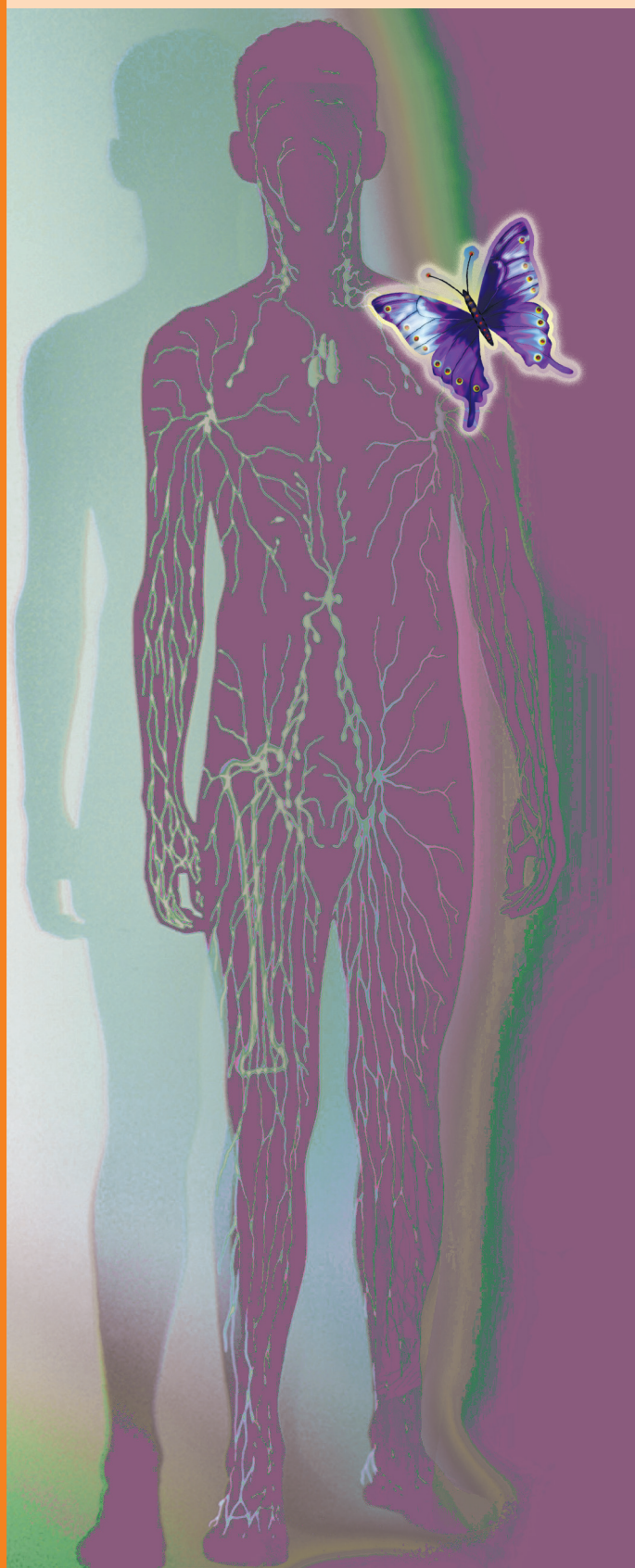


ФАРМАКО КИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№4.2019

18

Лет работы

230+

Исследований

220+

Публикаций

38

Партнёров

Комплексная оценка для включения в ограничительные перечни



Оценка эффективности и безопасности

- систематический обзор и метаанализ
- сетевой метаанализ



Фармакоэкономический анализ

- анализ "затраты-эффективность"
- анализ "затраты-полезность"
- анализ "минимизации затрат"
- анализ влияния на бюджет



Разработка моделей в MS Excel

- модель "дерево решений"
- модель Маркова
- гибридная модель
- калькулятор



Подготовка досье на включение в

- перечень ЖНВЛП
- перечень ОНЛС
- перечень ВЗН
- минимальный ассортимент

Также Центр занимается:

- оценкой технологий здравоохранения
- фармакоэпидемиологическими исследованиями
- изучением качества жизни, связанного со здоровьем
- неинтервенционными исследованиями

По вопросам сотрудничества обращаться к:



Белоусов Дмитрий Юрьевич

Ведущий специалист
+ 7 (910) 449-22-73
clinvest@mail.ru



Чеберда Алексей Евгеньевич

Исполнительный директор
+ 7 (963) 999-77-69
aecherberda@healtheconomics.ru



Афанасьева Елена Владимировна

Генеральный директор
+ 7 (910) 400-88-87
eva88@list.ru



Издательство

ОКИ

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

Бондарева Ирина Борисовна
д.б.н., Москва

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

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

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

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

Колик Лариса Геннадьевна
д.б.н., профессор РАН, Москва

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Выпускающая группа

Белоусов Дмитрий Юрьевич
Ответственный за выпуск
журнала
+7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

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

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

Подписано в печать 25.12.2019 г. Тираж 400 экз.
Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

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

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

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

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Hospital-Apteka.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Дайджест «Больничная аптека»
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

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

Центр Фармакоэкономических Исследований
Market Access Solutions
Издательство ОКИ

ОБЗОРЫ

Лиганды сигнальных белков Ерас как инструменты для изучения их биологической активности и создания новых оригинальных лекарственных средств
Мокров Г. В., Никифорова Т. Д., Крыжановский С. А. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Исследование кардиотропной активности орто-алкокси аналогов соединения АЛМ-802
Мокров Г. В., Лихошерстов А. М., Барчуков В. В., Столярук В. Н., Цорин И. Б., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А., Гудашева Т. А. 18

Антидепрессивные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в тесте Порсолта при внутрибрюшинном субхроническом и хроническом введении мышам
Таллерова А. В., Поварнина П. Ю., Минаев С. В., Гудашева Т. А., Середенин С. Б. 24

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Разработка и валидация методики количественного определения соединений ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс с использованием метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием
Подолько А. Л., Бочков П. О., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Грибакина О. Г., Шевченко Р. В., Жердев В. П. 28

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование хронической токсичности готовой лекарственной формы ГБ-115
Сорокина А. В., Алексеева С. В., Мирошкина И. А., Забродина В. В., Колик Л. Г., Дурнев А. Д. 37

Исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия лекарственного препарата Гомеовокс
Коваленко Л. П., Иванова Е. А., Лапицкая А. С., Коржова К. В., Журиков Р. В. 45



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

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

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

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

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

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Colic Larisa

Ph.D., Professor, Moscow

Kolyvanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

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

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Smirnov Valery

Ph.D., Moscow

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

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

Tyurenkov Ivan

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

Graduate group

Belousov Dmitry

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

Afanasyeva Elena

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

Zhuk Elena

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

Signed in print 25.12.2019 r. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com
115093, Moscow, Partinyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiyskay, 8
FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»
Tel./Fax: +7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

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

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Hospital-Apteka.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Digest «Hospital pharmacy»
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

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

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OKI

REVIEWS

Epac signaling protein ligands as tools for studying
their biological activity and creating new original drugs
Mokrov GV, Nikiforova TD, Kryzhanovskiy SA. 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Study of ALM-802 orto-alkoxi analogues cardiotropic
activity
*Mokrov GV, Likhoshesterov AM, Barchukov VV,
Stolyaruk VN, Tsorin IB, Vititnova MB,
Kryzhanovskiy SA, Gudasheva TA.*..... 18

Antidepressant-like activity of the dipeptide mimetic of brain-
derived neurotrophic factor GSB-106 in Porsolt test after
intraperitoneal sub-chronically and chronically
treatment in mice
*Tallerova AV, Povarnina PY, Minaev SV,
Gudasheva TA, Seredenin SB* 24

EXPERIMENTAL PHARMACOKINETICS

HPLC-MS method development and validation
for simultaneous quantitation of GZK-111
and CPG compounds in rat plasma
*Podolko AL, Bochkov PO, Kolyvanov GB,
Litvin AA, Gribakina OG, Shevchenko RV, Zherdev VP.* 28

TOXICOLOGY STUDIES

Study of chronic toxicity of the GB-115 drug formulation
*Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA,
Zabrodina VV, Kolik LG, Durnev AD* 37

Evaluation of allergenic properties and immunotoxicity of
Homeovox
*Kovalenko LP, Ivanova EA, Lapickaya AS,
Korzhova KV, Zhurikov RV* 45

Лиганды сигнальных белков Ерас как инструменты для изучения их биологической активности и создания новых оригинальных лекарственных средств

Мокров Г. В., Никифорова Т. Д., Крыжановский С. А.

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

Аннотация. В обзоре рассмотрены современные представления о строении и функциях белков Ерас (exchange proteins directly activated by cAMP, обменные белки, напрямую активируемые циклическим аденозинмонофосфатом). Вовлечённость белков Ерас как в регуляцию физиологических функций организма, так и в инициацию различных патологических процессов позволяет рассматривать их как принципиально новую биомишень для создания оригинальных, высокоэффективных лекарственных средств. Собраны сведения о существующих агонистах и антагонистах белков Ерас, проанализировано влияние строения лигандов Ерас на значения их аффинности и селективности. Представлены предполагаемые механизмы взаимодействия лигандов с белками Ерас.

Ключевые слова: белки Ерас; Ерас1; Ерас2; агонисты Ерас; антагонисты Ерас; cAMP

Для цитирования:

Мокров Г.В., Никифорова Т.Д., Крыжановский С.А. Лиганды сигнальных белков Ерас как инструменты для изучения их биологической активности и создания новых оригинальных лекарственных средств // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 4. – С. 3–17.
DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-3-17

Ерас signaling protein ligands as tools for studying their biological activity and creating new original drugs

Mokrov GV, Nikiforova TD, Kryzhanovskiy SA

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The review discusses modern views about the structure and functions of Epac proteins (exchange proteins directly activated by cyclic adenosine monophosphate). The involvement of Epac proteins both in the regulation of the physiological functions of the body and in the initiation of various pathological processes allows to consider them as a fundamentally new biological target for creating original, highly effective drugs. Information on existing Epac protein agonists and antagonists was collected, and the influence of Epac ligands structure on the values of their affinity and selectivity was analyzed. Presumptive mechanisms of the interaction of ligands with Epac proteins are presented.

Keywords: Epac proteins; Epac1; Epac2; Epac agonists; Epac antagonists; cAMP

For citations:

Mokrov GV, Nikiforova TD, Kryzhanovskiy SA. Epac signaling protein ligands as tools for studying their biological activity and creating new original drugs. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;4:3–17. (In Russ). DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-3-17

Введение

Исторически полагали, что единственным аллостерическим эффектором cAMP является фермент – cAMP-зависимая протеинкиназа или протеинкиназа А (РКА). Однако в конце 1998 г. был идентифицирован cAMP-зависимый белок, который без участия РКА активировал малые GEF-азы (cAMP-GEFs) Rap суперсемейства белков Ras [1], получивший название cAMP-регулируемый фактор обмена гуанидиновых нуклеотидов (cAMP-GEF) или обменный белок, напрямую активируемый cAMP (exchange protein directly activated by cAMP, Ерас) [2]. Несколько позже появились сообщения о том, что РКА и белки Ерас в одной и той же клетке могут инициировать независимые друг от друга, в том числе избыточные и/или противоположные, эффекты [3]. Выделяют две изоформы сигнальных белков Ерас – Ерас1 или cAMP-GEF-I (молекулярная масса около 100 kDa) и Ерас2 или cAMP-GEF-II (молекулярная масса около 110 kDa), которые кодируются различными генами [4].

Сигнальные белки Ерас (Ерас1 и Ерас2) близки к друг другу и по своей структуре являются мультидо-

менными белками, содержащими NH₂-концевую регуляторную область и COOH-концевой каталитический регион (рис. 1). Полагают, что NH₂-концевая регуляторная область ЕРАС произошла из R субъединицы РКА, в то время как COOH-концевой каталитический регион по своей структуре наиболее тесно связан с представителями суперсемейства Ras – факторами обмена гуаниновых нуклеотидов (guanine-nucleotide-exchange factors, GTFs) [5].

Каталитический регион у всех белков Ерас имеет идентичную структуру и состоит из Ras-обменного домена – REM, Ras-ассоциированного домена – RA и C-концевого CDC25-гомологичного домена – CDC25-HD (рис. 1). Домен REM необходим для поддержания стабильности каталитического региона [6]. Домен RA выполняет двоякую функцию – инициацию биологического эффекта и цитозольную локализацию белка, а в случае белка Ерас2С обеспечивает его фиксацию на внутренней поверхности цитоплазматической мембраны. Домен CDC25-HD ответственен за обмен гуаниновых нуклеотидов белков Rap и локализацию белков в области ядерных поровых комплексов [7].

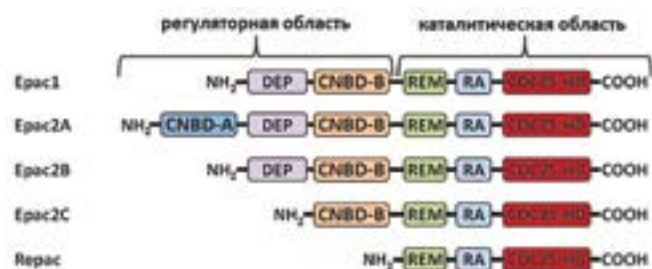


Рис. 1. Строение белков Ерас1, Ерас2А, Ерас2В и Ерас2С

Регуляторный регион белка Ерас1 содержит в своем составе сАМР-связывающий домен CNBD-B (или CBD-B), который помимо взаимодействия сАМР обеспечивает контакт белка Ерас1 с микротрубочками [8], и N-концевой домен DEP (Disheveled/Egl-10/pleckstrin domain), ответственный за локализацию белка в области внутренней поверхности клеточной мембраны, и обеспечивает транслокацию Ерас1 к митохондриям [9].

Регуляторный регион белка Ерас2А также содержит CNBD-B и DEP домены (рис. 1), однако N-концевым доменом этого белка является не DEP домен, а присоединенный к нему дополнительный низкоафинный CNBD-A (CBD-A) домен, который в отличие от CNBD-B домена обладает меньшим сродством к сАМР и не может индуцировать активность малых GTF-аз после связывания сАМР [9, 10]. CNBD-A и DEP домены принимают участие в регуляции внутриклеточной локализации белка Ерас2А [7].

Структура регуляторного региона белка Ерас2В аналогична таковой, известной для белка Ерас1 [7]. Регуляторный регион белка Ерас2С содержит только один N-концевой домен CNBD-B.

Между доменом CNBD-B регуляторного региона и REM доменом каталитической области белков Ерас располагается псевдо-β-складка, так называемый «шарнир» или «коммутатор», содержащий в своем составе консервативную последовательность (мотив) VLVLE (321VLVLE325), состоящий из 4 доменов — E308, T311, R313 и H317 (рис. 2) [11]. Шарнир необхо-

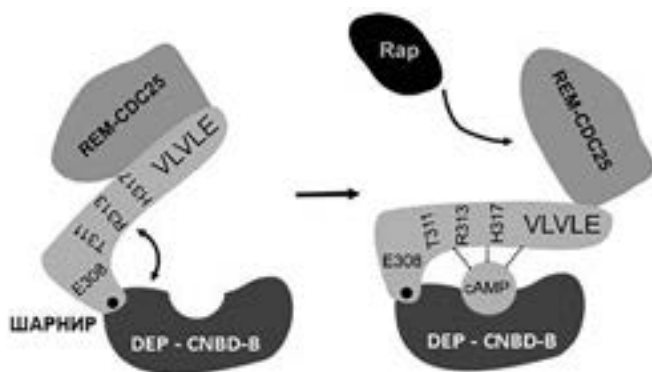


Рис. 2. Схема действия «шарнира» белков Ерас, обеспечивающего механизм их автоингибирования

дим для автоингибирования белков Ерас. Домен E308 прилежит к CNBD-B домену регуляторного региона, а консервативная последовательность VLVLE — к REM домену каталитической области (рис. 2).

К настоящему времени известно, что белки Ерас, как минимум, экспрессируются в нейронах ЦНС (фронтальная кора, гиппокамп), клетках гладкой мускулатуры бронхиального дерева, иммунокомпетентных клетках, кортикальных нефронах, β-клетках поджелудочной железы, клетках гладкой мускулатуры сосудов (в том числе коронарных), клетках сосудистого эндотелия и кардиомиоцитах [12]. Показано, что белки Ерас играют ключевую роль в регуляции базисных внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за поддержание внутриклеточного гомеостаза, а их гипер/гипоэкспрессия лежит в основе патогенеза многих патологических процессов. Например, в сердечно-сосудистой системе в нормальных физиологических условиях белки Ерас1 регулируют барьерную функцию и, возможно, ангиогенез эндотелиальных клеток сосудов [13, 14]. Если роль белков Ерас1 в регуляции ангиогенеза и пролиферации эндотелиальных клеток окончательно не ясна, то их место в регуляции пролиферации/ангиогенеза гладкомышечных клеток сосудов представляется достаточно определённым — белки Ерас1, действуя корпоративно с РКА, проявляют антиангиогенную активность [15]. Помимо этого, белки Ерас1 участвуют в регуляции тонической активности сосудистого русла — в крупных сосудах активация сопряжённых с белками Ерас1 сигнальных путей инициирует вазодилатацию, а в микрососудах кожи, напротив — вазоконстрикцию [16]. В условиях патологии, например сосудистой травмы, активированные белки Ерас1 стимулируют процессы миграции гладкомышечных клеток сосудов и пролиферацию их неointимы [17]. Несмотря на то что документально подтверждена экспрессия белков Ерас2 в эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, их вклад в регуляцию функциональной активности сосудистого русла не известен. Не менее важен и вклад белков Ерас в регуляцию деятельности сердца. В физиологических условиях сопряжённые с белками Ерас1 сигнальные каскады регулируют инотропную и в определённой мере лизитропную функцию кардиомиоцитов, а также процессы их межклеточного взаимодействия [18]. Помимо этого, как белки Ерас1, так и белки Ерас2 проявляют выраженную антиапоптотическую активность [19]. В условиях острой ишемии миокарда активация митохондриальной изоформы белков Ерас1 инициирует гибель кардиомиоцитов [20]. В условиях хронической сердечной патологии (хроническая сердечная недостаточность, постинфарктный коронарокардиосклероз и др.) сопутствующая ей избыточная активация β₁-адренорецепторов и, соответственно, избыточная активация сАМР/Ерас1-сопряжённых сигнальных каскадов играет существенную роль в развитии гипертрофии, ремоделирования и фиброза

миокарда, а активация Ерас2-сопряжённых сигнальных каскадов инициирует развитие нарушений сердечного ритма [21–23].

Накопленный к настоящему времени литературный материал свидетельствует о важной роли белков Ерас не только в регуляции физиологических функций организма, но и в инициации различных патологических процессов, что позволяет рассматривать их как принципиально новую биомишень для создания оригинальных, высокоэффективных лекарственных средств.

Для решения этой проблемы, а также для изучения роли белков Ерас в регуляции функциональной активности органов и тканей организма был сконструирован и синтезирован ряд фармакологических модуляторов/агонистов и ингибиторов/антагонистов этих белков.

