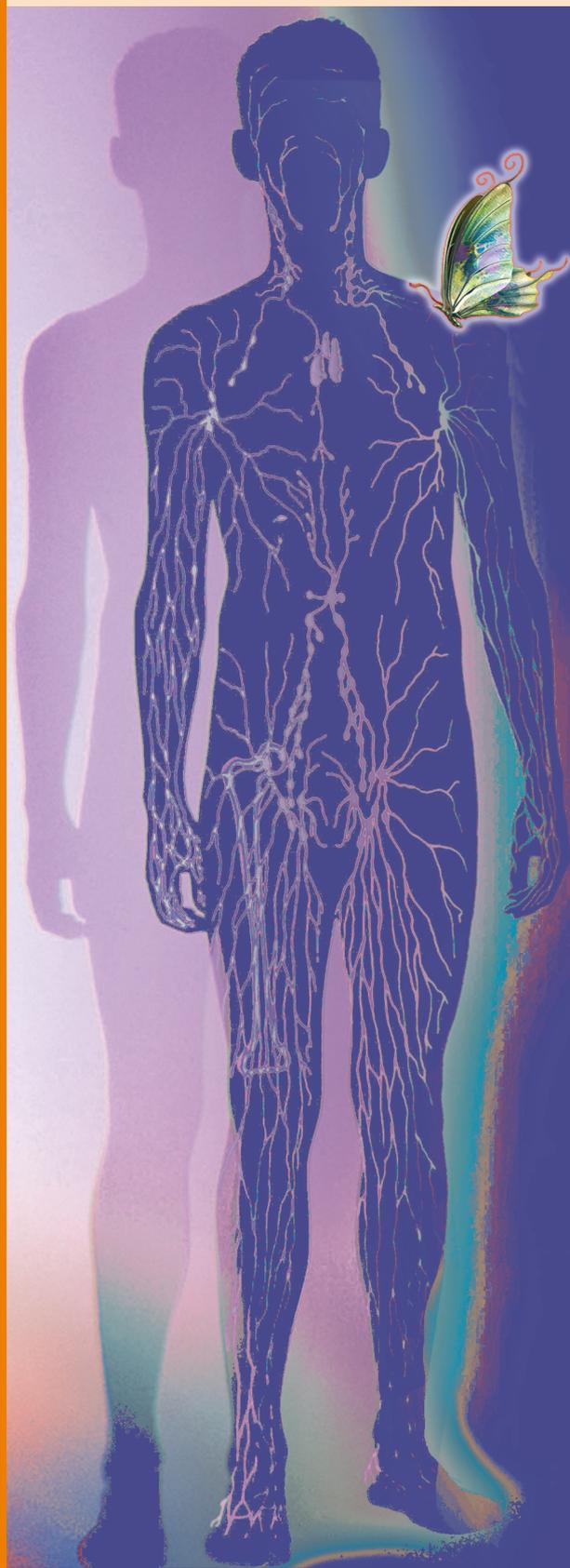


ФАРМАКО КИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№ 1.2020

19

Лет работы

230+

Исследований

220+

Публикаций

39

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

Коллик 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

Торенков 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 30.03.2020 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

Сайт журнала: www.Pharmacokinetics.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

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Влияние циклопролилглицина и его аналогов на моноаминергические системы мозга мышей BALB/c
Абдуллина А. А., Васильева Е. В., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Гудашева Т. А. Колясникова К. Н., Ковалёв Г.И. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Скрининговое изучение эффектов миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора на экспериментальной модели депрессии
Межлумян А. Г., Таллерова А. В., Поварнина П. Ю., Сазонова Н. М., Тарасюк А. В., Гудашева Т. А. 11

Исследования церебропротективной активности производных имидазола и индола и их влияния на эффекты антидепрессантов
Абрамец И. И., Зайка Т. О., Евдокимов Д. В., Кузнецов Ю. В., Сидорова Ю. В. 18

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Взаимосвязь между содержанием потенциального психофармакологического средства цикло-L-пролилглицина в мозге экспериментальных животных и его антигипоксическим эффектом
Жердев В. П., Бойко С. С., Колясникова К. Н. 25

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование алергизирующих свойств и иммунотоксичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106
Сорокина А. В., Коваленко Л. П., Коржова К. В., Журиков Р. В., Никитин С. В., Дурнев А. Д. 30

Исследование острой токсичности таблеток Гомеовокс, покрытых оболочкой, гомеопатических
Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Волкова А. В., Забродина В. В., Качалов К. С. Захаров А. Д., Алексеева С. В., Лапицкая А. С. 34

Исследование хронической токсичности таблеток Гомеовокс
Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Волкова А. В., Забродина В.В., Качалов К.С., Захаров А.Д., Алексеева С.В., Лапицкая А.С. 42

Исследование острой и хронической токсичности гомеопатического сиропа Стодаль
Алексеева С. В., Сорокина А.В., Забродина В.В., Мирошкина И.А., Лапицкая А.С. 53



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

Starodubtcev 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-okl.ru

Zhuk Elena

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

Signed in print 30.03.2020 r. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

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

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

FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»

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

Website: www.Pharmacokinetics.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-OkI.ru

Center of Pharmacoeconomics Research

Market Access Solutions

Publisher OKI

MECHANISM OF ACTION RESEARCH

The effects of cyclopropylglycine and its analogues on brain monoaminergic systems in BALB/c mice

Abdullina AA, Vasileva EV, Kudrin VS, Narkevich VB, Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kovalev GI 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Screening study of nerve growth factor's and brain-derived neurotrophic factor's mimetics effects at the experimental depression model

Mezhlumyan AG, Tallerova AV, Povarnina PYu, Sazonova NM, Tarasiuk AV, Gudasheva TA 11

Researches of the imidazole and indole derivatives cerebroprotective activity and its impact on effects of antidepressants

