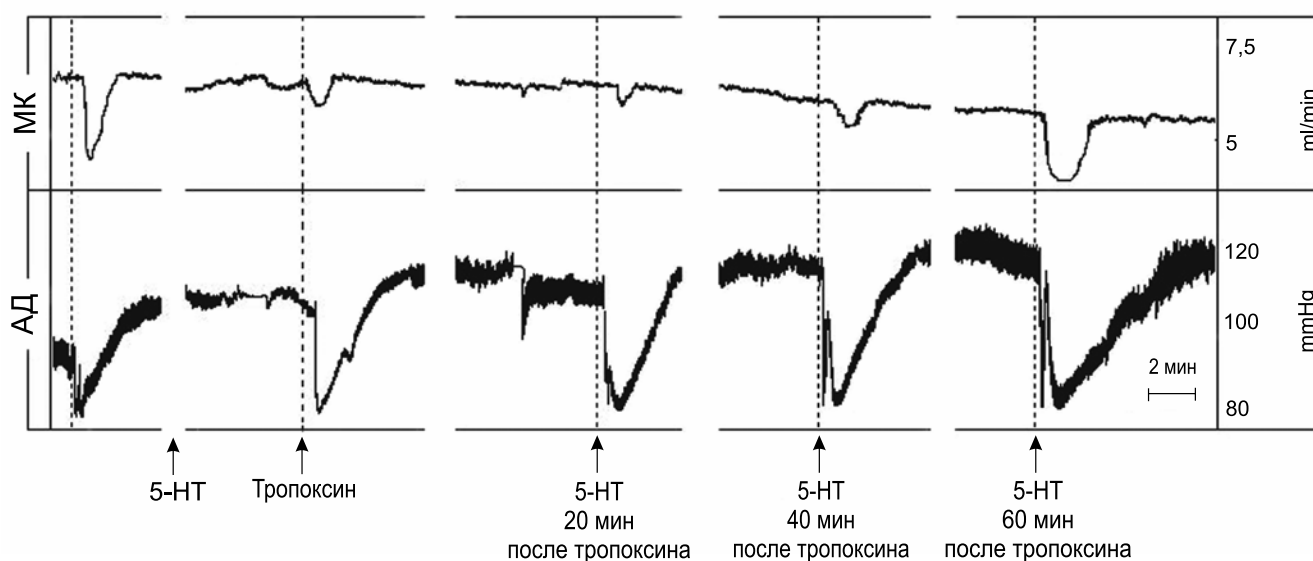


Рис. 1. Влияние тропоксина (10 мг/кг, в/в) на изменения притока крови в мозг (МК в мл/мин) и артериального давления (АД в мм рт. ст.), вызванные серотонином (5-НТ, 20 мкг/кг, в/в) у наркотизированной крысы

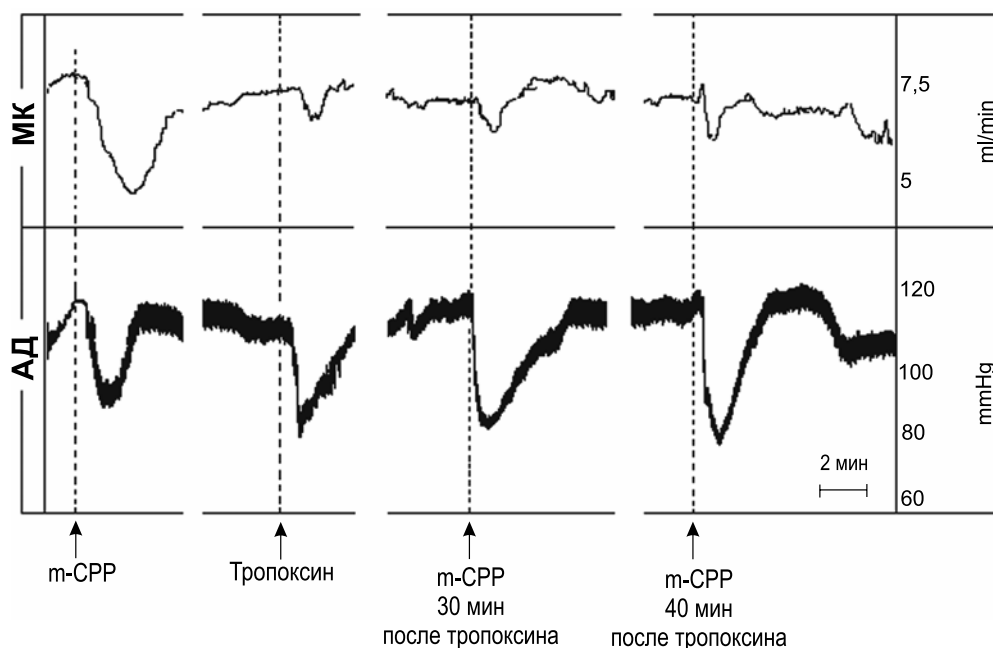


Рис. 2. Влияние тропоксина (10 мг/кг, в/в) на изменения притока крови в мозг (МК, мл/мин) и артериального давления (АД, мм рт. ст.), вызванные m-CPP, 0,1 мг/кг, в/в у наркотизированной крысы

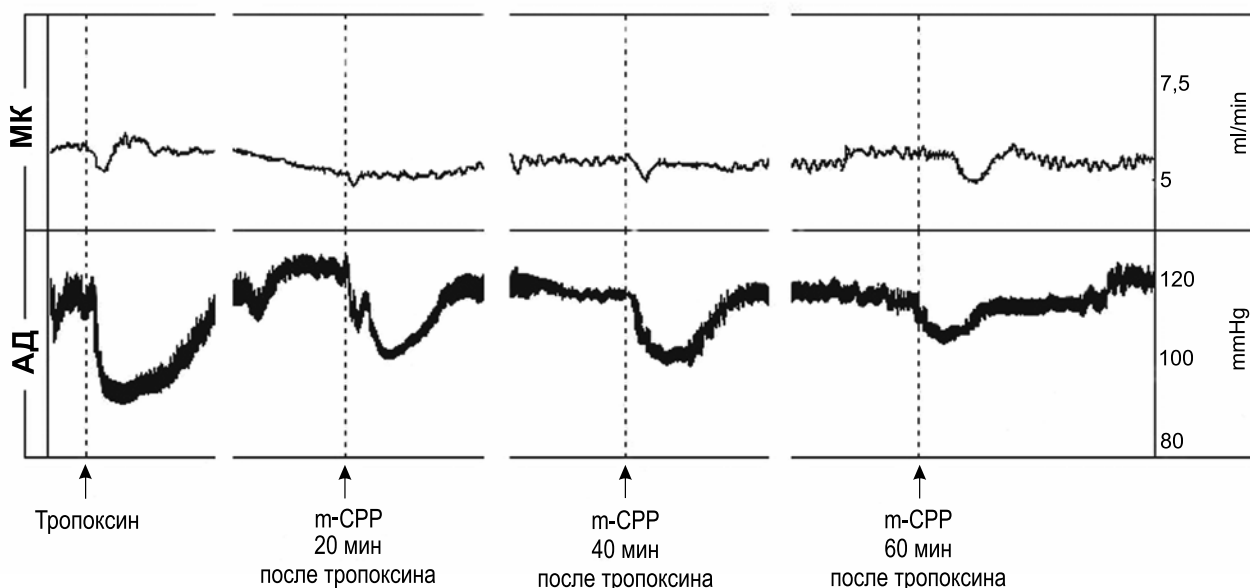


Рис. 3. Влияние предварительного введения тропоксина (10 мг/кг, в/в) на изменения притока крови в мозг (МК в мл/мин) и артериального давления (АД в мм рт. ст.), вызванные m-CPP, 0,1 мг/кг

плазмы из менингеальных сосудов и активацию чувствительных волокон тригеминоваскулярной системы.

В опытах с использованием m-CPP было показано, что если до введения тропоксина агонист $5HT_{2B/2C}$ -рецепторов вызывает снижение мозгового кровотока во внутренней сонной артерии в среднем на 25%, то через 20 мин после введения тропоксина снижение кровотока под влиянием m-CPP составляет 19,2%, через 30 мин — 13,1%, через 40 мин — 11,3% и через 50 мин — 18,7% ($p \leq 0,05$, рис. 2). Затем к 60-й

минуте реакция сосудов мозга на введение m-CPP даже несколько усиливается. При введении m-CPP артериальное давление кратковременно снижается в среднем на 33%, затем восстанавливается до значений, близких к исходным. Тропоксин не оказывает статистически значимого влияния на данную реакцию (см. рис. 2).

Далее в серии опытов m-CPP вводили крысам через 20 мин после тропоксина, и оказалось, что в этих условиях снижение мозгового кровотока под влиянием агониста $5HT_{2B/2C}$ -рецепторов составило только 6%

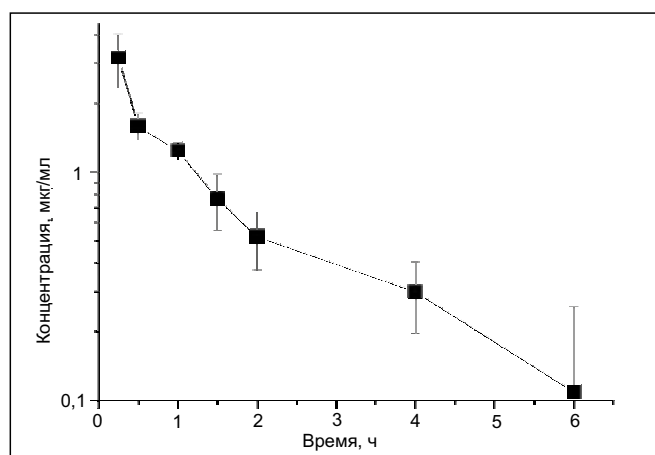


Рис. 4. Фармакокинетический профиль тропоксина в плазме крови крыс после однократного в/в введения в дозе 10 мг/кг ($n=4$, $\bar{x} \pm SD$)

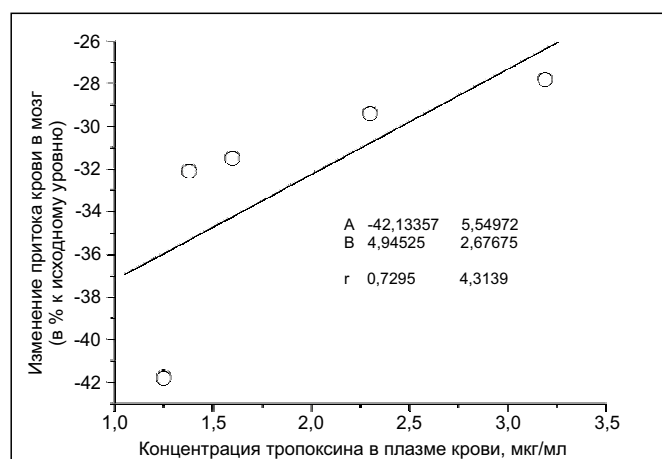


Рис. 5. Зависимость между усредненными концентрациями тропоксина в плазме крови и медианой изменения притока крови в мозг крыс после в/в введения тропоксина в дозе 10 мг/кг на фоне введения серотонина

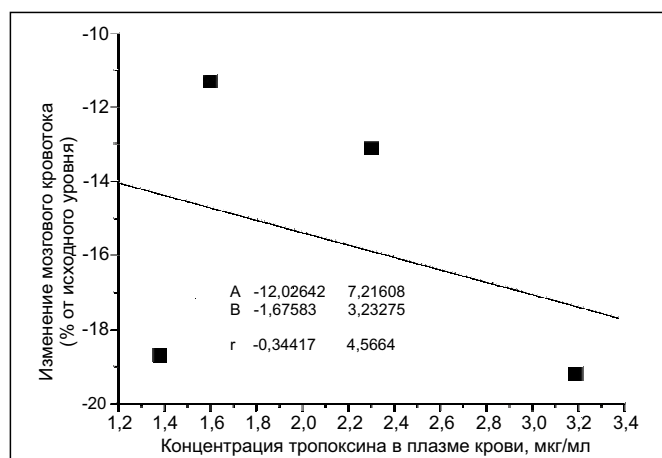


Рис. 6. Зависимость между усредненными концентрациями тропоксина в плазме крови и медианой изменения притока крови в мозг крыс после в/в введения тропоксина в дозе 10 мг/кг на фоне предварительного введения m-CPP

(20 мин), 6,8% (30 мин), 7,5% (40 мин), 12% (50 мин), 17% (60 мин). Затем к 80-й минуте констрикторная реакция сосудов мозга под влиянием m-CPP постепенно восстанавливалась до реакции, наблюдаемой в контрольных опытах, и составила в среднем 27,5% (рис. 3). При этом тропоксин не оказывал статистически значимого влияния на реакцию артериального давления на m-CPP.

Фармакокинетика тропоксина

На рис. 4 представлен фармакокинетический профиль тропоксина в плазме крови крыс после однократного в/в введения в дозе 10 мг/кг.

Из рис. 4 видно, что снижение концентраций тропоксина в плазме крови крыс носит монофазный характер. Усредненный период полувыведения исследуемого соединения составил 1,34 ч.

Фармакодинамико-фармакокинетические взаимосвязи

Предпринята попытка оценить взаимосвязь между усредненными концентрациями тропоксина (фармакокинетическая переменная) в плазме крови и медианой изменения притока крови в мозг крыс (фармакодинамическая переменная) после однократного в/в введения тропоксина в дозе 10 мг/кг на фоне в/в введения серотонина и m-CPP. Изменение сравниваемых параметров регистрировали в течение 1,0 ч — 80 мин после введения препарата. На рис. 5–7 представлены полученные результаты.

Результаты, представленные на рис. 6 и 7, отличаются друг от друга тем, что в первом случае сначала крысам в/в вводили m-CPP, а затем тропоксин, а в последнем случае — сначала тропоксин, а через 20 мин — m-CPP.

Как видно из рис. 5 выявлена прямая зависимость между падением концентрации тропоксина в плазме

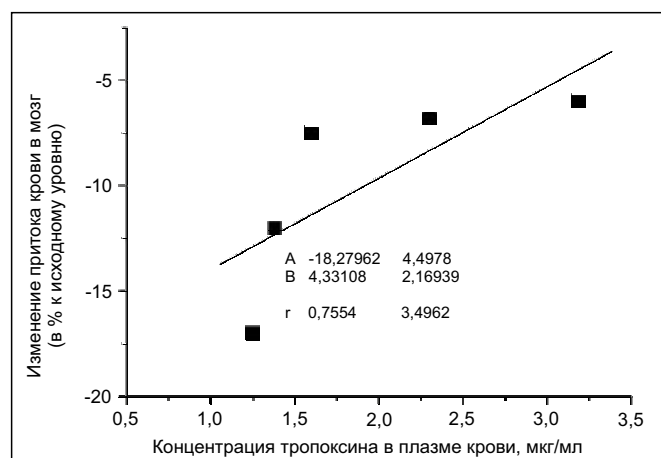


Рис. 7. Зависимость между усредненными концентрациями тропоксина в плазме крови и медианой изменения притока крови в мозг крыс после в/в введения тропоксина в дозе 10 мг/кг на фоне введения m-CPP

крови крыс и изменениями мозгового кровотока на фоне введения серотонина ($r=0,7295$). Для агониста $5HT_{2B/2C}$ рецепторов — m-CPP такая зависимость не обнаружена, если сразу после m-CPP животным вводили тропоксин (рис. 6). Коэффициент корреляции линейного уравнения характеризовался значением 0,3442. В то же время выявлена взаимосвязь между изучаемыми параметрами в случае введения тропоксина через 20 мин после введения агониста $5HT_{2B/2C}$ рецепторов — рис. 7.

Выводы

1. Тропоксин в значительной степени ослабляет констрикторное влияние и серотонина, и агониста $5HT_{2B/2C}$ рецепторов на сосуды мозга крыс.

2. Выявлена прямая зависимость между падением концентрации тропоксина в плазме крови крыс и изменениями мозгового кровотока на фоне введения серотонина и в случае введения тропоксина через 20 мин после введения агониста $5HT_{2B/2C}$ рецепторов — мета-хлорфенилпиперазина.

Литература

1. Амелин А.В., Игнатов Ю.Д., Скоромец А.А. Мигрень (патогенез, клиника, лечение). СПб медицинское издательство, 2001.
2. Ганьшина Т.С., Горбунов А.А., Гнездилова А.В. и др. Хим. фарм. Журнал. 2016; 50 (1): 19–23; Pharm. Chem. J. 2016; 50 (1): 19–23.
3. Косточка Л.М., Мирзоян Р.С., Ганьшина Т.С., Середенин С.Б. Хим. — фарм. журн. 2010; 44 (9): 6–9; Pharm. Chem. J. 2010; 44 (9): 472–475.
4. Мирзоян Р.С., Середенин С.Б., Ганьшина Т.С. и др. Эксперим. и клин. фармакол. 1998; 61 (2): 28–31.
5. Мирзоян Р.С., Плотников М.Б., Ганьшина Т.С. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. 2012; Часть первая. М.: Гриф и К, 480–487.
6. Соколов А.Ю., Любашина О.А., Пантелеев С.С. Нейрохимия. 2011; 2: 104–112.
7. Dent W., Stelzhammer B., Meindl M. et al. Headache. 2011; 51 (10): 1483–1492. Doi: 10.1111/j. 1526–4610. 2011.
8. Pezzini A., Del Zotto E., Giossi A., et al. Stroke Res. Treatment. 2010; 9, doi:10.4061/2011/304921.
9. Panconesi A., Sicuteri R. Cefalalgia. 1997; 17 (1): 3–14.
10. Rist P.M., Buring J.E., Kase C.S. et al. Circulation. 2010; 122 (24): 2551–2557.

Изучение нейropsychотропных свойств соединения с нейропротекторной активностью димерного дипептидного миметика 4-ой петли фактора роста нервов человека, ГК-2h

Котельникова С.О., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Крайнева В.А., Воронина Т.А.

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

Резюме. Димерный дипептидный миметик фактора роста нервов человека ГК-2h в дозах 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 мг/кг, в/б обладает антиамнестическими свойствами на моделях амнезии условной реакции пассивного избегания, вызванной скополамином, максимальным электрошоком или кетамином, увеличивая у крыс латентное время при воспроизведении рефлекса. ГК-2h в дозах 1,0–1,5 мг/кг при различных режимах введения обладает противогипоксическим эффектом в условиях гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме и слабым противосудорожным действием на модели судорог, вызванных максимальным электрошоком и не влияет на ориентировочно-исследовательское поведение животных в открытом поле.

Ключевые слова: димерный дипептидный миметик фактора роста нервов человека, антиамнестический и противогипоксический эффекты

Study of neuropsychotropic properties of substance with neuroprotective activity dimeric dipeptide mimethic of human NGF, GK-2h

Kotelnikova S.O., Garibova T.L., Gudasheva T.A., Kraineva V.A., Voronina T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. Dimeric dipeptide mimethic human nerve growth factor, bis-(N-monosuccinyl-glycyl-lysine), GK-2h at doses 0,1, 0,5, 1,0, 1,5 mg/kg, i.p. has an anti-amnesic effect on the models of scopolamine, maximal electroshock or ketamin induced passive avoidance response amnesia. GK-2h at doses 1,0–1,5 mg/kg possess weak antihypoxic and anticonvulsive properties, it does not affect the exploratory behavior of animals in the test of open field.

Keywords: mimetic human NGF bis-(N-monosuccinyl-glycyl-lysine), GK-2h, anti-amnesic, antihypoxic effects

Автор, ответственный за переписку:

Гарибова Таисия Леоновна – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел.: +79039616126; e-mail: T_Garibova@mail.ru

Введение

Один из актуальных подходов к созданию препаратов с нейropsychотропной активностью базируется на современных представлениях о механизмах эндогенного регулирования функций нейронов и их регенерации. Среди известных эндогенных регуляторных белков особое внимание уделяется факторам роста нервной ткани, в частности, нейротрофинам и среди них фактору роста нервов (ФРН, nerve growth factor, NGF). ФРН участвует в росте, созревании и поддержании жизнедеятельности нейронов в центральной и периферической нервной системе как в норме, так и при патологии [1]. Известно вовлечение ФРН в патогенез болезней с нейродегенерацией, в частности, болезни Альцгеймера (БА), болезни Паркинсона (БП), инсультов и др. [2]. Показана эффективность ФРН в клинике у больных [3] и в экспериментальных исследованиях [4, 5]. Вместе с тем, терапевтическое использование самого ФРН ограничивается его нестабильностью

в биологических жидкостях, плохой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), возможностью иммунной реакции, наличием побочных эффектов за счёт его плеiotропности. Актуальным подходом к регуляции системы факторов роста нервной ткани в ЦНС является создание (конструирование и синтез) низкомолекулярных миметиков факторов роста, взаимодействующих с соответствующими тирозинкиназными рецепторами [6].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в течение нескольких десятилетий проводятся исследования по созданию и изучению механизмов действия нейropsychотропных лекарственных препаратов, в частности, с нейропротекторной активностью. Была сформулирована оригинальная гипотеза о возможности конструирования фармакологически активных дипептидов на основе петлеобразных структур белков, определяющих рецепторное взаимодействие [7]. Определено, что фармакофорными участками нейротрофина являются их бета-изгибы

(последовательность из четырёх аминокислотных остатков с бета-поворотной конформацией) и созданы дипептидные миметики факторов роста [8]. В опытах на животных выявлены нейропротекторные свойства дипептидного миметика 4-й петли фактора роста нервов крысы [9]. Другой низкомолекулярный димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов человека гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина), ГК-2h, в исследованиях проявил нейропротективные свойства как *in vitro* [10], так и на экспериментальных моделях БА и инсультов в опытах на крысах [11].