Производные сАМР – агонисты белков Ерас

Первые синтетические агонисты белков Ерас были созданы на основе модификации структуры сАМР (структуры и значения аффинности представленных в обзоре лигандов белков Ерас представлены в табл. 1). Было установлено, что введение различных заместителей существенно влияет на сродство аналогов сАМР как к белкам Ерас, так и к РКА. Первая удачная попытка в создании селективных модуляторов белков Ерас относится к 2002 году, когда группой голландских и норвежских учёных в результате сравнения сайтов связывания сАМР с белком Ерас и РКА было показано, что гидроксильная группа в 2'-положении сАМР может образовывать водородную связь с остатком глутамата (Glu²³⁸ в человеческом белке РКА) в сАМР-связывающем домене РКА, который отсутствует в сайте связывания сАМР/Ерас [24, 25]. Было высказано предположение, что взаимодействие между группой 2'-ОН и остатком глутамата является существенным для связывания сАМР с сАМР-связывающим доменом РКА, его модификация может привести к созданию селективных модуляторов белков Ерас [24, 25]. Изучение синтезированного набора соединений, модифицированных по 2'-положению углеводного цикла, подтвердило сделанную гипотезу. Так, например, соединение 2'-О-Ме-сАМР, в котором 2'-гидроксильная группа заменена на метокси-группу, оказалось в 10–100 раз более селективным по отношению к белкам Ерас, чем к РКА, при этом аффинность в отношении белка Ерас была лишь немного меньшей, чем таковая для сАМР (коэффициент диссоциации $K_d = 24,2 \mu\text{M}$) [26].

Помимо модификации молекулы сАМР по 2'-положению, этими и другими исследователями был синтезирован набор производных сАМР с замещением по атому азота (N⁶) и 8 положению пуринового основания [24–27].

Изучение N⁶-производных сАМР показало, что введение заместителей в это положение приводит к незначительным изменениям в их способности связываться с белками Ерас, однако при этом происходит

существенное увеличение аффинности в отношении РКА. Так, например, фенильное и бензильное производные (N⁶-phenyl-сАМР и 6-Bnz-сАМР) имеют значения K_d (Ерас) $1,04 \mu\text{M}$ и $2,23 \mu\text{M}$, соответственно, в то время как их K_d (РКА) составили $0,26 \mu\text{M}$ и $0,73 \mu\text{M}$, соответственно [25]. Следует отметить, что аналог сАМФ с заменённой аминогруппой на атом кислорода в 6 положении (соединение цГМФ) обладает приблизительно в 10 раз меньшей аффинностью как к Ерас, так и к РКА [25, 26].

Наиболее широко в литературе представлен набор производных сАМР с модификацией в 8 положении аденинового цикла [24–27]. В качестве заместителей в этом положении использовались прежде всего галогены и аминокислотные, арилтиольные и арилалкилтиольные группы. Установлено, что в большинстве случаев введение заместителей в 8 положение приводит к увеличению аффинности соединений к белкам Ерас и к существенному увеличению их селективности по отношению к РКА. Так, 8-бром производное (8-Br-сАМР) имело K_d (Ерас) $0,35 \mu\text{M}$ и K_d (РКА) $2,23 \mu\text{M}$. Объёмные липофильные группы в 8 положении ещё более увеличивали сродство соответствующих молекул к белкам Ерас. Так, для структуры с п-хлорфенилтиольным заместителем (8-рСРТ-сАМР) значение K_d (Ерас) составило $0,04 \mu\text{M}$, а K_d (РКА) $0,74 \mu\text{M}$.

Как и следовало ожидать, одновременная модификация 2' и 8 положений сАМР в соответствии с вышеуказанными данными приводило к созданию высокоаффинных и Ерас/РКА селективных соединений [24–26]. При этом в положении 2' использовалась метокси-группа, а в 8 положении — липофильные заместители. Среди наиболее выдающихся примеров можно привести структуры 8-рСРТ-2'-О-Ме-сАМР (K_d (Ерас) $0,63 \mu\text{M}$) и 8-рМеОРТ-2'-О-Ме-сАМР (K_d (Ерас) $0,41 \mu\text{M}$), для которых K_d (РКА) составляла более $70 \mu\text{M}$. Поскольку соединение 8-рСРТ-2'-О-Ме-сАМР, которое в научной литературе обозначается следующими аббревиатурами — 8-СРТ, D-007 и 007, проявляло наибольшую аффинность и селективность по отношению к белкам Ерас, его стали широко использовать при изучении спектра биологической активности белков Ерас [28]. Однако соединение 8-СРТ имело и свои недостатки, поскольку плохо проникало через биологические мембраны. С целью улучшения проницаемости был синтезирован аналог соединения 8-СРТ — соединение 8-рСРТ-2'-О-Ме-сАМР-АМ (8-рСРТ-АМ), в котором один из атомов кислорода фосфатной группы соединения 8-рМеОРТ-2'-О-Ме-сАМР был этерифицирован ацетоксиметилловым эфиром [29]. В результате этой модификации соединение 8-рСРТ-АМ, в отличие от прототипа, легко преодолевает клеточную мембрану [29]. Соединение 8-рСРТ-АМ действует как пролекарство — после проникновения в клетку оно может гидролизироваться эстеразами до прототипа 8-рМеОРТ-

2'-О-Ме-сАМР. Биологические эффекты соединения 8-рСРТ-АМ реализуются в концентрации более чем в 100 раз меньшей, чем у прототипа, при этом его селективность в отношении белков Ерас сохраняется. Вместе с тем соединение 8-рСРТ-АМ является и хорошим субстратом для фосфодиэстераз (PDE) и действует как их ингибитор [30].

Ещё одним вариантом модификации структуры сАМР была замена одного из атомов кислорода в фосфатной группе на атом серы [25, 26, 31]. Следует отметить, что такое превращение ведёт к образованию двух диастереомеров: аксиальному (Sp) и экваториальному (Rp). В том случае, когда введение атома серы было проведено для молекулы 8-рСРТ-2'-О-Ме-сАМР, полученное производное Sp-8-рСРТ-2'-О-Ме-сАМРS являлось высокоспецифичным агонистом белков Ерас и обладало высокой липофильностью и, следовательно, легко преодолевало клеточную мембрану [31]. Однако, также как и соединение 8-рСРТ-АМ, оно являлось ингибитором PDE.

В исследовании Schwede F с соавт. была предпринята попытка получения производных сАМР, обладающих Ерас1/Ерас2-селективностью [27]. С использованием вышеописанных структурных модификаций авторами была получена молекула Sp-8-BnT-сАМРS (аббревиатуры: Sp-8-BnT-сАМРS; S-220), содержащая атом серы в фосфатной группе в аксиальном положении и бензилтиольную группу в 8 положении пуринового основания, обладающая 100-кратной селективностью к Ерас2 в сравнении с Ерас1 (константа полуактивации AC_{50} (Ерас2) 0,1 μ М, AC_{50} (Ерас1) 13 μ М), поскольку имеет тропность к представленному в его сАМР-связывающем домене (CNBD-B) регуляторного региона Lys₄₀₅ аминокислотному остатку. Хотя соединение S-220 рассматривают как селективный агонист белка Ерас2А, имеются сообщения о том, что оно может оказывать и незначительное модулирующее действие в отношении белка Ерас1 [27].

В ряде исследований показано, что в качестве селективных агонистов белка Ерас2А могут быть использованы гипогликемические препараты — производные сульфонилмочевины (глибенкламид, глипизид и др.), применяемые в клинике для лечения сахарного диабета 2-го типа [32, 33]. Связывание производных сульфонилмочевины с белками Ерас2А зависит от концентрации сАМР. Для глибенкламида и глипизида взаимодействие с белками Ерас2А наблюдалось при их концентрации порядка 10 μ М. Производные сульфонилмочевины и сАМР совместно активируют белки Ерас2А путём связывания с доменами регуляторного региона CNBD-A и CNBD-B, соответственно.

Необходимо подчеркнуть, что имеющиеся в распоряжении исследователей агонисты белков Ерас, созданные на основе аналогов сАМР и широко используемые при изучении их биологических эффектов, обладают существенными недостатками, поскольку большинство из них, помимо белков Ерас, взаимодействуют

и с другими внутриклеточными мишенями [34, 35]. Это связано с тем, что при дизайне молекулярных инструментов для изучения функций белков Ерас авторы практически не уделяли внимания их селективности по отношению к другим мишеням, что, с одной стороны, позволяет говорить о необходимости более тщательного подхода к трактовке имеющихся результатов, а с другой стороны, ставит вопрос о необходимости создания новых фармакологических инструментов, обладающих сродством исключительно к белкам Ерас.

Антагонисты белков Ерас

В исследованиях Tsalkova T с соавт. впервые был предложен метод высокопроизводительного скрининга для поиска антагонистов белков Ерас [36, 37]. Этот метод основан на способности молекул антагонистов конкурировать за место связывания на белке с флуоресцентной меткой, в качестве которой использовалось производное сАМР — 8-NBD-сАМР. Это соединение вызывает более чем 100-кратное увеличение флуоресценции при связывании с очищенным полноразмерным Ерас2 и может быть обращено путём добавления избытка сАМР. При этом увеличение флуоресцентного сигнала было существенно меньшим при связывании 8-NBD-сАМР с белком Ерас1 [38].

Первичный скрининг с использованием молекулярной библиотеки NCI DTP (Developmental Therapeutics Program) позволил выявить три высокоаффинных ингибитора белков Ерас различного химического строения: NSC45576, NSC119911 и NSC686365. Эти соединения не только ингибировали активность белков Ерас2 (константа полуингибирования IC_{50} 1,7 μ М, 3,8 μ М и 7,9 μ М, соответственно), но также ингибировали Ерас1-опосредованный обмен нуклеотидов Rap1 при 25 мкМ. В то же время, эти соединения не блокировали активность PKA, опосредованную сАМР, то есть обладали Ерас-селективностью.

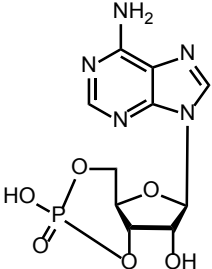
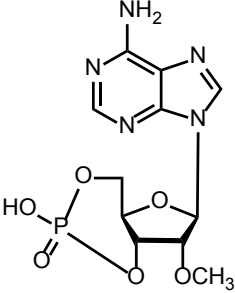
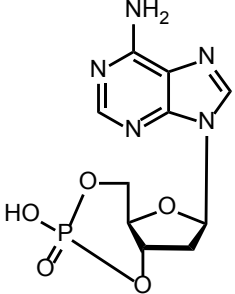
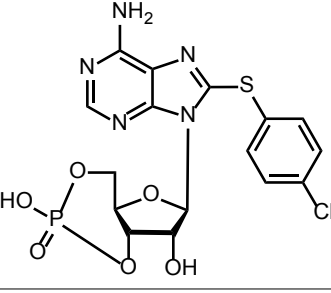
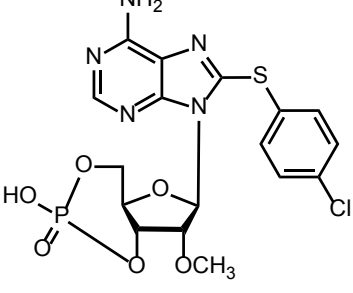
Дальнейший высокопроизводительный скрининг с использованием библиотеки соединений Maybridge Hitfinder, содержащей 14400 структур, позволил Tsalkova T с соавт. выявить ряд новых хитов (с шифром ESI), которые ингибировали белки Ерас2 в концентрациях не более 25 μ М в присутствии аналогичных концентраций сАМР [37].

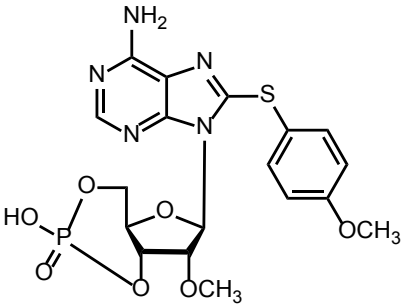
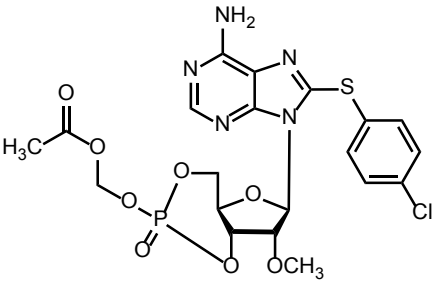
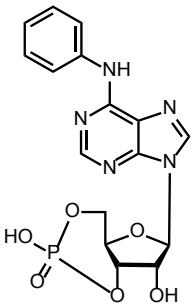
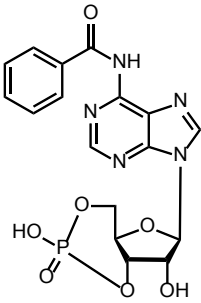
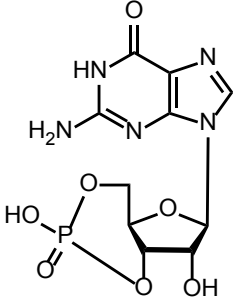
В первую группу хитов вошли биароматические соединения с одноатомной связкой: соединение ESI-05 с сульфонильной связкой, ESI-07 и ESI-10 с аминной связкой. Во второй группе оказались производные 5-циано-6-оксо-1,6-дигидропиримидина: соединения ESI-06 и ESI-08, отличающиеся заместителями при атоме серы во 2 положении. Отдельно стоят биароматические соединения ESI-04 и ESI-09.

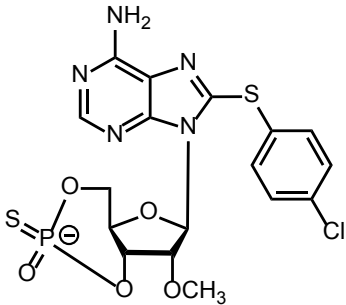
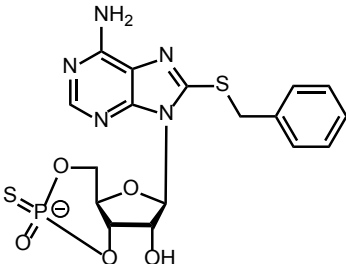
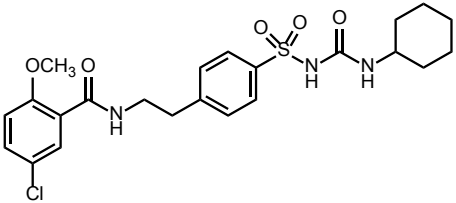
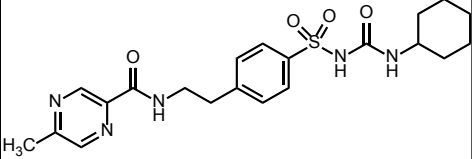
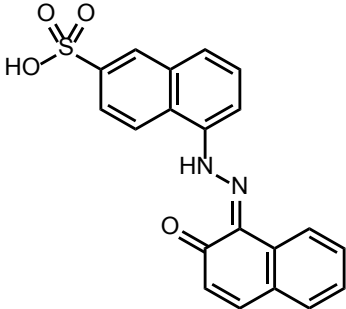
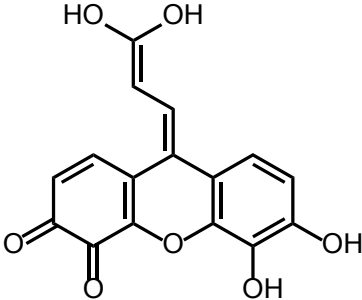
В одной из последующих работ Tsalkova T с соавт. описана оптимизация 5-циано-6-оксо-1,6-дигидропиримидиновых производных с целью под-

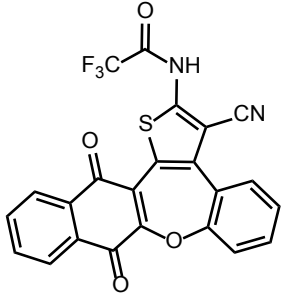
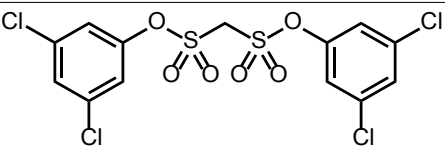
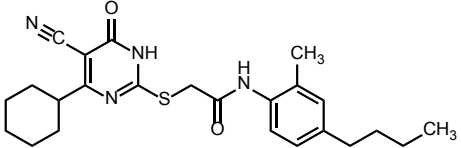
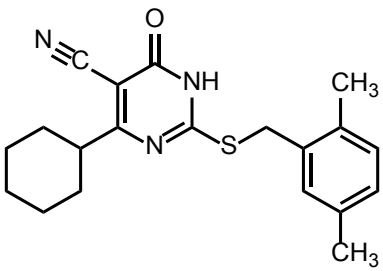
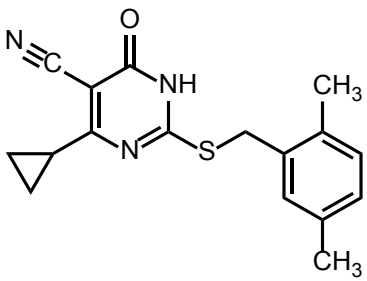
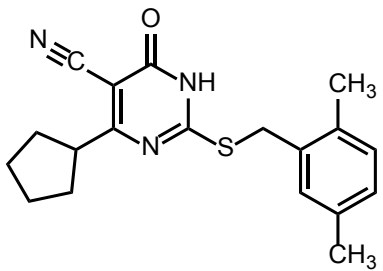
Таблица 1

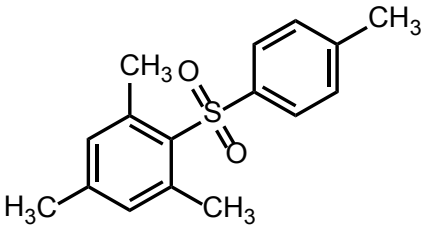
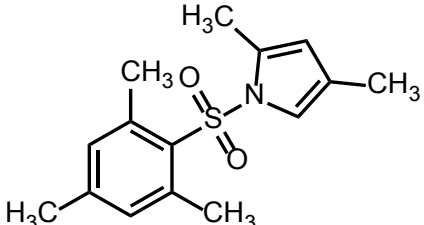
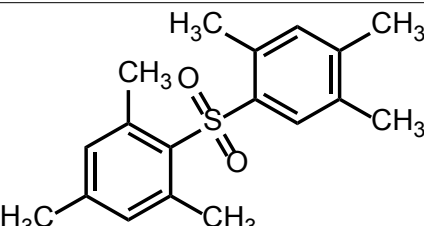
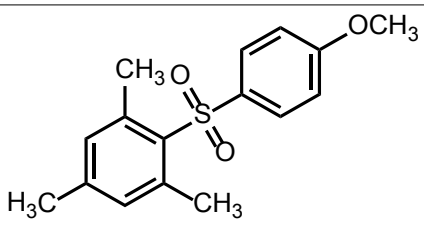
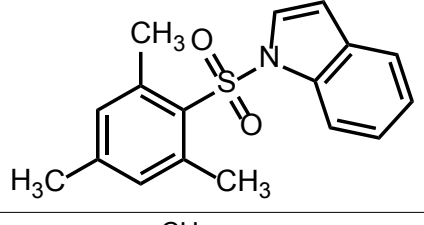
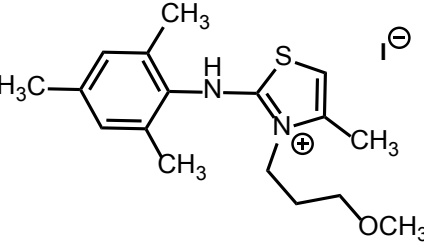
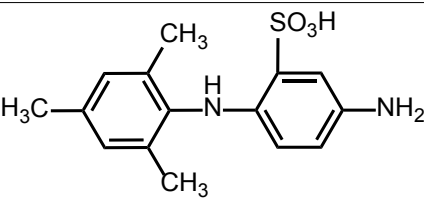
Структуры лигандов Ерас и значения их аффинности

Класс	Шифр	Структура	Аффинность (Ерас)	Ссылка
Производные cAMP	cAMP		Kd 2,9 μM	25, 26
	2'-O-Me-cAMP		Kd 24,2 μM	26
	2'-deoxy-cAMP		Kd 1160 μM	25, 26
	8-pCPT-cAMP		Kd 0,04 μM	25, 26
	8-pCPT-2'-O-Me-cAMP		Kd 0,63 μM	25, 26