Abramets II, Zayka TO, Evdokimov DV, Kuznetsov YV, Sidorova YV 18

EXPERIMENTAL PHARMACOKINETICS

The relationship between the content of the potential psychopharmacological agent cyclo-L-prolylglycine in the brain of experimental animals and its antihypoxic effect

Zherdev VP, Boyko SS, Kolyasnikova KN 25

TOXICOLOGY STUDIES

Evaluation of allergenic properties and immunotoxicity of dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106

Kovalenko LP, Korzhova KV, Zhurikov RV, Nikitin CB, Durnev AD 30

Study of acute toxicity of the drug Homeovox

Miroshkina IA, Sorokina AV, Volkova AV, Zabrodina VV, Kachalov KS, Zakharov AD, Alekseeva SV, Lapitskaya AS 34

Study of chronic toxicity of potential anxiolytic Homeovox

Miroshkina IA, Sorokina AV, Volkova AV, Zabrodina VV, Kachalov KS, Zakharov AD, Alekseeva SV, Lapitskaya AS 42

Study of acute and chronic toxicity of homeopathic syrup Stoda

Alekseeva SV, Sorokina AV, Schroeder OV, Zabrodina VV, Miroshkina IA, Lapitskaya AS 53

Влияние циклопролилглицина и его аналогов на моноаминергические системы мозга мышей BALB/c

Абдуллина А. А., Васильева Е. В., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Гудашева Т. А.
Колясникова К. Н., Ковалёв Г. И.

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

Аннотация. Методом ВЭЖХ изучено влияние хронического введения циклопролилглицина (ЦПГ) и его аналогов ГЗК-001 и ГЗК-002 в дозах 1 и 2 мг/кг на содержание и метаболизм (5-НТ), дофамина (ДА) и норадреналина (НА) в структурах мозга мышей BALB/c. Было показано, что антидепрессивноподобное действие пептидов сопровождается увеличением уровня НА и уменьшением содержания ДА во фронтальной коре. В стриатуме преобладало влияние аналогов ЦПГ: увеличивался уровень ДА и снижалась скорость его метаболизма. В гиппокампе напротив активнее был ЦПГ: уменьшалось содержание НА, ДА, 5-НТ и его метаболита 5-ГИУК. Под влиянием ГЗК-001 в дозе 1 мг снижался уровень ДА и 5-ГИУК. На основании полученных данных можно заключить, что в механизме антидепрессивноподобного эффекта ЦПГ и его аналогов принимают участие серотонинергическая, норадреналинергическая и дофаминергическая системы мозга.

Ключевые слова: циклопролилглицин; ГЗК-001; ГЗК-002; моноамины; фронтальная кора; стриатум; гиппокамп; антидепрессивноподобная активность; BALB/c

Для цитирования:

Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Ковалёв Г.И. Влияние циклопролилглицина и его аналогов на моноаминергические системы мозга мышей BALB/c // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 1. – С. 3–10. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-3-10

The effects of cycloprolylglycine and its analogues on brain monoaminergic systems in BALB/c mice

Abdullina AA, Vasileva EV, Kudrin VS, Narkevich VB, Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kovalev GI

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. Effects of chronic cycloprolylglycine (CPG) and its analogues GZK-001 and GZK-002 treatment at the doses 1 and 2 mg/kg on levels of monoamines and their metabolites in BALB/c mice brain were determined by HPLC. Neurochemical data demonstrated that antidepressant-like effects of the peptides are mediated by an increase in NA and decrease in DA content in frontal cortex. Alterations in striatal monoamine metabolism were observed predominantly after CPG's analogues treatment: the concentration of DA was increased, although its rate of turnover was diminished. In hippocampus more active was CPG: the levels of NE, DA, 5-HT, and its metabolite 5-HIAA were decreased. GZK-001 (1 mg/kg) caused a decrease in the concentration of DA and 5-HIAA. The present results suggest that antidepressant-like effects of CPG and its analogues are associated with DA, NE, and 5-HT systems.

Keywords: cycloprolylglycine; GZK-001; GZK-002; monoamines; frontal cortex; striatum; hippocampus; antidepressant-like activity; BALB/c

For citations:

Abdullina AA, Vasileva EV, Kudrin VS, Narkevich VB, Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kovalev GI. The effects of cycloprolylglycine and its analogues on brain monoaminergic systems in BALB/c mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):3–10. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-3-10

Введение

Одним из приоритетных направлений современной психофармакологии, в частности фармакотерапии депрессивных расстройств, является создание высокоэффективных соединений с безопасным профилем действия. Наиболее перспективным представляется поиск подобных веществ среди синтетических аналогов эндогенных соединений или их метаболитов, так как наряду с высокой фармакологической активностью и нетоксичностью благодаря метаболизму до эндогенных аминокислот, их применение с меньшей вероятностью может привести к развитию толерантности и зависимости.

Циклопролилглицин (ЦПГ) – синтетический аналог эндогенного пептида с широким спектром психотропной активности. Изучение фармакологических свойств ЦПГ в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова позволило выявить анксиолитическую

[1, 2], антиамнестическую [3], антигипоксическую [4] и нейропротективную активности [4, 5]. Также было обнаружено, что пептид при двухнедельном введении проявляет антидепрессивноподобную активность, сопоставимую с действием флуоксетина, на мышцах инбредной линии BALB/c [6]. Там же были синтезированы и фармакологически изучены аналоги ЦПГ – цикло-L-пипеколилглицин (ГЗК-001) и (S)-тетрагидро-2H-пирроло[1,2-e]имидазол-1,3-дион (ГЗК-002), для которых также было показано наличие антидепрессивноподобной активности [7].