Целью исследования явилось изучение общего спектра фармакологической активности димерного дипептидного миметика фактора роста нервов человека гексаметилендиамида бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина), ГК-2h, в опытах на животных. В задачи исследования входило изучение эффектов соединения, характерных для нейропсихотропных препаратов, а именно выявление антиамнестических свойств, противогипоксической, противосудорожной, антидепрессивной активности, оценка влияния соединения на двигательную активность и ориентировочно-исследовательское поведение животных.

Материалы и методы исследования

Исследование фармакологической активности соединений проводилось в опытах с использованием стандартных методов, применяемых для скрининга и изучения механизмов действия нейропсихотропных препаратов, согласно международным стандартам [12, 13].

Соединения. В исследовании были использованы: оригинальный димерный дипептидный миметик 4-ой петли ФРН человека — гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-глицил-лизина) — ГК-2h, синтезированный в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; блокатор мускаринового типа холинергических рецепторов — скополамин (Sigma); антагонист NMDA-рецепторов — кетамин (Sigma).

Животные. Эксперименты проводились на беспородных мышах-самцах, мышах инбредной линии C57BL/6 массой 20–23 г, беспородных крысах самцах, массой 180–200 г. Экспериментальные животные получены из питомника лабораторных животных «Столбовая», Московская область. Животные содержались в соответствии с правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3–96 и Р 51000.4–2011), приказу МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г.

Методы

Антиамнестическое действие соединения оценивали на модели амнезии УРПИ в установке Passive avoidance фирмы Lafayette Instrument Co (США). Регистрировали

латентное время захода животного в тёмную камеру при воспроизведении рефлекса через 24 ч после обучения (неизбегаемый удар током в тёмной камере установки в течение 10 с). Амнезию УРПИ у крыс вызывали максимальным электрошоком (МЭШ), проводимым после обучения через кортикальные электроды ($I = 43$ мА, частота 50 Гц, продолжительность 0,3 с), скополамином (1,5 мг/кг) или кетамином (10,0 мг/кг), каждый из которых вводили внутривенно (в/в) за 15 мин до обучения. ГК-2h использовали в/б однократно или повторно за 40 мин до тестирования. Животные контрольных групп получали дистиллированную воду в эквивалентном объёме.

Противогипоксическое действие соединения оценивали в опытах на мышах на моделях гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме, помещая животных в герметически закрываемые банки объёмом 200 см³. Регистрировали время гибели животных.

Для моделирования судорожных состояний использовался тест МЭШ для мышей. С помощью прибора Rodent shocker Type 221 фирмы Harvard apparatus GmbH (Германия) через кортикальные электроды животное получало электрический стимул (10–12 мА, 250 В, длительностью 0,2 с), вызывающий у 40–50% контрольных мышей тоническую экстензию задних конечностей. Регистрировались подергивания (1 балл), клонические судороги (2 балла), тоническая экстензия (3 балла) и гибель мышей (4 балла).

Депрессивноподобное поведение вызывали у мышей с использованием теста вынужденного плавания по Порсолт [14] и теста подвешивания за хвост [15] в опытах на мышах.

Исследование ориентировочно-исследовательского поведения и двигательной активности у животных проводилось в открытом поле размером 60×60 см с полом равномерно разделённым линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 4 см для крыс и размером 40×40 см с полом разделённым линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 2 см для мышей. Регистрировалась вертикальная (число подъёмов на задние лапы) и горизонтальная (число пересечений линий квадратов) двигательная активность и количество заглядываний в отверстия.

Статистическую обработку результатов проводили с определением среднего значения и стандартной ошибки среднего значения, которые представлены в итоговых таблицах. Использовался пакет статистических программ Statistica 6.0 (StatSoft, USA). Различия определялись как статистически значимые при уровне $p \leq 0,05$. Для определения статистической значимости различий между группами использовали ранговый однофакторный анализ Kruskal–Wallis. Если различия были достоверны ($p \leq 0,05$), проводилось попарное сравнение по непараметрическому критерию U Mann–Whitney, Стьюденту, а при анализе альтернативной формы учёта использовался точный метод Фишера (пакет программ Biostat).

Результаты и обсуждение

Изучение антиамнестических свойств ГК-2h на моделях амнезии УРПИ, показало, что МЭШ, скополамин в дозе 1,5 мг/кг или кетамин в дозе 10 мг/кг вызывали у крыс амнезию условной реакции пассивного избегания (УРПИ). Это характеризовалось по сравнению с контролем уменьшением латентного времени рефлекса при воспроизведении через 24 ч после обучения (рис. 1).

На модели амнезии УРПИ, вызванной МЭШ, показано, что ГК-2h в дозах 0,1; 0,3; 0,6; 1,0 и 2,0 мг/кг не оказывал влияния на формирование УРПИ, а в дозе 1,5 мг/кг ГК-2h существенно увеличивал латентное время при воспроизведении рефлекса (рис. 1). На модели амнезии УРПИ, вызванной скополамином, наиболее отчётливо эффект ГК-2h выявлялся при использовании соединения в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг, в дозе 0,1 мг/кг наблюдалась тенденция увеличения латентного времени рефлекса. Вместе с тем, при повторном 5-дневном предварительном введении крысам ГК-2h в дозе 0,1 и 0,5 мг/кг регистрировался сильный антиамнестический эффект, характеризующийся полным восстановлением памятного следа. На модели амнезии УРПИ, вызванной кетамином, антиамнестический эффект ГК-2h выявлялся в дозе 1,0 мг/кг при 5-дневном введении (рис. 1).

Таким образом, ГК-2h в диапазоне доз от 0,1 до 1,5 мг/кг обладает антиамнестическими свойствами на моделях амнезии УРПИ, вызванной МЭШ, скополамином или кетамином.

Изучение противогипоксического действия ГК-2h осуществлялось на модели гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме. Противогипоксический эффект ГК-2h выявлен в дозе 1,0 мг/кг при 5-дневном введении в опытах на мышах линии C57Bl6 (табл. 1).

Исследование противосудорожных свойств ГК-2h на модели судорожных реакций, вызванных МЭШ, в опытах на мышах линии C57Bl6 показало, что в дозах 0,1, 0,5, 1,0 и 2,0 мг/кг соединение не способно предупредить различные проявления судорожных реакций. Лишь в дозе 1,5 мг/кг отмечалось статистически достоверное ослабление судорожных реакций (табл. 2).

Изучение влияния вещества на депрессивноподобное поведение показало, что в тесте Порсолт в дозе 0,1 мг/кг и в тесте подвешивания за хвост в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг ГК-2h не оказывал влияния на поведение животных, а в дозе 1,0 мг/кг при предварительном 5-дневном введении у мышей наблюдалась тенденция уменьшения времени иммобилизации при плавании (табл. 3).

Изучение поведения животных в открытом поле. ГК-2h в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг при субхроническом 3-дневном введении не оказывал влияния на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность мышей в открытом поле (табл. 4).

Ранее было показано, что замещённый димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов человека ГК-2h, синтезированный как соединение, способное воспроизводить его эффекты, обладает нейропротекторными свойствами на моделях патологий, в механизме которых участвует ФРН. Показано, что в диапазоне доз от 0,1 до 1,0 мг/кг при

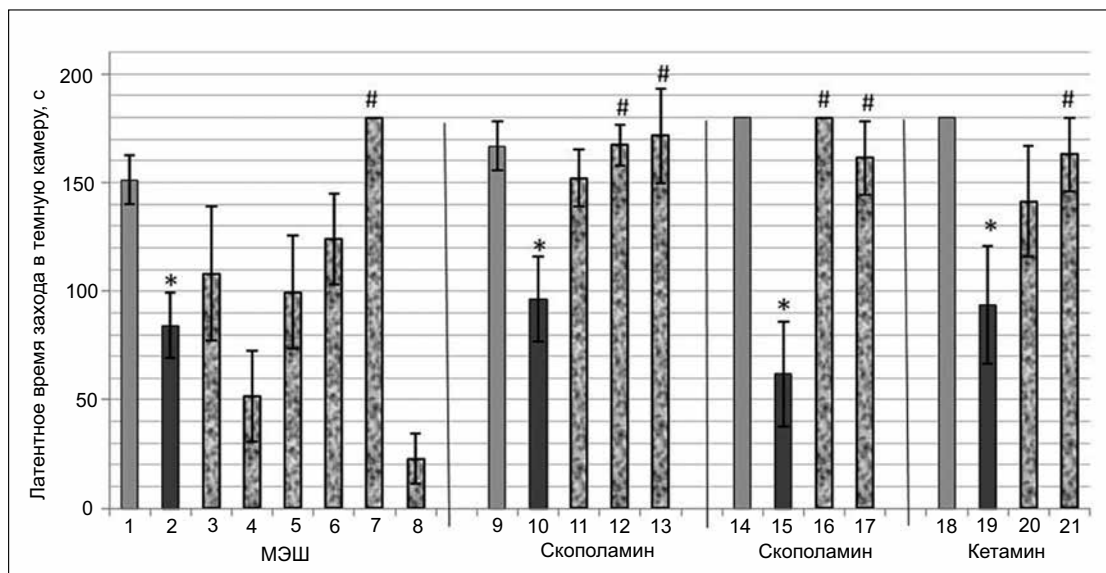


Рис. 1. Антиамнестический эффект ГК-2h на моделях амнезии УРПИ, вызванной максимальным электрошоком, скополамином или кетамином.

Примечание: 1 — пассивный контроль; 2 — активный контроль (МЭШ); 3 — ГК-2h (0,1 мг/кг); 4 — ГК-2h (0,3 мг/кг); 5 — ГК-2h (0,5 мг/кг); 6 — ГК-2h (1,0 мг/кг); 7 — ГК-2h (1,5 мг/кг); 8 — ГК-2h (2,0 мг/кг); 9 — пассивный контроль; 10 — активный контроль (скополамин 1,5 мг/кг); 11 — ГК-2h (0,1 мг/кг); 12 — ГК-2h (0,5 мг/кг); 13 — ГК-2h (1,0 мг/кг); 14 — пассивный контроль; 15 — активный контроль (скополамин 1,5 мг/кг); 16 — ГК-2h (0,1 мг/кг/5 дней); 17 — ГК-2h (0,5 мг/кг/5 дней)^(*) (* — введение ГК-2h внутрь); 18 — пассивный контроль; 19 — активный контроль (кетамин 10,0 мг/кг); 20 — ГК-2h (0,1 мг/кг/5 дней); 21 — ГК-2h (1,0 мг/кг/5 дней); * — достоверность отличий от пассивного контроля; # — достоверность отличий от активного контроля при $p \leq 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Таблица 1

**Изучение противогипоксических свойств ГК-2h на модели гипоксии
с гиперкапнией в гермообъёме в опытах на мышах**

Группы животных	Доза, продолжительность введения, в/б	Время жизни, с	
		беспородные мыши	мыши линии C57Bl6
Контроль	Дистиллированная вода/5 дней	1 488±41,76	1 850,0±47,6
ГК-2h	0,1 мг/кг/5 дней	1 360±72,1	2 001,0±105,1
ГК-2h	1,0 мг/кг/5 дней	1 626±104,9	2 228,0±129,5*

Примечание: * — достоверность отличий от контроля при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Таблица 2

**Изучение противосудорожных свойств на модели судорог
у мышей линии C57Bl6, вызванных МЭШ**

Группы животных	Доза в мг/кг, n=10	Судороги в баллах
Контроль		3,3±0,2
ГК-2h	0,1	3,1±0,3
	0,5	3,1±0,3
	1,0	2,8±0,3
	1,5	2,6±0,2*
	2,0	2,8±0,3

Примечание: * — достоверность отличий от контроля при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

Таблица 3

**Изучение антидепрессивного действия ГК-2h в тестах
вынужденного плавания и подвешивания за хвост
в опытах на мышах**

Группы животных	Время иммобилизации, с	
	вынужденное плавание	подвешивания за хвост
Контроль (дистиллированная вода)	229,13±14,62	118,76±16,51
ГК-2h 0,1 мг/5 дней	233,26±20,11	116,41±13,64
ГК-2h 1,0 мг/5 дней	177,92±18,38*	123,15±15,18

Примечание: * — достоверность отличий от контроля при $p = 0,067$ (критерий Манна–Уитни).

Таблица 4

**Влияние ГК-2h на ориентировочно-исследовательское
поведение и двигательную активность мышей в открытом поле**

Группы животных	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Обследование отверстий
Контроль (дистиллированная вода)	92,8±9,9	23,67±5,7	7,0±1,3
ГК-2h (0,1 мг/кг/3 дня)	80,7±7,86	13,1±2,05	8,2±0,88
ГК-2h (1,0 мг/кг/3 дня)	83,9±8,8	19,7±3,86	7,3±1,28

повторном введении ГК-2h на моделях БА ослабляет у крыс нарушения пространственной ориентации и памяти, а на моделях инсультов — обладает способностью увеличивать выживаемость, ослаблять неврологический дефицит, улучшать поведение и память. Нейропротекторный эффект соединения выявлен и при морфометрических исследованиях [11]. В результате проведённой работы по изучению общего спектра фармакологической активности ГК-2h в опытах на мышах и крысах показано, что соединение в используемых дозах и режимах введения обладает антиамнестическими свойствами на моделях амнезии УРПИ, вызванной скополамином, МЭШ или кетамином, умеренным противогипоксическим и слабым противосудорожным эффектами, не влияет на ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность животных в открытом поле. Особенно отчётливо выявляются антиамнестические свойства ГК-2h, что согласуется с полученным ранее мнемотропным эффектом нового соединения на моделях БА, инсультов [11]. Результаты настоящей работы подтверждают возможность использования методов скрининга нейропсихотропных препаратов, а именно, моделей амнезий УРПИ и гипоксий для первичной оценки и прогнозирования нейропротекторных свойств нейропептидов. Следует отметить, что эти эффекты соединения выявляются практически в том же диапазоне доз, что и его нейропротекторные свойства.

Выводы

1. ГК-2h в дозах 0,1; 0,5 и 1,0 мг/кг в/б обладает антиамнестическими свойствами на модели амнезии условной реакции пассивного избегания, вызванной скополамином; в дозе 1,5 мг/кг, вызванной максимальным электрошоком, а при использовании соединения в дозе 1,0 мг/кг/5 дней на модели кетаминовой амнезии, увеличивая у крыс латентное время при воспроизведении рефлекса.

2. ГК-2h в дозе 1,5 мг/кг, в/б при различных режимах введения обладает противогипоксическим эффектом в условиях гипоксии с гиперкапнией в гермообъёме и слабым противосудорожным действием на модели судорог, вызванных максимальным электрошоком, не влияет на ориентировочно-исследовательское поведение животных в открытом поле.

Литература

1. Manni L., Rocco M.L., Bianchi P., Soligo M., Guaragna M., Barbaro S.P., Aloe L. Nerve growth factor: basic studies and possible therapeutic applications. *Growth Factors*. 2013; 31: 4: 115–122.
2. Calissano P., Matrone C., Amadoro G. Nerve growth factor as a paradigm of neurotrophins to Alzheimer's disease. *Dev. Neurobiol.* 2010; 70: 5: 372–383.
3. Sopova K., Gatsiou K., Stellos K., Laske C. Dysregulation of neurotrophic and haematopoietic growth factors in Alzheimer's disease: from pathophysiology to novel treatment strategies. *Curr. Alzheimer. Res.* 2014; 11:1: 27–39.
4. Yang J., Liu H., Yang H., Feng P. Therapeutic time window for the neuroprotective effects of NGF when administered after focal cerebral ischemia. *Neurol Sci.* 2011; 32: 433–441.
5. Zhu, W., Cheng S., Xu G., Ma M., Zhou Z., Liu D, Liu X. Intranasal nerve growth factor enhances striatal neurogenesis in adult rats with focal cerebral ischemia. *Drug Deliv.* 2011; 18: 5: 338–43.
6. Obianyo O., Ye K. Novel small molecule activators of the Trk family of receptor tyrosine kinases. *Biochim. Biophys Acta.* 2013; 1834:10: 2213–2218.
7. Gudasheva T.A., Povarnina P. Yu., Antipova T.A., Firsova Yu.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. *J. Biomed. Sci.* 2015; 22: 106–116.
8. Середин С.Б., Гудашева Т.А. Патент РФ № 2410392. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. 27.01.2011. Бюл. № 3.
9. Поварнина П.Ю., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Середин С.Б. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 восстанавливает нарушенные когнитивные функции на моделях болезни Альцгеймера у крыс. *Acta Naturae.* 2013; 5: 3(18): 61–68.
10. Антипова Т.А., Николаев С.В., Гудашева Т.А., Середин С.Б. Исследование in vitro нейропротекторных свойств нового оригинального миметика фактора роста нервов человека ГК-2(h). Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014; 77: 2: 8–11.
11. Котельникова С.О. Изучение нейрорепродуктивных свойств димерного дипептидного миметика фактора роста нервов человека. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. 2015; 24.
12. Воронина, Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л. Методические рекомендации по экспериментальному изучению препаратов с ноотропным типом действия. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Под общ. ред. А.Н. Миронова. Часть 1, М.: Гриф и К. 2012; 276–296.
13. Vogel H.G. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays H.G. Vogel. Springer. Berlin. 3rd Edition. 2008; 1800.
14. Porsolt R. D. Animal model of depression. *Biomedicine.* 1979; 30: 3: 139–140.
15. Steru L., Chermat R., Thierry B., Simon P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology (Berl).* 1985; 85: 3: 367–370.

Нейропротективные свойства производного фурана — соединения ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта

Литвинова С.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Кутепова И.С., Жмуренко Л.А.

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

Резюме. Целью настоящего исследования было изучение нейропротективных свойств нового оригинального соединения ГИЖ-276 с биохимической оценкой его влияния на активность ферментов пролилэндепептидазы (ПЭП и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) в плазме крови крыс с посттравматической гематомой, моделью геморрагического инсульта. *Методика исследования:* моделирование геморрагического инсульта проведено с использованием методики создания интрацеребральной посттравматической гематомы с введением аутокрови в место повреждения. Флуориметрически, ультрафиолетовым методом проведено биохимическое исследование влияния ГИЖ-276 на активность ферментов ПЭП и ЛДГ в плазме крови крыс с ГИ. *Результаты исследования:* выявлено, что ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг (7 дней, внутривентриально) оказывает выраженный нейропротективный эффект, ослабляя неврологический дефицит у крыс с геморрагическим инсультом через 24 ч, 7 и 14 сут. после операции и статистически достоверно увеличивая число выживших крыс к 14-м суткам наблюдения. Ослабление неврологического дефицита и гибели животных сопровождается снижением активности ферментов ЛДГ и ПЭП, что свидетельствует об улучшении обеспечения тканей мозга кислородом и уменьшении нейровоспаления. *Заключение:* защитный, нейропротективный эффект ГИЖ-276 на модели геморрагического инсульта может быть частично обусловлен его положительным влиянием на воспалительное и гипоксическое звено развития вторичных повреждений мозга при инсульте.

Ключевые слова: ГИЖ-276, геморрагический инсульт, ишемия, гипоксия, ЛДГ, ПЭП, нейровоспаление

Neuroprotective properties furan compounds GIZH-276 on the model of hemorrhagic stroke

Litvinova S.A., Zolotov N.N., Voronina T.A., Kutepova I.S., Zhmurenko L.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The study of the neuroprotective properties new original compound GIZH-276 and evaluate changes activities of prolyl endopeptidase (PEP) and lactate dehydrogenase (LDH) in blood plasma of rats with post-traumatic hematoma (model of hemorrhagic stroke) is the aim of this investigation. *Methodology of the study:* Modeling of hemorrhagic stroke (HS) was carried out using the creation of intracerebral post-traumatic hematoma with the introduction of autologous blood into the site of injury. Assay of enzymes activities in plasma was carried out with fluorescent (PEP) and ultraviolet (LDH) methods. *The results of the study:* GIZH-276 at dose of 10 mg/kg (7 days, intraperitoneally) has a pronounced neuroprotective effect, attenuating neurological deficits in rats with hemorrhagic stroke 24 hours, 7 and 14 days after surgery and statistically significantly increasing the number of surviving rats by 14 days of observation. The weakening of neurological deficit and death of animals is accompanied by decreased activity of enzymes LDH and PEP, which indicates the improvement of security of brain tissue oxygen and reducing neuroinflammation. *Conclusion:* Safety and neuroprotective effect of GIZH-276 on the model of hemorrhagic stroke may be partially due to positive effect on inflammatory and hypoxia during the development of secondary brain damage in stroke.

Keywords: GIZH-276, hemorrhagic stroke, ischemia, hypoxia, LDH, PEP, neuroinflammation

Автор, ответственный за переписку:

Литвинова Светлана Александровна — в.н.с., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», лаборатория психофармакологии, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел. +7 (495) 601-14-24; e-mail: sa_litvinova@mail.ru

Введение

Согласно современным представлениям, тяжесть течения инсульта определяется частотой и интенсивностью постинсультных осложнений, обусловленных ишемией, гипоксией и нейровоспалением. После образования некротических зон в течение первых нескольких часов после инсульта в тканях, испытывающих недостаток кровотока, увеличивается содержание нейропептидов, прямо пропорционально коррелирующих с тяжестью постинсультных осложнений [6]. Увеличение экспрессии и активности пролилэндепептидазы (ПЭП) в ишемизированном

мозге свидетельствует о развитии нейровоспаления в постинсультный период [5, 7], а накопление лактата приводит к сдвигу кислотно-щелочного равновесия и развитию гипоксии, что, в конечном итоге, способствует ещё большему увеличению инфарктных зон головного мозга [8].