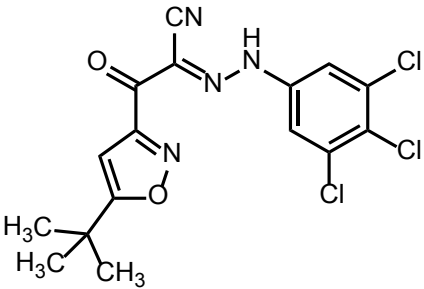
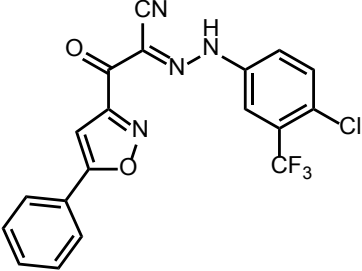
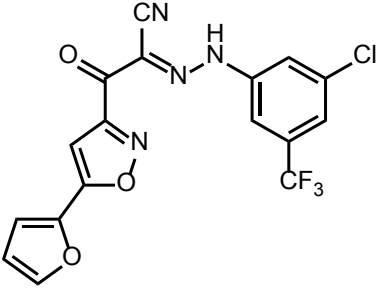
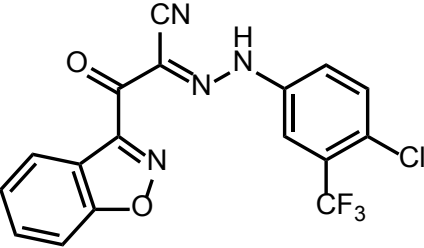
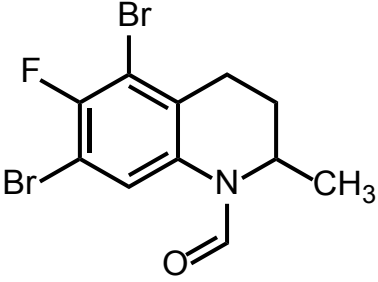
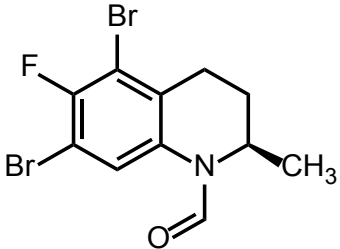
Производные cAMP	8-pMeOPT-2'-O-Me-cAMP		Kd 0,41 μ M	25, 26
	8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM		AC50 0,01 μ M	29
	N ⁶ -phenyl-cAMP		Kd 0,36 μ M	25
	6-Bnz-cAMP		Kd 0,77 μ M	25
	cGMP		Kd 37,2 μ M	25, 26

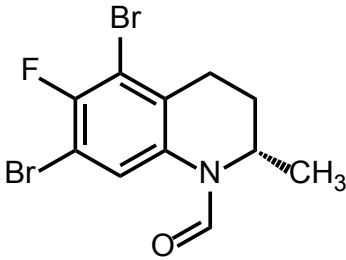
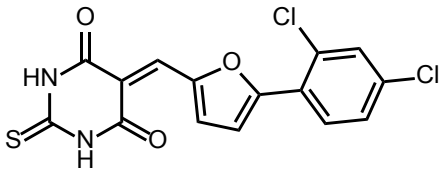
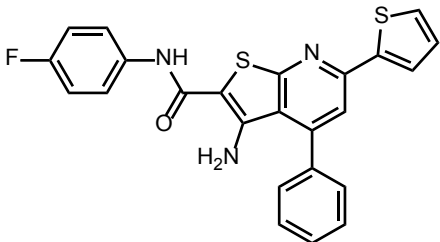
Производные cAMP	Sp-8-pCPT-2'-O-Me-cAMPS		Kd 6,1 μM	31
	Sp-8-BnT-cAMPS		AC50 (Epac2) 0,1 μM, AC50 (Epac1) 13 μM	27
Производные сульфонилмочевины	Глибенкламид		IC50~10 μM	32
	Глипизид		IC50~10 μM	32
Би-нафтильное производное	NSC45576		IC50 (Epac2) 1,7 μM	36
Производное ксантена	NSC119911		IC50 (Epac2) 3,8 μM	36

Полициклическое производное	NSC686365		IC50 (Ераc2) 7,9 μM	36
Биароматическое дисульфонильное производное	ESI-04		IC50 (Ераc2) 25 μM	37
Производные 5-циано-6-оксо-1,6-дигидро-пиримидина	ESI-06		IC50 (Ераc2) 25 μM	37
	ESI-08		IC50 (Ераc2) 8,4 μM	39
	HJC0198		IC50 (Ераc2) 4,0 μM	39
	HJC0197		IC50 (Ераc2) 5,9 μM	39

Биароматические сульфонильные производные	ESI-05		IC50 (Ераc2) 0,5 μM IC50 (Ераc1) > 25 μM	41
	HJC0350		IC50 (Ераc2) 0,3 μM IC50 (Ераc1) > 25 μM	41
	27		IC50 (Ераc2) 0,7 μM	41
	28		IC50 (Ераc2) 1,9 μM	41
	33		IC50 (Ераc2) 1,2 μM	41
Биароматические азот-содержащие производные	ESI-07		IC50 (Ераc2) 25 μM	37
	ESI-10		IC50 (Ераc2) 25 μM	37

Биароматические азот-содержащие производные	MAY0132		IC50 (Ераc2) 0,4 μ M IC50 (Ераc1) > 100 μ M	41
	HJC0338		IC50 (Ераc2) 0,4 μ M	42
	A		IC50 (Ераc2) 0,5 μ M	42
	Б		IC50 (Ераc2) 0,4 μ M	42
	В		IC50 (Ераc2) 0,4 μ M	42
Гидразоно-нитрильные производные с изоксазольным гетероциклом	ESI-09		IC50 (Ераc1) 3,2 μ M IC50 (Ераc2) 7,0 μ M	44
	HJC0726		IC50 (Ераc2) 1,9 μ M IC50 (Ераc1) 2,4 μ M	101

Гидразоно- нитрильные производные с изоксазольным гетероциклом	NY0123		IC50 (Epac2) 0,9 μ M IC50 (Epac1) 2,4 μ M	45
	14		IC50 (Epac2) 2,3 μ M IC50 (Epac1) 3,4 μ M	46
	26		IC50 (Epac2) 2,2 μ M IC50 (Epac1) 3,6 μ M	46
	33		IC50 (Epac2) 1,9 μ M IC50 (Epac1) 3,1 μ M	46
Производные тетрагидрохинолина	CE3F4		EC50 (Epac1) 10,7 μ M	48
	R-CE3F4		EC50 (Epac1) 5,8 μ M	48

Производные тетрагидрохинолина	S-CE3F4		EC ₅₀ (Eras1) 56 μM	48
Производные тиобарбитуровой кислоты	5376753		IC ₅₀ (Eras1) 4 μM	49
Производные тиено[2,3-b]пиридинов	AM-001		IC ₅₀ (Eras1) 47,8 μM IC ₅₀ (Eras2) > 1000 μM	21

бора более высокоаффинных структур [39]. Изучение влияния строения заместителей во 2 и 6 положениях пиримидинового цикла с использованием метода молекулярного докинга в программе AutoDock Vina показало, что их наличие является критичным для связывания с белками Eras2. Так, было установлено, что липофильная группа в 6 положении взаимодействует с остатками Phe³⁶⁷, Ala⁴¹⁵ и Ala⁴¹⁶ белка, а гидрофобный заместитель во 2 положении – с Leu⁴⁰⁶ и Leu⁴⁴⁹ [40]. При модификации циклоалканового заместителя в 6 положении пиримидинового цикла ESI-08 путём его уменьшения были созданы соединения HJC-0197 (с циклопентановым циклом) и HJC-0198 (с циклопропановым циклом), продемонстрировавшие более высокое сродство к белкам Eras2, чем прототип (IC₅₀ 5,9 μM и 4,0 μM, соответственно; ESI-08: 8,4 μM) [39]. При концентрации 25 μM соединение HJC0198 селективно блокировало сАМР-индуцированную активацию белков Eras, но не ингибировало сАМР-опосредованную активацию РКА. В клеточных линиях HEK293/Eras1 и HEK293/Eras2 соединение HJC0198 полностью блокировало Eras1- и Eras2-опосредованное фосфорилирование АКТ в концентрации 10 μM.

В работах тех же авторов была предпринята попытка оптимизации структуры биароматических молекул ESI-05 и ESI-10 [41, 42]. С целью поиска более высокоаффинных и селективных соединений ими были проанализированы аналоги этих соединений, полученные заменой или модификацией ароматических групп. В качестве связующего элемента были сохранены сульфонильная или аминогруппы. В случае

модификации сульфонильного производного ESI-05 близкие к прототипу значения аффинности продемонстрировали соединения 27, 28 и 33, в которых 4-метилфенильная группа заменена на 2,4,5-триметилфенильную, 4-метоксифенильную и триптофанильную, соответственно (IC₅₀ (Eras2) 0,7; 1,9 и 1,2 μM, соответственно) [41]. При замене 4-метилфенильного заместителя в ESI-05 на 2,4-диметилпиррольный было получено соединение HJC0350, показавшее наилучшие характеристики по связыванию с белками Eras2 (IC₅₀ 0,3 μM) [41], при этом оно не ингибировало белки Eras1-опосредованный обмен нуклеотидов Rap1 и РКА в концентрациях не менее 25 μM, что свидетельствует о селективности соединения HJC0350. В ряду аналогов ESI-05 и ESI-10 с аминной связкой на базе мезидина лучшие результаты показали соединения, содержащие во втором фенильном кольце атомы хлора, метильные группы или трифторметильную группу [42]. Так, 2,5-дихлорфенильное производное HJC0338 имело IC₅₀ (Eras2) 0,4 μM, 2-метил-3-хлорфенильное производное А и 3-трифторметил-4-хлорфенильное производное Б имели IC₅₀ (Eras2) 0,5 и 0,4 μM, соответственно. Симметричное соединение В также имело высокое сродство к Eras2 (IC₅₀ 0,4 μM). Более детальное изучение соединений А и В показало, что эти соединения ингибируют сАМР-опосредованную активность Eras2 при 1 μM и не связываются с Eras1 в концентрациях до 100 μM, что свидетельствует об их высокой селективности [42].

Следует отметить, что при анализе причин селективности биароматических антагонистов белков Eras2 на примере ESI-07 была выдвинута гипотеза,

закрывающаяся в том, что это соединение блокирует белок Ерас2 в его аутоингибирующей конформации, связываясь одновременно с поверхностью двух сАМР-связывающих доменов [43]. Так как у белков Ерас1 только один с-АМФ-связывающий домен, то они не имеют такого сайта связывания, что и является причиной селективности соединения ESI-07.

Производное ESI-09, относящееся к группе изоксазол-содержащих гидразонитрильных соединений, хотя и обладает сродством к обоим изоформам белков Ерас, но в большей степени ингибирует белки Ерас1 (IC_{50} (Ерас1) 3,2 μ M; IC_{50} (Ерас2) 7,0 μ M) [44]. При этом это соединение обладает выраженной Ерас-селективностью, поскольку не связывается с РКА. Исследования, проведенные с помощью метода молекулярного докинга, позволили установить, что при взаимодействии ESI-09 с сайтом связывания белков Ерас2 трет-бутилизоксазолильная группа образует водородную связь с остатком Gly404 и взаимодействует с гидрофобными остатками Phe³⁶⁷, Leu⁴⁰⁶, Ala⁴⁰⁷ и Ala⁴¹⁵, а 3-хлорфенильный фрагмент образует гидрофобные взаимодействия с остатками Val³⁸⁶, Val³⁹⁴ и Leu³⁹⁷.

Расширение группы гидразонитрильных производных с целью поиска более перспективных соединений привело к созданию молекул HJC0726 и NY0123, обладающих существенно большей аффинностью по отношению к белкам Ерас2 (IC_{50} (Ерас2) 1,9 μ M и 0,9 μ M, соответственно), отличающихся от прототипа наличием дополнительно одного или двух атомов хлора, соответственно [44, 45]. При этом эти соединения обладали также сродством к белкам Ерас1 (IC_{50} (Ерас1) 2,4 μ M). Изучение связи структура – действие показало, что модификация гидразонового линкера, изменение заместителя в изоксазольном цикле или удаление галогенов из фенильного кольца приводит к существенному падению активности [45]. В работе Ye N с соавт. более подробно рассмотрена возможность модификации изоксазольного фармакофора и заместителя в фенильном кольце [46]. Было установлено, что при использовании в качестве заместителей в фенильном кольце атома хлора и трифторметильной группы и введение в изоксазольное кольцо фенильного (соединение 14) или фурильного цикла (соединение 26) приводит к высокоаффинным соединениям по отношению как к белкам Ерас1, так и к белкам Ерас2 (для 14: IC_{50} (Ерас2) 2,3 μ M, IC_{50} (Ерас1) 3,4 μ M; для 26: IC_{50} (Ерас2) 2,2 μ M, IC_{50} (Ерас1) 3,6 μ M). Кроме того, к обоим изоформам белков Ерас высокую аффинность проявляло соединение 33, в котором изоксазольный цикл сконденсирован с бензольным кольцом (IC_{50} (Ерас2) 1,9 μ M, IC_{50} (Ерас1) 3,1 μ M). Данные молекулярного докинга позволили установить, что соединение 33 связывается с белком Ерас2 отличным от ESI-09 способом. В его взаимодействиях с Ерас2 преобладают три водородные связи и одна галогеновая связь, включая взаимодействие атома кислорода в бензо[d]изоксазольном фрагменте с

остатком Leu⁴⁰⁶, атома хлора в фенильном фрагменте с остатком Asn⁴⁴⁵ и атома азота в цианогруппе линкера с Lys⁴⁵⁰, а также взаимодействие атома водорода линкера с Arg⁴⁴⁸ [46].

Ещё одной группой Ерас-ингибиторов явились производные тетрагидрохинолина, выявленные группой Courilleau D с соавт. в 2012 году [47] путём высокопроизводительного скрининга библиотеки соединений «chimiothèque essentielle compound library». Данный скрининг был основан на способности белков Ерас катализировать активность нуклеотидного обмена Rap1. Тетрагидрохинолин CE3F4 блокировал Ерас1-индуцированную активацию Rap1 как в бесклеточных, так и в клеточных системах, и не влиял на активность РКА. Позже было установлено, что соединение CE3F4 обладает большей селективностью к белкам Ерас1, чем к белкам Ерас2 [48]. Кроме того, было установлено, что R-энантиомер соединения CE3F4 в 10 раз активнее, чем его S-энантиомер, который также обладает в 10 раз большей селективностью к белкам Ерас1. Изучение связи структура – активность показало, что наличие галогенов и формильной группы в тетрагидрохинолиновом ядре является необходимым для наличия аффинности по отношению к белкам Ерас1 [48].

С использованием компьютерного молекулярного моделирования Brown LM с соавт. было создано производное тиобарбитуровой кислоты – 5376753, которое аллостерически и селективно ингибировало активность белка Ерас1 (IC_{50} 4 μ M) [49]. По расчётным данным, это соединение имеет сайт связывания на шарнирной области нуклеотид-связывающего домена белка Ерас1. Установлена ключевая роль остатков Trp²⁸³, Val³³⁷, Asp³³⁸, Phe³⁴² и Arg³³⁶ во взаимодействии соединения 5376753 с этим сайтом связывания.

В 2019 г. были опубликованы результаты исследования Laudette M с соавт., в котором они с использованием метода Ерас1-BRET (биолюминесцентный резонансный перенос энергии) выявили ингибитор белка Ерас1 AM-001, относящийся к группе производных тиено[2,3-b]пиридинов, содержащий три ароматических заместителя. Соединение AM-001 не проявляло антагонизма по отношению к белкам Ерас2 и РКА (IC_{50} (Ерас1) 47,8 μ M; IC_{50} (Ерас2) > 1000 μ M), но предотвращало активацию белков Rap1, инициированную агонистом белков Ерас1 соединением 8-CPT [21].

Анализируя представленный в литературе набор синтетических антагонистов Ерас1 и Ерас2 можно сделать следующие выводы.

1. Большинство представленных антагонистов Ерас имеет в своей структуре два ароматических ядра, связанных достаточно коротким линкером в 2–6 σ -связей, содержащем, как минимум, один гетероатом.

2. У селективных Ерас2 антагонистов два ароматических ядра связаны друг с другом посредством лишь одного гетероатома: азота или серы.

3. По данным метода молекулярного докинга связывание синтетических антагонистов Ерас происходит

либо в месте связывания нативного лиганда сАМР (для обоих подтипов), либо на шарнирной области нуклеотид-связывающего домена белка Ерас1 (соединение 5376753), либо одновременно с поверхностью двух сАМР-связывающих доменов Ерас2 в его аутоингибирующей конформации (ESI-07 и аналоги). Необходимо указать, что эти гипотезы требуют экспериментального подтверждения.