Известно, что ЦПГ способен модулировать ионные токи AMPA-рецепторов [8], увеличивать концентрацию нейротрофина BDNF в культуре клеток гиппокамп в условиях глутаматной и 6-оксидофаминовой нейротоксичности [9], а также при длительном введении изменять плотность 5-НТ_{2A}-, NMDA- и ГАМК_A-рецепторов в структурах мозга мышей BALB/c [10]. Спектр фармакологической активности аналогов ЦПГ совпадает с профилем самого ЦПГ, однако была по-

казана разнонаправленность действия на некоторые рецепторные системы. В то же время нейрхимические механизмы психотропного действия ЦПГ и его аналогов остаются малоизученными. Хотя есть данные о влиянии однократного введения ЦПГ в дозе 4 мг/кг на активность ферментов синтеза моноаминов тирозин- и триптофангидроксилазы [11], исследование участия моноаминергических систем в реализации антидепрессивноподобного эффекта ЦПГ и его аналогов в дозах 1 и 2 мг/кг после хронического введения не проводилось.

В связи с этим, целью настоящей работы стало изучение влияния ЦПГ и его аналогов в дозах 1 и 2 мг/кг на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей BALB/c после двухнедельного введения.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на самцах мышей BALB/c массой 25–30 г ($n = 70$). Животных содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в стандартных условиях при 12-часовом световом режиме со свободным доступом к воде и корму, по 10 особей в клетке. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Изучаемые вещества, растворенные в физрастворе, в дозах 1 и 2 мг/кг вводили внутрибрюшинно один раз в сутки в течение двух недель, контрольной группе вводили физраствор в эквивалентных объёмах. Выбор доз и продолжительности введения основан на ранее полученных данных о способности ЦПГ и аналогов уменьшать время иммобилизации мышей в тесте Порсолта. Через час после последней инъекции мышей декапитировали, мозг извлекали на лёду и выделяли фронтальную кору, стриатум и гиппокамп по следующей схеме [12].

Содержание норадреналина, дофамина, серотонина и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) [13]. Выделенные структуры головного мозга мышей размельчали в гомогенизаторе «стекло–тефлон» (0,2 мм) при скорости вращения пестика 3 000 об/мин. Гомогенизацию осуществляли в 0,1 N HClO₄ с добавлением в качестве внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) в количестве 0,5 нмоль/мл. Пробы центрифугировали при 9 000 g и температуре 4 °C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость в количестве 20 мкл фильтрата методом прямой инъекции наносили на обращённо-фазную колонку ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм,

3 мкм (Dr.Majsch GMBH, Германия). Моноамины и их метаболиты разделяли на хроматографе РМ-80 (BAS, США), снабжённом инжектором «Rheodyne 7125» и электрохимическим детектором LC-4В (BAS, США). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 мМ ионопарного агента октансульфоната натрия, 0,1 мМ ЭДТА и 9 % ацетонитрила (рН = 3,0). Определение ДА (дофамин), ДОФУК (3,4-диоксифенилуксусная кислота), 3-МТ (3-метокситирамин), ГВК (гомованилиновая кислота), НА (норадреналин), 5-НТ (серотонин) и 5-ГИУК (5-гидроксииндолуксусная кислота) осуществляли на стеклоуглеродном электроде при потенциале +0,85 В против Ag/AgCl электрода сравнения. Скорость потока подвижной фазы составляла 1,0 мл/мин при давлении 200 атм. Регистрация образцов осуществлялась с помощью специального программного комплекса Мультихром 1,5 (Амперсенд). Для калибровки хроматографа в качестве стандарта для определения количества веществ в структурах мозга мышей использовали смеси рабочих растворов в концентрации 0,5 нмоль/мл. Величины концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали, исходя из отношений площадей пиков в стандартном и экспериментальных образцах.

Анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 6.0 согласно «Методическим рекомендациям по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». На графиках представлены средние значения с учётом стандартной ошибки среднего ($\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$).

Результаты и обсуждение

Результаты исследования влияния двухнедельного введения ЦПГ и его аналогов ГЗК-001 и ГЗК-002 на содержание и оборот моноаминов в мозге мышей BALB/c представлены в табл. 1–2 и рис. 1–2. Как видно из полученных данных, во фронтальной коре под влиянием ЦПГ в дозах 1 и 2 мг/кг отмечалось достоверное снижение уровня дофамина (на 41 и 42 %), вследствие чего происходило увеличение скорости внутри- и внеклеточного оборота дофамина — ДОФУК/ДА на 55 и 105 % и ГВК/ДА на 88 и 143 %, соответственно. Также в группе ЦПГ 2 мг/кг наблюдалось увеличение содержания НА во фронтальном коре на 27 % ($p < 0,05$), в меньшей дозе прослеживалась подобная тенденция (см. табл. 1).

В стриатуме мышей группы ЦПГ 2 мг снижался оборот дофамина — соотношение ДОФУК/ДА уменьшилось на 19 % ($p < 0,05$) (рис. 1А), ГВК/ДА — на 29 % ($p < 0,05$) (рис. 2Б).

В гиппокампе под влиянием ЦПГ в дозах 1 и 2 мг/кг, так же как и в коре, уменьшалось содержание ДА на 40 и 35 %, в дозе 2 мг/кг значительно увеличился оборот дофамина — ДОФУК/ДА на 175 % ($p < 0,05$), ГВК/ДА — на 270 % ($p < 0,05$) и снизился показатель

утилизации серотонина 5-ГИУК/5-НТ на 44 % ($p < 0,01$) с одновременным падением уровня 5-ГИУК на 38 % ($p < 0,05$) (рис. 1 А, Б и В; табл. 1). В группе ЦПГ 1 мг/кг наблюдалось снижение показателей НА на 45 % ($p < 0,01$), ДА на 40 % ($p < 0,05$) и 5-НТ на 47 % ($p < 0,05$) (табл. 1).