Целью данного исследования явилось изучение нейропротективных свойств нового оригинального соединения производного фурана — ГИЖ-276 с биохимической оценкой его влияния на активность ПЭП и ЛДГ в плазме крови крыс с посттравматической гематомой (модель геморрагического инсульта).

Методы исследования

Перед проведением операций крыс наркотизировали хлоралгидратом (300 мг/кг). Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы — геморрагического инсульта у крыс осуществляли согласно Руководству по проведению доклинических исследований [1, 4]. При помощи бор-машины в стереотаксисе осуществляли трепанацию черепа в области capsula interna по координатам атласа Буреша для аутобредных крыс — L = 3,5 мм, A = 2 мм от брегмы и затем, используя специальное устройство (мандрен-нож), проводили деструкцию мозговой ткани на глубине — H = 4,5–5,0 мм с последующим введением в место повреждения крови, взятой из-под языка оперируемого животного в объёме 0,02–0,03 мл. Ложнооперированным животным проводили скальпирование и трепанацию черепа без деструкции мозговой ткани.

Животные были разделены на группы: 1-я — пассивный контроль, ложнооперированные (ЛО); 2-я — активный контроль, геморрагический инсульт (ГИ); 3-я — ГИЖ-276 10 мг/кг + ГИ. Животным групп ЛО и ГИ вводили физиологический раствор. Крысам 3-й группы вводили ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг в течение 7 дней внутрибрюшинно (в/б), с первым введением через 3 ч после операции.

Динамику развития неврологических нарушений по шкале Stroke-index McGrow в модификации Ганушкиной [3] и выживаемость крыс регистрировали через 24 ч, на 7-е и 14-е сутки после операции. Тяжесть неврологического дефицита определяли с использованием тестов «Перекладина» и «Вращающийся стержень» [2].

На 7-й день после операций у свободноподвижных крыс брали кровь из хвостовой вены. В плазме крови крыс флуориметрически определяли активность ПЭП. Активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ, IU/L) определяли ультрафиолетовым методом с окисленным NAD и молочной кислотой.

Статистическую обработку проводили в программе «Биостат 6.0.» с помощью непараметрических критериев Манна–Уитни и Фишера. Результаты считали достоверными при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Геморрагический инсульт, созданный посттравматической гематомой с введением аутокрови в место повреждения, не вызвал через 24 ч гибели животных, но способствовал появлению животных с неврологическими нарушениями легкой и тяжелой симптоматики. Среди тяжелых неврологических нарушений отмечались парезы конечностей и манежные движения у 50% крыс, оцениваемые визуально и по неспособности животных удерживаться на вращающемся стержне со скоростью 10 об/мин. Среди легкой симптоматики наличествовали одно- и двусторонние полуптозы, вялость, замедленность движений, а также слабость конечностей у 58% животных, регистрируемая по неспособности подтянуться на перекладине (табл. 1).

С развитием постгеморрагических осложнений отмечалось нарастание гибели животных в критические дни постинсультной динамики — на 7-е и 14-е сутки после операции, что соответствовало 50 и 75% погибшим (табл. 2).

Гибель животных сопровождалась нарастанием неврологического дефицита на протяжении всего экспериментального исследования, который проявлялся парезами, параличами конечностей и манежными движениями у 66% животных на 7-е и 14-е сутки регистрации (см. табл. 1, 2).

У животных с ГИ соединение ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг при введении через 3 ч и далее в течение 6 дней ослабляло проявления неврологического дефицита, снижая число крыс с парезами конечностей и манежными движениями на 20% через 24 ч и на 38% — через 7 сут. после инсульта относительно ложно оперированных крыс. ГИЖ-276 ослаблял неврологические нарушения и после отмены соединения — к 14-у дню регистрации, уменьшая число животных с тяжелой симптоматикой на 33%. При этом, уменьшалось число погибших животных на 20 и 35% к 7- и 14-у дню регистрации относительно соответствующих показателей выживаемости крыс с ГИ без терапии (табл. 1, 2).

Таким образом, ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг при 7-кратном введении (в/б) защищал животных от ги-

Таблица 1

Влияние ГИЖ-276 на неврологический дефицит по шкале McGrow у крыс с геморрагическим инсультом (ГИ)

Группы животных	24 ч	7-е сутки	14-е сутки
Число крыс с тяжёлыми нарушениями: парезы конечностей, манежные движения			
ЛО	0/8	0/8	0/8
Активный контроль (ГИ)	6/12	4/6	2/3
ГИЖ-276 (10 мг/кг) + ГИ	3/10*	2/7	2/6
Число крыс с лёгкими нарушениями: одно- и двусторонние полуптозы, вялость, замедленность движений, слабость конечностей, полуптозы			
ЛО	1/8	1/8	0/8
Активный контроль (ГИ)	7/12	2/6	1/3
ГИЖ-276 (10 мг/кг) + ГИ	6/10	2/7	3/6

Примечание: * — достоверность отличий значений от контроля с ГИ при $p \leq 0,05$ (критерий Фишера).

Таблица 2

Исследование влияния ГИЖ-276 на выживаемость у крыс с геморрагическим инсультом (ГИ)

Группы животных	Число животных	Доза, мг/кг	Число выживших крыс после операции, %		
			1 сутки	7 суток	14 суток
ЛО	8	—	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)
Активный контроль (ГИ)	12	—	100 (12/12)	50 (6/12)	25 (9/12)
ГИЖ-276 + ГИ	10	10	100 (10/10)	70 (7/10)	60 (6/10)*

Примечание: * — достоверность отличий значений от контроля с ГИ при $p \leq 0,05$ (критерий Фишера).

Таблица 3

Влияние ГИЖ-276 на активность ПЭП и уровень ЛДГ у крыс с геморрагическим инсультом (ГИ)

Группы животных	Кол-во животных	Доза, мг/кг	Активность ПЭП	Лактатдегидрогеназа в плазме (ЛДГ), IU/L
			7-е сутки	7-е сутки
ЛО	6	—	0,31±0,02	—
Активный контроль (ГИ)	6	—	0,41±0,01 [#]	103,52±10,19
ГИЖ-276 + ГИ	7	10	0,31±0,03*	58,43±10,38*

Примечание: [#] — достоверность отличий значений от группы ЛО, при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни); * — достоверность отличий значений от группы активного контроля с ГИ, при $p \leq 0,05$ (критерий Манна–Уитни).

бели на протяжении 14 дней, что сопровождалось ослаблением неврологического дефицита.

Исследование плазмы крови крыс животных с геморрагическим инсультом без терапии выявило развитие нейровоспаления и окислительного стресса, маркерами которых является повышение активности ПЭП и ЛДГ. Так, биохимическое исследование группы крыс с ГИ без терапии (активный контроль) на 7-е сутки после моделирования геморрагического

инсульта показало увеличение ($p \leq 0,05$) показателя активности ПЭП на 33% относительно значений ложно оперированных крыс (ЛО) (табл. 3). ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг в режиме 7-дневного введения статистически достоверно снижал повышенную активность ПЭП до значений группы ЛО и двукратно уменьшал активность фермента ЛДГ относительно животных активного контроля (табл. 3).

Заключение

Проведённые исследования показали, что соединение ГИЖ-276 в дозе 10 мг/кг /7 дней уменьшает неврологический дефицит у крыс с геморрагическим инсультом через 24 ч, 7 и 14 сут. после операции и статистически достоверно увеличивает число выживших крыс к 14-м суткам наблюдения. Биохимическое исследование плазмы крови крыс показало, что ослабление неврологического дефицита и гибели животных сопровождаются снижением активности ферментов ЛДГ и ПЭП, что свидетельствует об улучшении обеспечения тканей мозга кислородом и уменьшении нейровоспаления.

Таким образом, ГИЖ-276 обладает защитным, нейропротективным действием и положительно влияет на воспалительное и гипоксическое звено развития вторичных повреждений мозга при инсульте.

Литература

1. Воронина Т.А., Островская Р.У., Гарибова Т.Л. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия, «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», Издание ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, Москва, 2012; 1 (17): 276–296.
2. Воронина Т.А., Середенин С.Б., Яркова М.А., Воронин М.В. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1, М.: изд-во «Гриф и К» ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, 2012; 1 (14): 264–275.
3. Ганнушкина И.В. Патфизиологические механизмы нарушений мозгового кровообращения и новые направления в их профилактике и лечении. Журн. неврол. и психиатр. 1996; 1: 14–18.
4. Мирзоян Р.С., Плотникова М.Б., Ганьшина Т.С. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств

для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени. «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», Издание ФГБУ «НЦЭМСП» Минздрава России, М.: 2012; 1 (28): 480–487.

5. Männistö P.T., Venäläinen J., Jalkanen A., Garcia-Horsman, J.A. Prolyl oligopeptidase: a potential target for the treatment of cognitive disorders. Drug news & perspectives. 2007; 20 (5): 293–305.

6. Turner R.J., Vink R. The Role of Substance P in Ischaemic Brain Injury. Brain Sci. 2013; 3 (1): 123–142.

7. Röhnert P., Schröder U.H., Ziabreva I., Täger M., Reymann K.G., Striggow F. Insufficient endogenous redox buffer capacity may underlie neuronal vulnerability to cerebral ischemia and reperfusion. J Neurosci Res. 2012; 90 (1): 193–202.

8. Yoshimasa Takeda, Liang Zhao, Michael Jacewicz, William A Pulsinelli, and Thaddeus S Nowak, Jr // Metabolic and perfusion responses to recurrent peri-infarct depolarization during focal ischemia in the Spontaneously Hypertensive Rat: dominant contribution of sporadic CBF decrements to infarct expansion. J Cereb Blood Flow Metab. 2011; 31 (9): 1863–1873.

Димерные дипептидные миметики 3-й и 4-й петель фактора роста нервов активны на модели ишемического инсульта

Поварнина П.Ю.¹, Гудашева Т.А.¹, Середенин С.Б.²

¹ – Отдел химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

² – Отдел фармакогенетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Изучена фармакологическая активность димерных дипептидных миметиков 3-й и 4-й петель фактора роста нервов, соответственно ГТС-115 и ГК-2, на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. Оба соединения при в/б субхроническом введении (0,5–1 мг/кг/сутки, 7 суток, начало введения через 4 ч после операции) статистически достоверно снижали объём инфаркта мозга, по данным морфометрии срезов мозга, окрашенных трифенилтетразолий-2,3,5 хлоридом (ТТХ): ГТС-115 на 25% и ГК-2 – на 35%. Миметик 4-й петли NGF ГК-2, как наиболее активное соединение, был отобран для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного средства.

Ключевые слова: димерный дипептидный миметик, фактор роста нервов, нейропротекция, ишемический инсульт, окклюзия средней мозговой артерии

Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor loops 3 and 4 are active in a model of ischemic stroke

Povarnina P.Y.¹, Gudashева T.A.¹, Seredenin S.B.²

¹ – Department of Medicinal Chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Department of Pharmacogenetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. Pharmacological activity of dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor loops 3 and 4, correspondingly GTS-115 and GK-2, was studied in a model of ischemic stroke, induced by transient middle cerebral artery occlusion in rats. The both compounds, at i.p. subchronic administration (0.5-1 mg/kg/day, 7 days, beginning at 4 hours after surgery), significantly reduced cerebral infarct volume as was estimated by morphometry of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) -stained brain slices: GTS-115 by 25% and GK-2 by 35%. Mimetic of NGF loop 4 (GK-2), which is the most active compound, was selected for further development as a potential therapeutic agent.

Keywords: dimeric dipeptide mimetic, nerve growth factor, neuroprotection, ischemic stroke, middle cerebral artery occlusion

Автор, ответственный за переписку:

Поварнина Полина Юрьевна — ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел. +7 (905) 789-30-31; e-mail: povarnina@gmail.com

Введение

За последние десятилетия накоплено множество данных, подтверждающих высокий терапевтический потенциал фактора роста нервов (NGF — nerve growth factor) для лечения ряда нейродегенеративных и других заболеваний, в частности ишемического инсульта. На основе разных подходов во всём мире предпринимаются попытки преодоления ограничений применения NGF в клинике, связанные с его белковой природой.

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова были сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики наиболее экспонированных наружу участков β -изгибов 4-й и 3-й петель NGF, соответственно гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (рабочий шифр ГК-2) и гексаметилендиамид бис-(*N*-гамма-оксибутирил-*L*-лизил-*L*-гистидина) (рабочий шифр ГТС-115) [1, 2].

Ранее было установлено, что оба миметика проявляют нейропротекторную активность *in vitro* в микро-намолярных концентрациях на модели окислительного

стресса в культуре гиппокампальных нейронов HT-22 [2, 3]. Методом Вестерн-блот анализа было показано, что оба соединения активируют специфичные для NGF TrkA рецепторы, но имеют разную картину активации пострецепторных сигнальных путей: ГТС-115 активирует оба основных TrkA пострецепторные сигнальные пути, MAPK/ERK и PI3K/AKT (неопубликованные данные), а ГК-2 селективно активирует PI3K/AKT путь [4].

Целью данной работы являлось сравнительное изучение фармакологических эффектов димерных дипептидных миметиков 4-й и 3-й петель NGF на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс.

Материалы и методы

Материалы и реактивы. Дипептиды ГК-2 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина)) и ГТС-115 (гексаметилендиамид бис-(*N*-гамма-оксибутирил-*L*-лизил-*L*-гистидина)) были синтезированы в ФГБНУ «НИИ фармаколо-

гии имени В.В. Закусова. Хлоралгидрат был получен в фирме Merck and Co., Inc. (USA). Трифенилтетразолий-2,3,5 хлорид (ТТХ) был получен в компании Sigma-Aldrich (USA).

Животные. Эксперименты были проведены на беспородных крысах-самцах массой 250–290 г на момент начала эксперимента, полученных из Государственного предприятия Питомника лабораторных животных «Столбовая» при РАМН. Животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде. При работе с крысами соблюдались требования, сформулированные в Директивах Совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований.

Моделирование ишемического инсульта. Ишемический инсульт моделировали внутрисосудистым перекрытием средней мозговой артерии нитью по методике, впервые описанной E.Z. Longa et al. (1989) [5]. Крыс наркотизировали 5% раствором хлоралгидрата (350 мг/кг, внутривентриально), выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли правые общую сонную артерию, внешнюю сонную артерию и внутреннюю сонную артерию. Накладывали лигатуры на внешнюю и внутреннюю сонные артерии и микрососудистую клипсу на общую сонную артерию. После этого перерезали внешнюю сонную артерию дистальнее лигатуры. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0,25 мм, покрытую силиконом, вводили через культю внешней сонной артерии на глубину 19–20 мм, до перекрытия средней мозговой артерии и фиксировали клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 1 ч, после чего нить извлекали. Ложнооперированные животные подвергались тем же процедурам, что и оперированные, за исключением перерезания сосудов и введения нити.

Дизайн исследования. Оперированных животных случайным образом делили на 2 группы. Животным первой группы через 4 ч после операции, а затем раз в сутки в течение 6 дней внутривентриально (в/б) вводили ГК-2 (0,5 мг/кг) или ГТС-115 (1 мг/кг), растворённые в дистиллированной воде из расчёта 2 мл/кг. Выбор дозы исследуемых соединений был осуществлён на основании предварительных экспериментов. Ложнооперированные и оперированные нелеченые животные получали в/б дистиллированную воду. Массу тела крыс измеряли перед операцией, а также на 3-й и 7-е сутки после операции. На 7-е сутки животных декапитировали и определяли объём инфаркта с помощью анализа отсканированных изображений срезов мозга, окрашенных ТТХ. Фармакологические свойства ГК-2 и ГТС-115 были изучены в отдельных экспериментах.

Определение объёма инфаркта. Для оценки объёма инфаркта мозга животных под глубоким наркозом (хлоралгидрат, 350 мг/кг, в/б) декапитировали, головной мозг извлекали и замораживали при -20°C в течение 15 мин. Затем мозг нарезали на 5 фронтальных

срезов по 1,7 мм толщиной. Срезы головного мозга окрашивали в 2% растворе ТТХ в фосфатном буфере при температуре 37°C в течение 20 мин. Окрашенные срезы затем фиксировали в 10% растворе формалина, помещали на предметные стекла и сканировали с обеих сторон с разрешением 2400 dpi на сканере LaserJet M1212nf MFP. Анализ цифровых изображений проводили с помощью свободно распространяемой программы анализа медицинских изображений Image J. Объём инфаркта (V) определяли по формуле: $V = 1,7 \times \Sigma S_i / 2$, где ΣS_i — сумма площадей области повреждения (неокрашенные участки) на срезах.

Статистика. Межгрупповые различия оценивали с помощью U критерия Манна–Уитни. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В табл. 1 показана гибель животных в течение 7 суток после операции. Статистически достоверных межгрупповых различий по данному параметру выявлено не было.

У оперированных нелеченых животных наблюдалась выраженная область повреждения в правом полушарии головного мозга. По результатам эксперимента с ГК-2 морфометрии срезов мозга, окрашенных ТТХ, объём зоны некроза составлял 250–300 мм³. Оба исследуемых соединения — ГК-2 и ГТС-115 — вызывали значительное снижение объёма повреждения мозга по сравнению с оперированными нелечеными животными. ГК-2 (0,5 мг/кг/сутки, в/б, 7 сут) снижал объём повреждения на 35% (рис. 1) и ГТС-115 (0,5 мг/кг/сутки, в/б, 7 суток) — на 25% (рис. 2).

Таблица 1

Число выживших животных в течение 7 суток после операции

Группа	Дни после операции, число выживших животных						
	Эксперимент с ГК-2						
	1	2	3	4	5	6	7
Л.о.	8	8	8	8	8	8	8
МСаО	13	13	11	11	11	11	11
МСаО+ГК-2	12	12	10	10	10	10	10
Группа	Эксперимент с ГТС-115						
	1	2	3	4	5	6	7
	1	2	3	4	5	6	7
Л.о.	6	6	6	6	6	6	6
МСаО	9	6	6	6	6	6	6
МСаО+ГТС-115	7	7	7	7	7	7	7

Примечание: «Л.о.» — ложная операция; «МСаО» — группа животных с ишемическим инсультом, вызванным транзиторной окклюзией средней мозговой артерии (МСаО — middle cerebral artery occlusion); «МСаО+ГК-2» и «МСаО+ГТС-115» — группы животных с ишемическим инсультом, вызванным транзиторной окклюзией средней мозговой артерии, леченные соответственно ГК-2 (0,5 мг/кг в сутки, в/б, 7 сут) или ГТС-115 (1 мг/кг в сутки, в/б, 7 сут).



Срезы головного
мозга крысы
из группы
«инсульт»

Срезы головного
мозга крысы
из группы
«инсульт + ГК-2»

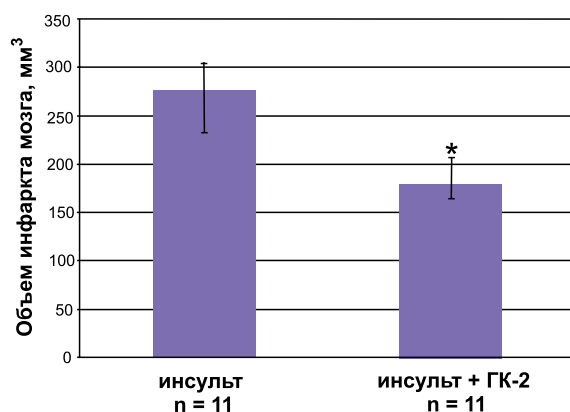
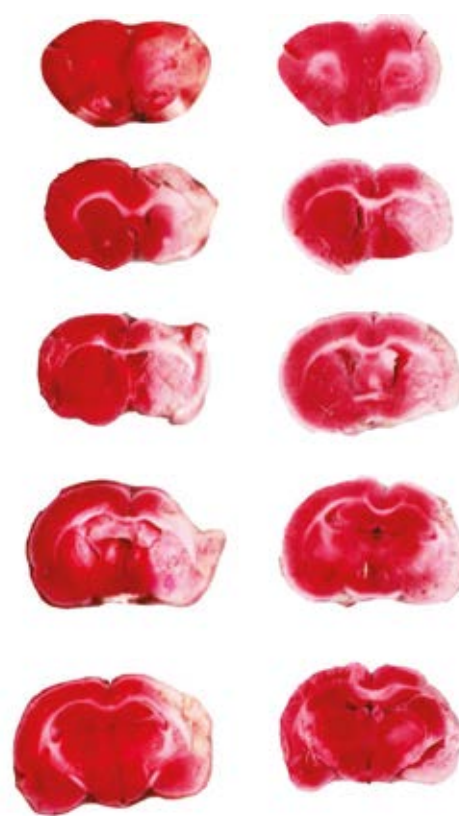


Рис. 1. Снижение объёма инфаркта мозга в условиях транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс после введения ГК-2 (0,5 мг/кг/сутки, в/б, 7 суток, начало введения через 4 ч после операции). Объём инфаркта мозга оценивали на 7-е сутки после операции с помощью морфометрии срезов мозга, окрашенных ТТХ. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; * — $p < 0,05$ (U тест Манна–Уитни)



Срезы головного
мозга крысы
из группы
«инсульт»

Срезы головного
мозга крысы
из группы
«инсульт + ГТС-115»

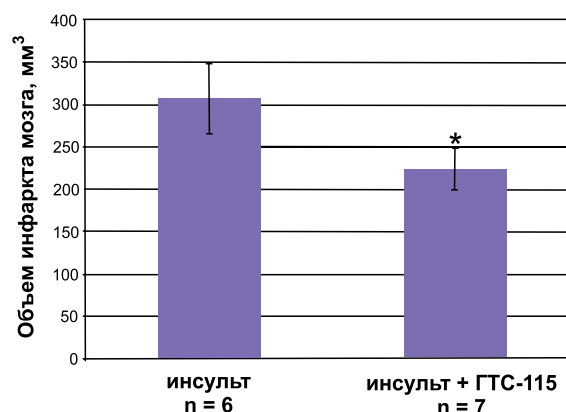


Рис. 2. Снижение объёма инфаркта мозга в условиях транзиторной окклюзии средней мозговой артерии у крыс после введения ГТС-115 (1 мг/кг/сутки, в/б, 7 суток, начало введения через 4 ч после операции). Объём инфаркта мозга оценивали на 7-е сутки после операции с помощью морфометрии срезов мозга, окрашенных ТТХ. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; * — $p < 0,05$ (U тест Манна–Уитни)

Таким образом, выраженность нейропротекторных эффектов миметика 4-й петли NGF ГК-2 была выше, чем у миметика 3-й петли NGF ГТС-115. Эти данные согласуются с результатами, ранее полученными *in vitro*. Дипептид ГК-2 проявлял нейропротекторную активность на модели окислительного стресса в культуре гиппокампальных нейронов НТ-22 в концентрациях 10^{-5} – 10^{-9} [3], а ГТС-115 в тех же условиях был активен в концентрациях 10^{-5} – 10^{-8} М [2]. Выращенность нейропротекторных эффектов у ГК-2 была выше, чем у ГТС-115 в соответствующих концентрациях. Это можно объяснить разным вкладом 3-й и 4-й петель NGF в нейропротекцию.