Вследствие того, что белки Ерас являются достаточно новыми молекулярными мишенями на се-

годняшний день получен весьма небольшой набор их антагонистов, который можно отнести к приблизительно десяти химическим подгруппам. В то же время, понимание важнейшей роли белков Ерас в биохимических процессах в организме и имеющиеся данные по биологической активности известных синтетических антагонистов Ерас свидетельствует об актуальности дальнейшего поиска новых и селективных Ерас-антагонистов с целью создания потенциальных лекарственных средств.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мокров Григорий Владимирович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID: 0000-0003-2617-0334

SPIN-код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Mokrov Grigory

Corresponding author

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID: 0000-0003-2617-0334

SPIN code: 8755-7666

Candidate of Chemical Sciences, Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the medicinal chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Никифорова Татьяна Дмитриевна

ORCID: 0000-0003-1717-4659

SPIN-код: 8593-9450

Лаборант-исследователь лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Nikiforova Tatiana

ORCID: 0000-0003-1717-4659

SPIN code: 8593-9450

Laboratory assistant-researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Крыжановский Сергей Александрович

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

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

Kryzhanovskii Sergey

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Kawasaki H, Springett GM, Mochizuki N, et al. A family of cAMP-binding proteins that directly activate Rap1. *Science*. 1998 Dec;18;282(5397):2275–9. DOI: 10.1126/science.282.5397.2275
2. de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, et al. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature*. 1998 Dec 3;396(6710):474–7. DOI: 10.1038/24884
3. Cheng X, Ji Z, Tsalkova T, Mei F. Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008 Jul;40(7):651–62. DOI: 10.1111/j.1745-7270.2008.00438.x
4. Banerjee U, Cheng X. Exchange protein directly activated by cAMP encoded by the mammalian rapgef3 gene: Structure, function and therapeutics. *Gene*. 2015 Oct 10;570(2):157–67. DOI: 10.1016/j.gene.2015.06.063
5. Dao KK, Teigen K, Kopperud R, et al. Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem*. 2006 Jul 28;281(30):21500–11. DOI: 10.1074/jbc.M603116200
6. de Rooij J, Rehmann H, van Triest M., et al. Mechanism of regulation of the Epac family of cAMP-dependent RapGEFs. *J Biol Chem*. 2000 Jul 7;275(27):20829–36. DOI: 10.1074/jbc.M001113200
7. Laurent AC, Breckler M, Berthouze M, Lezoualc'h F. Role of Epac in brain and heart. *Biochem Soc Trans*. 2012 Feb;40(1):51–7. DOI: 10.1042/BST20110642
8. Borland G., Gupta M., Magiera M.M., et al. Microtubule-associated protein 1B-light chain 1 enhances activation of Rap1 by exchange protein activated by cyclic AMP but not intracellular targeting. *Mol Pharmacol*. 2006 Jan;69(1):374–84. DOI: 10.1124/mol.105.016337
9. Gloerich M., Ponsioen B., Vliem M.J., et al. Spatial regulation of cyclic AMP-Epac1 signaling in cell adhesion by ERM proteins. *Mol Cell Biol*. 2010 Nov;30(22):5421–31. DOI: 10.1128/MCB.00463-10
10. Kiermayer S, Biondi RM, Imig J, et al. Epac activation converts cAMP from a proliferative into a differentiation signal in PC12 cells. *Mol Biol Cell*. 2005 Dec;16(12):5639–48. DOI: 10.1091/mbc.e05-05-0432
11. Rehmann H, Rueppel A, Bos JL, Wittinghofer A. Communication between the regulatory and the catalytic region of the cAMP-responsive guanine nucleotide exchange factor Epac. *J Biol Chem*. 2003 Jun 27;278(26):23508–14. DOI: 10.1074/jbc.M301680200
12. Robichaux WG, Cheng X. Intracellular cAMP Sensor EPAC: Physiology, Pathophysiology, and Therapeutics Development. *Physiol Rev*. 2018 Apr 1;98(2):919–1053. DOI: 10.1152/physrev.00025.2017

13. Sehrawat S, Hernandez T, Cullere X, et al. AKAP9 regulation of microtubule dynamics promotes Epac1-induced endothelial barrier properties. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):708–18. DOI: 10.1182/blood-2010-02-268870
14. Hong J, Doebele RC, Lingen MW, et al. Anthrax edema toxin inhibits endothelial cell chemotaxis via Epac and Rap1. *J Biol Chem*. 2007 Jul 6; 282(27):19781–7. DOI: 10.1074/jbc.M700128200
15. Amano H, Ando K, Minamida S, et al. Adenylate cyclase/protein kinase A signaling pathway enhances angiogenesis through induction of vascular endothelial growth factor *in vivo*. *Jpn J Pharmacol*. 2001 Nov;87(3):181–188. DOI: 10.1254/jip.87.181
16. Kawano Y, Yoshimura T, Kaibuchi K, Smooth muscle contraction by small GTPase Rho. *Nagoya J Med Sci*. 2002 May;65(1-2):1–8. PMID: 12083286
17. Wang H, Robichaux WG, Wang Z, et al. Inhibition of Epac1 suppresses mitochondrial fission and reduces neointima formation induced by vascular injury. *Sci Rep*. 2016 Nov 10;6:36552. DOI: 10.1038/srep36552
18. Pereira L, Rehmann H, Lao DH, et al. Novel Epac fluorescent ligand reveals distinct Epac1 vs. Epac2 distribution and function in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 Mar 31;112(13):3991–3996. DOI: 10.1073/pnas.1416163112
19. Mangmool S, Hemplueksa P, Parichatanond W, Chattipakorn N. Epac is required for GLP-1R-mediated inhibition of oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes. *Mol Endocrinol*. 2015 Apr;29(4):583–596. DOI: 10.1210/me.2014-1346
20. Fazal L, Laudette M, Paula-Gomes S, et al. Multifunctional Mitochondrial Epac1 Controls Myocardial Cell Death. *Circ Res*. 2017 Feb 17;120(4):645–657. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309859
21. Laudette M, Coluccia A, Sainte-Marie Y, et al. Identification pharmacological inhibitor Epac1 that protects heart against acute and chronic models cardiac stress. *Cardiovasc Res*. 2019 Mar 14. pii: cvz076. DOI: 10.1093/cvr/cvz076
22. Insel PA, Murray F, Yokoyama U, et al. cAMP and Epac in the regulation of tissue fibrosis. *Br J Pharmacol*. 2012 May;166(2):447–456. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01847.x
23. Pereira L, Cheng H, Lao DH, et al. Epac2 mediates cardiac β 1-adrenergic-dependent sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} leak and arrhythmia. *Circulation*. 2013 Feb 26;127(8):913–22. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.12.148619
24. Enserink JM, Christensen AE, de Rooij J, et al. A novel Epac-specific cAMP analogue demonstrates independent regulation of Rap1 and ERK. *Nat Cell Biol*. 2002;4:901–906. DOI: 10.1038/ncb874
25. Christensen AE, Selheim F, de Rooij J, et al. cAMP analog mapping of Epac1 and cAMP kinase. Discriminating analogs demonstrate that Epac and cAMP kinase act synergistically to promote PC-12 cell neurite extension. *J Biol Chem*. 2003;278:35394–35402. DOI: 10.1074/jbc.M302179200
26. Dao KK, Teigen K, Kopperud R, et al. Epac1 and cAMP-dependent protein kinase holoenzyme have similar cAMP affinity, but their cAMP domains have distinct structural features and cyclic nucleotide recognition. *J Biol Chem*. 2006;281:21500–21511. DOI: 10.1074/jbc.M603116200
27. Schwede F, Bertinetti D, Langerijs CN, et al. Structure-guided design of selective Epac1 and Epac2 agonists. *PLoS Biol*. 2015;13:e1002038.
28. Wang P, Liu Z, Chen H, et al. Exchange proteins directly activated by cAMP (EPACs): Emerging therapeutic targets. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Apr 15;27(8):1633–1639. DOI: 10.1016/j.bmcl.2017.02.065
29. Vliem MJ, Ponsioen B, Schwede F, et al. 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP-AM: an improved Epac-selective cAMP analogue. *ChemBioChem*. 2008;9:2052–2054. DOI: 10.1002/cbic.200800216
30. Schmidt M, Dekker FJ, Maarsingh H. Exchange protein directly activated by cAMP (epac): a multidomain cAMP mediator in the regulation of diverse biological functions. *Pharmacol Rev*. 2013;65:670–709. DOI: 10.1124/pr.110.003707
31. Poppe H, Rybalkin SD, Rehmann H, et al. Cyclic nucleotide analogs as probes of signaling pathways. *Nat Methods*. 2008;5:277–278. DOI: 10.1038/nmeth0408-277
32. Takahashi T, Shibasaki T, Takahashi H, et al. Antidiabetic sulfonylureas and cAMP cooperatively activate Epac2A. *Sci Signal*. 2013 Oct 22;6(298):ra94. DOI: 10.1126/scisignal.2004581
33. Zhang CL, Katoh M, Shibasaki T, et al. The cAMP sensor Epac2 is a direct target of antidiabetic sulfonylurea drugs. *Science*. 2009 Jul 31;325(5940):607–610. DOI: 10.1126/science.1172256
34. Enyeart JA, Liu H, Enyeart J. cAMP analogs and their metabolites enhance TREK-1 mRNA and K^{+} current expression in adrenocortical cells. *J Mol Pharmacol*. 2010;77:469–482. DOI: 10.1124/mol.109.061861
35. Herfindal L, Nygaard G, Kopperud R, et al. Off-target effect of the Epac agonist 8-pCPT-2'-O-Me-cAMP on P2Y12 receptors in blood platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;437:603–608. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.07.007
36. Tsalkova T, Mei FC, Cheng X. A fluorescence-based high-throughput assay for the discovery of exchange protein directly activated by cyclic AMP (EPAC) antagonists. *PLoS One*. 2012;7:e30441. [PubMed: 22276201]. DOI: 10.1371/journal.pone.0030441
37. Tsalkova T, Mei FC, Li S, et al. Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:18613–18618. DOI: 10.1073/pnas.1210209109
38. Kraemer A, Rehmann HR, Cool RH, et al. Dynamic interaction of cAMP with the Rap guanine-nucleotide exchange factor Epac1. *J Mol Biol*. 2001;306:1167–1177. [PubMed: 11237625]. DOI: 10.1006/jmbi.2001.4444
39. Chen H, Tsalkova T, Mei FC, et al. Zhou 5-Cyano-6-oxo-1,6-dihydro-pyrimidines as potent antagonists targeting exchange proteins directly activated by cAMP. *J Bioorg Med Chem Lett*. 2012;22:4038–4043. DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.082
40. Chen H, Yang Z, Ding C, et al. Fragment-based drug design and identification of HJC0123, a novel orally bioavailable STAT3 inhibitor for cancer therapy. *Eur J Med Chem*. 2013;62:498–507. [PubMed: 23416191] DOI: 10.1016/j.ejmech.2013.01.023
41. Chen H, Tsalkova T, Chepurony OG, et al. Identification and characterization of small molecules as potent and specific EPAC2 antagonists. *J Med Chem*. 2013;56:952–962. DOI: 10.1021/jm3014162
42. Wild CT, Zhu Y, Na Y, et al. Functionalized N,N-Diphenylamines as Potent and Selective EPAC2 Inhibitors. *ACS Med Chem Lett*. 2016;7:460–464. DOI: 10.1021/acsmchemlett.5b00477
43. Tsalkova T, Mei FC, Li S, et al. Isoform-specific antagonists of exchange proteins directly activated by cAMP. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012 Nov 6;109(45):18613–8. DOI: 10.1073/pnas.1210209109
44. Chen H, Ding CY, Wild C, et al. Efficient Synthesis of ESI-09, A Novel Non-cyclic Nucleotide EPAC Antagonist. *Tetrahedron Lett*. 2013;54:1546–1549. DOI: 10.1016/j.tetlet.2013.01.024
45. Ye N, Zhu Y, Chen H, et al. Structure-Activity Relationship Studies of Substituted 2-(Isoxazol-3-yl)-2-oxo-N'-phenyl-acetohydrazonoyl Cyanide Analogues: Identification of Potent Exchange Proteins Directly Activated by cAMP (EPAC) Antagonists. *J Med Chem*. 2015;58(15):6033–6047. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.5b00635
46. Na Ye, Yingmin Zhu, Zhiqing Liu, Fang C. Mei, Haiying Chen, Pingyuan Wang, Xiaodong Cheng, and Jia Zhou. Identification of novel 2-(benzo[d]isoxazol-3-yl)-2-oxo-N-phenylacetohydrazonoyl cyanide analogues as potent EPAC antagonists. *Eur J Med Chem*. 2017 July 07;134:2–71. DOI: 10.1016/j.ejmech.2017.04.001
47. Courilleau D, Bissierier M, Jullian JC, et al. Identification of a tetrahydroquinoline analog as a pharmacological inhibitor of the cAMP-binding protein Epac. *J Biol Chem*. 2012;287:44192–44202. DOI: 10.1074/jbc.M112.422956
48. Courilleau D, Bouyssou P, Fischmeister R, et al. The (R)-enantiomer of CE3F4 is a preferential inhibitor of human exchange protein directly activated by cyclic AMP isoform 1 (Epac1). *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;440:443–448. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.09.107
49. Brown LM, Rogers KE, Aroonsakool N, et al. Allosteric inhibition of Epac: computational modeling and experimental validation to identify allosteric sites and inhibitors. *J Biol Chem*. 2014;289(42):29148–29157. DOI: 10.1074/jbc.M114.569319

Исследование кардиотропной активности орто-алкокси аналогов соединения АЛМ-802

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

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

Аннотация. Синтезированы новые орто-алкокси аналоги соединения АЛМ-802 — 1а (N¹-(2-метоксибензил)-N²-[2-((2-метоксибензил)амино)этил]этан-1,2-диамин тригидрохлорид) и 1б (N¹-(2-этоксibenзил)-N²-[2-((2-этоксibenзил)амино)этил]этан-1,2-диамин тригидрохлорид), отличающиеся от него наличием алкокси-групп в фенильных кольцах только в орто-положениях. Установлено, что эти структурные изменения приводят к исчезновению антиишемической активности. В то же время у соединения 1б выявлена антиаритмическая активность на моделях аконитиновой и хлоридкальциевой аритмии у крыс (1 мг/кг, внутривенно), которая отсутствовала у 1а.

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

Для цитирования:

Мокров Г. В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В., Столярчук В.Н., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А., Гудашева Т.А. Исследование кардиотропной активности орто-алкокси аналогов соединения АЛМ-802 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 4. – С. 18–23. DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-18-23

Study of ALM-802 orto-alkoxi analogues cardiotropic activity

Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, Stolyaruk VN, Tsorin IB, Vititnova MB, Kryzhanovskiy SA, Gudasheva TA

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. New ortho-alkoxy analogs of the compound ALM-802 1a (N¹-(2-methoxybenzyl)-N²-[2-((2-methoxybenzyl)amino)ethyl]ethane-1,2-diamine trihydrochloride) and 1b (N¹-(2-ethoxybenzyl)-N²-[2-((2-ethoxybenzyl)amino)ethyl]ethane-1,2-diamine trihydrochloride), which differ from it by the presence of alkoxy groups in the phenyl rings only in the ortho positions. It was established that these structural changes lead to the disappearance of anti-ischemic activity. At the same time, antiarrhythmic activity was revealed in compound 1b on the models of aconitine and calcium chloride arrhythmias in rats (1 mg / kg, intravenously), which was absent in 1a.

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

For citations:

Mokrov GV, Likhosherstov AM, Barchukov VV, Stolyaruk VN, Tsorin IB, Vititnova MB, Kryzhanovskiy SA, Gudasheva TA. Study of ALM-802 orto-alkoxi analogues cardiotropic activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;4:18–23. (In Russ). DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-18-23

Введение

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова ранее были сконструированы и синтезированы соединения ряда линейных и циклических метоксифенилтриазаалканов (А и В) [1]. В этих веществах были совмещены фармакофорные элементы известных ингибиторов окисления свободных жирных кислот триметазидина [2] и ранолазина [3], широко используемых в клинической практике для лечения ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности, помимо этого ранолазин с успехом применяется для купирования нарушений сердечного ритма [4–7]. Большинство представителей метоксифенилтриазаалканов А и В обладали кардиотропной активностью на моделях аритмии и ишемии у экспериментальных животных [1]. Наиболее активным в группе производных А и В оказалось соединение АЛМ-802 (тригидрохлорид N¹–(2,3,4-триметоксибензил)-N²–{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина) (рис.). АЛМ-802 в дозе 1 мг/кг при внутривенном введении препятствовало развитию аритмий у крыс на моделях аконитиновой и

хлоридкальциевой аритмии, увеличивало порог электрической фибрилляции желудочков сердца крыс с 2 до 10 мА. Кроме того, в дозе 1 мг/кг при внутривенном введении в условиях модели субэндокардиальной ишемии у крыс это соединение препятствовало депрессии сегмента ST на электрокардиограмме животных по сравнению с контрольной группой, демонстрируя выраженный антиишемический эффект.

Целью настоящей работы явилось продолжение изучения влияния строения метоксифенилтриазаалканов на их биологическую активность. Объектом исследования при этом явились орто-алкокси аналоги соединения АЛМ-802 (1), отличающиеся тем, что арильные фармакофоры молекул содержат только по одной алкокси-группе в орто-положениях (см. рис.).

Синтез

Синтез орто-алкокси аналогов соединения АЛМ-802 (1а, 1б) осуществлялся путём восстановительного аминирования 2-метокси- или 2-этоксibenзальдегида с

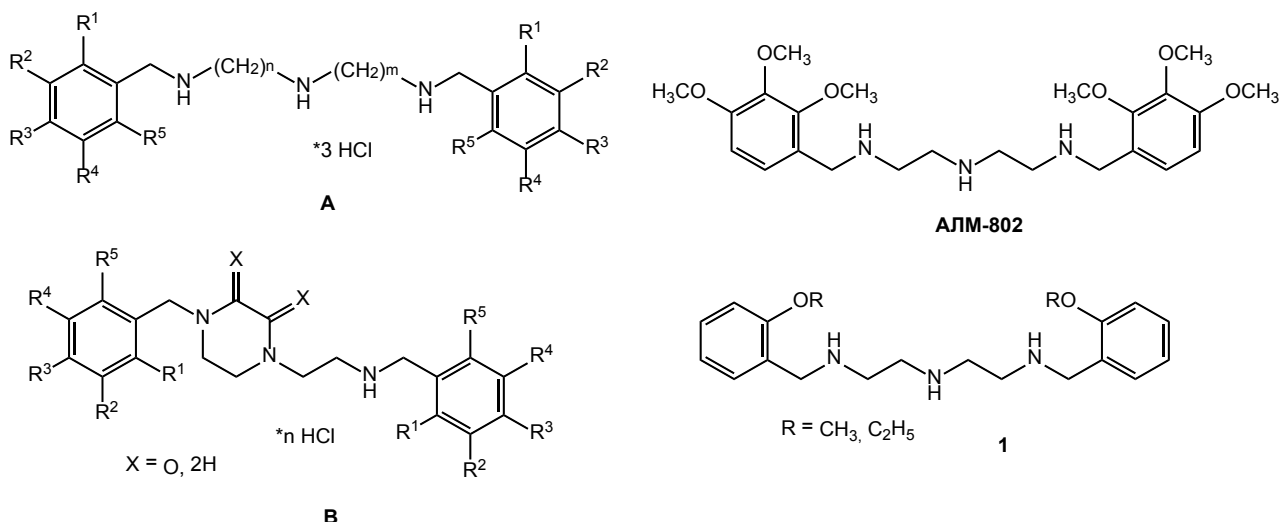


Рис. Линейные и циклические метоксифенилтриазаалканы (А и В), соединение АЛМ-802, орто-алкокси аналоги соединения АЛМ-802 (1)

диэтилен триамином в соотношении 2:1, соответственно, в этаноле. Восстановление осуществляли путём каталитического гидрирования на палладиевом катализаторе.

***N*'-(2-Метоксибензил)-*N*'-[2-((2-метоксибензил)амино)этил]этан-1,2-диамин тригидрохлорид (1а)**

Получен из 2-метоксибензальдегида. Выход 6,5 г (54 %). Т.пл. 201–203 °С (с разл.). Найдено %: С 50,89; Н 7,38; N 9,03; Cl 22,44. C₂₀H₃₂Cl₃N₃O₂ · H₂O. Вычислено %: С 51,02; Н 7,28; N 8,92; Cl 22,59. ¹H NMR (DMSO, δ, ppm, J/Hz): 3,26–3,47 (м, 8 H, ((CH₂)₂)₂N); 3,85 (с, 6 H, 2 OMe); 4,16 (с, 4 H, 2 CH₂Ar); 6,99 (т, 2 H, 2 ArH(3), J³ = 8,5); 7,10 (д, 2 H, 2 ArH(2), J³ = 8,5); 7,41 (т, 2 H, 2 ArH(4), J³ = 8,5); 7,50 (д, 2 H, 2 ArH(5), J³ = 8,5).

***N*'-(2-Этоксibenзил)-*N*'-[2-((2-этоксibenзил)амино)этил]этан-1,2-диамин тригидрохлорид (1б)**

Получен из 3-метоксибензальдегида. Выход 7,55 г (69,1 %). Т.пл. 215–218 °С (с разл.). Найдено %: С 54,56; Н 7,71; N 8,61; Cl 22,56. C₂₂H₃₆Cl₃N₃O₂. Вычислено %: С 54,95; Н 7,55; N 8,74; Cl 22,12. ¹H NMR (DMSO, δ, ppm, J/Hz): 1,39 (т, 6 H, 2 CH₃, J³ = 8,0); 3,25–3,49 (м, 8 H, ((CH₂)₂)₂N); 4,10 (кв, 4 H, 2 OCH₂, J³ = 8,0); 4,15 (с, 4 H, 2 CH₂Ar); 6,97 (т, 2 H, 2 ArH(3), J³ = 8,5); 7,08 (д, 2 H, 2 ArH(2), J³ = 8,5); 7,39 (т, 2 H, 2 ArH(4), J³ = 8,5); 7,52 (д, 2 H, 2 ArH(5), J³ = 8,5).