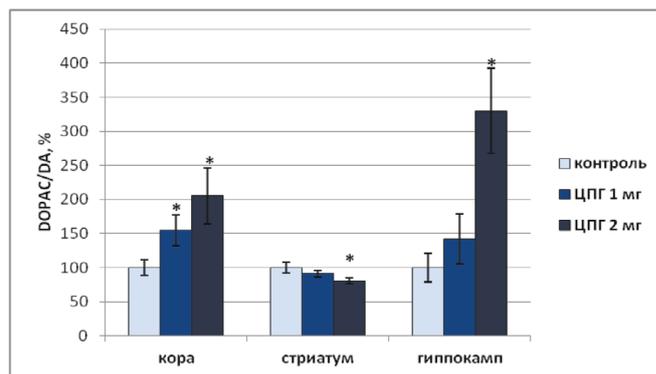
Под влиянием аналогов во фронтальной коре наблюдалась тенденция к снижению содержания ДА и увеличению уровня ГVK, ГЗК-002 в дозе 2 мг/кг статистически значимо увеличил уровень ГVK на 32 % ($p < 0,05$) (табл. 2). Под действием ГЗК-001 в дозах 1 и 2 мг/кг увеличивались показатели ДОФУК/ДА на 108 % ($p < 0,01$) и 68 % ($p < 0,05$) (рис. 2А) и ГVK/ДА – на 110 % ($p < 0,01$) и 56 % ($p < 0,05$) (рис. 2Б), соот-

Таблица 1

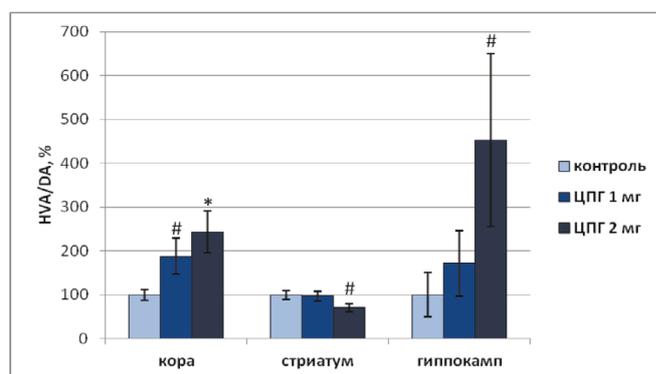
Влияние двухнедельного введения ЦПГ (1 и 2 мг/кг) на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей BALB/c ($m \pm S.E.M.$)

Моноамины	Контроль	ЦПГ, 1 мг/кг	ЦПГ, 2 мг/кг
Фронтальная кора			
НА	3,32±0,32	3,63±0,43	4,21±0,38 *
ДОФУК	0,22±0,02	0,21±0,02	0,22±0,02
ДА	3,98±0,74	2,33±0,25 *	2,30±0,39#
5-ГИУК	0,61±0,10	0,49±0,06	0,40±0,69
ГVK	3,59±0,24	4,23±0,40	4,52±0,67
3-МТ	0,20±0,03	0,18±0,03	0,21±0,06
5-НТ	2,54±0,40	1,99±0,18	1,98±0,33
Стриатум			
НА	0,71±0,14	0,80±0,24	0,78±0,06
ДОФУК	3,98±0,38	4,11±0,47	3,71±0,23
ДА	164,4±13,5	181,7±15,2	190,9±13,1
5-ГИУК	0,09±0,03	0,04±0,01	0,13±0,09
ГVK	6,42±0,64	7,14±1,05	5,47±0,73
3-МТ	4,43±0,43	5,93±0,73	5,51±0,59
5-НТ	2,21±0,47	1,98±0,68	2,34±0,56
Гиппокамп			
НА	4,56±0,45	2,54±0,28 *	3,73±0,40
ДОФУК	0,21±0,04	0,18±0,02	0,21±0,03
ДА	1,41±0,21	0,85±0,15 *	0,92±0,24
5-ГИУК	2,63±0,31	1,63±0,46 #	1,53±0,48 #
ГVK	3,34±1,10	3,41±1,02	3,40±1,13
3-МТ	2,04±0,73	1,59±0,50	1,12±0,33
5-НТ	6,33±0,78	3,33±0,88 *	6,07±1,50

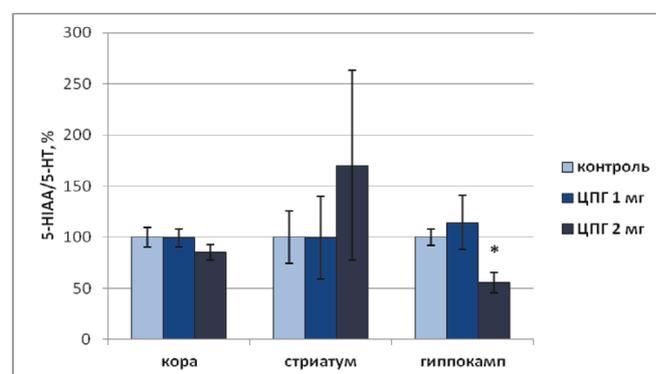
Примечания: *, # – статистически значимые отличия от контроля по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна-Уитни, соответственно.



А



Б



В

Рис. 1. Влияние двухнедельного введения ЦПГ на метаболический оборот дофамина (А, Б) и серотонина (В) в структурах мозга мышей BALB/c ($m \pm S.E.M.$)

Примечания: *, # – статистически значимые отличия от контроля по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна-Уитни, соответственно

ветственно. Второй аналог ГЗК-002 также увеличивал оборот дофамина – ДОФУК/ДА на 72 % ($p < 0,05$) и 50 % ($p < 0,05$) (рис. 2А) и ГVK/ДА на 68 % ($p < 0,05$) и 65 % ($p < 0,05$) (рис. 2Б) в дозах 1 и 2 мг/кг, соответственно (рис. 2Б). Также оба аналога в дозах 1 и 2 мг/кг достоверно увеличили уровень НА: ГЗК-001 – на 28 и 32 %, ГЗК-002 – на 28 и 23 % ($p < 0,05$) (табл. 2).