Из литературы известно, что нейропротекторная активность нейротрофинов, в частности NGF, опосредована в основном PI3K/AKT путём [6]. MAPK/ERK путь отвечает за дифференцирующую активность, а в случае с NGF вовлечён в развитие гипералгезии [7]. Таким образом, миметик 4-й петли NGF, селективно активирующий PI3K/AKT сигнальный путь, обладает более предпочтительными фармакологиче-

скими характеристиками, чем ГТС-115, активирующий PI3K/AKT и MAPK/ERK пути.

На основании полученных в данной работе результатов димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF ГК-2 был отобран для дальнейшего изучения в качестве потенциального нейропротекторного средства для лечения острых нарушений мозгового кровообращения.

Выводы

Установлено, что димерные дипептидные миметики 3-й и 4-й петель NGF обладают NGF-подобной нейропротекторной активностью на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. При этом активации PI3K/AKT сигнального пути достаточно для проявления этой активности. Наиболее активный миметик 4-й петли NGF ГК-2 был отобран для дальнейшей разработки в качестве потенциального лекарственного средства.

Литература

1. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. Патент РФ № 2410392.
2. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Константинопольский М.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дизайн, синтез и нейропротекторные эффекты димерного дипептидного миметика 3-й петли фактора роста нервов ГТС-115. Биоорганическая химия. 2016 (в печати).
3. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. Доклады Академии Наук. 2010; 434: 4: 262–265.

4. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Константинопольский М.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 избирательно активирует пострецепторные пути TrkA, не вызывая побочных действий полноразмерного неротрофина. Доклады Академии наук. 2014; 456: 1: 88–91.
5. Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989; 1: 84–91.
6. Kaplan D.R., Miller F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr. Opin. Neurobiol. 2000; 10: 3: 381–391.
7. Obata K., Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci. 2004; 74: 21: 2643–5263.

Сравнительное изучение кардиопротекторного действия триметазида и фабомотизола гидрохлорида у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в условиях продолжающегося потребления этанола

Цорин И.Б., Мирошкина И.А., Ионова Е.О., Надорова А.В., Столярчук В.Н., Вититнова М.Б., Сорокина А.В., Колик Л.Г., Дурнев А.Д., Крыжановский С.А.

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

Резюме. На разработанной ранее трансляционной модели алкогольной кардиомиопатии у белых беспородных крыс изучали кардиопротекторные эффекты триметазида и фабомотизола гидрохлорида, вводимых ежедневно в период 25–28-й недель продолжающегося потребления 10% этилового спирта. Показано, что триметазидин (30 мг/кг/сут, в/б) и фабомотизола гидрохлорид (15 мг/кг/сут, в/б) в указанных выше условиях статистически значимо уменьшали ремоделирование левого и правого желудочков сердца и увеличивали сократительную функцию сердца.

Ключевые слова: алкогольная кардиомиопатия, трансляционная модель, триметазидин, фабомотизола гидрохлорид, ремоделирование сердца, кардиопротективное действие, дилатационная сердечная недостаточность, эхокардиография, крысы

Comparative study of the trimetazidine and fabomotizole hydrochloride cardioprotective effect in rats with established alcoholic cardiomyopathy with the continued ethanol consumption

Tsorin I.B., Miroshkina I.A., Ionova E.O., Nadorova A.V., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Sorokina A.V.,

Kolik L.G., Durnev A.D., Kryzhanovskii S.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. In the previously developed translation model of alcoholic cardiomyopathy in white nonlinear rats was studied the cardioprotective effects of trimetazidine and fabomotizole hydrochloride that were injected daily during the 25th – 28th weeks of continued consumption of 10% ethanol. It is shown that trimetazidine (30 mg/kg/day i.p.) and fabomotizole hydrochloride (15 mg/kg / day i.p.) in the above conditions, significantly reduced the remodeling of the left and right ventricles of the heart and increased the heart contractile function.

Keywords: alcoholic cardiomyopathy, translation model, trimetazidine, fabomotizole hydrochloride, heart remodeling, cardioprotective effects, dilated heart failure, echocardiography, rats

Автор, ответственный за переписку:

Цорин Иосиф Борисович — ведущий научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (903) 560-04-24; e-mail: tsorinib@yandex.ru

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 13-04-00464

Введение

В России хронический алкоголизм в структуре летальности занимает третье место после сердечно-сосудистых и онкологических заболеваний [1] и является причиной каждой третьей смерти [9, 10]. Анализ структуры соматической летальности больных хроническим алкоголизмом свидетельствует о том, что её основной причиной является именно алкогольная кардиомиопатия (АКМП) [11, 13].

АКМП представляет собой специфическую дилатационную кардиомиопатию (МКБ-142.6), которая как по патогенезу, так и по особенностям своей клинической картины в значительной мере отличается от других наиболее распространённых заболеваний сердечно-сосудистой системы. Это связано с тем, что

в основе АКМП лежит некоронарогенное, невоспалительное моноэтиологическое алкоголь-обусловленное токсическое повреждение сердечной мышцы, тонкие механизмы которого до настоящего времени окончательно не изучены.

Несмотря на всю значимость этой проблемы, сколько-нибудь эффективной схемы терапии АКМП до настоящего времени не существует [3, 4]. Лечение сопутствующей АКМП хронической сердечной недостаточности (ХСН), проводимое по схемам, используемым при терапии ХСН другой этиологии [2, 12], как правило, малоэффективно [2, 12]. Вместе с тем, учитывая, что в патогенезе АКМП значительную роль играет окислительный стресс, нарушения метаболизма и транспорта свободных жирных кислот, патогенетически обоснованной при этом заболевании является

метаболическая терапия [1, 12, 16]. В частности для лечения такого рода больных используют рFох-ингибитор триметазидин, который не только способствует восстановлению сократительной функции сердечной мышцы, но и вызывает регрессию дистрофических изменений миокарда [12]. Следует отметить, что, по мнению большинства врачей, обязательным условием успеха терапии больных, страдающих АКМП, является полный отказ от приёма содержащих этанол напитков [2]. Однако, как показывает практика, многие пациенты не выполняют предписанного им режима.

Ранее на разработанной нами инновационной трансляционной модели АКМП у крыс было показано, что в период абстиненции триметазидин оказывает кардиопротективное действие. Препарат снижает интенсивность гибели кардиомиоцитов, активизирует репаративные процессы в миокарде, что способствует обратному ремоделированию желудочков сердца и, тем самым, уменьшает тяжесть дилатационной сердечной недостаточности [8]. Такой же эффект, в этих условиях, оказывает и оригинальный отечественный анксиолитик фабомотизола гидрохлорид (афобазол), синтезированный и фармакологически изученный в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова». Кардиопротективное действие этого лекарственного средства во многом связано с его агонистическим влиянием на σ_1 -рецепторы, локализованные в цитозоле кардиомиоцитов [14], которые являются своеобразным возникшим ходе эволюции ремонтным комплексом клетки [15]. Не менее важно и то, что в условиях модели АКМП фабомотизола гидрохлорид обладает выраженным противofiбрилляторным действием [6], что представляется достаточно важным, поскольку известно, что у пациентов, страдающих АКМП, крайне высок риск возникновения внезапной сердечной смерти [17].

Целью исследования явилось изучение кардиопротективных эффектов триметазидина и фабомотизола гидрохлорида на модели сформировавшейся АКМП на фоне продолжающегося потребления этанола.

Материалы и методы

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах начальной массой 180–200 г, которые содержались в виварии в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 09.06.2003 г. «Об учреждении правил лабораторной практики» с представлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме. АКМП моделировали как описано [7]. Потребление алкоголя в пересчёте на чистый этанол составляло 5,0–6,5 г/кг/сут.

По окончании 24-й недели алкоголизации, когда полностью формируется АКМП [5, 7], животных рандомизировали на 3 группы: крысам 1-й группы ($n=10$) ежедневно в течение 28 дней вводили триме-

тазидин в дозе 30 мг/кг/сут в/б; животным 2-й группы ($n=9$) по аналогичной схеме вводили фабомотизола гидрохлорид в дозе 15 мг/кг/сут в/б; крысам 3-й группы (контроль, $n=10$) по такой же схеме вводили эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида. В течение 28 дней введения веществ животные продолжали потреблять этанол. Оценку внутрисердечной гемодинамики при помощи эхокардиографии [7] производили по окончании 24-й недели алкоголизации и через сутки после последней инъекции препаратов. У интактных крыс ($n=10$), которые в течение всего опыта находились в таких же условиях, как и алкоголизованные, оценку состояния внутрисердечной гемодинамики проводили через 24 и 28 недель от момента начала эксперимента. По окончании 28-й недели животных подвергали эвтаназии, сердца извлекали для морфометрических исследований, которые проводили, как описано ранее [6].

Полученные данные подвергали статистической обработке. Нормальность распределения анализируемых выборок проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Так как данные, полученные в эхокардиографических и морфометрических исследованиях, были распределены по нормальному закону, а дисперсии выборок были гомогенны, то для определения статистической значимости изменений использовали однофакторный дисперсионный анализ с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету, критерий односторонний и критерий Стьюдента для зависимых выборок. Результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Во всех случаях принимали уровень значимости $\alpha=0,05$.

Результаты и обсуждение

Ранее мы показали, что к концу 24-й недели алкоголизации у крыс формируется «клинически» значимая АКМП. Наблюдаются известные из клиники патогномоничные для этой патологии морфофункциональные изменения миокарда — дилатация полостей обоих желудочков сердца, снижение электрической стабильности сердечной мышцы, жировая дистрофия миокарда и т. д. [5, 7].

Анализ полученных данных свидетельствует о том, что у крыс, принудительно потреблявших этанол в течение 24 недель, по сравнению с интактными животными, значительно снижена как фракция укорочения (ФУ), так и фракция выброса (ФВ), и увеличен конечно-систолический размер (КСР) левого желудочка сердца, что свидетельствует о формировании дилатационной алкогольной кардиомиопатии (табл. 1). Так, например, КСР у контрольных алкоголизованных животных, по сравнению с интактными крысами, был статистически значимо ($p=0,0001$) больше — $2,76\pm 0,07$ мм и $1,92\pm 0,03$ мм, соответственно,

Таблица 1

Влияние триметазидина и фабомотизола гидрохлорида на основные показатели внутрисердечной гемодинамики у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией

Показатели	Группа животных			
	интактные крысы, $n=10$	Алкоголизованные крысы, с 24 по 28 неделю алкоголизации получавшие		
		физ.раствор (контроль), $n=10$	триметазидин, $n=10$	фабомотизола гидрохлорид, $n=9$
КСР, мм 24-я неделя	$1,92 \pm 0,03$ $p=0,0001$	$2,76 \pm 0,07$	$2,80 \pm 0,09$ $p=0,70$	$2,90 \pm 0,08$ $p=0,51$
Изменение КСР (мм) к 28-ой неделе	$+0,30 \pm 0,05$ $p=0,007$ $p_1=0,0006$	$+0,06 \pm 0,02$ $p_1=0,007$	$-0,10 \pm 0,04$ $p=0,040$ $p_1=0,050$	$-0,21 \pm 0,06$ $p=0,001$ $p_1=0,007$
ФУ, % 24-я неделя	$51,5 \pm 1,0$ $p=0,0001$	$36,8 \pm 0,6$	$37,1 \pm 0,7$ $p=0,78$	$38,0 \pm 0,7$ $p=0,76$
Изменение ФУ(%) к 28-й неделе	$-2,6 \pm 1,2$ $p=0,24$ $p_1=0,055$	$-1,3 \pm 0,4$ $p_1=0,006$	$+2,9 \pm 0,9$ $p=0,006$ $p_1=0,009$	$+4,5 \pm 1,4$ $p=0,002$ $p_1=0,011$
ФВ, % 24-я неделя	$87,6 \pm 0,8$ $p=0,0001$	$73,2 \pm 0,9$	$73,5 \pm 0,8$ $p=0,78$	$74,5 \pm 0,8$ $p=0,77$
Изменение ФВ (%) к 28-ой неделе	$-2,1 \pm 0,9$ $p=0,53$ $p_1=0,046$	$-1,6 \pm 0,5$ $p_1=0,007$	$+3,2 \pm 0,9$ $p=0,002$ $p_1=0,007$	$+4,8 \pm 1,4$ $p=0,0007$ $p_1=0,009$

Примечание: данные приведены в виде средних арифметических и их стандартных ошибок, p – указано по отношению к алкоголизированному контролю, p_1 – указано по отношению к уровню после 24 недель алкоголизации.

а ФВ левого желудочка была, напротив, статистически значимо ($p=0,0001$) меньше — $73,2 \pm 0,9\%$ и $87,6 \pm 0,8\%$, соответственно.

Потребление алкоголя с 25-й по 28-ю неделю приводило к дальнейшему уменьшению сократительной функции миокарда и увеличению КСР левого желудочка.

Триметазидин и фабомотизола гидрохлорид, которые вводили по описанной выше схеме, уменьшали КСР и увеличивали ФУ и ФВ (см. табл. 1). Так, если у контрольных алкоголизированных животных ФВ уменьшалась на $1,6 \pm 0,5\%$, то под влиянием триметазидина и фабомотизола гидрохлорида этот показатель увеличивался на $3,2 \pm 0,9\%$ ($p=0,002$) и $4,8 \pm 1,4\%$ ($p=0,0007$), соответственно.

Таким образом, триметазидин и фабомотизола гидрохлорид в изученных дозах уменьшают нарушения внутрисердечной гемодинамики в условиях сформировавшейся АКМП и продолжающегося потребления алкоголя.

Данные эхокардиографических исследований нашли своё подтверждение при проведении морфометрических исследований. Так, например, у животных со сформировавшейся АКМП по сравнению интактными крысами были значительно увеличены площади полостей левого и правого желудочков сердца: с $11,04 \pm 0,40$ мм² до $18,36 \pm 1,37$ мм² ($p=0,0003$) и с $2,79 \pm 0,17$ мм² до $4,17 \pm 0,30$ мм² ($p=0,044$), соответственно (табл. 2). Фабомотизола гидрохлорид в условиях АКМП и продолжающейся алкоголизации значимо уменьшал площадь полостей левого и правого желудочков сердца (табл. 2): до $8,15 \pm 0,51$ мм² ($p=0,0001$)

и $2,14 \pm 0,40$ мм² ($p=0,008$), соответственно. Сходным образом изменялись максимальный и минимальный диаметры левого желудочка (табл. 2). Триметазидин, также как и фабомотизола гидрохлорид, уменьшал дилатацию полостей левого и правого желудочков сердца, возникающую у крыс в условиях длительного 28-недельного потребления алкоголя (табл. 2).

Ранее мы показали, что изучаемые вещества, вводимые алкоголизированным крысам в период абстиненции, в условиях сформировавшейся АКМП, уменьшают тяжесть сердечной недостаточности [6, 8]. Систематическая экспериментальная терапия этими соединениями у животных со сформировавшейся АКМП на фоне продолжающегося приёма алкоголя также способствует статистически значимому уменьшению интенсивности ремоделирования левого и правого желудочков сердца, т. е. вызывает обратное ремоделирование.

Выводы

1. Систематическое потребление этилового спирта крысами в течение 24 недель приводит к формированию дилатационной АКМП, проявляющейся увеличением размеров желудочков сердца и угнетением их сократительной функции.

2. Систематическая экспериментальная терапия фабомотизола гидрохлоридом (15 мг/кг/сут, в/б) и триметазидином (30 мг/кг/сут, в/б), проводимая в период с 25 по 28 неделю систематического потребления этанола, вызывает обратное ремоделирование левого и правого желудочков сердца и увеличивает сократительную функцию миокарда.

Таблица 2

Влияние триметазидина и фабомотизола гидрохлорида на морфометрические показатели сердца крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией

Показатель	Группа животных			
	интактные крысы, $n=5$	Алкоголизованные крысы, с 24 по 28 неделю алкоголизации получавшие		
		физ.раствор (контроль), $n=5$	триметазидин, $n=5$	фабомотизола гидрохлорид, $n=5$
Площадь полости левого желудочка (ЛЖ), мм ²	$11,04 \pm 0,40$ $p=0,0003$	$18,36 \pm 1,37$	$9,54 \pm 1,22$ $p=0,0002$	$8,15 \pm 0,51$ $p=0,0001$
Относительная площадь полости ЛЖ, %	$14,1 \pm 0,4$ $p=0,0001$	$22,7 \pm 0,6$	$12,8 \pm 1,1$ $p=0,0001$	$11,9 \pm 0,7$ $p=0,0001$
Максимальный диаметр полости ЛЖ, мм	$4,37 \pm 0,25$ $p=0,022$	$5,29 \pm 0,24$	$3,85 \pm 0,30$ $p=0,001$	$3,64 \pm 0,15$ $p=0,0005$
Минимальный диаметр полости ЛЖ, мм	$3,24 \pm 0,16$ $p=0,001$	$4,42 \pm 0,18$	$3,15 \pm 0,26$ $p=0,001$	$2,94 \pm 0,17$ $p=0,0004$
Площадь полости правого желудочка, мм ²	$2,79 \pm 0,17$ $p=0,044$	$4,17 \pm 0,30$	$2,00 \pm 0,13$ $p=0,006$	$2,14 \pm 0,40$ $p=0,008$
Примечание: данные приведены в виде средних арифметических и их стандартных ошибок, p — указано по отношению к алкоголизированному контролю.				

Литература

1. Бохан Н.А., Мандель А.И., Максименко Н.Н., Михалева Л.Д. Смертельные исходы при алкогольной зависимости. Наркология. 2007; 12: 37–40.
2. Драпкина О.М. Проблема алкогольной кардиомиопатии. Эффективная фармакотерапия в кардиологии и ангиологии. 2008; 1: 30–34.
3. Драпкина О.М., Ашихмин Я.И., Ивашкин В.Т. Проблема алкогольной кардиомиопатии. Врач. 2005; 8: 48–50.
4. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Ашихмин Я.И. Алкогольная кардиомиопатия. // Медицинская помощь: Научно-практический журнал. 2006; 3: 11–15.
5. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., Ионова Е.О., Столярчук В.Н., Вититнова М.Б., Надорова А.В., Середенин С.Б. К возможности использования эхокардиографии для оценки этапов формирования алкогольной кардиомиопатии. Физиология человека. 2014; 40: 1: 122–128.
6. Крыжановский С.А., Колик Л.Г., Цорин И.Б., Столярчук В.Н., Вититнова М.Б., Ионова Е.О., Сорокина А.В., Мирошкина И.А., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. К возможности использования афобазола для лечения алкогольной кардиомиопатии и профилактики сопутствующих ей осложнений. Молекулярная медицина. 2015; 4: 35–42.
7. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., Столярчук В.Н., Вититнова М.Б., Ионова Е.О., Сорокина А.В., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии. Молекулярная медицина. 2015; 3: 40–47.
8. Мирошкина И.А., Ионова Е.О., Надорова А.В., Столярчук В.Н., Вититнова М.Б., Сорокина А.В., Колик Л.Г., Дурнев А.Д., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Кардиопротекторное действие триметазидина у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в период абстиненции. Молекулярная медицина, 2016. в печати
9. Немцов А.В. Алкогольная смертность в России 1980–90 гг. М.: Nalex, 2001.
10. Немцов А.В. Алкогольный урон регионов России. М.: Nalex, 2003.
11. Никитина С.Ю., Козеева Г.М. Совершенствование статистики смертности от алкоголизма. Вопросы статистики. 2006; 11: 21–23.
12. Рябенко Д.В., Корниенко Т.М. Алкогольная кардиомиопатия. Украинський кардіологічний журнал. 2010; 4: 91–97.
13. Семенова В.Г., Антонова О.И., Евдокушкина Г.Н., Гаврилова Н.С. Потери населения России в 2000–2008 г. г., обусловленные алкоголем: масштабы, структура, тенденции. Социальные аспекты здоровья населения. 2010; 2: 34–37.
14. Середенин С.Б., Вититнова М.Б., Столярчук В.Н., Цорин И.Б., Чичканов Г.Г., Крыжановский С.А. К механизму противоишемического действия препарата «Афобазол». Бюлл. эксп. биол. и мед. 2013; 155: 6: 723–727.
15. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. // Эксперим. и клин. фармакол. 2009; 72: 1: 3–11.
16. Piano M.R., Phillips Sh.A. Alcoholic cardiomyopathy: Pathophysiologic insight. Cardiovasc. Toxicol. 2014; 14: 4: 291–308.
17. Wannamethee G., Shaper A.G. Alcohol and sudden cardiac death. Br. Heart J. 1992; 68: 5: 443–448.