Материалы и методы

Животные

В экспериментах по оценке острой токсичности соединений использовали беспородных мышей-самцов с массой тела 21–24 г. В экспериментах по оценке антиишемической и антиаритмической активности соединений использовали белых беспородных крыс-самцов массой 160–420 г. Все животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животных содержали в соответствии с приказом Минз-

драва России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Определение LD₅₀

Значения LD₅₀ соединений определяли на беспородных мышцах-самцах. Вещества вводили внутривенно в пяти различных дозах, число животных в каждой серии 6. В качестве растворителя использовали апиогенную воду для инъекций. Летальность животных оценивали через 24 ч после введения соединений. Значения LD₁₆, LD₅₀ и LD₈₄ с их доверительными 95 % интервалами рассчитывали по методу Литчфилда–Вилкоксона.

Модель субэндокардиальной ишемии у крыс, вызываемой изопроterenолом

Антиишемическую активность соединений изучали на белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, наркотизированных уретаном (1 300 мг/кг, в/б). Острую субэндокардиальную ишемию миокарда вызывали по методу Yamamoto S. с соавт. [8]. Для этой цели животным с помощью инъектора «Линеомат» (Россия) внутривенно со скоростью 20 мкг/кг/мин вводили неселективный агонист β-адренорецепторов изопроterenол. Об интенсивности ишемического повреждения судили по величине депрессии сегмента ST на ЭКГ (II стандартное отведение) через 5 мин от момента начала инфузии изопроterenолом. В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Полиспектр 8/EX» (Нейрософт, Россия).

Животных рандомизировали на четыре группы: 1-я — контроль ($n = 16$); 2-я — соединение АЛМ-802 ($n = 7$); 3-я — соединение **1a** ($n = 7$); 4-я — соединение **1b** ($n = 9$). Изучаемые вещества вводили внутривенно в дозе 1 мг/кг за 2 мин до начала инфузии изопроterenола. Животным контрольной группы вводили эквивалентный объём изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида.

Модель аконитиновой аритмии [9, 10]

Опыты проводили на беспородных наркотизированных (уретан 1 300 мг/кг, в/б) крысах-самцах массой 160—180 г. Животных переводили на искусственное дыхание. Регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении. В качестве регистратора использовали Mingograf-82 фирмы Elema-Siemens (Швеция). Визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента производили при помощи 8-канального осциллографа фирмы Nihon Konden (Япония). Число животных в группах указано в табл. 2. В контрольной серии экспериментов определяли минимальную дозу аконитина, вызывающую фатальные нарушения ритма сердца в первые 5 мин от момента его внутривенного введения. Животным опытных групп за 2 мин до инъекции аконитина вводили исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в). В каждой опытной группе оценивали число погибших животных в первые 5 мин после введения аконитина.

Модель хлоридкальцевой аритмии [9, 10]

Опыты проводили на беспородных наркотизированных (уретан 1 300 мг/кг, в/б) крысах-самцах массой тела 250—300 г. Животных переводили на искусственное дыхание. Регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении. В качестве регистратора использовали Mingograf-82 фирмы Elema-Siemens (Швеция). Визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента производили при помощи 8-канального осциллографа фирмы Nihon Konden (Япония). Число животных в группах указано в табл. 2. В контрольной серии экспериментов определяли минимальную дозу кальция хлорида, вызывающую фатальные нарушения ритма сердца в первые 5 мин от момента его внутривенного введения. Животным опытных групп за 2 мин до инъекции кальция хлорида вводили исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в). В каждой опытной группе оценивали число погибших животных в первые 5 мин после введения кальция хлорида.

Модель электрической фибрилляции желудочков сердца [9]

Опыты проводили на анестезированных (уретан, 1 300 мг/кг, в/б) беспородных крысах-самцах массой тела 380—420 г. Животных переводили на искусственное дыхание; производили стернэктомию и перикардотомию. В миокард левого желудочка сердца на расстоянии 3—5 мм друг от друга имплантировали два позолоченных электрода. Порог электрической фибрилляции сердца определяли сканированием уязвимого периода серий из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока уве-

личивающейся интенсивности (длительность импульса 4 мс, частота 50 имп/с) до возникновения фибрилляции желудочков. За порог фибрилляции принимали минимальную силу тока, стабильно вызывающую фибрилляцию желудочков при повторной стимуляции. В опыт отбирали только тех животных, у которых фибрилляция желудочков наступала при силе тока не более 6 мА.

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

Статистическая обработка

При анализе данных, полученных при исследовании антиишемической активности соединений, нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро—Уилка; гомогенность выборочных дисперсий проверяли по Левену. Так как распределение данных было близко к нормальному, выборочные дисперсии были гомогенны, статистическую значимость различий между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой по критерию Стьюдента с поправкой Бонферрони. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$, критерий двухсторонний. Полученные результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. При анализе антиаритмической активности статистическую значимость различий между экспериментальными выборками определяли с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений, а при анализе антифибрилляторной активности — с использованием знаково-рангового критерия Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

Исследование острой токсичности новых соединений показало, что в то время как значение LD_{50} для соединения **1a** составило 116,6 мг/кг, что практически совпадает с данным показателем для АЛМ-802 (118,8 мг/кг), то для соединения **1b** LD_{50} составило 50,1 мг/кг (табл. 1).

Таким образом, удаление мета- и пара-метокси групп из соединения АЛМ-802 не приводило к изменению токсичности, однако увеличение орто-алкоксизаместителя на одно метиленовое звено сразу увеличивало значение показателя LD_{50} более чем в два раза.

Таблица 1

Острая токсичность соединений **1a** и **1b** сравнении с АЛМ-802 (беспородные мыши-самцы, внутрибрюшинное введение)

Соединения	LD ₁₆ мг/кг, в/б	LD ₅₀ мг/кг, в/б	LD ₈₄ мг/кг, в/б
АЛМ-802	98,6 (98,2÷99,0)	118,8 (103,0÷121,4)	126,9 (126,4÷127,4)
1a	82,7 (78,8÷86,8)	116,6 (93,2÷145,8)	164,3 (156,5÷170,5)
1b	33,1 (31,0÷35,4)	50,1 (39,7÷63,4)	75,9 (71,1÷81,0)

Таблица 2

Антиишемическая и антиаритмическая активность соединений **1a** и **1b** в сравнении с АЛМ802 в дозе 1 мг/кг у беспородных белых крыс-самцов (внутривенное введение)

Соединение	Депрессия сегмента ST после 5 мин инфузии изопроterenоло*, мВ	Антиаритмическая активность на модели аконитиновой аритмии**	Антиаритмическая активность на модели хлоридкальциевой аритмии**	Влияние на порог электрической фибрилляции желудочков сердца***
Контроль	0,20±0,02 (n = 16)	0/11	0/11	—
АЛМ-802	0,01±0,01 (n = 7) p = 0,001	8/8 p < 0,001	4/6 p = 0,008	2/>10 p = 0,018
1a	0,16±0,03 (n = 7)	0/6	0/6	1/5 (n = 6) p = 0,062
1b	0,13±0,05 (n = 9)	6/6 p = 0,001	3/6 p = 0,036	1/1 (n = 6)

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

Исходя из данных по токсичности, для изучения кардиотропной активности соединений АЛМ-802, **1a** и **1b** была выбрана одинаковая доза 1 мг/кг, именно в этой дозе АЛМ-802 было эффективно в ранее проведенных исследованиях.

При исследовании антиишемического действия соединений **1a** и **1b** на модели субэндокардиальной ишемии у крыс, вызываемой изопроterenолом, значимого эффекта выявлено не было, в то время как вещество АЛМ-802 обладало на данной модели выраженным противоишемическим действием ($p = 0,001$; табл. 2).

При исследовании антиаритмической активности было установлено, что на модели аконитиновой аритмии соединение **1a** не обладало антиаритмическим эффектом (см. табл. 2), в тоже время этокси-производное **1b** и вещество АЛМ-802 полностью препятствовали развитию нарушений сердечного ритма. Сходные результаты были получены на модели хлоридкальциевой аритмии: соединение **1a** не обладало антиаритмической активностью, в то время как **1b** и АЛМ-802 обладали статистически значимым эффектом (табл. 2). На модели электрической фибрилляции желудочков сердца вещество АЛМ-802 статистически значимо ($p = 0,018$) увеличивало порог фибрилляции желудочков с 2 до ≥ 10 мА. Соединение **1a** также увеличивало этот показатель с 1 до 5 мА, однако эти изменения были статистически незначимыми ($p = 0,062$). Производное **1b** в данной модели оказалось неэффективным.

Анализ влияния представленных в работе структурных изменений соединения АЛМ-802 позволяет сделать

следующие выводы. Если при удалении из молекулы АЛМ-802 лишь одной пара-метокси группы антиишемическое действие соответствующего соединения сохраняется на уровне тенденции [1], то при наличии лишь одной пары орто-метокси групп в арильных фармакофорах эта активность полностью исчезает. У этокси-соединения **1b** антиишемического эффекта также не наблюдается. Эти данные подтверждают тот факт, что для наличия антиишемической активности в группе метоксифенилтриазаалканов требуется наличие именно трёх метокси-групп в орто-, мета- и пара-положениях арильных фармакофоров.

Практически полное отсутствие антиаритмической активности соединения **1a**, и её наличие в моделях аконитиновой аритмии и хлоридкальциевой аритмии у соединения **1b** может свидетельствовать о реализации отличного от АЛМ-802 механизма действия этокси-производного. Частично это подтверждает и существенное изменение острой токсичности соединения **1b** в сравнении с **1a** и АЛМ-802.

Таким образом, в работе были синтезированы новые орто-алкокси аналоги соединения АЛМ-802 **1a** и **1b**, отличающиеся от него наличием алкокси-групп в фенильных кольцах только в орто-положениях. Установлено, что эти структурные изменения приводит к исчезновению антиишемической активности. В то же время у соединения **1b** выявлена антиаритмическая активность на моделях аконитиновой и хлоридкальциевой аритмии у крыс (1 мг/кг, внутривенно), которая отсутствовала у **1a**.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

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

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

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

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

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

Вититнова Марина Борисовна
 ORCID ID: 0000-0002-7407-7516
 SPIN-код: 1901-8919
 к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Крыжановский Сергей Александрович
 ORCID ID: 0000-0003-2832-4739
 SPIN-код: 6596-4865
 д. м. н., заведующий лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

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

Likhosherstov Arkady
 ORCID ID: 0000-0001-5935-5146
 SPIN code: 1980-7331
 Candidate of Chemical Sciences, Consultant of drug chemistry department. FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

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

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

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

Vititnova Marina
 ORCID ID: 0000-0002-7407-7516
 SPIN code: 1901-8919
 Candidate of Biological Sciences, Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Kryzhanovskii Sergey
 ORCID ID: 0000-0003-2832-4739
 SPIN code: 6596-4865
 Doctor of Medical Sciences, Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Гудашева Татьяна Александровна

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN-код: 4970-0006

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

Gudasheva Tatiana

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN code: 4970-0006

Doctor of Biological Sciences, professor, RAS cor-
responding member, Head of medicinal chemistry
department FSBI «Zakusov institute of Pharmacol-
ogy», Moscow

Литература / References

1. Мокров Г.В., Лихошерстов А.М., Барчуков В.В. и др. Синтез и кардиотропная активность линейных метоксифенилтриазаалканов // *Хим.-фарм. журн.* — 2019. — Т. 53. — № 6. — 16–23. [Mokrov GV, Likhoshesterov AM, Barchukov VV, et al. Synthesis and cardiotropic activity of linear methoxyphenyltriazalkanes. *Khim.-Pharm. Journal.* 2019;53(6): 16–23. (In Russ).] DOI: 10.30906/0023-1134-2019-53-6-16-23
2. Kantor PF, Lucien A, Kozak R, Lopaschuk GD. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res.* 2000;86(5):580–588. DOI: 10.1161/01.RES.86.5.580
3. Aldakkak M, Camara AK, Heisner JS, et al. Ranolazine reduces Ca^{2+} overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res.* 2011;64(4):381–392. DOI: 10.1016/j.phrs.2011.06.018
4. Fragasso G, Salerno A, Spoladore R, et al. Effects of metabolic approach in diabetic patients with coronary artery disease. *Curr. Pharm. Des.* 2009;15(8):857–862. DOI: 10.2174/138161209787582093
5. Hu B, Li W, Xu T, et al. Evaluation of trimetazidine in angina pectoris by echocardiography and radionuclide angiography: a meta-analysis of randomized, controlled trials. *Clin. Cardiol.* 2011;34(6):395–400. DOI: 10.1002/clc.20888
6. Zhang L, Lu Y, Jiang H, et al. Additional use of trimetazidine in patients with chronic heart failure: a meta-analysis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2012;59(10):913–922. DOI: 10.1016/j.jacc.2011.11.027
7. Vizzardi E, D'Aloia A, Quinzani F, et al. A focus on antiarrhythmic properties of ranolazine. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2012;17(4):353–356. DOI: 10.1177/1074248412442000
8. Yamamoto S, Matsui K, Sasabe M, Ohashi N. Effect of an orally active Na^+/H^+ exchange inhibitor, SMP-300, on experimental angina and myocardial infarction models in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002;39(2):234–241. DOI: 10.1097/00005344-200202000-00010
9. Миронов А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств*, часть 1, Гриф и К., — М.: 2013; сс. 385–416 [Mironov AN. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv*, part 1. Grif i K. Moscow: 2013. (In Russ).]
10. Илюшкина И.А., Берчатова А.Н., Дьяченко И.А., и др. Модели оценки новых противоаритмических препаратов // *Биомедицина.* — 2012. — № 2. — С. 6–13. [Ilushkina IA, Berchatova AN, Dyachenko IA, et al. Model evaluation of new antiarrhythmic drugs. *Biomedicina.* 2012;(2); 6–13. (In Russ).]

Антидепрессивные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в тесте Порсолта при внутрибрюшинном субхроническом и хроническом введении мышам

Таллерова А. В., Поварнина П. Ю., Минаев С. В., Гудашева Т. А., Середенин С. Б.

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

Аннотация. Изучено влияние димерного дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора гексаметилендиамида бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) (ГСБ-106) на мышей Balb/c в тесте вынужденного плавания по Порсолту при субхроническом и хроническом внутрибрюшинном введении в дозе 1 мг/кг. Установлено, что ГСБ-106 статистически значимо уменьшал время иммобилизации мышей в 1,2 раза при 4-дневном, в 1,3 раза – при 14-дневном и в 1,2 раза – при 21-дневном введении. Таким образом, зависимость эффекта ГСБ-106 от времени введения в тесте Порсолта не установлена.

Ключевые слова: BDNF; низкомолекулярный миметик; ГСБ-106; антидепрессивная активность; тест вынужденного плавания

Для цитирования:

Таллерова А.В., Поварнина П.Ю., Минаев С.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Антидепрессивные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в тесте Порсолта при внутрибрюшинном субхроническом и хроническом введении мышам // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 4. – С. 24–27. DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-24-27

Antidepressant-like activity of the dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 in Porsolt test after intraperitoneal sub-chronically and chronically treatment in mice

Tallerova AV, Povarnina PY, Minaev SV, Gudasheva TA, Seredenin SB

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The present work was to study the GSB-106 effect on the immobility behavior of mice Balb/c in the Porsolt test. GSB-106 was administered sub-chronically and chronically intraperitoneal in dose 1 mg/kg. GSB-106 administration significantly decreased immobility time in mice by 1.2 times after 4 days, by 1.3 times after 14 days and 1.2 times after 21 days' injections. Thus, the dependence of the GSB-106 effect-time administration in the Porsolt test was not established.

Keywords: BDNF; low-molecular weight mimetic; GSB-106; antidepressant activity; forced swimming test

For citations:

Tallerova AV, Povarnina PY, Minaev SV, Gudasheva TA, Seredenin SB. Antidepressant-like activity of the dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 in Porsolt test after intraperitoneal sub-chronically and chronically treatment in mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;4:24–27. (In Russ). DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-24-27

Введение

В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова в качестве перспективного антидепрессанта разрабатывается димерный дипептид ГСБ-106, миметик бета-изгиба 4-й петли мозгового нейротрофического фактора (BDNF), представляющий собой гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) [1, 2]. Методом Вестерн-блот-анализа с использованием моноклональных антител к фосфорилированной форме TrkB установлено, что ГСБ-106 активирует специфические для нейротрофина TrkB рецепторы и их пострецепторные сигнальные пути MAPK/ERK и PI3K/AKT [3, 4].

Известно, что BDNF-зависимая активация MAPK/ERK и PI3K/AKT каскадов является ключевым фактором регуляции выживания и развития нейронов, а также процессов синапто- и нейрогенеза, которые лежат в основе механизмов антидепрессивного действия клинически эффективных препаратов [5, 6]. Изучение влияния ГСБ-106 на нейрогенез установило, что дипептид стимулирует

пролиферативную активность в зубчатой извилине гиппокампа на модели стресса у мышей, вызванного контактом с хищником [7]. Введение ГСБ-106 животным в течение 21 дня способствовало достоверному увеличению содержания белка синаптофизина в гиппокампе мышей, что свидетельствует об усилении синаптогенеза [8]. В исследованиях *in vitro* и *in vivo* выявлены выраженные нейротрофические свойства ГСБ-106, подтверждающие функциональное подобие димерного дипептида нейротрофину BDNF [9, 10].

Антидепрессивная активность ГСБ-106 была установлена в тесте вынужденного плавания по Порсолту у мышей линии Balb/c при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг [11]. Этот эффект ГСБ-106 проявлялся и при его субхроническом введении беспородным мышам в течение 4–5 дней в тесте вынужденного плавания в тех же дозах и в тесте подвешивания мышей за хвост в дозах 1,0 и 1,5 мг/кг [12]. Антидепрессивные свойства ГСБ-106 сохранялись и при пероральном введении в тесте вынужденного плавания по Порсолту

в интервале доз 0,5–5,0 мг/кг для фармацевтической субстанции и 0,01–5,0 мг/кг для лекарственной формы у крыс [13, 14].

В настоящей работе изучены эффекты ГСБ-106 в тесте вынужденного плавания по Порсолту в зависимости от длительности курсового введения.

Материал и методы

Эксперименты выполнены на 80 мышах-самцах линии Balb/c массой 18–20 г, полученных из Филиала "Столбовая" Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства", (Московская обл.). Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 от 29 августа 2014 г. №51. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 01 апреля 2016 г. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол №2 от 20 февраля 2017 г.).

Тесты выполнены на установке, представляющей собой сосуды цилиндрической формы. Сосуд заполняли на 65 % водой (22–25 °C). В день эксперимента животных помещали в сосуд с водой и за 5 мин теста оценивали время пассивного плавания (иммобильность) в воде. Уменьшение длительности пассивного плавания мышцей расценивали как свидетельство антидепрессивной активности [15].

Субстанцию ГСБ-106 растворяли в дистиллированной воде и вводили мышам в/б в дозе 1,0 мг/кг, выбранной на основании ранее проведенных исследований [11, 12], в течение 4, 14 и 21 дня, последнее введение было за 30 мин до тестирования. Контрольные животные получали в том же режиме дистиллированную воду.

Результаты и обсуждение

Установлено, что при субхроническом и хроническом введении ГСБ-106 в дозе 1,0 мг/кг выраженно корректировал поведение животных в тесте вынужденного плавания, статистически значимо уменьшая время иммобильности по сравнению с контрольной группой: в 1,2 раза при 4-дневном введении ($172,7 \pm 11,4$ с против $205,0 \pm 9,1$ с, $p \leq 0,05$), в 1,3 раза при 14-дневном введении ($153,3 \pm 8,2$ с против $204,2 \pm 13,6$ с, $p \leq 0,05$) и в 1,2 раза при 21-дневном введении ($179,2 \pm 7,9$ с против $217,6 \pm 11,7$ с, $p \leq 0,05$) (табл. 1).