В стриатуме оба аналога в дозе 2 мг/кг увеличивали содержание дофамина на 26 % ($p < 0,05$), в меньшей дозе прослеживалась подобная тенденция. Также оба аналога в дозе 1 мг/кг повышали уровень 3-МТ на

Таблица 2

Влияние двухнедельного введения ГЗК-001 и ГЗК-002 на содержание моноаминов и их метаболитов в структурах мозга мышей BALB/c ($m \pm S.E.M.$)

Моноамины	Контроль	ГЗК-001 1 мг/кг	ГЗК-001 2 мг/кг	ГЗК-002 1 мг/кг	ГЗК-002 2 мг/кг
Фронтальная кора					
НА	3,32±0,32	4,25±0,28 *	4,39±0,32 *	4,25±0,32 *	4,10±0,23 *
ДОФУК	0,22±0,02	0,24±0,03	0,23±0,02	0,23±0,02	0,26±0,02
ДА	3,98±0,74	2,67±0,97	2,82±0,51	3,23±0,78	2,99±0,39
5-ГИУК	0,61±0,10	0,66±0,11	0,61±0,05	0,72±0,09	0,60±0,06
ГВК	3,59±0,24	3,80±0,32	3,84±0,20	3,82±0,21	4,75±0,78 *
3-МТ	0,20±0,03	0,20±0,05	0,24±0,05	0,22±0,04	0,17±0,02
5-НТ	2,54±0,40	3,20±0,40	2,98±0,29	3,00±0,34	2,70±0,34
Стриатум					
НА	0,71±0,14	0,72±0,09	0,81±0,09	0,71±0,07	0,99±0,16
ДОФУК	3,98±0,38	4,44±0,30	4,44±0,26	4,70±0,56	4,48±0,40
ДА	164,4±13,5	177,2±11,6	206,4±13,8 *	191,9±15,7	206,6±15,9 #
5-ГИУК	0,09±0,03	0,05±0,02	0,02±0,01 *	0,15±0,09	0,17±0,07
ГВК	6,42±0,64	5,81±0,36	5,81±0,77	6,91±0,95	7,99±0,85
3-МТ	4,43±0,43	7,11±0,98 *	5,11±0,55	7,52±1,22 *	5,312±0,58
5-НТ	2,21±0,47	1,36±0,18	2,68±0,44	3,21±0,68	2,80±0,59
Гиппокамп					
НА	4,56±0,45	3,59±0,38	5,33±0,61	4,68±0,43	5,13±0,48
ДОФУК	0,21±0,04	0,31±0,04	0,29±0,05	0,25±0,05	0,25±0,05
ДА	1,41±0,21	0,86±0,16 #	1,18±0,25	1,75±0,26	1,40±0,18
5-ГИУК	2,63±0,31	1,48±0,32 *	2,44±0,59	2,71±0,57	2,42±0,63
ГВК	3,34±1,10	2,72±0,75	3,40±1,23	3,62±1,29	3,44±0,97
3-МТ	2,04±0,73	1,68±0,62	2,18±0,70	2,05±0,76	1,93±0,58
5-НТ	6,33±0,78	5,38±0,97	8,08±1,82	7,24±1,36	6,98±1,33

Примечания: *, # — статистически значимые отличия от контроля по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна-Уитни, соответственно.

60 % (ГЗК-001) и 70 % (ГЗК-002) по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (табл. 2). В то же время, следует отметить, что оборот дофамина — ДОФУК/ДА под влиянием ГЗК-002 в дозе 2 мг/кг снижался на 8 % ($p < 0,05$), в группе ГЗК-001 2 мг уменьшались внеклеточный оборот дофамина — ГВК/ДА на 30 % ($p < 0,05$) и утилизация серотонина — 5-ГИУК/5-НТ на 68 % ($p < 0,05$) (рис. 2). Под действием обоих аналогов в дозе 1 мг наблюдалось увеличение уровня метаболита 3-МТ на 60 % (ГЗК-001) и 70 % (ГЗК-002) ($p < 0,05$). Также ГЗК-001 в дозе 2 мг/кг уменьшал концентрацию 5-ГИУК на 78 % ($p < 0,05$) (табл. 2).

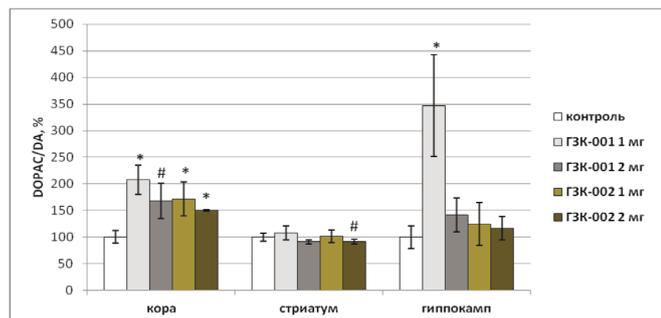
В гиппокампе мышей группы ГЗК-001 1 мг/кг увеличивался внутриклеточный оборот дофамина — ДОФУК/ДА на 175 % ($p < 0,05$) (рис. 2А) и снижался оборот серотонина 5-ГИУК/5-НТ на 34 % ($p < 0,05$) (рис. 2В) с одновременным снижением концентраций ДА и 5-ГИУК на 39 % ($p < 0,05$) и 44 % ($p < 0,05$), со-

ответственно (табл. 2). Под влиянием ГЗК-002 в дозе 2 мг/кг происходило уменьшение оборота серотонина на 33 % ($p < 0,05$) по сравнению с контролем (рис. 2В).

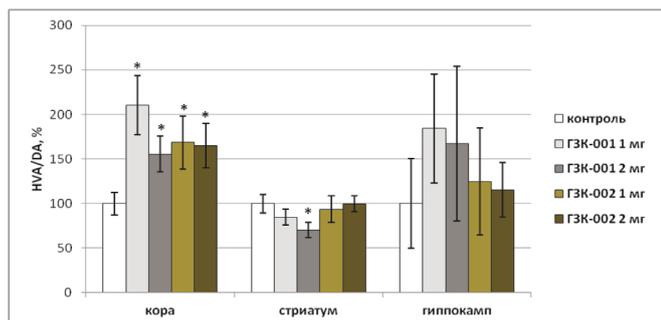
Полученные данные позволяют увидеть однонаправленное влияние ЦПГ и двух его аналогов на моноаминовые системы мозга экспериментальных животных, но при этом векторы их эффектов в разных структурах не совпадают.