Изучение противопаркинсонического, противовоспалительного и анальгетического действия метаболита гимантана АДК-1058 в сравнении с гимантаном

Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Авдюнина Н.И.

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

Резюме. В сравнительном аспекте проведено изучение противопаркинсонического, противовоспалительного и противоболевого действия метаболита гимантана АДК-1058 и гимантана в эффективной дозе 20 мг/кг. АДК-1058 проявляет слабую противопаркинсоническую активность, снижая выраженность олигокинезии у мышей C57BL/6 с МФТП-вызванным паркинсоническим синдромом. АДК-1058 проявляет противовоспалительную активность на модели уксуснокислого перитонита, но не оказывает анальгетического действия в отношении висцеральной и соматической боли. Метаболит гимантана АДК-1058 (20 мг/кг) по противопаркинсоническому, противовоспалительному и противоболевому действию не превосходит соответствующую активность гимантана (20 мг/кг).

Ключевые слова: метаболит гимантана, паркинсонический синдром, МФТП, экссудативное воспаление, висцеральная боль, соматическая боль

Investigation of antiparkinsonian, anti-inflammatory and analgesic effects of ADK-1058, a metabolite of hemantane, in comparison with hemantane

Kapitsa I.G., Ivanova E.A., Voronina T.A., Valdman E.A., Avdiunina N.I.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. Antiparkinsonian, anti-inflammatory and analgesic activity of ADK-1058, a metabolite of hemantane, was investigated in comparison with hemantane at the effective dose of 20 mg/kg. ADK-1058 exhibits a minor antiparkinsonian effect by reducing the severity of oligokinesia in C57BL/6 mice with MPTP-induced parkinsonian syndrome. ADK-1058 exhibits anti-inflammatory activity in the model of acetic acid peritonitis, but has no analgesic effect in visceral or somatic pain in mice. Effects of ADK-1058 at the dose of 20 mg/kg do not exceed antiparkinsonian, anti-inflammatory or analgesic effects of hemantane at the dose of 20 mg/kg.

Keywords: metabolite of hemantane, experimental parkinsonian syndrome, MPTP, exudative inflammation, visceral pain, somatic pain

Автор, ответственный за переписку:

Капица Инга Геннадиевна – к.б.н., ст. научный сотрудник ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, Балтийская ул. 8; e-mail: ingakap73@mail.ru

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) — хроническое прогрессирующее заболевание головного мозга, преимущественно характеризующееся дегенерацией дофаминергических нейронов чёрной субстанции с образованием в них особых внутриклеточных включений (тельца Леви) и проявляющееся сочетанием гипокинезии с ригидностью, тремором покоя и постуральной неустойчивостью. Помимо классических двигательных нарушений, для БП характерен широкий спектр немоторных проявлений, включающий психические, вегетативные, сенсорные расстройства, нарушения сна и бодрствования, которые отражают вовлечение других структур центральной нервной системы, а также периферической нервной системы в патологический процесс [1]. Одно из значимых мест в структуре недвигательных симптомов БП занимают болевые синдромы, которые приводят к снижению качества жизни пациентов, отличаются сложностью патогенетических механизмов и трудностью в лечении. Частота

хронической боли при БП, продолжающейся свыше трёх месяцев, по данным разных авторов, составляет от 40 до 70% и превышает таковую в общей популяции (от 20 до 44%) [2]. Предполагают, что боль у пациентов может быть связана с основными симптомами паркинсонизма, прежде всего мышечной ригидностью, сопутствующей скелетно-мышечной патологией или может быть самостоятельным симптомом, отражающим нарушение функции ноцицептивной системы при БП [3]. Показано, что при адекватной терапии болей у пациентов с БП увеличивается двигательная активность, улучшаются социальная адаптация и качество жизни.

Гимантан — новый оригинальный препарат, созданный в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», обладает выраженной противопаркинсонической активностью, доказанной на экспериментальных моделях [4–6] и подтверждённой в клинике у больных с начальными стадиями БП [7]. Показано, что гимантан обладает противовоспалительной активностью как на модели экспериментального

нейровоспаления, так и на модели периферического воспаления [8], а также оказывает противоболевое действие [9, 10].

Результаты фармакокинетического исследования препарата показали, что в организме гимантан метаболизируется в гидроксилированные метаболиты [11]. Установлено, что период полувыведения гимантана и его метаболита, гидроксилированного в 2 разных положениях, в 2 раза меньше, чем период полувыведения гидроксилированного в одном положении метаболита [11], что явилось предпосылкой синтеза моногидроксилированного метаболита с целью создания более длительно действующего аналога гимантана. В опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» было синтезировано моногидроксилированное производное гимантана под шифром АДК-1058.

Целью данного исследования является сравнительная оценка антипаркинсонической, противовоспалительной и противоболевой активности метаболита гимантана АДК-1058 с гимантаном.

Материалы и методы

Опыты проводились на половозрелых инбредных мышах-самцах линии C57B1/6 весом 23–29 г и на аутбредных белых мышах-самцах массой 24–26 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая», Московская область. Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при 12-часовом световом режиме. Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» от 06.04.1973 г., № 1045–73. Организация и проведение работы выполнялись в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. (Страсбург).

Для оценки антипаркинсонической активности соединений использовалась методика создания паркинсонического синдрома (ПС) при помощи однократного внутрибрюшинного (в/б) введения нейротоксина 1-метил 4-фенил 1,2,3,6 тетрагидропиридина (МФТП) мышам линии C57B1/6 в дозе 30 мг/кг [12]. Об антипаркинсонической активности соединений судили по уменьшению выраженности на их фоне основных экстрапирамидных нарушений, вызванных МФТП: ригидности, олигокинезии, нарушении координации движений и каталепсии, оценку которых проводили согласно методическим рекомендациям [12].

Влияние соединения АДК-1058 на выраженность экссудативного воспаления в сравнении с гимантаном исследовалось на модели «Уксуснокислый перитонит» у аутбредных белых мышей [13]. Мыши контрольной группы получали физиологический раствор, а опытных — гимантан или соединение АДК-1058 в дозе 20 мг/кг за 1 ч до введения уксусной кислоты. В ответ на введение 1% раствора уксусной кислоты у мышей развивается висцеральная болевая реакция, проявляющаяся специфическими болевыми движениями животных, — корчами, количество которых подсчитывали на протяжении 15 мин после введения агента [13, 14]. Через 3 ч после введения уксусной кислоты мышам подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и измеряли его массу. О наличии у изучаемых соединений противоболевого действия судили по снижению количества корчей, а о наличии противовоспалительной активности — по снижению средней массы экссудата.

Исследование влияния соединения АДК-1058 на выраженность соматической боли в сравнении с гимантаном проводили в тесте «Отдергивания хвоста» у аутбредных белых мышей. АДК-1058 и гимантан вводили за 40 мин до тестирования в дозе 20 мг/кг. Животным контрольных групп вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Болевое раздражение наносили на хвост локально, воздействуя тепловым излучением с помощью анальгезиметра TSE-system (Германия) при интенсивности излучения, равной 25%, что соответствовало средней температуре раздражителя 50–55 °С. Регистрировали латентный период отдергивания хвоста в секундах, по увеличению которого делали вывод о наличии анальгетического действия соединений в отношении соматической боли [14].

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0. В каждой экспериментальной группе было от 8 до 16 животных. Статистическую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики — критерия Манна–Уитни. Результаты в таблицах представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего (Mean $\pm$ SEM). Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Метаболит гимантана АДК-1058 не оказал влияния на уменьшение ригидности у мышей с ПС. На фоне введения гимантана отмечалось недостоверное увеличение на 15% длины шага мышей с ПС по сравнению с группой активного контроля (табл. 1).

На фоне введения метаболита гимантана выявлено значимое уменьшение выраженности олигокинезии у мышей с ПС, оцениваемой в тесте «Открытое поле». Так, АДК-1058 достоверно повышал горизонтальную активность животных по сравнению с группой МФТП

Таблица 1

Влияние АДК-1058 в сравнении с гимантаном на поведение мышей C57B1/6 с МФТП-вызванным паркинсоническим синдромом в тестах «Оценка ригидности» и «Открытое поле» (Mean±SEM)

Группа	Оценка ригидности	Тест «Открытое поле»	
	длина шага, см	горизонтальная активность, ед.	вертикальная активность, ед.
Пассивный контроль (физ. р-р)	6,30±0,2	67,3±6,6	13,5±2,0
Активный контроль (МФТП 30 мг/кг в/б)	4,12±0,2 [#]	2,7±1,8 [#]	0±0 [#]
Гимантан 20 мг/кг в/б + МФТП	4,74±0,3	44,8±11,0*	2,8±1,1*
АДК-1058 20 мг/кг в/б + МФТП	4,37±0,2	27,0±9,7*	0,6±0,4

Примечание: [#] — $p<0,05$ — достоверность различий по сравнению с группой пассивного контроля; * — $p<0,05$ — достоверность различий по сравнению с группой активного контроля (МФТП).

Таблица 2

Влияние АДК-1058 в сравнении с гимантаном на поведение мышей C57B1/6 с МФТП-вызванным паркинсоническим синдромом в тестах оценки координации движений (Mean±SEM)

Группа	Вращающийся стержень (10 оборотов/мин)	Вертикальный стержень	
	ЛВ падения, с	ЛВ поворота, с	ЛВ спуска, с
Пассивный контроль (физ. р-р)	164,5±11,1	—	—
Активный контроль (МФТП 30 мг/кг в/б)	38,0±6,7 [#]	40,0±5,0	19,0±1,0
Гимантан 20 мг/кг в/б + МФТП	63,2±7,2*	4,8±0,8*	9,8±1,2*
АДК-1058 20 мг/кг в/б + МФТП	43,3±9,3	8,5±3,8*	11,8±2,0

Примечание: * — $p<0,05$ — достоверность различий по сравнению с группой МФТП; [#] — $p<0,05$ — достоверность различий по сравнению с группой пассивного контроля; ЛВ — латентное время.

(табл. 1). Препарат сравнения гимантан увеличил как число горизонтальных перемещений, так и число вертикальных стоек у мышей с ПС по сравнению с группой, получавшей только нейротоксин. Активность АДК-1058 в тесте «Открытое поле» не отличалась от действия гимантана.

На фоне введения метаболита гимантана мышам с ПС достоверного улучшения моторной активности и координации движений, регистрируемых в тесте «Вращающийся стержень», не выявлено, однако соединение способствовало улучшению вышеуказанных показателей, о чем свидетельствовали данные, полученные в ходе выполнения теста «Вертикальный стержень». Так, введение АДК-1058 достоверно уменьшило в 4,7 раза латентное время, затрачиваемое на разворот животного на 180° в направлении спуска, и в 1,6 раза время, необходимое для спуска мыши с верхушки вертикального стержня (табл. 2).

Гимантан статистически значимо снижал нарушения моторной активности и координации движений у мышей с ПС по сравнению с группой, которой вводили только нейротоксин (табл. 2).

Через 7 дней после однократного введения МФТП мышам C57B1/6 проводили изучение влияния метаболита гимантана в сравнении с гимантаном на выраженность каталепсии, потенцированной введением малой дозы галоперидола (0,1 мг/кг, подкожно). Показано, что на фоне метаболита АДК-1058 время нахожде-

ния животных в неудобной позе «лектора» через 60 и 120 мин после введения галоперидола было на 40 и 24% меньше, соответственно, чем в группе МФТП, но эти различия не достигали уровня достоверности. Гимантан как через 60, так и через 120 мин достоверно снижал выраженность каталепсии на 67,3 и 57%, соответственно, по сравнению с группой мышей, по-

Таблица 3

Влияние АДК-1058 в сравнении с гимантаном на каталепсию, вызванную введением малой дозы галоперидола мышам C57B1/6 с МФТП-вызванным паркинсоническим синдромом (Mean±SEM)

Группа	ЛВ нахождения в позе «лектора», с	
	60 мин после введения галоперидола 0,1 мг/кг	120 мин после введения галоперидола 0,1 мг/кг
Пассивный контроль (физ. р-р)	0,0	5,0±3,1
МФТП 30 мг/кг в/б	34,5±8,4 [#]	94,6±10,2 [#]
Гимантан 20 мг/кг в/б + МФТП	11,3±6,5*	40,7±14,6*
АДК-1058 20 мг/кг в/б + МФТП	20,7±12,7	71,8±16,8

Примечание: * — $p<0,05$ — достоверность различий по сравнению с группой МФТП; [#] — $p<0,05$ — достоверность различий по сравнению с группой пассивного контроля; ЛВ — латентное время.

Таблица 4

Влияние АДК-1058 в сравнении с гимантаном на выраженность экссудативной реакции в тесте «Уксуснокислый перитонит» у мышей (Mean±SEM)

Группа	Средняя масса экссудата, мг	
	внутрибрюшинное введение	интрагастральное введение
Активный контроль, физ. р-р	840,6±37,0	885,0±45,3
Гимантан, 20 мг/кг	541,4±37,5*	646,8±79,1*
АДК-1058, 20 мг/кг	626,4±68,1*	595,9±55,8*

Примечание: * — $p \leq 0,05$, достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Таблица 5

Влияние АДК-1058 в сравнении с гимантаном на выраженность висцеральной боли у мышей в тесте уксуснокислых корчей (Mean±SEM)

Группа	Количество корчей, ед.	
	внутрибрюшинное введение	интрагастральное введение
Активный контроль, физ. р-р	55,4±1,8	74,6±4,0
Гимантан, 20 мг/кг	39,0±3,7*	48,1±6,1*
АДК-1058, 20 мг/кг	69,0±6,2	76,3±4,5

Примечание: * — $p \leq 0,05$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

лучавших только МФТП (табл. 3). Влияние гимантана на выраженность катаlepsии статистически значимо не отличалось от подобного действия его метаболита.

Соединение АДК-1058 при в/б введении на 25,5% достоверно снижало среднюю массу экссудата относительно показателей контрольной группы, уступая при этом гимантану, который уменьшал выраженность экссудативной реакции на 35,6% (табл. 4). При интрагастральном введении метаболит был немного активнее гимантана: выраженность воспалительной реакции на его фоне достоверно уменьшалась на 32,7% относительно контрольной группы; тогда как при введении гимантана данное уменьшение составило 26,9% ($p < 0,05$).

Установлено, что метаболит гимантана АДК-1058 в дозе 20 мг/кг при обоих способах введения не только не снижал выраженность висцеральной боли у мышей, но даже несколько увеличивал болевую реакцию от-

Литература

1. Chaudhuri K.R., Schapira A.H. Non-motor symptoms of Parkinson's disease: dopaminergic pathophysiology and treatment. *Lancet Neurol.* 2009; 8: 464–474.
2. Lee M.A. Walker R.W., Hildreth T.J. et al. A survey of pain in idiopathic Parkinson's disease. *J. Pain Symptom Manage.* 2006; 32: 462–469.
3. Fahn S. Description of Parkinson's disease as a clinical syndrome. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 991: 1–14.

Таблица 6

Влияние АДК-1058 в сравнении с гимантаном на выраженность соматической боли у мышей в тесте отдергивания хвоста (Mean±SEM)

Группа	Латентный период, с	
	внутрибрюшинное введение	интрагастральное введение
Активный контроль, физ. р-р	4,7±0,2	4,3±0,2
Гимантан, 20 мг/кг	5,9±0,3*	5,2±0,3*
АДК-1058, 20 мг/кг	4,6±0,2	4,5±0,2

Примечание: * — $p \leq 0,05$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

носительно значений контрольной группы (табл. 5). Гимантан в дозе 20 мг/кг проявлял выраженный противоболевой эффект, достоверно снижая среднее количество корчей на 29,6% и 35,5%, при в/б и интрагастральном введениях, соответственно, относительно показателей контрольной группы.

При изучении влияния соединения АДК-1058 в тесте «Отдергивание хвоста» снижения выраженности соматической боли у мышей не наблюдалось. Гимантан как при в/б, так и интрагастральном введении, проявлял достоверную анальгетическую активность, увеличивая латентный период отдергивания хвоста у мышей на 25,8 и 20,6%, соответственно, относительно контрольной группы животных (табл. 6).

Выводы

1. Метаболит гимантана моногидроксированное соединение АДК-1058 (20 мг/кг) проявляет слабую противопаркинсоническую активность, снижая выраженность отдельных экстрапирамидных нарушений, в основном олигокинезии, вызванных введением нейротоксина МФТП и проявляет противовоспалительную активность на модели уксуснокислого перитонита у мышей, но не оказывает анальгетического действия на моделях висцеральной и соматической боли.

2. Метаболит гимантана моногидроксированное соединение АДК-1058 (20 мг/кг) по противопаркинсоническому, противовоспалительному и противоболевому действию не превосходит соответствующую активность гимантана (20 мг/кг).

4. Неробкова Л.Н., Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Маркина Н.В., Шаркова Л.М. Влияние нового производного аминадамантана А7 на проявления паркинсонического синдрома, вызванного системным введением нейротоксина МФТП. *Эксп. и клин. фарм.* 2000; 3: 3–6.

5. Непоклонов А.В., Капица И.Г., Иванова Е.А., Воронина Т.А., Вальдман Е.А. Изучение эффектов гимантана на модели ранней («домоторной») стадии болезни паркинсона у крыс. *Эксп. и клин. фарм.* 2012; 75 (11): 3–6.

6. Иванова Е.А., Капица И.Г., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Противопаркинсоническая активность гимантана на модели гемипаркинсонического синдрома у крыс. Бюлл. Эксп. биол. и мед. 2015; 159 (3): 362–365.
7. Катунина Е.А., Петрухова А.В., Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Саядян Х.С. Возможности применения гимантана при лечении болезни Паркинсона. Журн. Неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2008; 108 (6): 24–27.
8. Иванова Е.А., Капица И.Г., Непоклонов А.В., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., Воронина Т.А. Противовоспалительная активность гимантана на моделях периферического воспаления и нейровоспаления, индуцированного липополисахаридом. Химико-фармацевт. журн. 2013; 47 (10): 12–15.
9. Средство для терапии боли и воспаления: заявка РФ № 2012139274/15 / Е.А. Вальдман [и др.]; заявл. 14.09.12; опубл. 20.03.14.
10. Ivanova E.A., Kapitsa I.G., Valdman E.A., Voronina T.A. Comparison of the analgesic activity of antiparkinsonian aminoadamantane derivatives amantadine and hemantane. *Advances in Parkinson's Disease*. 2016; 5: 50–60.
11. Литвин Е.А. Биотрансформация и фармакокинетика нового противопаркинсонического препарата гимантана (экспериментальное исследование). Автореф. ... канд. биол. наук: 14.03.06. М.: 2012; 24.
12. Воронина Т.А., Вальдман Е.А., Неробкова Л.Н., Капица И.Г. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью. В кн: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012; 219–235.
13. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В кн: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012; 746–58.
14. Воронина Т.А., Гузевых Л.С. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств. В кн: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К, 2012; 197–218.

Хемореактомное моделирование эффектов аскорбата, никотината, оксибутирата, комената и карбоната лития

Торшин И.Ю.¹, Сардарян И.С.², Громова О.А.³, Расташанский В.А.¹, Федотова Л.Э.³

¹ – ГБОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Москва

² – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет» Минздрава России, г. Санкт-Петербург

³ – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

Резюме. Получены оценки нейрофизиологических, фармакокинетических, гемодинамических, противовоспалительных свойств аскорбат-аниона в составе аскорбата лития. По сравнению с контрольными молекулами (никотинатом, оксибутиратом, коменатом и карбонатом лития). Аскорбат-аниону свойственно большее сродство к серотониновым, дофаминовым, бензодиазепиновым, адренергическим рецепторам. Более высокое, по сравнению с никотинатом, сродство к рецепторам бензодиазепинов человека указывает на возможные анксиолитические эффекты аскорбата. Аскорбат-анион может характеризоваться выраженным антиоксидантным эффектом и противовоспалительным действием, обусловленным модуляцией метаболизма простагландинов. Аскорбат-анион может проявлять антикоагуляционный, антигиперлипидемический и антигипергликемический эффекты. Результаты хемореактомного моделирования показали, что карбонат анион не обладает ни одним из вышеперечисленных свойств аскорбат-аниона.

Ключевые слова: соли лития, аскорбат лития, хемоинформатика

Chemoreactome modeling the effects of anions of lithium salts ascorbate, nicotinate, hydroxybutyrate, komenata and lithium carbonate

Torshin I.Yu.¹, Sardaryan I.S.², Gromov O.A.³, Rastashansky V.A.¹, Fedotova L.E.³

¹ – Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

² – FSBI HPE «St. Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

³ – FSBI HPE «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo

Abstract. The estimates of the neurophysiological, pharmacokinetic, hemodynamic and anti-inflammatory properties of ascorbate anion were obtained. In comparison with the control molecules (nicotinate, oxybutyrate, comenata, carbonate) ascorbate anion has characteristically higher affinity for serotonin, dopamine, benzodiazepine, adrenergic receptors. Higher affinity for human benzodiazepine receptor indicates possible anxiolytic effects of ascorbate. Ascorbate anion can be characterized by a strong antioxidant and anti-inflammatory effect caused by modulation of prostaglandin metabolism. Ascorbate anion can also exhibit anticoagulant, antihyperglycemic and antihyperlipidemic effects. Chemoreactome simulation results also indicated that carbonate anion has none of the aforementioned properties of ascorbate anion.