Ранее было установлено, что однократное в/б введение ГСБ-106 в дозе 1,0 мг/кг мышам самцам линии Balb/c снижало время иммобилизации животных в 1,2 раза [11, 12]. Таким образом, можно заключить что в тесте вынужденного плавания по Порсолту выраженность антидепрессивного эффекта ГСБ-106 составляет в среднем 20 % и не изменяется при различных режимах введения (1, 4, 14, 21 день).

В литературе подобная картина описана для ряда антидепрессантов, в частности, amitriptilina. В работе японских авторов установлено, что введение amitriptilina в дозе 10 мг/кг способствовало статистически значимому уменьшению времени иммобильности в тесте вынужденного плавания у крыс, при этом выраженность эффекта сопоставима как при однократном, так и при хроническом введении в течение 15 дней [16]. Известно, что amitriptilin, наряду с ингибированием обратного нейронального захвата медиаторных моноаминов, является агонистом TrkB рецепторов [17], подобно исследуемому дипептиду ГСБ-106 [1]. Авторами установлено, что однократное введение amitriptilina в дозе 15 мг/кг способствует активации тирозинкиназных рецепторов в мозге мышцей, в частности TrkB, а также синхронному увеличению уровней фосфорилированных киназ Akt и ERK, свидетельствующих об активации пострецепторных путей [17].

Таблица 1

Влияние димерного дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 на поведение мышей Balb/c в тесте вынужденного плавания по Порсолту при разных режимах введения

В/б введения ГСБ-106, 1 раз в сутки	Продолжительность введения, дни		
	4	14	21
	Время иммобильности, с		
Контроль — дистиллированная вода	$205,0 \pm 9,1$	$204,2 \pm 13,6$	$217,6 \pm 11,7$
1,0 мг/кг ГСБ-106	$172,7 \pm 11,4$ *	$153,3 \pm 8,2$ **	$179,2 \pm 7,9$ *
Снижение времени иммобилизации по сравнению с контролем (во сколько раз)	1,2	1,3	1,2
Примечания: Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего; * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой по непарному <i>t</i> -критерию Стьюдента			

Таким образом, в настоящем исследовании показано, что антидепрессивные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в тесте вынужденного плавания не различаются при изученных режимах введения. Окончательное заключение об изменении эффекта ГСБ-106 при длительном введении требует дополнительных исследований с расширением батареи тестов оценки антидепрессивных свойств.

Работа выполнена в рамках гранта Президиума РАН «Изучение роли синаптогенеза и нейрогенеза в механизме антидепрессивной активности мозгового нейротрофического фактора с использованием его дипептидных миметиков — первых в классе потенциальных антидепрессантов».

Таллерова Анна Вадимовна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: antatatall@gmail.com

ORCID ID: 0000-003-0845-9003

SPIN-код: 2826-2687

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

Tallerova Anna

Corresponding author

e-mail: antatatall@gmail.com

ORCID ID: 0000-003-0845-9003

SPIN code: 2826-2687

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, the laboratory of peptide bioregulators FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Поварнина Полина Юрьевна

ORCID ID: 0000-0003-3278-8915

SPIN-код: 5498-6724

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

Povarnina Polina

ORCID ID: 0000-0003-3278-8915

SPIN code: 5498-6724

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Peptide Bioregulators, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Минаев Сергей Викторович

к. фарм. н., руководитель опытно-технологического отдела ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Minaev Sergey

Candidate of Pharmaceutical Sciences, Head of the experimental and technological Department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Гудашева Татьяна Александровна

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN-код: 4970-0006

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

Gudasheva Tatiana

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN code: 4970-0006

Doctor of Biological Sciences, professor, RAS corresponding member, Head of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Середенин Сергей Борисович

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN-код: 3896-4655

д. м. н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Seredenin Sergey

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN code: 3896-4655

Doctor of Medical Sciences, professor, academician of RAS, Head of the laboratory of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Патент РФ на изобретение №2410392/16.02.2009. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF. [Patent RUS №2410392/16.02.2009. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. (In Russ.)] Доступно по: <http://allpatents.ru/patent/2410392.html>. Ссылка активна на 17.12.2019.
2. Seredenin SB, Gudasheva TA. Dipeptide mimetics of NGF and BDNF neurotrophins. United States patent US 9683014B2. 2017 Jun 20.
3. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик 4-й петли мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 активирует TrkB, Erk, Akt и способствует выживаемости нейронов *in vitro* // Доклады академии наук. — 2013. — Т. 451. — № 5. — С. 577–580. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. Brain-derived neurotrophic factor loop 4 dipeptide mimetic GSB-106 activates TrkB, Erk, and Akt and promotes neuronal survival *in vitro*. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2013;451(1):212–214. (In Russ.)] DOI: 10.7868/S0869565213240250
4. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Анализ зависимости антидепрессивного действия лигандов рецепторов TrkB от активации MAP-киназного пути // Доклады академии наук. — 2015. — Т. 460. — № 3. — С. 346–348. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Povarnina PY, Antipova TA, Seredenin SB. Analysis of dependence of antidepressant properties of TrkB receptor ligands on MAP-kinase pathway activation. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2015;460(1):20–22. (In Russ.)] DOI: 10.7868/S0869565215030251
5. Björkholm C, Monteggia LM. BDNF — A key transducer of antidepressant effects. *Neuropharmacology*. 2016;(102): 2–79. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.10.034
6. Castrén E, Kojima M. Brain-derived neurotrophic factor in mood disorders and antidepressant treatments. *Neurobiol Dis*. 2017;(97):119–126. DOI: 10.1016/j.nbd.2016.07.010
7. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора предотвращает нарушение нейрогенеза у стрессированных мышей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2016. — Т. 162. — № 10. — С. 448–451. [Gudasheva TA, Povarnina PY, Seredenin SB. Dipeptide mimetic of the brain-derived neurotrophic factor prevents impairments of neurogenesis in stressed mice. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2017;162(4): 454–457. (In Eng.)] DOI: 10.1007/s10517-017-3638-9
8. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик BDNF ГСБ-106 с антидепрессивной активностью стимулирует синаптогенез // Доклады академии наук. — 2018. (в печати). [Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, Seredenin SB. Dipeptide mimetic of the BDNF GSB-106 with antidepressant-like activity stimulates synaptogenesis. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2018 (in press). (In Russ.)]
9. Логвинов И.О., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. и др. Нейропротективные свойства дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в экспериментах *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2013. — Т. 155. — № 3. — С. 319–322. [Logvinov IO, Antipova TA, Gudasheva TA, et al. Neuroprotective effects of dipeptide analogue of brain-derived neurotrophic factor GSB-106 *in vitro* experiments. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2013;155(3):343–345. (In Eng.)] DOI: 10.1007/s10517-013-2149-6
10. Gudasheva TA, Povarnina P, Logvinov IO, et al. Mimetics of brain-derived neurotrophic factor loops 1 and 4 are active in a model of ischemic stroke in rats. *Drug Des Devel Ther*. 2016;(10):3545–3553. DOI: 10.2147/DDDT.S118768
11. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В. и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора // Биоорганическая химия. — 2012. — Т. 38. — № 3. — С. 280–290. [Gudasheva TA, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of the brain-derived neurotrophic factor. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012;38(3):243–252. (In Eng.)] DOI: 10.1134/S1068162012030053
12. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., и др. Антидепрессивный эффект оригинального низкомолекулярного миметика BDNF, димерного дипептида ГСБ-106 // Acta Naturae. — 2013. — Т. 5. — № 4(19). — С. 116–120. [Seredenin SB, Voronina TA, Gudasheva TA, et al. Antidepressant effect of dimeric dipeptide GSB-106, an original low-molecular-weight mimetic of BDNF. *Acta Naturae*. 2013;5(4):105–109. (In Eng.)]
13. Поварнина П.Ю., Гарибова Т.Л., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении // Acta Naturae. — 2018. (в печати). [Povarnina PY, Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. Antidepressant activity of dipeptide mimetic of the BDNF GSB-106 by oral administration. *Acta Naturae*. 2018 (in press). (In Russ.)]
14. Таллерова А.В., Поварнина П.Ю., Бlynская Е.В. и др. Антидепрессивный эффект дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 воспроизводится в лекарственной форме для перорального применения // Химико-фармацевтический журнал. — 2018. — Т. 52. — № 5. — С. 15–17. [Tallerova AV, Povarnina PY, Blynskaya EV, et al. Antidepressant effect of dipeptide mimetic of brain derived neurotrophic factor (GSB-106) reproduced in medicinal dosage form for oral administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(5):15–17. (In Russ.)] DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-5-15-17
15. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioral despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatment. *Eur J Pharmacol*. 1978;47(4):379–391.
16. Kawashima K, Araki H, Aihara H. Effect of chronic administration of antidepressants on duration of immobility in rats forced to swim. *Japan J. Pharmacol*. 1986;6:199–204.
17. Sung-Wuk Jang, Xia Liu, Chi-Bun Chan, et al. The Antidepressant Amitriptyline is a TrkA and TrkB Receptor agonist that promotes TrkA/TrkB Heterodimerization and has potent neurotrophic activity. *Chem Biol*. 2009; 26:16:644–656.

Разработка и валидация методики количественного определения соединений ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс с использованием метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием

Подолько А. Л., Бочков П. О., Колыванов Г. Б., Литвин А. А., Грибакина О. Г., Шевченко Р. В., Жердев В. П.

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

Аннотация. Разработана методика количественного определения соединений ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс. Анализ проводили с использованием совмещённого метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Методика линейна в диапазоне концентраций 25–1000 нг/мл для обоих соединений. Процент извлечения ГЗК-111 из плазмы крови составил 57,8 %. Нижний предел обнаружения для соединения ГЗК-111 составил 25 нг/мл. Процент извлечения соединения ЦПГ составил 42,5 %. Нижний предел обнаружения соединения ЦПГ также составил 25 нг/мл.

Ключевые слова: ГЗК-111; ЦПГ; количественное определение; высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия; плазма крови

Для цитирования:

Подолько А.Л., Бочков П.О., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Грибакина О.Г., Шевченко Р.В., Жердев В.П. Разработка и валидация методики количественного определения соединений ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс с использованием метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 4. – С. 28–36. DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-28-36

HPLC-MS method development and validation for simultaneous quantitation of GZK-111 and CPG compounds in rat plasma

Podolko AL, Bochkov PO, Kolyvanov GB, Litvin AA, Gribakina OG, Shevchenko RV, Zherdev VP
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The technique of quantitative determination of GZK-111 and CPG compounds in rat blood plasma has been developed. The analysis was carried out using the combined method of high-performance liquid chromatography with mass spectrometric detection. The method was linear in the concentration range of 25–1000 ng/ml for both compounds. Percentage of GZK-111 extraction from rat blood plasma was 57.8 %. The lower limit of detection for GZK-111 compound was 25 ng/ml. Percentage of extraction of CPG compound was 42.5 %. The lower limit of detection of CPG compound was also 25 ng/ml.

Keywords: GZK-111; CPG; quantitative determination; high-performance liquid chromatography-mass-spectrometry; blood plasma

For citations:

Podolko AL, Bochkov PO, Kolyvanov GB, Litvin AA, Gribakina OG, Shevchenko RV, Zherdev VP. HPLC-MS method development and validation for simultaneous quantitation of GZK-111 and CPG compounds in rat plasma. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;4:28–36. (In Russ). DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-28-36

Введение

Большое внимание медиков и фармакологов уделено проблеме нарушения когнитивных функций. Это связано с тем, что с увеличением продолжительности жизни вопрос сохранения интеллектуальных способностей становится актуальным. К причинам когнитивных расстройств относятся такие факторы, как нейродегенеративные и сосудистые заболевания головного мозга, нейроинфекции и другие патологии. Крайним проявлением тяжёлых когнитивных нарушений является деменция, которая приводит к развитию зависимости от окружающих, что особенно часто наблюдается у людей пожилого и старческого возраста, а также вызывает дополнительные трудности при диагностике и лечении сопутствующих заболеваний. Деменция наблюдается почти у 50 млн людей в мире. Ежегодно регистрируется около 10 млн новых случаев этого заболевания. По прогнозам специалистов, общее число людей с деменцией к 2050 г. достигнет 152 млн человек [1]. Поэтому поиск новых препаратов, эффективных

в терапии когнитивных нарушений, является важной задачей современной фармакологии.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезирован этиловый эфир N-фенилацетилглицил-L-пролина (ГЗК-111) [2]. Данное соединение предположительно является пролекарством и метаболизируется в организме в нейропептид цикло-L-пролилглицин (ЦПГ), обладающий следующими видами активности: ноотропной [3], нейропротекторной [4], антигипоксической [5] и анксиолитической [6].

Целью настоящего исследования является разработка и валидация методики количественного определения соединений ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови крыс для последующего изучения экспериментальной фармакокинетики.

Материалы и методы

Фармацевтическая субстанция ГЗК-111 (этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина) (рис. 1). Про-

изводитель: ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (г. Москва, РФ). Номер серии – 435.

Фармацевтическая субстанция цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) (рис. 2). Производитель: ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (г. Москва, РФ). Серия – КЗ-36.

Использованы следующие растворители и реактивы:

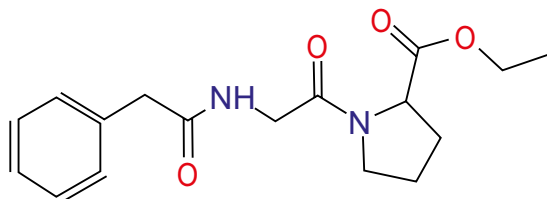


Рис. 1. Структурная формула ГЗК-111

вода ультрачистая «Panreac», «Applichem», ФРГ; аммония ацетат «Merck», ФРГ; кислота муравьиная 85 % «Acros Organics», РФ; ацетонитрил «J.T. Baker», США.

Исследование выполнено с использованием совмещённой системы высокоэффективного жидкостного хроматографа «Agilent 1200» («Agilent», США), с масс-селективным детектором типа ионная ловушка модели «Agilent 6310 Series LC/MSD Ion Trap» («Agilent», США). В составе оборудования дегазатор

Таблица 1

Условия хроматографического анализа соединений ГЗК-111 и ЦПГ в плазме крови

Параметр	Значение		
Колонка	UCT Selectra ETG (150×4,6мм; 5мкм)		
Температура	30 °С		
Режим элюирования	Градиентный		
Состав подвижной фазы	Представлен в табл. 2		
Скорость потока	0,8 мл/мин		
Режим ионизации	Режим положительной ионизации молекул на электроспрее		
Давление газа-распылителя	40 psi		
Скорость осушающего газа	8 л/мин		
Температура осушающего газа	350 °С		
Тип детектирования	Соединение	Родительский ион	Дочерний ион
	ГЗК-111	319	144
	ЦПГ	155	-
Объём, вводимой пробы	15 мкл		
Время удерживания	Соединение	Время удерживания	
	ЦПГ	2,9 мин	
	ГЗК-111	7,1 мин	
Время анализа	10,5 мин		

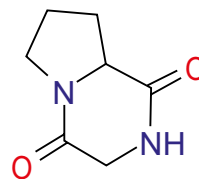


Рис. 2. Структурная формула ЦПГ

подвижной фазы, бинарный насос, система автоматического ввода пробы, термостат хроматографических колонок. Ионизацию молекул соединений ГЗК-111 и ЦПГ проводили в режиме положительной ионизации молекул на электроспрее при атмосферном давлении. Управление совмещённой системой ВЭЖХ-МС осуществлялось компьютером с системой обработки данных «ChemStation» (v.1.0).

Условия хроматографического анализа соединений ГЗК-111 и ЦПГ представлены в табл. 1.

Рабочую подвижную фазу, используемую для градиентного элюирования целевых компонентов, получали смешиванием растворов А и Б бинарным насосом хроматографа по следующей программе, представленной в табл. 2.

Таблица 2

Соотношение компонентов А и Б подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Время, мин	Раствор А, %	Раствор Б, %
0,0	85	15
2,7	85	15
3,5	20	80
5,0	20	80
6,0	85	15
10,5	85	15

В настоящей методике матрицей для приготовления калибровочных стандартов служила плазма крови крыс с массой тела 180–220 г, полученных из питомника Филиал «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», (Московская обл.). Образцы крови получали методом декапитации интактных животных. Плазму крови получали центрифугированием образцов цельной крови при 3 500 об/мин в течение 10 мин. Образцы плазмы крови крыс хранили при –50 °С.

Пробоподготовка

Совместное извлечение целевых соединений ГЗК-111 и ЦПГ из образцов плазмы крови крыс проводили методом осаждения белков с последующей экстракцией белкового осадка ацетонитрилом. К образцам плазмы крови объёмом 250 мкл

добавляли 1 250 мкл ацетонитрилом, тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex, после чего центрифугировали в течение 15 мин при скорости 6 000 об/мин. Надосадочную жидкость переносили в пробирки конические. К осадку добавляли 500 мкл ацетонитрила, помещали на орбитальный встряхиватель и проводили процедуру повторной экстракции в течение 20 мин. Органический слой отделяли, полученные экстракты совмещали и упаривали на водяной бане в токе воздуха при нагревании до 60 °С. Полученный сухой остаток растворяли в 250 мкл подвижной хроматографической фазы (соотношение компонентов А:Б = 40:60), фильтровали, после чего переносили в хроматографические флаконы, оснащённые коническими пластиковыми вставками (внутренним объёмом 250 мкл). Полученные растворы помещали на устройство автоматического ввода хроматографа.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора)

Матричные растворы соединений ГЗК-111 и ЦПГ с концентрацией 100 мкг/мл готовили растворением в воде точной навески (0,0100 г) соединений в мерной колбе вместимостью 100 мл.

Приготовление калибровочных стандартов

В работе использовали следующие калибровочные стандарты с равными концентрациями соединений

ГЗК-111 и ЦПГ в растворе: 25, 50, 75, 100, 125, 250, 500, 750 и 1 000 нг/мл.

Калибровочные стандарты для валидации были приготовлены путём последовательного разбавления матричного раствора интактной плазмой. Диапазон концентраций соединений ГЗК-111 и ЦПГ выбирался исходя из концентраций, ожидаемых в исследовании экспериментальной фармакокинетики.

Концентрации целевых соединений в анализируемых пробах определяли методом абсолютной калибровки.

Результаты и обсуждения

Валидацию методики проводили в соответствии с «Руководством по валидации аналитических методик для производителей лекарств» [7]. В приведённых выше условиях время удерживания соединения ЦПГ составило около 2,9 мин (рис. 3 а); время удерживания соединения ГЗК-111 составило около 7,1 мин (рис. 3 а).

Селективность

Для определения селективности были протестированы 6 образцов биологической матрицы (плазма крови) на возможность создания помех потенциально мешающими веществами (эндогенные компоненты плазмы крови, метаболиты, продукты деструкции и др.).