Во фронтальной коре мы наблюдаем активацию дофаминергической системы, скорее всего, происходит увеличение выброса дофамина, что приводит к истощению его депо в клетках. Об этом свидетельствует неизменный уровень внутриклеточного метаболита дофамина ДОФУК, и повышенный уровень внеклеточного метаболита ГВК на фоне снижения самого дофамина.

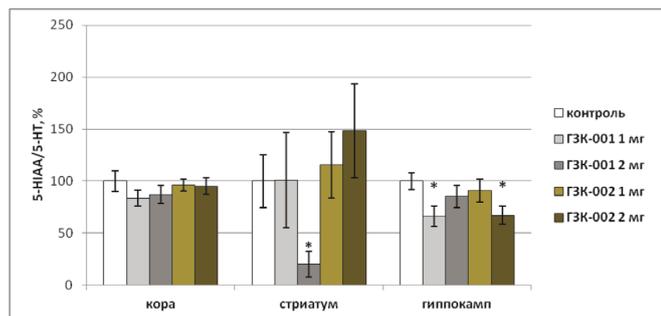
В гиппокампе мышей снижается синтез дофамина (ЦПГ и ГЗК-001 1 мг/кг) и серотонина (ЦПГ 1 мг/кг),



А



Б



В

Рис. 2. Влияние двухнедельного введения ГЗК-001 и ГЗК-002 на метаболический оборот дофамина (А, Б) и серотонина (В) в структурах мозга мышей BALB/c ($m \pm S.E.M.$)

Примечания: *, # — статистически значимые отличия от контроля по *t*-критерию Стьюдента и *U*-критерию Манна-Уитни, соответственно

так как уменьшение их содержания параллельно сопровождается снижением уровня их метаболитов 3-МТ и 5-ГИУК. Выявленные изменения не всегда достигали статистической значимости, иногда различия были на уровне тенденции, что объяснимо с учётом низкого содержания дофамина и его метаболитов во фронтальной коре и гиппокампе.

В стриатуме наблюдается увеличение дофамина — в случае с ЦПГ в обеих дозах и аналогами в дозе 1 мг в виде тенденции, в группах ГЗК-001 2 мг и ГЗК-002 2 мг — статистически достоверное, и его метаболита 3-МТ — в группах ГЗК-001 1 мг и ГЗК-002 1 мг — статистически значимое, в остальных группах — тенденция. Можно допустить, что при увеличении дозы до 2 мг на фоне активации синтеза дофамина происхо-

дит ингибирование выброса нейромедиатора за счёт взаимодействия с пресинаптическими дофаминовыми рецепторами в качестве агонистов.

Повышение уровня НА во фронтальной коре под влиянием ЦПГ и аналогов может свидетельствовать об увеличении активности дофамин- β -гидроксилазы — фермента, катализирующего превращение дофамина в норадреналин. Снижение содержания норадреналина в гиппокампе в группе ЦПГ 1 мг, по всей видимости, обусловлено усилением активности ферментов МАОА и МАОВ, так как происходит уменьшение уровня его субстратов — НА, 5-НТ и ДА.

Также следует отметить, что содержание серотонина значимо не изменялось ни в одной из изученных структур, за исключением гиппокампа, в котором наблюдалось снижение уровня метаболита серотонина под влиянием ЦПГ в обеих дозах и ГЗК-001 (1 мг/кг), что при неизменном уровне серотонина может свидетельствовать об уменьшении метаболизма нейромедиатора. Аналогичный эффект аналога наблюдался в стриатуме мышей, но в дозе 2 мг/кг.

Данные научной литературы указывают на то, что терапия антидепрессантами увеличивает содержание, по крайней мере, одного моноаминового нейромедиатора (серотонина, дофамина и/или норадреналина). Системы серотонина, дофамина и норадреналина связаны друг с другом сложными взаимодействиями и все они так или иначе вовлечены в механизмы патогенеза депрессии и действия антидепрессантов [14]. Известно, что все виды антидепрессантной терапии (электрошоковая терапия, транскраниальная магнитная стимуляция, депривация сна и все химические классы антидепрессантов) стимулируют высвобождение дофамина в префронтальной коре. Увеличение уровня дофамина отмечают и в других структурах мозга, например, в прилежащем ядре (*n. accumbens septi*) и в стриатуме.

Существуют наблюдения, свидетельствующие о способности дофаминергической системы потенцировать синаптическую пластичность [14]. Исходя из того, что антидепрессивноподобные эффекты ЦПГ и аналогов развиваются не раньше, чем через 2 нед., можно предположить, что изучаемые пептиды оказывают свое действие, в том числе, за счёт воздействия на синаптогенез и нейропластичность, в частности, посредством модуляции дофаминергической системы.

Дофамин, являясь одним из факторов внутреннего подкрепления, служит важной частью системы вознаграждения мозга, поскольку вызывает чувство удовольствия и удовлетворения [15]. У пациентов с большим депрессивным расстройством была обнаружена корреляция между изменённой функцией дофаминергической системы и нарушенной кортико-стриарной системой вознаграждения [16].

Известно также, что дофамин играет роль стимулирующего нейромедиатора, способствующего повышению двигательной активности, уменьшению

двигательной заторможенности и скованности. Следует отметить, что выявленное влияние ЦПГ и аналогов на дофаминергическую систему мозга представляет собой компонент антидепрессивноподобной, а не психостимулирующей активности, так как в тесте «открытое поле» пептиды в изучаемом режиме введения не влияли на двигательную активность животных.