Keywords: lithium, lithium ascorbate, cheminformatics

Автор, ответственный за переписку:

Громова Ольга Алексеевна – д.м.н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИВГМА МЗ России, 153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: unesco.gromova@gmail.com

Введение

Соли лития существенно отличаются по своим фармакокинетическим и другим биологическим свойствам, что обуславливает существенные различия в их биодоступности и фармакологическом действии. Неорганические соли (хлорид, карбонат), вследствие сравнительно малых размеров аниона, в принципе не могут проявлять высокоспецифичных взаимодействий с белками протеома или с другими макромолекулами, что и было подтверждено в результате настоящего анализа. В результате, транспорт ионов лития внутрь клетки существенно затруднён и большая часть ионов лития рассеивается в межклеточной жидкости.

В отличие от неорганических солей, соли с *органическими анионами* (аскорбат, никотинат, оксибутират

и др.), способные к более специфическим взаимодействиям с белками, обеспечивают более эффективный транспорт ионов лития внутрь клетки и, кроме того, могут также проявлять специфические эффекты. До настоящего времени, систематического исследования различий в биологических и фармакологических свойствах солей лития и соответствующих анионов не было проведено.

В настоящей работе представлены результаты комплексного сравнительного анализа биологических свойств анионов аскорбата, никотината, оксибутирата и комената с использованием нового направления в постгеномной медицине — хемореактомного моделирования. Оценка эффективности и безопасности потенциальных лекарственных средств на основе их молекулярной структуры является важнейшей задачей

постгеномной медицины. В рамках постгеномной парадигмы, множество всех генов организма данного вида (геном) предоставляет информацию для синтеза всех белков организма (протеом), активность которых приводит к образованию всех метаболитов организма (метаболом) через осуществление всей совокупности химических реакций, протекающих в организме (реактом).

В рамках хемореактомного моделирования принимается, что молекула потенциального лекарственного средства похожа на эндогенные или экзогенные молекулы метаболизма и, таким образом, «мимикрирует» под определенные метаболиты (вследствие наличия тех или иных сходств в химической структуре). Связываясь с теми или иными белками протеома, рассматриваемая молекула производит соответствующие данному лекарству эффекты (как позитивные, так и негативные). Совокупность всей имеющейся для заданной молекулы информации о взаимодействии с белками протеома (профиль сродства) позволяет сделать обоснованные выводы о потенциальных эффектах исследуемой молекулы [1].

В данном исследовании был проведен анализ фармакологических «возможностей» химической структуры аскорбата на основе хемоинформационного подхода [2, 3] — т. е. сравнения химической структуры молекулы аскорбата (молекулярной структуры с непонятно изученными молекулярно-фармакологическими свойствами) со структурами миллионов других молекул, для которых рассматриваемые молекулярно-фармакологические были изучены ранее. Данное сравнение проведено с использованием современных методов анализа данных, которые разрабатываются в научной школе акад. РАН Ю.И. Журавлёва [2–8].

Материалы и методы

Хемоинформатика — область исследований на стыке структурной химии, фармакологии и биоинформатики, в которой взаимосвязи типа «химическая структура» — «свойство вещества» исследуются методами современной информатики. Хемоинформационный анализ позволяет найти молекулы, схожие с исследуемой и, соответственно, предположить физиологические, фармакологические и другие свойства исследуемой молекулы на основе имеющейся информации о свойствах молекул, наиболее близких по структуре.

Особый подраздел хемоинформатики, *хемореактомный анализ*, направлен на оценку биологических активностей исследуемой молекулы (в частности, моделирование профиля сродства исследуемой молекулярной структуры к различным белкам протеома). В настоящей работе был проведен сравнительный хемореактомный анализ анионов *аскорбата, никотината, оксibuтирата, комената, карбоната* (рис. 1), входящих в состав соответствующих солей лития.

В настоящей работе, для проведения хемоинформационного анализа был применен новый математический метод, основанный на комбинаторной теории разрешимости [2–7]. Комбинаторная теория разрешимости, представляющая собой развитие алгебраического подхода к задачам распознавания, является современным инструментом для исследования признаков описаний объектов. В случае задачи установления молекул, химическая структура которых схожих с заданной, объектами исследования являются *хемографы*. Хемограф (χ -граф) — особая разновидность графа (т. е. математического объекта, являющегося как совокупности множества вершин и множества ребер — связей между вершинами). Хемографом называется конечный, связный, неориентированный, размеченный граф без петель, с кликовым числом, не превышающим 3.

В рамках комбинаторной теории разрешимости, χ -графы рассматриваются как объекты, а их инварианты (или corteжи инвариантов) — как признаковые описания объектов. В применении к хемографам, практически важны *теорема о полноте corteжей инвариантов произвольного хемографа* и *теорема соответствия критерия полноты инварианта критерию разрешимости/регулярности* [3], основной результат которых можно записать в следующей форме:

$$\forall_{a,b \in \text{Pr}} \text{iso}(a) \neq \text{iso}(b) \Rightarrow \exists_{i=1 \dots |\chi|} i: \bar{1}[i]\chi(a) \neq \bar{1}[i]\chi(b) \quad (1)$$

где $\text{Pr} \subset I_n \times I_k$ — множество прецедентов графов (полученный из заданного набора молекулярных структур), I_n — множество начальных информаций (вектора $\hat{1}\chi$), I_k — множество конечных (финальных) информаций, $\text{iso}(G)$ — метка, указывающая на принадлежность графа G к некоторому классу изоморфных графов (очевидна из описаний молекулы в базе данных химических структур) в, I_k, χ — множество

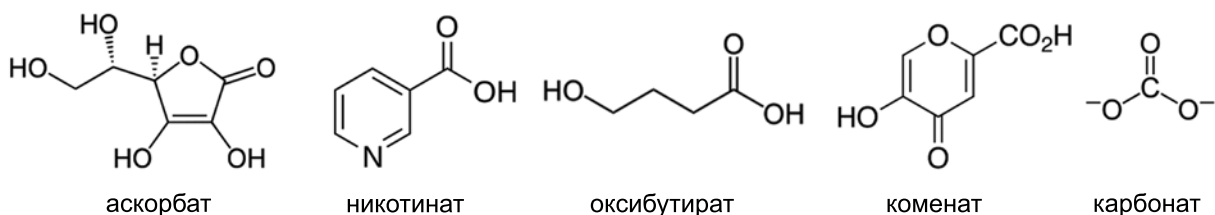


Рис. 1. Химические формулы и модели пространственных структур исследованных анионов солей лития

элементарных χ -инвариантов (фрагментов химической структуры), $\hat{\chi}$ — кортеж-инвариант (список фрагментов структур, применимый к структуре любой молекулы). Если условие (1) выполнено для заданного множества χ , то χ обеспечивает разрешимость задачи над Pg и позволяет систематически исследовать все фрагменты углеродных скелетов органических молекул. Если множество Pg регулярно, т. е. не содержит двух идентичных хемографов (молекул), то множество χ устанавливается на основе стандартного подхода к вычислению характеристической функции множества информативных значений признаков [3–5, 7] для множества χ , так что $T(\alpha)$, $\alpha \in \chi$ определяется на основе выбора элемента кортеж-инварианта (т. е. типа фрагмента углеродного скелета) с наибольшим рангом информативности α :

$$T(\alpha) = \begin{cases} 1 & \text{если } \exists_{a,b \in Pr} : (\hat{\chi}[\alpha]\chi(a) \neq \hat{\chi}[\alpha]\chi(b)) \wedge (\forall k < \alpha \Rightarrow \\ & \Rightarrow \hat{\chi}[k]\chi(a) = \hat{\chi}[k]\chi(b)) \\ 0 & \text{в противном случае} \end{cases} \quad (2)$$

Данная процедура позволяет найти такой кортеж-инвариант, который бы позволял отличать каждый хемограф (молекулу) в Pg от всех остальных. Тестирование условий (1, 2) проводилось на случайных выборках по 50 000 попарно различных структур молекул из базы данных PubChem [9] с использованием бинарных кортеж-инвариантов над множеством χ -цепей (цепных фрагментов химической структуры) длины n ($n=1\dots7$). В результате вычислений было установлено, что при $n=7$ аккуратность различения одной молекулы от другой составила 99,4% и даже при более коротких длинах χ -цепей ($n=4,5$) достигались довольно высокие показатели аккуратности (93...97%).

С использованием полученного множества χ и метрики Хэмминга, функция расстояния между хемографами d_χ над бинарными χ -инвариантами определяется следующим образом:

$$d_\chi(X_1, X_2) = \frac{1}{|\chi|} \sum_{i=1}^{|\chi|} \hat{\chi}[i]\beta[X_1]\chi \oplus \hat{\chi}[i]\beta[X_2]\chi. \quad (3)$$

Данное выражение, отражающее «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами, и было использовано для решения задачи поиска молекул, структурно схожих с аскорбатом.

Таким образом, на первом этапе хемоинформационного анализа с использованием расстояния d_χ устанавливается список наиболее близких к аскорбату химических структур. На втором этапе, для каждой молекулы из баз данных извлекаются все имеющиеся данные экспериментального измерения различных биологических свойств этой молекулы и проводится хемореактомный анализ.

Хемореактомный анализ направлен на оценки биологических активностей и, прежде всего, моделирование профиля сродства исследуемой молекулярной

структуры к различным белкам протеома человека. Профиль сродства необходим для последующего экспертного анализа потенциальных позитивных и негативных эффектов исследуемой молекулы. Элементами множества I_n являются вектора $\hat{\chi}$, соответствующие бинарным или численным кортеж-инвариантам хемографов, обладающих свойством локальной полноты. При этом, могут использоваться не только тупиковые кортеж-инварианты, полученные в результате комбинаторного тестирования локальной полноты (1, 2), но и кортежи большей мощности (например, включающие все виды элементарных χ -инвариантов, возможные для заданного словаря меток хемографа и найденные в исследованном множестве хемографов и т. д.). Элементами множества являются вектора, соответствующие теоретико-множественным формам профилей сродства (квантильные, вероятностные, ранговые, бинарные).

После вычисления выполнимости условий (1, 2), для каждого из свойств, для которого необходимо рассчитать значения соответствующей константы (константа связывания, константа ингибирования, те или иные экспериментально измеренные свойства молекул и др.) выбираются все схожие молекулы (для которых это свойство было экспериментально измерено) и строится эмпирическая функция распределения значений константы. Представленные в таблицах 2–14 оценки значений различных констант были получены как математическое ожидание и дисперсия соответствующей эмпирической функции распределения, которая использовалась после соответствующей фильтрации посредством i -спектров с образованием непрерывной повсюду дифференцируемой функции и анализа модальности (т. е. числа пиков).

Результаты и обсуждение

С использованием описанного выше метода хемоинформационного анализа были проведены сравнения химической структуры аскорбата с молекулами в базе данных метаболома человека и с молекулами в базах данных лекарственных средств. В качестве модели метаболома человека использовались более 40 000 соединений, приведённых в базе данных HMDB (Human Metabolome Database, т. е. база данных метаболома человека) [10]. Данные соединения включают большинство соединений, измеряемых в плазме крови человека и, также, ряд лекарственных средств и их метаболитов. В таблице 1 представлены наиболее интересные результаты анализа сходства аскорбата с фармакологически активными веществами.

Анализ сходств химической структуры аскорбиновой кислоты с фармакологически активными веществами указал на сходство аскорбата с многочисленными антиоксидантами растительного происхождения, в т. ч. полифенолами черного и зеленого чая, эпигаллокатехинами, флавоноидами. Данные соединения характеризуются антихолестеринемии-

Таблица 1

Соединения, структурно схожие с аскорбатом и характеризующиеся известной фармакологической активностью

d _x	Соединение	Фармакологические роли
0,0	 Аскорбат	Витамин С, антиоксидант
0,26	 Дауковая кислота	Антиоксидант растительного происхождения
0,37	 Теафлавин	Антиоксидантный полифенол из экстракта чая, антихолестеринемическое и противоопухолевое действие
0,37	 5-этилсотолон	Одорант экстрактов пажитника
0,39	 Теафлагаллин	Антиоксидантный полифенол
0,40	 Эпикатехин-О-галлат	Флавоноид зеленого чая, противоопухолевое, антибактериальное действие, антагонист опиоидных рецепторов
0,44	 Эпигаллокатехин	Флавоноид зеленого чая, противоопухолевое, ноотропное действие
0,45	 Сотолон	Одорант экстрактов пажитника
0,46	 Гомофуреанол	Антиоксидант ферментированной соевой пасты
0,47	 Глицинол	Фитоалексин сои, антиэстрогенное действие
0,48	 Даттеловая кислота	Антиоксидант черной смородины
0,49	 Лютеофорол	Флавоноид яблок, антиоксидант, противомикробное действие

Примечание: Соединения упорядочены в соответствии со значением d_x, «химического расстояния» от молекулы аскорбата (см. Методы). Более низкие значения d_x соответствуют большей структурной близости молекулы вещества к аскорбату.

ческим, противоопухолевым, антибактериальным и ноотропным действием. Данный результат был подтвержден и существенно уточнен в результате проведения хемореактного моделирования.

В процессе проведения хемореактного моделирования, было проанализировано более 500 000 разновидностей биологических активностей более чем 10 000 000 молекул, информация о которых представлена в базе данных PubChem [9]. Из полученного списка из 4 520 видов биологической активности были выбраны те, отличия в значениях оценок достоверно отличались для аскорбата по сравнению с контрольными молекулами — никотинатом и оксибутиратом. В результате, для аскорбата, никотината, оксибутирата и карбоната лития были получены оценки различных свойств: нейрофизиологических, фармакокинетических, вазоактивных и гемодинамических, противовоспалительный и других.

Хемореактомный анализ нейрофизиологических свойств аскорбата и других анионов

Хемореактомное моделирование показало, что аскорбат-аниону, по сравнению с никотинатом, свойственно большее средство к серотониновым, дофаминовым, бензодиазепиновым, адренергическим и др. рецепторам (табл. 2). Более высокое средство к рецепторам, указывает, во-первых, на возможность модуляции активности этих рецепторов аскорбатом лития и, во-вторых, на более интенсивный транспорт аскорбата лития внутрь нейронов (в процессе интернализации рецепторов с поверхности клеточной мембраны).

Анализ указал на более высокое средство аскорбата к *серотониновым рецепторам* 5HT1A, 5HT2B, 5HT6 человека (по сравнению со средством никотината). Рецепторы типа 5HT1A регулируют широкий круг

Таблица 2

Связывание с рецепторами нейротрансмиттеров и другие неврологические эффекты аскорбата в сравнении с никотинатом и карбонатом лития (по результатам хемореактного анализа)

Конст.	Аскорбат	Никотинат	Карбонат	Ошиб.	Ед.	Активность
<i>Серотониновые рецепторы</i>						
Ki	173,1	1 050	5 400	314	нМ	Средство к рецептору 1A 5-гидрокситриптамина гиппокампа, лиганд 8-ОН-DPAT
Ki	648	2 980	8 850	872	нМ	Ингибирование всасывания 5НТТ, лиганд циталопрам
Ki	120,1	1 378	6 300	394	нМ	Средство к рецепторам 5НТ2В человека, лиганд LSD
Ki	263,4	604	10 045	319,6	нМ	Вытеснение LSD из рецептора 5-НТ6 человека
<i>Дофаминовые рецепторы</i>						
Ki	1 164	2 564	7 340	397,8	Вi	Средство к рецепторам допамина D1 в полосатом теле мозга крысы, лиганд фенолдопам
Ki	26,28	421,8	3 450	559	нМ	Средство к рецепторам допамина D3 человека, лиганд спиперон
<i>Бензодиазепиновые рецепторы</i>						
Ki	343,9	4 344	9 284	972	нМ	Средство к рецепторам бензодиазепинов, лиганд диазепам
Ki	248	591	4 829	213,6	нМ	Вытеснение флумазенила из центрального бензодиазепинового рецептора корковых мембран человека
<i>Глутаматные рецепторы</i>						
Ki	622	1 866	7 402	319,6	нМ	Ингибирование токов N-метил-D-аспартат рецепторов NR1a/NR2D
IC50	47	614,6	4 356	95,09	нМ	Ингибирование рецептора mGluR1a человека, путем измерения внутриклеточного кальция
<i>Адренергические рецепторы</i>						
Ki	173	438,7	6 820	182,1	нМ	Средство к альфа-2 адренергическим рецепторам гомогенатов мозга крыс, лиганд клонидин
Ki	547	1 883	6 029	655	нМ	Средство к альфа-1 адренергическим рецепторам коры головного мозга крысы, лиганд празозин
<i>Ацетилхолиновые рецепторы</i>						
Ki	115	1 838	5 928	2 539	нМ	Вытеснение N-метилскополамина из мускариновых рецепторов M1
<i>Ингибирование GSK3</i>						
—	47	3,3	0	6,7	%	Ингибирование GSK3B при 1 мкМ
IC50	13,2	2 534	8 240	191	нМ	Константа ингибирования GSK3B
IC50	3 890	6 835	13 014	6 011	нМ	Ингибирование фосфорилирования GSK3B посредством АКТ1
<i>Моделирование экспериментальных эффектов</i>						
—	46,45	1,804	—	23,98	%	% устранения амнезии, вызванной электрошоком в эксперименте у крыс при дозе 10 мг/кг в/м
—	60,4	111,1	—	81,59	мг/кг	Противосудорожная активность в модели электрошока

Примечание: «Конст.», общепринятое название типа исследуемой фармакологической константы («Ki», «IC50» и др.); «Ошиб.» — погрешность оцениваемых свойств; «Ед.», единицы измерения.

функций ЦНС, включая агрессию, тревогу, аппетит, артериальное давление, ЧСС, память, ноцицепцию, цикл «сон-бодрствование», терморегуляцию. Рецепторы типа 5HT_{2B} регулируют тревожность, аппетит, моторику ЖКТ, вазоконстрикцию, а рецепторы типа 5HT₆ — тревожность, когнитивные способности, обучение, память [11]. Более высокое ингибирование всасывания 5HTT ($K_i=872$ нМ, в субмикромольном диапазоне, характерном для лекарственных средств) указывают на возможные эффекты аскорбата лития как селективного ингибитора обратного захвата серотонина (СИОЗС), которые используются для лечения тревожных расстройств и депрессии.

Более высокое, по сравнению с никотинатом, сродство аскорбат-аниона к рецепторам бензодиазепинов человека указывает на возможные анксиолитические эффекты аскорбата. Этот вывод подтверждается результатами моделирования взаимодействия с NMDA-рецепторами и другими глутаматными рецепторами — аскорбат будет способствовать ингибированию активности NMDA-рецепторов NR1a/NR2D ($K_i=622$ нМ) и метаботропных рецепторов mGluR1a человека ($K_i=47$ нМ). Глутаматные рецепторы поддерживают процессы возбуждения ЦНС, так что их ингибирование соответствует седативному и анксиолитическому эффекту.

Хемореактивное моделирование эффектов аскорбата с использованием экспериментальных данных указало на возможные эффекты аскорбата лития как более эффективного средства, чем никотинат, в устранении амнезии, вызванной электрошоком в эксперименте у крыс (46%, никотинат — только 1,8%), но и возможную противосудорожную активность (см табл. 2).

Важно отметить, что аскорбат может быть более эффективен, чем никотинат и оксибутират (см. табл. 2) в ингибировании активности фермента GSK3B (аскорбат — 47%, никотинат — 3,3%, оксибутират — 6%) — одного из основных таргетных белков воздействия ионов лития. Константа ингибирования GSK3B (IC₅₀) составила 13,2 нМ для аскорбата, 2 534 нМ для никотината и 1 658 нМ для оксибутирата. Иначе говоря, аскорбат-анион имеет наиболее высокий потенциал ингибирования GSK-3, а никотинат — наименьший. Данный результат отчасти подтверждается результатами моделирования фосфорилирования GSK3B посредством AKT1 — значение константы ингибирования IC₅₀ составило 3 890 нМ для аскорбата и было выше для никотината (6 835 нМ).

Результаты хемореактивного моделирования эффектов аскорбата в сравнении с оксибутиратом подтверждает приводимые выше результаты и указывает на дополнительные неврофизиологические эффекты аскорбат-аниона. Во-первых, следует отметить выраженный антагонизм аскорбата по отношению к мю-опиоидным рецепторам (полученные оценки значений констант связывания/ингибирования лежат в наномольном диапазоне, 45...233 нМ), которые

участвуют в формировании болезней зависимости. С точки зрения лечения болезней зависимости также важно возможное сродство аскорбата к каннабиоидным рецепторам ($K_i=346...652$ нМ), бензодиазепиновым рецепторам ($K_i=135...343$ нМ) и дофаминовым рецепторам ($K_i=102...268$ нМ, табл. 3).

Хемореактивное моделирование фармакокинетических и фармакодинамических свойств аскорбата

Из фармакологии известно, что аскорбиновая кислота абсорбируется преимущественно в тонкой кишке, ТСмах после приёма внутрь — приблизительно 4 ч. С увеличением дозы до 200 мг всасывается до 140 мг (70%); при дальнейшем повышении дозы всасывание уменьшается (50–20%). Связь с белками плазмы — 25%. В норме, концентрация аскорбиновой кислоты в плазме составляет 10...20 мкг/мл [12]. Проведенный анализ позволил получить сравнительные оценки фармакокинетических свойств аскорбата (табл. 4). Прогнозирование свойств аскорбата показало, что при приеме даже высоких доз аскорбата (порядка 10 мг/кг/сут), в отличие от никотината и оксибутирата, не будет происходить существенного изменения гематокрита (связанного с изменениями водно-солевого баланса форменных элементов крови): полученная оценка подразумевает весьма малый процент изменения гематокрита — 3,8%.