На рис. 3 представлены типичные хроматограммы интактной плазмы крови крыс (б) и экстракта плаз-

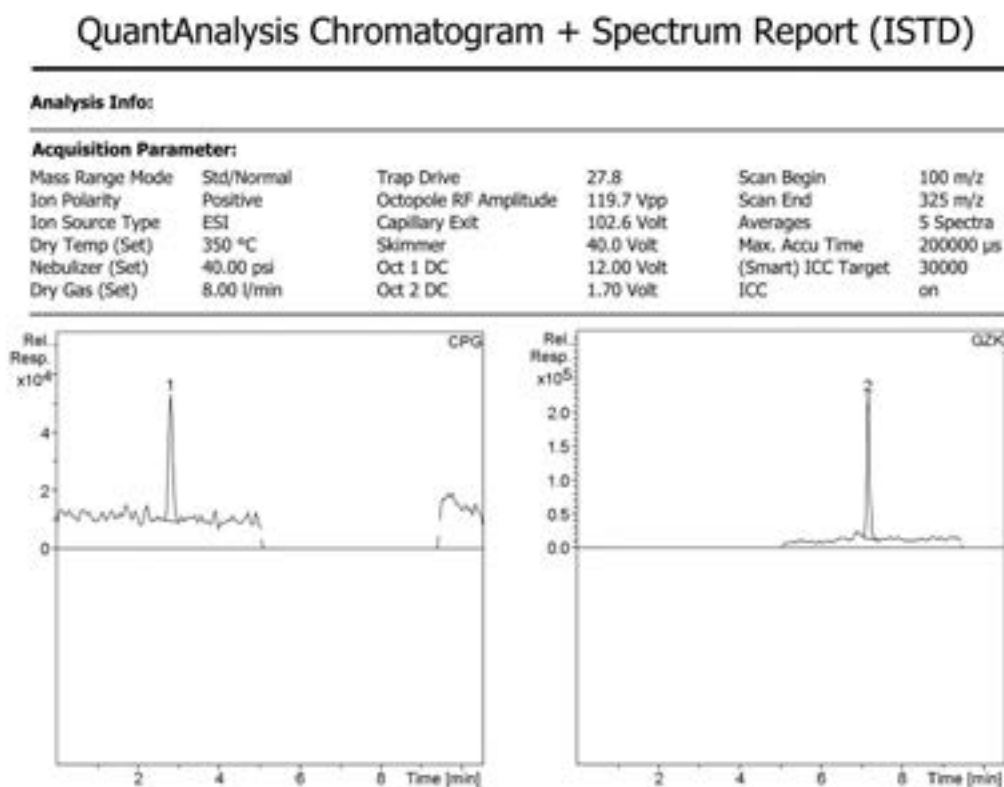


Рис. 3а. Хроматограмма плазмы крови, содержащей 25 нг/мл соединений ЦПГ и ГЗК-111

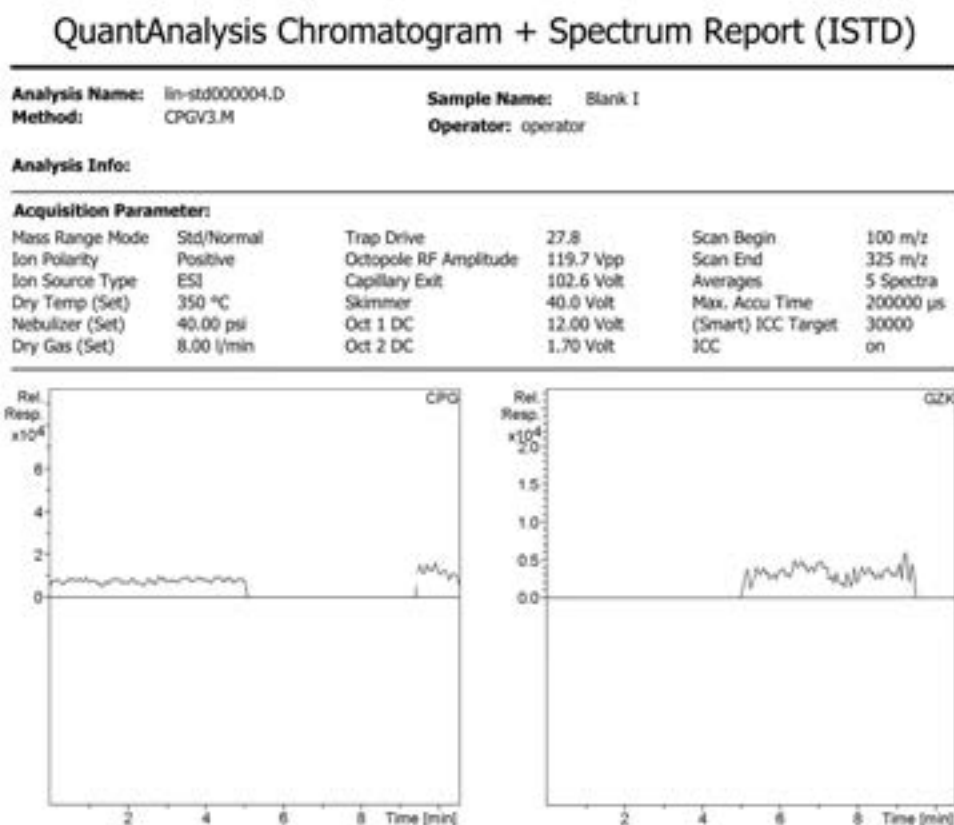


Рис. 36. Хроматограмма интактной плазмы крови

мы крови, содержащего 25 нг/мл соединений ЦПГ и ГЗК-111(а). Из рис. 3 видно, что потенциально мешающие вещества не оказывают влияния на анализ целевых соединений.

Линейность и чувствительность

Калибровочная кривая построена с использованием 9 калибровочных стандартов, охватывающих ожидаемый диапазон концентраций соединений ЦПГ и ГЗК-111 в плазме крови крыс (25–1 000 нг/мл).

Самый низкий стандарт на калибровочной кривой ГЗК-111 и ЦПГ с концентрацией обоих соединений 25 нг/мл был принят в качестве предела количественного определения, т. к. были выполнены следующие условия.

Показания стандарта на нижнем пределе количественного определения (НПКО) были не менее чем в 5 раз выше показаний пробы интактной плазмы крови. Значение стандарта на уровне НПКО поддавались определению и были дискретными и воспроизводимыми с точностью 13,97 % для соединения ЦПГ и 15,15 % для соединения ГЗК-111 (оба значения не превышают 20 %), и воспроизводимостью 97,27 % для соединения ЦПГ и 95,14 % (оба значения входят в диапазон 80–120 %).

Предел обнаружения соединений ГЗК-111 и ЦПГ составил 25 нг/мл. Зависимость величины хроматографических пиков от концентраций калибровочных

стандартов соединений ГЗК-111 и ЦПГ соответственно в области измерения методики была линейной в рассматриваемом диапазоне концентраций.

Для описания изучаемой зависимости использовалась линейная аппроксимация типа $y = a + b \times x$. Данная зависимость признана приемлемой, поскольку коэффициент корреляции для всех 3 калибровок был выше 0,99.

Параметры калибровочных кривых (коэффициенты уравнения и коэффициенты корреляции) представлены в табл. 3 и 4.

Для оценки прецизионности результатов для обоих соединений были построены 3 калибровочные кривые и проведён обратный расчёт концентраций используемых стандартов по всем кривым и определены статистические характеристики.

Прецизионность результатов с учётом критериев приемлемости достигается во всем используемом интервале концентраций (табл. 5 и 6).

Критерии приемлемости по калибровочным стандартам:

1. Отклонения нижнего стандарта кривой от теоретической концентрации не более 20 %.
2. Отклонения всех остальных стандартов не более 15 %.

Таблица 3

Параметры калибровочных кривых ЦПГ в плазме крови крыс

Калибровочная кривая	a	b	r
1	28 367,28	10 128,14	0,998
2	194 470,71	9 212,77	0,999
3	181 248,58	9 223,60	0,998

Примечания: a – участок, отсекаемый от оси ординат; b – наклон кривой; r – коэффициент корреляции.

Таблица 4

Параметры калибровочных кривых ГЗК-111 в плазме крови крыс

Калибровочная кривая	a	b	r
1	2 133 392,07	31 255,72	0,995
2	1 914 246,12	38 085,22	0,995
3	1 934 116,66	31 714,81	0,993

Примечания: a – участок, отсекаемый от оси ординат; b – наклон кривой; r – коэффициент корреляции.

3. Не менее 75 % ненулевых стандартов, включая нижний и верхний калибровочный стандарт, должны удовлетворять вышеуказанным требованиям; все зна-

чения, которые не попадают в эти пределы, можно не учитывать, при условии, что они не изменяют установленную линейную модель.

Как видно из данных табл. 5 и 6 отклонения нижнего стандарта кривой от теоретической концентрации составили для соединения ЦПГ 2,73 %; для соединения ГЗК-111 – 4,86 %, т. е. для обоих соединений соответствующие значения составили менее 20 %. Отклонения всех остальных стандартов были менее 15 %, что также удовлетворяет критериям приемлемости.

Правильность и воспроизводимость внутри одной аналитической серии

Правильность и воспроизводимость внутри одной аналитической серии оценивались по результатам параллельных анализов образцов контроля качества (КК) с концентрациями соединений ГЗК-111 и ЦПГ 25, 75, 500 и 1 000 нг/мл. Каждый образец КК определялся в 6 повторениях. Расчёт концентраций образцов КК проводился по калибровочной кривой, полученной в составе той же аналитической серии. Данные по точности и прецизионности определения соединений ЦПГ и ГЗК-111 в плазме крови внутри одного цикла представлены в табл. 7 и 8 и удовлетворяют следующим критериям приемлемости: воспроизводимость –

Таблица 5

Концентрации стандартов соединения ЦПГ, рассчитанные по уравнениям калибровочных кривых

№/№ Калибровочной кривой	Стд. A2	Стд. B2	Стд. C2	Стд. D2	Стд. E2	Стд. F2	Стд. H2	Стд. J2	Стд. K2
1	21,94	54,68	89,64	112,39	106,29	243,45	534,64	737,24	994,73
2	29,79	41,61	70,37	89,92	141,33	277,80	557,02	714,44	1 009,33
3	26,92	47,65	53,56	77,60	152,74	262,69	487,39	701,49	991,48
$\bar{x}$	26,21	47,98	71,19	93,30	133,45	261,32	526,35	717,72	998,51
SD	3,97	6,54	18,06	17,64	24,21	17,21	35,55	18,10	9,50
CV %	15,15	13,63	25,36	18,90	18,14	6,59	6,75	2,52	0,95
% от теоретического	4,86	4,04	5,08	6,70	6,76	4,53	5,27	4,30	0,15

Примечание: в таблице приведены концентрации стандартных растворов и их статистические характеристики.

Таблица 6

Концентрации стандартов соединения ГЗК-111, рассчитанные по уравнениям калибровочных кривых

№/№ Калибровочной кривой	Стд. A2	Стд. B2	Стд. C2	Стд. D2	Стд. E2	Стд. F2	Стд. H2	Стд. J2	Стд. K2
1	21,94	54,68	89,64	112,39	106,29	243,45	534,64	737,24	994,73
2	29,79	41,61	70,37	89,92	141,33	277,80	557,02	714,44	1 009,33
3	26,92	47,65	53,56	77,60	152,74	262,69	487,39	701,49	991,48
$\bar{x}$	26,21	47,98	71,19	93,30	133,45	261,32	526,35	717,72	998,51
SD	3,97	6,54	18,06	17,64	24,21	17,21	35,55	18,10	9,50
CV %	15,15	13,63	25,36	18,90	18,14	6,59	6,75	2,52	0,95
% от теоретического	4,86	4,04	5,08	6,70	6,76	4,53	5,27	4,30	0,15

Примечание: в таблице приведены концентрации стандартных растворов и их статистические характеристики.

Таблица 7

Правильность и воспроизводимость определения соединения ЦПГ в плазме крови крыс внутри одного аналитического цикла

№/№ калибровочной кривой	25 нг/мл	75 нг/мл	500 нг/мл	1 000 нг/мл
2	20,00	84,58	527,15	978,28
	27,29	66,25	517,80	973,54
	24,38	86,33	483,34	1 285,16
	26,24	68,52	467,39	990,25
	21,97	90,09	467,79	1 175,41
	19,30	65,59	561,49	1 097,80
$\bar{x}$	23,19	76,89	504,16	1 083,41
SD	3,30	11,26	37,71	127,42
CV %	4,22	14,64	7,48	11,76
% от теоретического	7,22	2,52	0,83	8,34

Таблица 8

Точность и прецизионность определения соединения ГЗК-111 в плазме крови крыс внутри одного аналитического цикла

№/№ калибровочной кривой	25 нг/мл	75 нг/мл	500 нг/мл	1 000 нг/мл
2	19,44	87,87	462,91	1 120,28
	22,61	90,54	450,15	1 232,99
	28,66	75,94	574,20	945,16
	29,00	73,16	490,64	944,84
	20,82	72,13	517,79	931,10
	25,63	64,71	531,88	1 182,71
$\bar{x}$	24,36	77,39	504,59	1 059,51
SD	4,03	9,91	46,18	135,41
CV %	16,56	12,81	9,15	12,78
% от теоретического	2,57	3,19	0,92	5,95

средние значения концентрации образца КК не должны превышать 15 % от теоретической величины, за исключением значения на уровне нижнего количественного предела, где допускается отклонение не выше 20 %; правильность – С.V. % значений концентраций каждого образца КК не должен превышать 15 %, за исключением значений НПКО, где этот параметр не должен быть выше 20 % [7].

Степень извлечения

Степень извлечения соединений ЦПГ и ГЗК-111 из плазмы крови определялась путём сравнения площадей хроматографических пиков образцов контроля качества (принимались за 100 %) с площадями пиков тех же проб, которые подвергались процедуре пробоподготовки. Измерения каждого уровня концентрации стандартов (низкий – 25, средний – 250 и высокий – 500 нг/мл) проводили в трёх повторностях. Установлено, что процент извлечения соединений ЦПГ и ГЗК-111 из плазмы крови составил 42,5 и 57,8 %, соответственно.

Стабильность препарата после пробоподготовки

Для оценки стабильности соединений ЦПГ и ГЗК-111 в плазме крови использовались образцы контроля

качества с концентрацией целевых соединений 25 и 500 нг/мл, которые хранились при комнатной температуре и дневном свете после пробоподготовки в течение 8 ч. Далее проводили анализ образцов вместе со свежеприготовленными образцами в составе одной аналитической серии. Рассчитанные концентрации ЦПГ и ГЗК-111 после хранения при комнатной температуре сравнивали со средними значениями концентраций соединений в свежеприготовленных образцах контроля качества. Полученные значения должны были удовлетворять критерию приемлемости, т. е. разница между результатами анализа до и после хранения не превышает 15 %.

Из данных табл. 9 и 10 следует, что концентрации соединений ЦПГ и ГЗК-111 после хранения при комнатной температуре в течение 8 ч удовлетворяют критерию приемлемости.

Заключение

Проведена валидация аналитической методики количественного определения соединений ЦПГ и ГЗК-111 в плазме крови методом высокоэффективной жид-

Таблица 9

Краткосрочная стабильность соединения ЦПГ после пробоподготовки и хранения при комнатной температуре в течение 8 ч

Калибровочная кривая	Образцы после пробоподготовки		Свежеприготовленные образцы	
	25 нг/мл	500 нг/мл	25 нг/мл	500 нг/мл
2	20,00	527,15	24,58	578,28
	27,29	517,80	26,25	573,54
	24,38	583,34	26,33	485,16
	26,24	567,39	18,52	490,25
	21,97	567,79	20,09	575,41
	19,30	491,49	25,59	497,80
$\bar{x}$	23,19	542,49	23,56	533,41
SD	3,30	35,71	3,39	46,58
CV %	14,21	6,58	14,40	8,73
Разница, %	7,22	8,50	5,77	6,68

Таблица 10

Краткосрочная стабильность соединения ГЗК-111 после пробоподготовки и хранения при комнатной температуре в течение 8 ч

Калибровочная кривая	Образцы после пробоподготовки		Свежеприготовленные образцы	
	25 нг/мл	500 нг/мл	25 нг/мл	500 нг/мл
2	29,44	492,91	27,87	520,28
	22,61	550,15	30,54	532,99
	28,66	474,20	25,94	545,16
	29,00	590,64	23,16	544,84
	20,82	517,79	22,13	531,10
	25,63	531,88	24,71	482,71
$\bar{x}$	26,02	526,26	25,72	526,18
SD	3,64	41,57	3,11	23,25
CV %	14,00	7,90	12,09	4,42
Разница, %	4,10	5,25	2,90	5,24

костной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Нижний предел количественного определения соединения ЦПГ составил 25 нг/мл, ГЗК-111 – 25 нг/мл. Точность и прецизионность результатов анализа с учётом критериев приемлемости

соблюдались во всём интервале исследуемых концентраций для обоих соединений (25–1000 нг/мл). При комнатной температуре пробы стабильны после пробоподготовки на протяжении 8 ч.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Подолько Анна Леонидовна

ORCID ID: 0000-0003-2418-8055

SPIN-код: 4707-3068

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

Podolko Anna

ORCID ID: 0000-0003-2418-8055

SPIN code: 4707-3068

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

Бочков Павел Олегович

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN-код: 5576-8174

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

Bochkov Pavel

ORCID ID: 0000-0001-8555-5969

SPIN code: 5576-8174

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

Колыванов Геннадий Борисович

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN-код: 2538-8639

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolyvanov Gennadiy

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN code: 2538-8639

Doctor of Biological Sciences, Leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литвин Александр Алексеевич

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN-код: 6193-5770

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Litvin Alexander

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN code: 6193-5770

Doctor of Biological Sciences, leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Грибакина Оксана Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN-код: 6266-8161

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

Gribakina Oxana

ORCID ID: 0000-0002-4604-4346

SPIN code: 6266-8161

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

Шевченко Роман Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN-код: 1844-6202

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

Shevchenko Roman

ORCID ID: 0000-0003-4646-7733

SPIN code: 1844-6202

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

Жердев Владимир Павлович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN код: 2213-9592

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

Zherdev Vladimir

Corresponding author

e-mail: zherdevpharm@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN code: 2213-9592

Doctor of Medical Sciences, professor, Head of
laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/dementia>
2. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А., и др. Этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина метаболизируется до цикло-L-пролилглицина, проявляя сходный спектр нейropsychотропной активности // *Хим.-фарм. ж.* — 2016. — Т. 50. — № 11. — С. 3–8. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kuznetsova YeA, et al. Etilovyy efir N-fenilatsetil-glitsil-L-prolina metaboliziruyetsya do tsiklo-L-prolilglitsina, proyavlyaya skhodnyy spektr neyropsikhotropnoy aktivnosti. *Khim.-farm. zh.* 2016;50(11):3–8. (In Russ).] DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-11-3-8
3. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-propylglycine in rat brain. *FEBS Lett.* 1996;391(1-2):149–152. DOI:10.1016/0014-5793(96)00722-3
4. Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В., и др. Нейропептид циклопролилглицин проявляет нейропротективную активность при системном введении на модели неполной глобальной ишемии у крыс и в условиях глутаматной нейротоксичности *in vitro* // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 2015. — Т. 160. — № 11. — С. 600–603. [Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Nikolayev SV, et al. Neuropeptid tsikloprolilglitsin proyavlyayet neyroprotektivnuyu aktivnost' pri sistemnom vvedenii na modeli nepolnoy global'noy ishemii u krys i v usloviyakh glutamatnoy neyrotoksichnosti *in vitro*. *Byul. eksperim. biologii i meditsiny.* 2015;160(11):600–603. (In Russ).] DOI 10.1007/s10517-016-3241-5
5. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., и др. Сходство цикло-пролилглицина с пираретамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам // *Эксперим. клин. фармакол.* — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Skhodstvo tsiklo-prolilglitsina s piratsetamom po antigipoksicheskomu i neyroprotektornomu efektam. *Eksperim. klin. farmakol.* 2012;75(9):3–6 (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6
6. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного пептида циклопропилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюл. эксперим. биологии и медицины.* — 2001. — Т. 131. — № 5. — С. 547–550. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skiy MA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Anksioliticheskaya aktivnost' endogennoy nootropnoy peptida tsiklopropilglitsina v teste pripodnyatogo krestobraznogo labirinta. *Byul. eksperim. biologii i meditsiny.* 2001;131(5):547–550. (In Russ).]
7. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств / под ред. В.В. Береговых — М.: Литтерра, 2008. — 132 с. [Validierung analytischer Verfahren der fictiven Firma “Muster” für die Arzneimittel-Herstellung (der Bundesverband der Arzneimittel-Hersteller (BAH)), 2004. (In Russ).]