Таким образом, двухнедельное введение ЦПГ и его аналогов в дозах 1 и 2 мг/кг оказывает влияние на системы серотонина, норадреналина и дофамина. В целом, полученные нами результаты отражают сложный комплексный характер действия изучаемых дипептидов на моноаминергические системы мозга. Однако для более полного понимания механизмов психотропного действия изучаемых веществ необходимо исследовать и другие нейромедиаторные системы.

Выводы

1. В механизме действия ЦПГ и его аналогов в дозах 1 и 2 мг/кг принимают участие дофаминергическая, норадренергическая и серотонинергическая нейромедиаторные системы мозга. Введение пептидов

вызывает разнонаправленные изменения содержания моноаминов в различных структурах мозга.

2. ЦПГ и его аналоги в дозах 1 и 2 мг/кг/сут при двухнедельном введении схожим образом влияют на содержание моноаминов и их метаболитов в префронтальной коре мозга мышей: отмечается рост уровня норадреналина; увеличение оборота дофамина при снижении (ЦПГ) или заметной тенденции к снижению (ГЗК-001 и ГЗК-002) уровня дофамина.

3. В гиппокампе мышей BALB/c ЦПГ в дозе 2 мг/кг вызывает увеличение оборота дофамина и снижение оборота серотонина, сопровождающиеся снижением тканевых концентраций норадреналина, дофамина, 5-оксииндолуксусной кислоты и серотонина. Влияние аналогов ЦПГ было незначительно: снижались оборот серотонина (ГЗК-001 1 мг, ГЗК-002 2 мг), в группе ГЗК-001 1 мг наблюдалось уменьшение содержания дофамина и 5-гидроксииндолуксусной кислоты.

4. В стриатуме более активными оказались аналоги ЦПГ, снижающие в дозе 2 мг/кг внеклеточный (ГЗК-001) и внутриклеточный (ГЗК-002) оборот дофамина, а также скорость метаболизма серотонина (ГЗК-001).

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абдуллина Алия Анвяровна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: aliyeabla@mail.ru

ORCID ID: 0000-0001-7499-0885

SPIN-код: 9781-1554

м. н. с. Лаборатории радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Abdullina Aliya

Corresponding author

e-mail: aliyeabla@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-2617-0334

SPIN code: 9781-1554

Junior Researcher, Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Васильева Екатерина Валерьевна

ORCID ID: 0000-0002-9178-2823

SPIN-код: 1054-4872

к. б. н., с. н. с. Лаборатории радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Vasileva Ekaterina

ORCID ID: 0000-0002-9178-2823

SPIN code: 1054-4872

PhD in Biology, Senior Research Scientist, Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Кудрин Владимир Сергеевич

ORCID ID: 0000-0002-0321-5125

SPIN-код: 3986-3262

к. м. н., заведующий Лабораторией нейрохимической фармакологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kudrin Vladimir

ORCID ID: 0000-0002-0321-5125

SPIN code: 3986-3262

PhD in Medicine, Head of Laboratory of Neurochemical Pharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Наркевич Виктор Борисович

ORCID ID: 0000-0002-0321-5125

к. м. н., с. н. с. Лаборатории нейрохимической фармакологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Narkevich Victor

ORCID ID: 0000-0002-0321-5125

PhD in Medicine, Senior Research Scientist, Laboratory of Neurochemical Pharmacology, 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 «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва

Gudasheva Tatiana

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN code: 4970-0006

D. Sci. in Biology, professor, corresponding member of the RAS, Head of Medicinal chemistry department, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Колясникова Ксения Николаевна

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN-код: 5682-2035

к. б. н., н. с. Лаборатории пептидных биорегуляторов, Отдел химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolyasnikova Ksenia

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN code: 5682-2035

PhD in Biology, Research Scientist, Laboratory of peptide bioregulators, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Ковалёв Георгий Иванович

ORCID ID: 0000-0002-8597-7018

SPIN-код: 8461-8814

д. м. н, проф., заведующий Лабораторией радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kovalev Georgy

ORCID ID: 0000-0002-8597-7018

SPIN code: 8461-8814

D. Sci. in Medicine, professor, Head of the Laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного пептида циклопролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2001. — Т. 131. — № 5. — С. 547–550. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, Seredenin S.B. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2001;131(5):547–550. (In Russ).]

2. Seredenin SB, Gudasheva TA, Boiko SS, et al. Endogenous Dipeptide Cycloprolylglycine Shows Selective Anxiolytic Activity in Animals with Manifest Fear Reaction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2002;133(4):360–362.

3. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С. и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирacetаму по селективности мнемоторного эффекта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 1999. — Т. 116. — № 10. — С. 411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. New endogenous dipeptide cycloprolyl-glycine is similar to piracetam by its mnemotropic selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 1999; 128(4):411–413. (In Russ).]

4. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А. и др. Сходство циклопролилглицина с пирacetамом по антигипоксическому и нейрорепротекторному эффектам // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Similarity of cycloprolylglycine to piracetam in antihypoxic and neuroprotective effects. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2012;75(9):3–6. (In Russ).]

5. 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* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2015. — Т. 160. — № 11. — С. 600–603. [Povarnina P.Yu., Kolyasnikova K.N., Nikolaev S.V. et al. Neuropeptid cikloprolilglicin proyavlyayet nejroprotektivnyuyu aktivnost' pri sistemnom vvedenii na modeli nepolnoj global'noj ishemii u kryis i v usloviyah glutamatnoj nejrotoksichnosti *in vitro*. *Byulleten' eksperimental'noj biologii i mediciny*. 2015;160(11):600–603. (In Russ).]