Моделирование указало на более низкое сродство аскорбата к калиевому каналу KCNH2 и более слабое ингибирование KCNH2. Данный калиевый канал является важным «антитаргетным» белком, взаимодействие с которым следует избегать во время разработки лекарственных средств [13]. Нарушения активности KCNH2 может привести к смертельно опасному «синдрому длинного QT», чрезвычайно повышающего риск внезапной остановки сердца вследствие спонтанно развивающейся аритмии. Общеизвестно, что многие «клинически успешные» препараты характеризуются, тем не менее, весьма опасной тенденцией к ингибированию KCNH2 (т. е. невысокой безопасностью при высокой клинической эффективности) [14].

По сравнению с оксибутиратом, аскорбат в гораздо меньшей степени может ингибировать микросомальный CYP19 — цитохромный фермент ароматазу (эстроген синтазу): IC₅₀ аскорбата — 6 714 нМ, оксибутирата — 145 нМ. Ингибирование CYP19 может приводить к нарушениям баланса стероидных гормонов.

Хемореактивное моделирование противовоспалительных, вазоактивных и гемодинамических свойств аскорбата

Результаты моделирования показывают, что аскорбат-анион может характеризоваться более выраженным противовоспалительным действием, чем никотинат или оксибутират (табл. 5). Противовоспалительное действие осуществляется, по всей видимости, за счёт

Таблица 3

Связывание с рецепторами нейротрансмиттеров и другие неврологические эффекты аскорбата в сравнении с оксibuтиратом (по результатам хемореактивного анализа)

Конст.	Аскорбат	Оксibuтират	Ошиб.	Ед.	Активность
Серотониновые рецепторы					
Ki	220,9	1 261	12,19	нМ	Сродство к рецептору-2 5-гидрокситриптамина лобной коры крыс
Ki	37,57	339,5	0,0475	нМ	Сродство к рецептору 5-HT7b, лиганд 5-СТ
Ki	11,98	1 344	67,2	нМ	Сродство к 5-HT1A, лиганд 8-ОН-DPAT
Ki	263,4	1 503	319,6	нМ	Сродство к 5-HT6, лиганд LSD
Опиоидные рецепторы					
Ki	44,96	187,7	-2,29	нМ	Сродство к опиоидным рецепторам дельта-1 крысы, лиганд Ile5,6- дельторфин-2
Ki	146,6	1 474	-23,19	нМ	Сродство к мю-опиоидным рецепторам человека
—	233,9	882	29,87	нМ	Антагонизм мю опиоидного рецептора, лиганд ГТФ-гамма-S
—	31	837	26,35	—	Селективность антагонизма мю-опиоидных рецепторов по сравнению с каппа-рецепторами
Каннабиоидные рецепторы					
Ki	346	1067	1263	нМ	Сродство к рецепторам CB2 человека, лиганд CP-55940
Ki	652,8	3693	-1,114	нМ	Сродство к рецепторам CB2, лиганд CP-55940
Бензодиазепиновые рецепторы					
Ki	343,9	499	972	нМ	Сродство к рецептору бензодиазепаина, лиганд диазепам
Ki	135	212,4	213,3	нМ	Сродство к центральным бензодиазепиновым рецепторам, лиганд флумазенил
Дофаминовые рецепторы					
Ki	102	285,4	-41,35	нМ	Сродство к рецепторам допамина D2L человека
Ki	268,4	3 170	68,59	нМ	Сродство к дофаминовым D1 рецепторам, лиганд SCH23390
IC50	176,4	648	221	нМ	Сродство к рецептору допамина D2, лиганд YM09151
Глутаматные рецепторы					
Ki	622	930	319,6	нМ	Ингибирование токов N-метил-D-аспартат рецепторов NR1a/NR2D
IC50	214	426	90,2	нМ	Антагонизм mGluR1a, путем измерения внутриклеточного кальция
EC50	1 186	2 784	-256	нМ	Ингибирование метаботропного глутамат-рецептора-2
Другое					
—	16,03	28,3	-3,666	%	Частичный агонизм адренергических бета-2 рецепторов, как синтез цАМФ при 30 мкМ
EC50	169,6	30,7	-17,3	нМ	Агонист бета-1 рецепторов как накопление цАМФ
—	47,96	0,09319	6,796	%	Ингибирование GSK3B (1 мкМ)
IC50	13,2	1 658	158,6	нМ	Константа ингибирования GSK3-бета

Примечание: «Конст.», общепринятое название типа исследуемой фармакологической константы («Ki», «IC50» и др.); «Ошиб.» — погрешность оцениваемых свойств; «Ед.», единицы измерения.

модуляции метаболизма простагландинов (ингибирование таких ферментов, как ЦОГ-2, простагландин G/H синтазы-2, 5-липоксигеназы) и подтверждается результатами моделирования эффектов исследуемых молекул на липополисахарид-индуцированную продукцию ФНО-альфа и др.

Аскорбат-анион, потенциально, проявляет более выраженные вазоактивные и гемодинамические эффекты по сравнению с никотинатом и оксibuтиратом (табл. 6). Константы ингибирования аскорбатом ренина (IC50=395 нМ) и рецептора вазопрессина (Ki=145 нМ) находятся в субмикромольном диапазоне и соответствуют достоверно более высокому сродству к этим

рецепторам, в сравнении с контрольными молекулами. Аскорбат-анион также может проявлять умеренный антикоагуляционный, антигиперлипидемический и антигипергликемический эффекты, что также способствует нормализации гемодинамики.

Хемореактивный анализ указал на то, что аскорбат может быть гораздо более эффективен, чем никотинат, оксibuтират и карбонат лития в снижении толерантности к глюкозе. Этот антидиабетический эффект, вероятно, осуществляется за счёт связывания и активации PPARγ-рецептора — известного таргетного белка для антидиабетических средств (например, розиглитазона). Белки рецепторы типа PPAR (акти-

Таблица 4

Оценки фармакокинетических и фармакодинамических свойств аскорбата в сравнении с никотинатом и карбонатом лития (по результатам хемореактивного анализа)

Конст.	Аскорбат	Никотинат	Карбонат	Ошиб.	Ед.	Активность
—	3,8	37,4	29,1	—4,8	%	Процент изменения гематокрита при дозе 10 мг/кг/сут
T _{1/2}	0,14	0,90	—	0,06	ч	Метаболическая стабильность в микросомах печени человека
Ki	5 308	1 868	—	2 118	нМ	Сродство к К-каналу KCNH2
IC50	5 069	2 746	—	1 199	нМ	Ингибирование К-канала KCNH2
IC50	38	524	—	9	нМ	Ингибирование стероид 5-альфа-редуктазы человека
Примечание: «Конст.», общепринятое название типа исследуемой фармакологической константы («Ki», «IC50» и др.); «Ошиб.» — погрешность оцениваемых свойств; «Ед.», единицы измерения.						

Таблица 5

Оценки противовоспалительных свойств аскорбата (по результатам хемореактивного анализа)

Конст.	Аскорбат	Никотинат	Карбонат	Оксибутират	Ошиб.	Ед.	Активность
IC50	113,9	4 967	9 130	495,7	−351	нМ	Ингибирование MMP-2
Ki	165,3	347,5	10 239	344,6	0,542	нМ	Ингибирование MMP-9
IC50	33,64	109,4	3 013	4 010	−31,08	нМ	Противовоспалительное действие как ингибирование липополисахарид-индуцированной продукции ФНО-альфа
—	56,5	5,66	0	7,06	−4,937	%	Ингибирование СОХ-2 в ЛПС-стимулированных клетках J774 мыши
—	41,25	22,16	0	8,05	33,75	%	Противовоспалительная активность как ингибирование каррагинан-индуцированного отека лапы при дозе 25 мг/кг, перорально
Примечание: «Конст.», общепринятое название типа исследуемой фармакологической константы («Ki», «IC50» и др.); «Ошиб.» — погрешность оцениваемых свойств; «Ед.», единицы измерения.							

Таблица 6

Оценки вазоактивных и гемодинамических свойств аскорбата (по результатам хемореактивного анализа)

Конст.	Аскорбат	Никотинат	Карбонат	Оксибутират	Ошиб.	Ед.	Активность
IC50	395,8	1 447	>20 000	1 204	813	нМ	Ингибирование очищенного ренина человека
Ki	145	2 389	>25 000	3 402	−731	нМ	Сродство к рецепторам вазопрессина V1B, лиганд AVP
IC50	125,7	383	>40 000	>25 000	−507	нМ	Ингибирование фактора 10a свертывания крови
IC50	627,6	1 308	12 080		3590	нМ	Ингибирование фактора активации тромбоцитов, лиганд PAF
—	−58	−26,26	0	−10,12	−46,64	%	Процентное изменение общего холестерина при приеме экспериментальной диеты «холестерин + арахисовое масло»
—	91,2	53,29	0	23,67	7,83	%	Антиоксидантная активность по уровням перекисных радикалов измеренных спектрофотометрически при формировании формазона
IC50	338	1 751	>40 000	>20 000	36,18	нМ	Сродство к рецептору PPAR-гамма
EC50	26,3	2 264	>40 000	>40 000	294,8	нМ	Агонист PPAR-дельта
—	14,98	8,08	0	7,65	5,52	%	Антигипергликемическая активность у крыс как снижение уровня глюкозы в крови при дозе 100 мг/кг, перорально
Примечание: «Конст.», общепринятое название типа исследуемой фармакологической константы («Ki», «IC50» и др.); «Ошиб.» — погрешность оцениваемых свойств: «Ед.», единицы измерения.							

Таблица 7

Оценки противоопухолевых свойств аскорбата

Конст.	Аскорбат	Никотинат	Карбонат	Оксибутират	Ошиб.	Ед.	Активность
IC50	401	4 634	>20 000	5 342	393	нМ	Ингибирование c-Src онкопролиферации фибробластов крысы
IC50	683	323	>20 000	5 039	758	нМ	Антипролиферативная активность к клеткам SK-N-MC человека
IC50	185,5	3 842	>20 000	1 702	929	нМ	Антипролиферативная активность против клеток человека QG56
IC50	110,8	3 096	>20 000	1 100	–242,5	нМ	Антипролиферативная активность против клеток H460 человека
GI50	123,6	3 381	>20 000	676	236,8	нМ	Антипролиферативная активность против клеток HCT116 человека
IC50	2 430	6 128	>20 000	3 604	–493	нМ	Антипролиферативная активность в отношении фибробластов кожи человека

Примечание: «Конст.», общепринятое название типа исследуемой фармакологической константы («Ki», «IC50» и др.); «Ошиб.» – погрешность оцениваемых свойств; «Ед.», единицы измерения.

вирунный рецептор пролифераторов пероксисом) необходимы для переработки избыточного холестерина и снижения уровня сахара в крови. Белки PPAR активируют процессы бета-окисления жирных кислот и агонисты PPAR-γ используются при гипергликемии и гиперлипидемии [15, 16].

Сравнительный хемореактивный анализ других свойств аскорбата

Результаты моделирования указывают на возможные *противоопухолевые и антимикробные свойства аскорбата лития* (табл. 7), которые, в настоящее время, остаются практически неисследованными. Моделирование показало, что аскорбат-анион может проявлять *антипролиферативную активность по отношению к различным культурам онкопролиферирующих клеток человека (SK-N-MC, QG56, H460, HCT116 и др.)*.

Как следует, например, из данных в табл. 7, для проявления противоопухолевых свойств необходимы меньшие концентрации аскорбата (константа IC50) по сравнению с никотинатом. Данный эффект прогнозируется для различных линий онкопролиферирующих клеток, в т. ч. для нейробластомы (SK-N-MC), карциномы лёгких (QG56, H460), аденокарциномы толстого кишечника (HCT116) и др.

Достаточно интересным и неожиданным результатом проведённого моделирования является указание на возможные *противомикробные свойства аскорбат-аниона*. Например, в сравнении с никотинатом, оценённое значение IC50 против малярийного плазмодия (штамм DD2) составило 41 нМ для аскорбата и 185 нМ для никотината. Также, моделирование указало и на более выраженную противоямблиозную активность (IC50 аскорбата 38 нМ, никотината — 1 134 нМ для *Giardia duodenalis*). В сравнении с оксибутиратом антимикробные свойства аскорбата также более выражены.

Таблица 8

Биологические активности, характерные для аскорбата, но не для комената

Конст.	Аскорбат	Ошиб.	Ед.	Активность
IC50	167,50	395,50	нМ	Ингибирование 5-липоксигеназы
Ki	45,17	847	нМ	Ингибирование простагландин G/H синтазы-2
IC50	395,80	813	нМ	Ингибирование ренина
Ki	622	319,60	нМ	Ингибирование токов NMDA рецепторов NR1a/NR2D
EC50	26,30	294,80	нМ	Агонист PPAR-дельта
Ki	120,10	394	нМ	Сродство к рецепторам 5HT2B человека
IC50	125,70	–507	нМ	Ингибирование коагуляционного фактора 10a
IC50	338	36,18	нМ	Сродство к рецептору PPAR-гамма

Сравнительный анализ хемореактивных профилей аскорбиновой и коеновой кислот

Коеновая кислота, предположительно, может использоваться как лиганд для переноса иона лития внутрь клеток. Как показало сравнение хемореактивных профилей химических структур аскорбата и коената, между этими двумя анионами отмечены достоверные отличия. Во-первых, хемореактивный анализ показал, что коенат, по всей видимости, не обладает рядом биологических активностей, характерных для аскорбата (табл. 8). Во-вторых, были установлены достоверные различия между аскорбатом и коенатом в ряде констант биологических активностей (табл. 9).

Для аскорбата характерны противовоспалительное действие за счет модуляции метаболизма простагландинов, ингибирование NMDA рецепторов (что вносит определенный вклад в снижение гипервозбудимости

Таблица 9

Достоверные различия между аскорбатом и коменатом в ряде констант биологических активностей

Конст.	Аскорбат	Коменат	Ошиб.	Ед.	Активность
Неврологические эффекты					
IC50	13,20	2 017	158,60	нМ	Ингибирование GSK3-бета
Ki	115	1 607	2 539	нМ	Вытеснение N-метилскополамина из мускариновых рецепторов M1
—	16,03	2,51	3,67	%	Активность адренергических бета-2 рецепторов как синтез цАМФ при 30 мкМ
IC50	758	4 452	2 065	нМ	Антагонизм каннабиноидных рецепторов 1
Ki	648	2 912	872	нМ	Ингибирование всасывания 5НТТ, лиганд циталопрам
Ki	248	99,80	213,60	нМ	Вытеснение флумазенила из центрального бензодиазепинового рецептора на мембранах корковых нейронов человека
Другие свойства					
—	93	25,56	24,35	мкМ	Антиоксидантная активность против медь-индуцированного перекисного окисления липидов
—	91,20	55,80	7,83	%	Антиоксидантная активность (формазановый тест)
IC50	627,60	2 780	3 590	нМ	Ингибирование фактора активации тромбоцитов, лиганд PAF
—	8,81	4,31	—15,77	%	Воздействие на АД у крыс при анестезии
—	14,98	6,34	5,52	%	Антигипергликемическая активность у крыс как снижение уровня глюкозы в крови при дозе 100 мг/кг, перорально

нервной системы), противогликемическое действие (агонист PPAR-рецепторов). Данные эффекты отсутствуют в хемореактивном профиле комената (см. табл. 8).

Анализ достоверных различий показал, прежде всего, что коменат в значительно меньшей степени способен ингибировать фермент *GSK3-бета-киназу* (табл. 9). Таким образом, в отличие аскорбата, коменат не обладает столь выраженным синергизмом по отношению к одному из основных механизмов молекулярного действия ионов лития, важного для реализации нейропротекторного эффекта, как ингибирование GSK3. Антиоксидантная активность комената также несколько ниже, чем для аскорбата (табл. 9).

Заключение

Впервые проведено хемореактивное моделирование эффектов аниона аскорбата в сравнении с контрольными молекулами (никотинатом, оксibuтиратом, коменатом и карбонатом) — анионами, использующимися для транспорта ионов лития внутрь клеток. В соответствии с результатами моделирования, аскорбат-аниону свойственно большее сродство к серотониновым, дофаминовым, бензодиазепиновым, адренергическим рецепторам по сравнению с контрольными молекулами. Более высокое сродство аскорбат-аниона к этим рецепторам, указывает, во-первых, на возможность модуляции активности этих рецепторов аскорбатом лития и, во-вторых, на более интенсивный транспорт аскорбата лития

внутри нейронов и других клеток ЦНС. Более высокое, по сравнению с никотинатом, сродство к рецепторам бензодиазепинов человека указывает на возможные анксиолитические эффекты аскорбата. В отличие аскорбат-аниона, контрольные молекулы не обладают столь выраженным синергизмом по отношению к одному из основных механизмов молекулярного действия ионов лития, важного для реализации нейропротекторного эффекта — ингибированию фермента киназы-3 гликогенсинтетазы (GSK3). В соответствии с результатами анализа исследованные контрольные молекулы, по сравнению с аскорбатом, характеризуются меньшей биодоступностью, меньшим всасыванием в ЖКТ, меньшей растворимостью в воде и более низким антиоксидантным действием. Аскорбат-анион может характеризоваться выраженным противовоспалительным действием, обусловленным модуляцией метаболизма простагландинов и проявлять умеренный антикоагуляционный, антигиперлипидемический и антигипергликемический эффекты, что также способствует нормализации гемодинамики. Сравнение с результатами хемореактивного моделирования карбонат-аниона показало, что карбонат-анион не обладает ни одним из вышеперечисленных свойств аскорбат-аниона.

Источник финансирования

Работа выполнена в рамках диссертационного исследования Сардаряна И.С.

Литература

1. *Torshin I. Yu.* Bioinformatics in the post-genomic era: sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. Nova Biomedical Books, NY, 2009, ISBN: 978–1–60692–217
2. *Torshin I. Y., Rudakov K. V.* On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications). 2014. Т. 24. № 1. С. 11–23.
3. *Torshin I. Y., Rudakov K. V.* On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. Part 2: Local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability. Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications). 2014. Т. 24. № 2. С. 196–208.
4. *Рудаков К. В., Торшин И. Ю.* Об отборе информативных значений признаков на базе критериев разрешимости в задаче распознавания вторичной структуры белка. ДАН, 2011, Т. 441, № 1, с. 1–5.
5. *Рудаков К. В., Торшин И. Ю.* Анализ информативности мотивов на основе критерия разрешимости в задаче распознавания вторичной структуры белка. Информатика и её применения, Т. 5, № 4, 2011, с. 40–50.
6. *Torshin I. Yu.* On solvability, regularity, and locality of the problem of genome annotation. Pattern Recognition and Image Analysis, 2010, V. 20(3): 386–395.
7. *Журавлёв Ю. И., Рудаков К. В., Торшин И. Ю.* Алгебраические критерии локальной разрешимости и регулярности как инструмент исследования морфологии аминокислотных последовательностей. Труды МФТИ. — 2011 — Т. 3. № 4, с. 67–76.
8. *Торшин И. Ю., Громова О. А.* Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. М., Изд. МЦНМО, 2012, 768 с.
9. *Bolton E., Wang Y., Thiessen P. A., Bryant S. H.* PubChem: Integrated Platform of Small Molecules and Biological Activities. Chapter 12 IN Annual Reports in Computational Chemistry, Volume 4, American Chemical Society, Washington, DC, 2008 Apr. (pubchem.ncbi.nlm.nih.gov).
10. *Wishart D. S., Tzur D., Knox C., Eisner R., Guo A. C., Young N., Cheng D., Jewell K., Arndt D., Sawhney S., Fung C., Nikolai L., Lewis M., Coutouly M. A., Forsythe I., Tang P., Shrivastava S., Jeroncio K., Stothard P., Amegbey G., Block D., Hau D. D., Wagner J., Miniaci J., Clements M., Gebremedhin M., Guo N., Zhang Y., Duggan G. E., Macinnis G. D., Weljie A. M., Dowlatabadi R., Bamforth F., Clive D., Greiner R., Li L., Marrie T., Sykes B. D., Vogel H. J., Querengesser L.* HMDB: the Human Metabolome Database. Nucleic Acids Res. 2007;35(Database: D521–D526).
11. *Müller C. P., Carey R. J., Huston J. P., De Souza Silva M. A.* Serotonin and psychostimulant addiction: focus on 5-HT_{1A}-receptors. Prog Neurobiol. 2007 Feb;81(3):133–78.
12. ОЛС (Обращение лекарственных средств). ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Росздравнадзора РФ (27.03.2008)
13. *Braga R. C., Alves V. M., Silva M. F., Muratov E., Fourches D., Tropsha A., Andrade C. H.* Tuning HERG out: antitarget QSAR models for drug development. Curr Top Med Chem. 2014;14(11):1399–415.
14. *Sanguinetti M. C., Tristani-Firouzi M.* hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. Nature. 2006 Mar 23;440(7083):463–9.
15. *Gaikwad A. B., Viswanad B., Ramarao P.* PPAR gamma agonists partially restores hyperglycemia induced aggravation of vascular dysfunction to angiotensin II in thoracic aorta isolated from rats with insulin resistance. Pharmacol Res. 2007 May;55(5):400–7.
16. *Torshin I. Yu.* Bioinformatics in the post-genomic era: physiology and medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA (2007), ISBN1–60021–752–4.

Исследование хронической токсичности и противовоспалительных свойств препарата Дилепт

**Алексеева С.В., Сорокина А.В., Мирошкина И.А., Кузнецова О.С.,
Коваленко Л.П., Дурнев А.Д.**

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

Резюме. Проведено изучение хронической токсичности препарата Дилепт при ежедневном пероральном введении в течение 6 месяцев в дозах 16 мг/кг и 160 мг/кг самцам и самкам крыс и кроликов. Развёрнутое клинично-лабораторное исследование не выявило токсических эффектов препарата за исключением обратимых дистрофических явлений в почках, печени, сердце, обратимого увеличения содержания креатинина в моче и дегенеративных форм эритроцитов у крыс, получавших препарат в дозе 160 мг/кг. Оценка противовоспалительных свойств Дилепта в реакции воспаления на конканавалин А показала, что Дилепт в дозах 0,1 и 10 мг/кг при в/б введении мышам проявляет выраженную противовоспалительную активность. У Дилепта не выявлено алергизирующих свойств.