Исследование хронической токсичности готовой лекарственной формы ГБ-115

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

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

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

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

Для цитирования:

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

Study of chronic toxicity of the GB-115 drug formulation

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

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

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

For citations:

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

Введение

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

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

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

возникла необходимость доклинического изучения её безопасности.

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

Цель исследования

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

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

Материалы и методы

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Результаты и обсуждение

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Таблица 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Заключение

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

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

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

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сорокина Александра Валериановна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: alex-mike5475@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

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

Sorokina Aleksandra

Corresponding author

e-mail: alex-mike5475@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

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

Алексеева Светлана Витальевна

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN-код: 8985-3418

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

Alekseeva Svetlana

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN code: 8985-3418

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

Мирошкина Ирина Александровна

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-код: 4697-7938

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

Miroshkina Irina

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

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

Забродина Виктория Владимировна

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN-код: 8473-6920

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

Zabrodina Victoria

ORCID ID: 0000-0002-8450-9853

SPIN code: 8473-6920

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

Колик Лариса Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

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

Kolik Larisa

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

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

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

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

Durnev Andrei

ORCID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

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

Литература / References

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия лекарственного препарата Гомеовокс

Коваленко Л. П., Иванова Е. А., Лапицкая А. С., Коржова К. В., Журиков Р. В.

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

Аннотация. Проведено исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия лекарственного препарата Гомеовокс. Гомеовокс – многокомпонентный гомеопатический препарат, который применяется при ларингитах различной этиологии. *Методы.* Исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия лекарственного препарата Гомеовокс выполнено на 80 самцах морских свинок альбиносов и на 180 самцах мышей линий CBA, C57BL/6, гибридах F1(CBAxС57BL/6). При оценке иммунотоксичности Гомеовокс вводили мышам перорально 14 дней в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг, при изучении аллергенности Гомеовокса морским свинкам альбиносам препарат вводили также в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг согласно стандартным схемам иммунизации. *Результаты.* 14-дневное пероральное введение Гомеовокса в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг мышам не вызывало значимых изменений основных показателей иммунного ответа по сравнению с контролем. При оценке аллергенности введение препарата Гомеовокс по стандартной схеме иммунизации в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг не вызывало у морских свинок альбиносов системной реакции анафилаксии и реакции активной кожной анафилаксии. После иммунизации морских свинок Гомеовоксом в тех же дозах в смеси с полным адъювантом Фрейнда у животных не выявлено аллергических реакций замедленного типа. Однократное введение препарата Гомеовокс перорально в дозе 1 000 мг/кг мышам линии CBA вызвало значимое уменьшение реакции воспаления на конканавалин А — на 58,4 %. *Заключение.* Препарат Гомеовокс в диапазоне изученных доз не обладает иммунотоксическим действием и не вызывает аллергических реакций немедленного, замедленного типа и псевдоаллергических реакций.

Ключевые слова: лекарственный препарат Гомеовокс; таблетки; покрытые оболочкой гомеопатические; фагоцитоз; хемилюминесценция; гуморальный иммунный ответ; клеточный иммунный ответ; иммунотоксичность; реакция системной анафилаксии; гиперчувствительность замедленного типа; реакция воспаления на конканавалин А

Для цитирования:

Коваленко Л.П., Иванова Е.А., Лапицкая А.С., Коржова К.В., Журиков Р.В. Исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия лекарственного препарата Гомеовокс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2019. – № 4. – С. 45–48. DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-45-48

Evaluation of allergenic properties and immunotoxicity of Homeovox

Kovalenko LP, Ivanova EA, Lapickaya AS, Korzhova KV, Zhurikov RV

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. Homeovox, a multicomponent homeopathic treatment for laryngitis of various etiologies, was tested for allergenic properties and immunotoxicity. *Methods.* 80 male albino guinea pigs and 180 male CBA, C57BL/6 and F1 hybrid (CBAxС57BL/6) mice were used in the study. In order to assess immunotoxicity, Homeovox was administered orally to mice for 14 days at doses of 100 mg/kg and 1 000 mg/kg. To assess the allergenic properties of Homeovox, albino guinea pigs were also given the drug at doses of 100 mg/kg and 1 000 mg/kg according to the standard immunization schedules. *Results.* Oral administration of Homeovox to mice for 14 days at doses of 100 mg/kg and 1 000 mg/kg did not cause significant changes in the main characteristics of immune response compared to controls. When assessing allergenicity, Homeovox at doses 100 mg/kg and 1 000 mg/kg administered according to the standard immunization schedules did not induce systemic anaphylaxis or active skin anaphylaxis in albino guinea pigs. The immunization of guinea pigs by Homeovox at the same doses in a mixture with Freund's complete adjuvant caused no delayed allergic reactions. Homeovox at a single oral dose of 1 000 mg/kg significantly decreased concanavalin A-induced inflammation in CBA mice by 58.4 %. *Conclusion.* Within the dosage range investigated, Homeovox does not induce immunotoxicity, immediate- or delayed-type allergic or pseudoallergic reactions.

Keywords: Homeovox; homeopathic coated tablets; phagocytosis; chemiluminescence; humoral immune response; cellular immune response; immunotoxicity; systemic anaphylaxis; delayed hypersensitivity; concanavalin A-induced inflammation

For citations:

Kovalenko LP, Ivanova EA, Lapickaya AS, Korzhova KV, Zhurikov RV. Evaluation of allergenic properties and immunotoxicity of Homeovox. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2019;4:45–48. (In Russ). DOI: 10.37489/2587-7836-2019-4-45-48

Введение

Согласно данным литературы, гомеопатический препарат Гомеовокс может длительно применяться у детей и взрослых при ларингитах различной этиологии, показан детям старше 1 года. Вопрос о выборе препарата детям младшего возраста для лечения больных с дисфонией достаточно сложен, так как не все аллопатические препараты могут использоваться длительно и непрерывно, а на фоне приёма гомеопатических препаратов случаи передозировки и/или зависимости практически не встречаются. Препарат Гомеовокс наиболее эффективен в лечении острых ларингитов и мутиционной дисфонии, купирует воспаление, оказывает

муколитическое действие, способствует разжижению мокроты, делает её менее вязкой и облегчает её выведение из лёгких, ускоряя выздоровление [1, 2]. Препарат Гомеовокс также используется и с профилактической целью, особенно у больных с рецидивирующими ларингитами на фоне ОРВИ, а также у лиц голосо-речевых профессий. Органические нарушения голоса, приводящие к изменению структуры складчатого отдела гортани, верхних и нижних дыхательных путей, обусловлены различной патологией: воспалительной, аллергической, нарушением иннервации или другими причинами [3], поэтому исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия препарата Гомеовокс является актуальной задачей.

Целью данной работы являлось изучение алергизирующих свойств и иммунотоксического действия гомеопатического препарата Гомеовокс.

Материалы и методы

Исследование алергизирующих свойств и иммунотоксического действия лекарственного препарата Гомеовокс выполнено на сертифицированных лабораторных животных — 180 самцах мышей линий СВА, С57BL/6, гибридах F1(СВАхС57BL/6) массой 18–20 г, 80 самцах морских свинок альбиносов массой 250–300 г, клинически здоровых особях, полученных из питомников «Андреевка» и «Столбовая» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России. Животных содержали при 12-часовом световом режиме на стандартном сбалансированном брикетированном корме со свободным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 20–24 °С. Эксперименты проводили в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях, и приказом Минздрава России №199 от 1 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утверждёнными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол № 3 от 7 марта 2019 г.).

При оценке иммунотоксичности препарата Гомеовокс мышам опытных групп 14 дней перорально вводили Гомеовокс в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг. Животным контрольных групп вводили 1 % раствор крахмала. При изучении алергенности Гомеовокса морским свинкам альбиносам опытных групп вводили препарат в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг согласно стандартным схемам иммунизации [4–6]. Животным контрольных групп вводили 1 % раствор крахмала.

При изучении иммунотоксичности лекарственного препарата Гомеовокс использовали следующие методы:

- определение массы и клеточности органов иммунной системы мышей-гибридов F1 (СВАхС57BL/6);
- оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей-гибридов F1 (СВАхС57BL/6);
- оценка активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции на мышцах-гибридах F1 (СВАхС57BL/6);
- постановка реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышцах-гибридах F1 (СВАхС57BL/6);

— постановка реакции геммаглютинации на мышцах линии СВА и линии С57BL/6.

При оценке алергенности Гомеовокса проводили постановку реакции общей системной анафилаксии и активной кожной анафилаксии на морских свинках альбиносах; при изучении реакции гиперчувствительности замедленного типа морских свинок альбиносов иммунизировали Гомеовоксом в смеси с полным адьювантом Фрейнда. Наличие псевдоаллергических реакций на Гомеовокс изучали в реакции воспаления на неиммунологический активатор конканавалин А на мышцах линии СВА.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Проверку выборок на нормальность распределения осуществляли по критерию Шапиро–Уилка. В случае нормального распределения в экспериментальных группах дальнейшую обработку проводили с помощью метода параметрической статистики *t*-критерия Стьюдента. При отсутствии нормального распределения в экспериментальных группах дальнейшую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Результаты в таблицах представлены как среднее $\pm$ ошибка среднего.

Результаты и обсуждение

При оценке иммунотоксичности лекарственного препарата Гомеовокс было выявлено, что 14-дневное пероральное введение препарата в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг мышам-гибридам F1 (СВАхС57BL/6) вызвало значимое увеличение массы тимуса по сравнению с данными контрольной группы, остальные показатели в опытных группах значимо не отличались от контрольных значений (табл. 1). Двухнедельное пероральное введение препарата Гомеовокс в дозе

Таблица 1

Индексы массы лимфоидных органов (% от массы тела) мышей-самцов F₁ (СВАхС57BL/6) при пероральном введении лекарственного препарата Гомеовокс в течение 14 дней

Органы лимфоидной системы, $n = 10$	Группы		
	Контрольная, 1 % раствор крахмала (перорально)	Гомеовокс, 100 мг/кг (перорально)	Гомеовокс, 1 000 мг/кг (перорально)
Селезёнка	0,365 $\pm$ 0,017	0,335 $\pm$ 0,011	0,352 $\pm$ 0,015
Тимус	0,203 $\pm$ 0,013	0,249 $\pm$ 0,014*	0,252 $\pm$ 0,007*
Подколенные лимфоузлы	0,059 $\pm$ 0,033	0,031 $\pm$ 0,001	0,032 $\pm$ 0,002

Примечания: n — количество животных; * — $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, получавшей 1 % раствор крахмала, *t*-критерий Стьюдента.

1 000 мг/кг значимо ($p < 0,01$) уменьшило показатель клеточности тимуса по сравнению с контрольной группой и не влияло на клеточность селезёнки и подколенных лимфатических узлов. Двухнедельное пероральное введение препарата в дозе 100 мг/кг не вызывало значимого изменения клеточности тимуса, селезёнки и подколенных лимфатических узлов (табл. 2).

Таблица 2

Индексы клеточности лимфоидных органов мышей-самцов F1 (CBA×C57BL/6) при пероральном введении лекарственного препарата Гомеовокс в течение 14 дней

Органы лимфоидной системы, $n = 10$	Индекс клеточности $\frac{n \times 10^6 \text{ клеток}}{\text{мл} \times \Gamma_{\text{органа}}}$		
	Контрольная, 1 % раствор крахмала (перорально)	Гомеовокс, 100 мг/кг (перорально)	Гомеовокс, 1 000 мг/кг (перорально)
Подколенные лимфоузлы	10,7±0,9	10,5±0,8	10,5±0,8
Тимус	76,6±5,0	86,2±12,0	29,3±8,7*
Селезёнка	63,0±2,8	70,5±6,2	58,1±4,5
Примечания: n – количество животных; * – $p < 0,01$ по сравнению с контрольной группой, получавшей 1 % раствор крахмала, t -критерий Стьюдента.			

Курсовое введение препарата Гомеовокс в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг не влияло на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов у мышей-гибридов F1 (CBA×C57BL/6). Введение препарата Гомеовокс в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг не оказывало

значимого влияния на параметры хемилюминесценции полиморфноядерных гранулоцитов, активированных опсонизированным зимозаном, у мышей-гибридов F1(CBA×C57BL/6).

При оценке аллергенности введение препарата Гомеовокс по стандартной схеме иммунизации в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг не вызывало у морских свинок альбиносов системной реакции анафилаксии и реакции активной кожной анафилаксии. После иммунизации морских свинок Гомеовоксом в тех же дозах в смеси с полным адьювантом Фрейнда у животных не выявлено аллергических реакций замедленного типа.

Однократное введение препарата Гомеовокс перорально в дозе 1 000 мг/кг мышам линии CBA вызвало значимое уменьшение реакции воспаления на конканавалин А — на 58,4 %. Лекарственный препарат Гомеовокс в дозе 100 мг/кг значимого влияния на реакцию воспаления на конканавалин А у мышей линии CBA не оказывал.

Заключение

Результаты проведённого комплексного исследования позволяют заключить, что гомеопатический лекарственный препарат Гомеовокс в диапазоне изученных доз не обладает иммунотоксическим действием и не вызывает аллергических реакций немедленного, замедленного типа и псевдоаллергических реакций. Проведённое исследование не установило данных, препятствующих клиническому применению лекарственного препарата Гомеовокс, таблетки, покрытые оболочкой гомеопатические.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Коваленко Лариса Петровна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru

ORCID ID:0000-0002-2083-0832

SPIN-код: 5185-4250

д. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kovalenko Larisa

Corresponding author

e-mail: kovalenko.larisa@mail.ru

ORCID ID:0000-0002-2083-0832

SPIN code: 5185-4250

Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher of drug toxicology department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Иванова Елена Анатольевна

ORCID ID: 0000-0003-4961-2051

SPIN-код: 5005-0337

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

Ivanova Elena

ORCID ID: 0000-0003-4961-2051

SPIN code: 5005-0337

Candidate of Pharmaceutical Sciences, Senior Researcher of drug toxicology department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Лапицкая Анастасия Сергеевна

к. б. н., с. н. с. лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний
ФБУН МНИИЭМ им. Габричевского, Москва

Lapickaya Anastasiya

Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher of diagnosis and prevention of infectious diseases department Gabrichovsky Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow

Коржова Ксения Витальевна

ORCID ID: 0000-0002-8087-4976
SPIN-код: 3831-3782

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Korzhova Kseniya

ORCID ID: 0000-0002-8087-4976
SPIN code: 3831-3782

Junior Researcher of drug toxicology department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Журиков Руслан Владимирович

ORCID ID:0000-0003-1084-690X
SPIN-код: 6648-1794

м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zhurikov Ruslan

ORCID ID:0000-0003-1084-690X
SPIN code: 6648-1794

Junior Researcher of drug toxicology department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Гусейнов А.К., Ивашев М.Н. Синергизм лецитина и гомеовокса // *Международный журнал медицинского образования*. — 2017. — № 5. — С. 32–33. [Guseynov AK, Ivashev MN. Sinergizm lecitina i gomeovoksa. *Mezhdunarodnyj zhurnal medicinskogo obrazovaniya*. 2017;(5):32–33. (In Russ).]
2. Радциг Е.Ю. Нарушения голоса у детей и подростков и их лечение гомеопатическим препаратом Гомеовокс // *Педиатрия*. — 2009. — Т. 88. — № 6. — С. 130–136. [Radzig EYu. Narusheniya golosa u detej i podrostkov i ih lechenie gomeopatiche-skim preparatom Gomeovoks. *Pediatrics*. 2009;88(6):130–136. (In Russ).]
3. Радциг Е.Ю., Ермилова Н.В. Нарушения голоса в различные периоды его становления: причины и алгоритм ведения пациентов // *Российский медицинский журнал*. — 2016. — № 4. — С. 217–220. [Radzig EYu, Ermilova NV. Voice disorders at different stages of its maturation: the causes and patient management. *Rossijskij medicinskij zhurnal*. 2016;(4): 217–220. (In Russ).]
4. Коваленко Л.П., Федосеева В.Н., Дурнев А.Д., и др. Методические рекомендации по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К; 2012. — С. 51–63. [Kovalenko LP, Fedoseeva VN, Durnev AD,

et al. Metodicheskie rekomendacii po ocenke allergiziruyushchih svoystv lekarstvennyh sredstv. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv*. Part one. / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. p. 51–63. (In Russ).]

5. Хаитов Р.М., Иванова А.С., Коваленко Л.П., и др. Методические рекомендации по оценке иммуноотоксического действия фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К; 2012. — С. 64–79. [Haitov RM, Ivanova AS, Kovalenko LP, et al. Metodicheskie rekomendacii po ocenke immunotoksicheskogo dejstviya farmakologicheskikh veshchestv. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv*. Part one. / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. p. 64–79. (In Russ).]

6. Хаитов Р.М., Гушин И.С., Пинегин Б.В., и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению иммуноотропной активности фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К; 2012. — С. 626–656. [Haitov RM, Gushchin IS, Pinegin BV, et al. Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniyu immunotropnoj aktivnosti farmakologicheskikh veshchestv. *Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv*. Part one. / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. p. 626–656. (In Russ).]

УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ



«УПРАВЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИМИ ИССЛЕДОВАНИЯМИ»

описывает методологию эффективного управления проектом по изысканию, разработке и выводу на фармацевтический рынок лекарственных средств, начиная с этапа поиска перспективных химических соединений, проведения доклинических испытаний веществ-кандидатов, клинических исследований лекарств-кандидатов, фармаконадзора, управления данными, анализа полученных данных, составления окончательного отчёта об исследовании, получения регистрационного удостоверения, публикации результатов, заканчивая организацией пострегистрационных исследований безопасности, проведением неинтервенционных и фармакоэпидемиологических исследований, а также процесс обеспечения качества, проведения аудита и инспекций уполномоченных органов здравоохранения, создания стандартных операционных процедур, архивирования документов исследования. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и государств – членов Евразийского экономического союза.



«ФАРМАКОНАДЗОР» описывает методологию фармаконадзора, организацию пострегистрационных исследований безопасности, фармакоэпидемиологических и неинтервенционных исследований, организацию системы фармаконадзора в фармацевтической компании, чрезвычайные ситуации в клинических исследованиях, особенности фармаконадзора у беременных и кормящих. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и государств – членов Евразийского экономического союза.



«ВКЛЮЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОГРАНИЧИТЕЛЬНЫЕ ПЕРЕЧНИ: ПОШАГОВЫЙ АЛГОРИТМ»

– это невероятно полезный и компактный ресурс по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни лекарственных препаратов. После прочтения этой книги процесс включения в Перечни сложится из разрозненных пазлов в единую картину. На страницах книги авторы профессионально, шаг за шагом, подробно и доходчиво объясняют методы сбора доказательной базы, рассказывают о методологии проведения сравнительной оценки эффективности и безопасности, клинико-экономических исследований и анализа влияния на бюджет, современных рекомендациях по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации.

Приобрести книги можно по тел. +7 (910) 449-22-73 или e-mail: eva88@list.ru
ООО «Издательство ОКИ», <https://izdat-oki.ru>