Ключевые слова: Дилепт, хроническая токсичность, реакция воспаления на конканавалин А, мыши, крысы, кролики

Experimental study of chronic toxicity and anti-inflammatory properties of the drug Dilept

Alekseeva S.V., Sorokina A.V., Miroshkina I.A., Kuznestova O.S., Kovalenko L.P., Durnev A.D.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The purpose of this study is to evaluate the chronic toxicity of the drug dilept upon a daily orally administration for 6 months at doses of 16 and 160 mg/kg. Detailed clinical and laboratory examinations did not reveal any chronic toxic effect in animals except for reversible dystrophic changes in heart, kidneys, liver, reversible high level of creatinine in urine and degenerative forms of red blood cells in rats treated with drug at dose 160 mg/kg. Evaluation of anti-inflammatory properties of dilept in the inflammatory reaction induced by concanavalin A showed that at doses of 0,1 and 10 mg/kg i.p. in mice led to a significant suppression of the inflammatory response. Study showed that dilept has no allergenic properties.

Keywords: Dilept, chronic toxicity, acute exudative inflammation by concanavalin A, mice, rat, rabbit

Автор, ответственный за переписку:

Алексеева Светлана Витальевна – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8;
e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

Введение

Дилепт, метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина — оригинальный дипептидный атипичный нейрелептик, разработанный в ФГНБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». В основе химической структуры лежит аминокислотная последовательность Pro-Туг, фрагмент нейротензина — эндогенного тридекапептида, играющего важную роль в патогенезе шизофрении [1].

Дилепт обладает антипсихотической активностью, а также проявляет положительный мнемотропный эффект, что позволяет прогнозировать его эффективность не только в отношении негативной симптоматики шизофрении, а также при купировании психотических расстройств при болезни Альцгеймера [2].

Необходимым этапом разработки Дилепта явилась доклиническая оценка его безопасности.

Цель исследования

Оценка хронической токсичности Дилепта, а также его алергизирующих и противовоспалительных свойств.

Материалы и методы

Хроническую токсичность Дилепта оценивали на самцах и самках беспородных белых крыс массой 180–200 г и кроликах породы шиншилла массой 1,5–2 кг.

Алергизирующие свойства Дилепта исследованы в экспериментах на морских свинках альбиносах массой 250–300 г, противовоспалительные эффекты на мышцах СВА массой 18–20 г.

Все животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при свободном доступе к воде и корму.

При оценке хронической токсичности препарат в виде суспензии на 1% крахмале вводили крысам

и кроликам перорально 1 раз в сутки в течение шести месяцев в дозе, соответствующей терапевтической — 16 мг/кг и превышающей её в десять раз — 160 мг/кг. При оценке аллергенности препарат использовали в тех же дозах по стандартным схемам иммунизации, в экспериментах по выявлению противовоспалительной активности Дилепт вводили в/б дозах 0,1 и 10 мг/кг.

Объём и продолжительность исследования, набор использованных методов, регистрируемых параметров и другие условия проведения исследования регламентировались соответствующим Руководством [3]. В экспериментах использовали современное лабораторное оборудование, прошедшее соответствующую поверку; электрокардиограф ЭК 1Т-03М, гемоанализатор (Лаборскель), установка «Открытое поле». Биохимический анализатор Stat Fax, анализатор мочи Clinitek Status, компьютеризированная система микроскопии МЕКОС-Ц1 и др.

Все анализы выполнялись до начала эксперимента, через 3 и 6 месяцев, не позже 24 ч после последнего введения препарата, за исключением «отставленной» группы, в которой измерения выполняли через 30 дней после последнего введения препарата.

Всех животных опытных и контрольных групп подвергали патологоанатомическому вскрытию с последующей оценкой микроскопической картины важнейших внутренних органов.

Изучение аллергизирующих и противовоспалительных свойств Дилепта проводили согласно методическим рекомендациям [4].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10.

Результаты выражали в виде средней арифметической и её средней ошибки, проверку данных на нормальность распределения выборок определяли по критерию Шапиро–Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

В результате проведённого исследования установлено, что 6-месячное введение Дилепта крысам и кроликам обоего пола в дозах 16 и 160 мг/кг перорально не вызывает выраженных изменений массы тела, общего состояния и поведенческих реакций животных в тесте «открытое поле». Дилепт не влияет на биохимические показатели сыворотки крови экспериментальных животных и физико-химические свойства мочи у крыс, за исключением увеличения содержания креатинина в моче, которое имеет обратимый характер. Дилепт в использованных дозах не вызывает выраженных изменений показателей ЭКГ. В ходе эксперимента не установлено влияния препарата на ритм, глубину и частоту дыхания у исследованных животных.

Дилепт не оказывает повреждающего действия на систему крови, за исключением появления дегенеративных форм эритроцитов у крыс, получавших препарат в дозе 160 мг/кг. Так, в крови самцов и самок отмечалось уменьшение количества дискоидных нормоцитов и появление пойкилоцитных форм (рис. 1), у самцов число анизохромных эритроцитов было значимо выше контрольного показателя (рис. 2). Однако

Таблица 1

Морфометрические показатели эритроцитов крыс, получавших препарат Дилепт в дозах 16 мг/кг и 160 мг/кг в течение 6 мес. по сравнению с контролем

Показатели	Крысы самки <i>n</i> = 6				Крысы самцы <i>n</i> = 6			
	контроль	16 мг/кг	160 мг/кг	160 мг/кг «отстав. гр.»	контроль	16 мг/кг	160 мг/кг	160 мг/кг «отстав. гр.»
Морфология клеток								
Дискоциты%	99,6 (98,8÷99,7)	99,5 (99,4÷99,8)	89,5* (88,8÷89,8)	99,20* (97,6÷99,6)	99,7 (99,2÷99,8)	99,5 (99,4÷99,8)	89,2* (86,8÷89,8)	99,65* (99,35÷99,70)
Пойкилоциты%	0,4 (0,3÷0,5)	0,5 (0,2÷0,6)	10,5* (4,2÷14,3)	0,80* (0,25÷2,45)	0,3 (0,2÷0,8)	0,9 (0,5÷1,0)	10,8 (3,2÷15,2)	0,35* (0,30÷1,50)
Анизоцитоз%	6,0 (6,0÷7,0)	6,0 (6,0÷7,0)	11,0* (6,0÷15,0)	5,0 (5,0÷6,5)	7,0 (7,0÷8,0)	7,0 (7,0÷8,0)	12,0 (9,0÷14,0)	8,5 (8,0÷10,0)
Анизохромия%	16,0 (15,0÷18,0)	16,0 (15,0÷17,0)	17,5 (15,5÷23,5)	13,0 (13,0÷16,0)	16,0 (15,0÷21,0)	18,5 (16,0÷24,0)	27,0* (22,0÷33,0)	18,0* (15,0÷20,0)
Политохромат- офи%	2,0 (2,0÷3,0)	2,0 (1,0÷3,0)	4,5 (2,5÷6,0)	2,0 (1,5÷3,0)	3,0 (3,0÷5,0)	2,5 (2,0÷4,0)	3,0 (0,0÷7,0)	1,5 (1,0÷2,0)
Эритроцитометрия								
Диаметр эритроц. мкм	6,50 (6,34÷6,69)	6,39 (6,25÷6,45)	6,44 (6,37÷6,54)	6,28* (6,13÷6,40)	6,27 (6,19÷6,51)	6,35 (6,20÷6,61)	6,52 (6,41÷6,63)	6,36 (6,25÷6,49)
Кэф.овалоцитоза	0,95 (0,93÷0,95)	0,95 (0,95÷0,96)	0,95 (0,95÷0,96)	0,95 (0,94÷0,96)	0,95 (0,94÷0,96)	0,96 (0,94÷0,96)	0,97 (0,95÷0,98)	0,94 (0,93÷0,95)
Примечание: данные представлены в виде медиан групп и 25% и 75% квартилей; * — различие с контролем достоверно с уровнем значимости $p < 0,05$ (обработка проведена с использованием критерия Манна-Уитни). • — статистически значимые различия ($p < 0,05$) между 3 и 4 группами.								

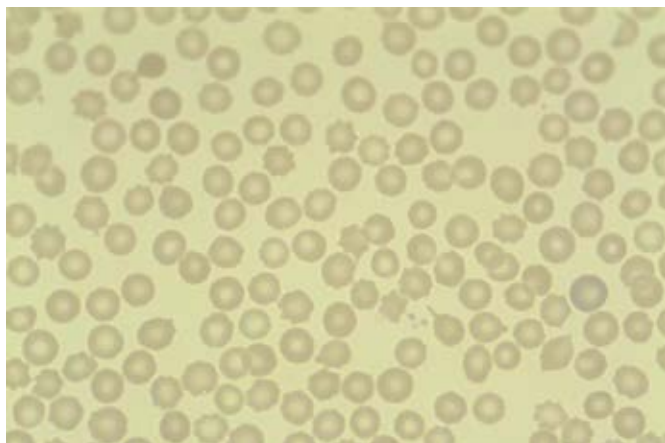


Рис. 1. Пойкилоцитные эритроциты в периферической крови самки № 28, через 6 мес. введения препарата Дилепт в дозе 160 мг/кг. Окраска по Романовскому. Увеличение 100×10

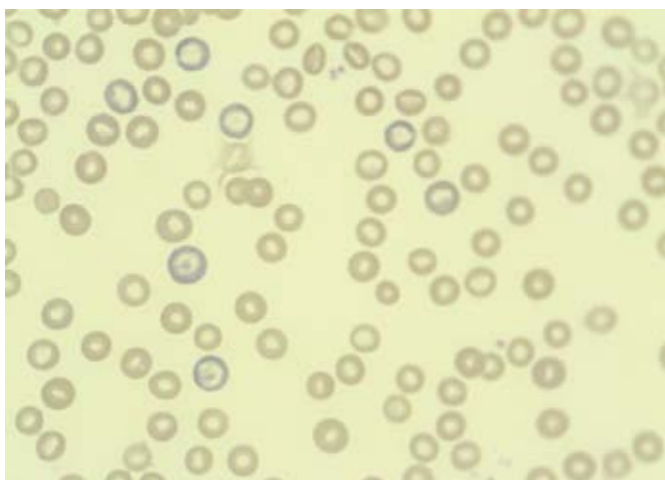


Рис. 2. Анизохромия в периферической крови самца № 33, через 6 мес. введения препарата Дилепт в дозе 160 мг/кг. Окраска по Романовскому. Увеличение 100×10

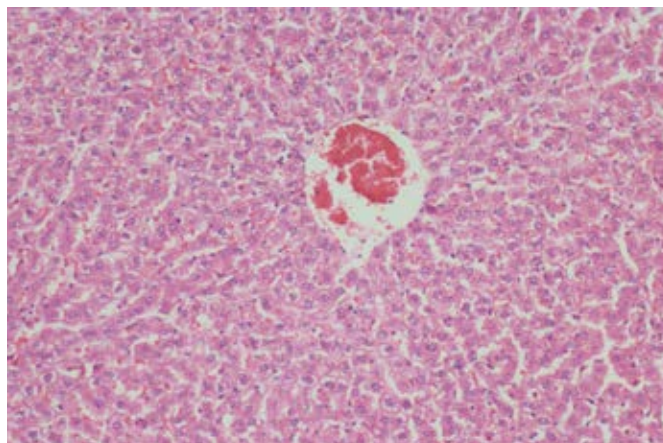


Рис. 3. Печень крысы № 26, которой перорально вводили Дилепт в дозе 160 мг/кг. Увеличение 10×10

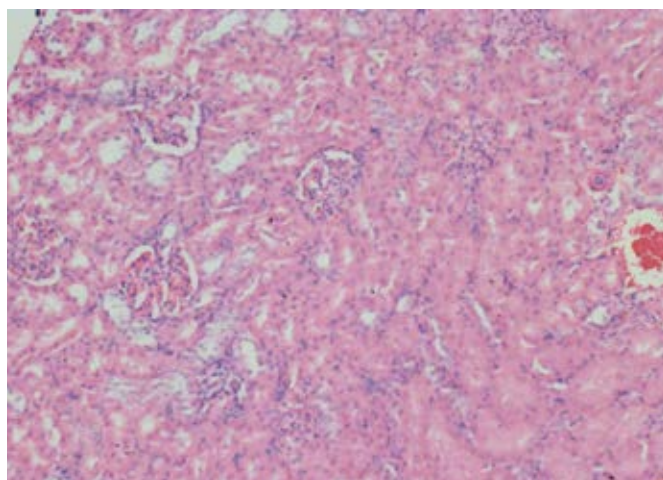


Рис. 4. Почка крысы № 26, которой перорально вводили Дилепт в дозе 160 мг/кг. Увеличение 10×10

выявленные изменения были обратимы и не наблюдались у крыс «отставленной» группы, исследованных через месяц после отмены препарата (табл. 1).

Описанные данные согласуются с результатами гистологических исследований селезёнки, где обнаружено значительное увеличение содержания гемосидерина, пигмента, образующегося при ускоренном распаде эритроцитов и выбросе гемоглобина.

Кроме того, после шестимесячного введения препарата в дозе 160 мг/кг отмечены дистрофические процессы различной степени выраженности в печени (рис. 3), почках (рис. 4) и сердце, однако, как показали исследования животных «отставленной» группы эти изменения носят обратимый характер.

При изучении алергизирующих свойств Дилепта было установлено, что его введение в дозах 16 и 160 мг/кг не приводило к усилению реакции общей анафилаксии у животных опытных групп на белок куриного яйца (БКЯ). При иммунизации морских

свинок Дилептом в дозах 16 и 160 мг/кг в смеси с полным адъювантом Фрейнда аллергических реакций не обнаружено. Однократное введение Дилепта в дозе 16 мг/кг не оказывало значимого влияния на реакцию воспаления на конканавалин А (Кон А). Однократное пероральное введение препарата в дозе 160 мг/кг вызывало выраженное подавление реакции воспаления на Кон А на 42,9%.

Таким образом, Дилепт при введении в дозах 16 мг/кг и 160 мг/кг не вызывает аллергических реакций немедленного и замедленного типа и псевдоаллергических реакций и оказывает противовоспалительное действие при пероральном введении в дозе 160 мг/кг.

Известно, что при хронизации воспалительного процесса возникает усиление синтеза провоспалительных цитокинов, нарушение баланса Th1 и Th2 хелперов, что приводит к выраженным неврологическим нарушениям и онкологическим заболеваниям. В последние годы накопилось достаточное количество

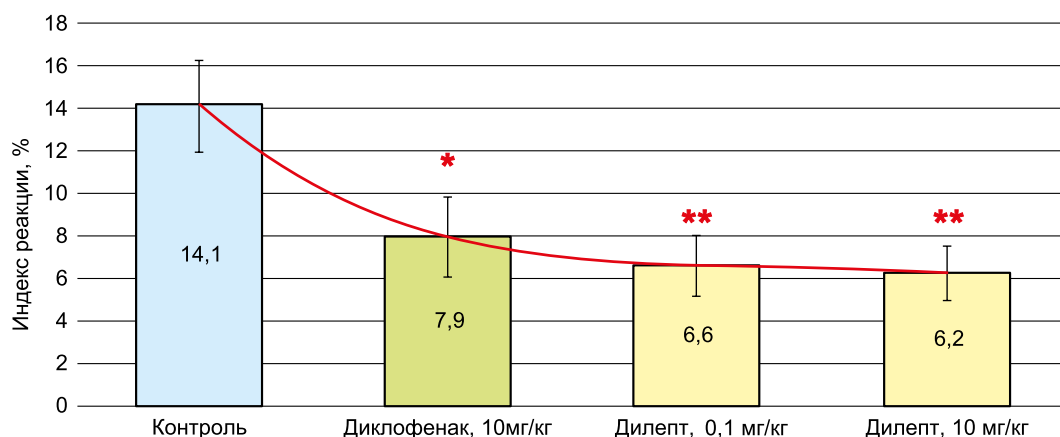


Рис. 5. Противовоспалительные свойства Дилепта и Диклофенака в реакции воспаления на канавалин А.

Примечание: $n = 10$ — количество животных в группе; * — $p < 0,05$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой по непарному t -критерию Стьюдента; ** — $p < 0,01$ достоверность различий по сравнению с контрольной группой по непарному t -критерию Стьюдента

данных, свидетельствующих о вовлеченности воспалительных реакций в патогенез психических и нейродегенеративных заболеваний, в частности повышение содержания провоспалительного ИЛ-6 у пациентов с болезнью Альцгеймера и Паркинсона может служить молекулярным диагностическим маркером этих заболеваний [7, 8]. Участие воспаления в патогенезе и симптомообразовании болезни Альцгеймера и Паркинсона, предполагает необходимость исследования потенциальных терапевтических возможностей противовоспалительных препаратов при этих заболеваниях. В связи с этим, для нейролептиков актуально наличие сопряженной противовоспалительной активности.

При изучении противовоспалительной активности в реакции воспаления на Кон А препарата Дилепт, который вводили в/б однократно в дозах 0,1 мг/кг и 10 мг/кг, и препарат сравнения Диклофенак, который вводили в/б в дозе 10 мг/кг, было установлено, что

Дилепт обладает выраженной противовоспалительной активностью по сравнению с препаратом сравнения Диклофенак (рис. 5).

Таким образом, 6-месячное изучение хронической токсичности препарата Дилепт при пероральном введении в дозах 16 и 160 мг/кг в не выявило токсических эффектов препарата за исключением дистрофических явлений в почках, печени и сердце и появления дегенеративных форм эритроцитов и увеличения содержания креатинина в моче у крыс, получавших препарат в дозе 160 мг/кг. Указанные изменения имели обратимый характер. При введении препарата в дозах 16 мг/кг и 160 мг/кг не обнаружено аллергических реакций немедленного и замедленного типа и псевдоаллергических реакций. Дилепт в малых дозах при в/б введении обладает выраженной противовоспалительной активностью, что, возможно, является составляющей его комплексного нейротропного действия.

Литература

1. Грушевская Л.Н., Гусев М.В., Бlynская Е.В. и др. Разработка состава, технологии изготовления и стандартизации твердой дозированной лекарственной формы нового атипичного нейролептика. Дилепта. Вестн. Моск. Ун-та. Серия 2. Химия, 2013; 54: 5: 288–294.
2. Шубенина Е.В., Островская Р.У., Кудрин В.С. и др. Экспериментальное изучение влияния дипептидного аналога нейротензина Дилепта на дофаминергические системы прилежащего ядра головного мозга. Казанский медицинский журнал. 2011; 92: 3: 408–411.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. М.: 2005; 41–54.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по оценке аллергизирующих свойств лекарственных средств. М.: 2012; 51–63.
5. Хлопушина Т.Г., Кринская А.В., Коваленко Л.П. и др. — Влияние хиксорины на фармакокинетику антипирина у интактных и сенситизированных морских свинок. Бюл. exper. биол. 1991; 7: 67–69.
6. Kimber I., Kerkvliet N.I., Taylor S.L. et al. — Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization. Toxicol. Sci. 1999; 48: 157–162.
7. Андросова Л.В., Михайлова Н.М., Зозуля С.А. и др. Маркеры воспаления при шизофрении позднего возраста. Журнал неврологии и психиатрии. 2014; 12: 60–64.
8. Торган Т.И. Воспалительные механизмы синдрома усталости при болезни Паркинсона. Автореферат канд дисс. мед. наук, Пермь, 2013.



- 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

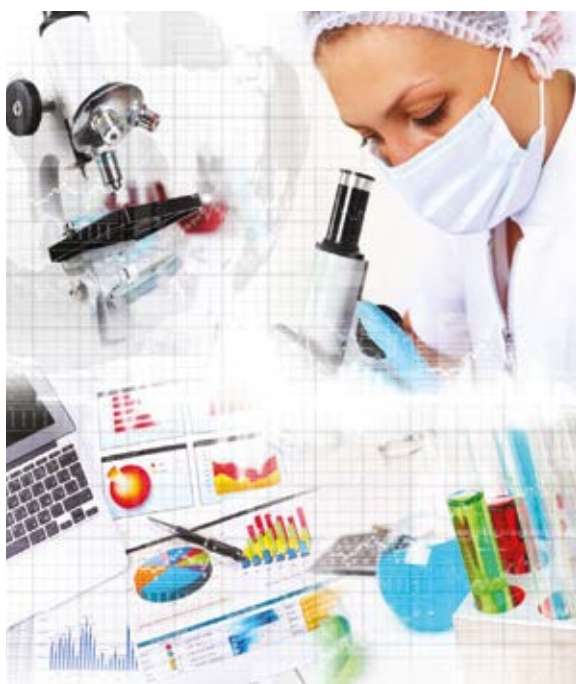
- фармакоэкономические исследования
- фармакоэпидемиологические исследования
- наблюдательные неинтервенционные исследования
- непрямые сравнительные исследования
- оценка технологий здравоохранения
- оценка качества жизни, связанного со здоровьем
- систематический литературный обзор и мета-анализ
- 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



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



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 (910) 400-88-87

✉ info@marketaccess.ru

🌐 www.Market-Access-Solutions.ru



Издательство ОКИ

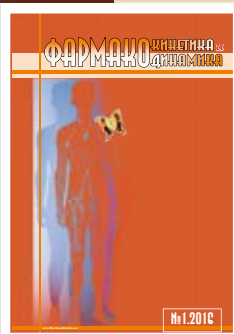
ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей,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

Сайт издательства: www.izdat-oki.ru



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

Сайт журнала: www.clinvest.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

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