6. Ковалёв Г.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Антидепрессантоподобные свойства циклопролилглицина // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2015. — Т. 81. — № 10. — С. 76–79. [Kovalev G.I., Abdullina A.A., Vasil'eva E.V. Antidepressant-Like Properties of Cycloprolylglycine. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2015;81(10):76–79. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2015-81-11-3-6

7. Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., и др. Антидепрессивноподобная активность аналогов циклопролилглицина и участие серотониновых, глутаматных и ГАМК-рецепторов в механизме её реализации // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2019. — Т. 82. — № 6. — С. 8–15. [Abdullina A.A., Vasil'eva E.V., Kondrakhin E.A. Antidepressant-Like Effects of Cycloprolylglycine Analogs and the Involvement of Serotonin-, Glutamate-, and GABA-Receptors in Their Mechanisms. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2019;82(6): 8–15. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2019-82-6-8-15

8. Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясникова К.Н., и др. Нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором АМРА-рецепторов // *Доклады Академии наук*. — 2016. — Т. 471. — № 1. — С. 106–108. [Gudasheva TA, Kolyasnikova K.N., Seredenin S.B.,

Grigoriev V.V., Zamoyski V.L. Neuropeptide cycloprolylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2016;471(1):387–389. (In Russ.)

9. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках // *Доклады академии наук*. – 2016. – Т. 469. – № 4. – С. 492–495. [Gudasheva T.A., Kolyasnikova K.N., Antipova T.A., Seredenin S.B. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Doklady Akademii nauk*. 2016;469(4):492–495. (In Russ.)] DOI: 0.7868/S0869565216220254

10. Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Ковалёв Г.И. Участие серотониновых, глутаматных и ГАМК-рецепторов в проявлении антидепрессивноподобного эффекта циклопролилглицина // *Нейрохимия*. – 2019. – Т. 36. – № 3. – С. 218–225. [Abdullina A.A., Vasilyeva E.V., Kondrakhin E.A., Kovalev G.I. Participation of Serotonin, Glutamate, and GABA Receptors in the Manifestation of Antidepressive-Like Effect of Cycloprolylglycine. *Nejrohimiya*. 2019;36(3):218–225. (In Russ.)] DOI: 10.1134/S1027813319030026

11. Наркевич В.Б., Овчинникова И.П., Клодт П.М., Кудрин В.С. Изучение эффектов гимантана и циклопролилглицина на ферментативное звено синтеза моноаминов в мозге крыс // *Нейрохимия*. – 2012. – Т. 29. – № 4. – С. 1–7. [Narkevich V.B., Ovchinnikova I.P., Klodt P.M., Kudrin V.S.

The effects of himantane and cycloprolylglycine on the enzymatic linkage of monoamine synthesis in the rat brain. *Nejrohimiya*. 2012;29(4): 1–7. (In Russ.)]

12. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 1966;13(8):655–669. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1966.tb09873.x

13. Кудрин В.С., Надорова А.В., Наркевич В.Б., Колик Л.Г. Изучение поведенческих и нейрохимических эффектов гимантана на динамику гиперлокомоторной реакции, индуцированной этанолом, у мышей линии DBA/2 // *Нейрохимия*. – 2018. – Т. 35. – № 1. – С. 62–69. [Kudrin V.S., Nadorova A.V., Narkevich V.B., Kolik L.G. An Analysis of the Behavioral and Neurochemical Effects of Himantane on the Dynamics of the Ethanol-Induced Hyperlocomotor Response in DBA/2 Mice. *Nejrohimiya*. 2018;35(1):62–69. (In Russ.)] DOI: 10.7868/S1027813318010065

14. Lavergne F, Jay TM. A new strategy for antidepressant prescription. *Frontiers in neuroscience*. 2010;4:192. DOI:10.3389/fnins.2010.00192

15. Arias-Carrión O, Stamelou M, Murillo-Rodríguez E, et al. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *International Archives of Medicine*. 2010;(3):24. DOI: 10.1186/1755-7682-3-24

16. Escalona R, Fawcett J. Pramipexole in Treatment Resistant-Depression, Possible Role of Inflammatory Cytokines. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):363. DOI:10.1038/npp.2016.217

Скрининговое изучение эффектов миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора на экспериментальной модели депрессии

Межлумян А. Г., Таллерова А. В., Поварнина П. Ю.,
Сазонова Н. М., Тарасюк А. В., Гудашева Т. А.

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

Аннотация. В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики 1-й (ГК-6) и 4-й (ГК-2) петель фактора роста нервов, 1-й (ГСБ-214), 2-й (ГТС-201) и 4-й (ГСБ-106, ГСБ-106Ac) петель мозгового нейротрофического фактора. Для ГСБ-106 ранее установлена антидепрессивноподобная активность в дозах 0,1-5,0 мг/кг при введении внутрь и внутривнутрибрюшинно. Вновь синтезированные миметики изучены в сравнении с ГСБ-106 на наличие антидепрессивноподобной активности в тесте вынужденного плавания на мышах-самцах Balb/c при однократном внутривнутрибрюшинном введении. Установлено, что только миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106Ac, отличающийся от ГСБ-106 заменой моно-сукцинильного фрагмента на ацетильный, обладал антидепрессивноподобным действием в дозах 1,0 мг/кг и 5,0 мг/кг.

Ключевые слова: NGF; BDNF; миметик; ГСБ-106; ГК-2; дипептид; антидепрессивное действие; тест вынужденного плавания

Для цитирования:

Межлумян А.Г., Таллерова А.В., Поварнина П.Ю., Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Гудашева Т.А. Скрининговое изучение эффектов миметиков фактора роста нервов и мозгового нейротрофического фактора на экспериментальной модели депрессии // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 1. – С. 11–17. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-11-17

Screening study of nerve growth factor's and brain-derived neurotrophic factor's mimetics effects at the experimental depression model

Mezhlumyan AG, Tallerova AV, Povarnina PYu, Sazonova NM, Tarasiuk AV, Gudasheva TA
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. At the Zakusov Institute of Pharmacology designed and synthesized dimeric dipeptide mimetics of the 1st (GK-6) and 4th (GK-2) nerve growth factor loops, 1st (GSB-214), 2nd (GTS-201) and 4th (GSB-106, GSB-106Ac) brain-derived neurotrophic factor loops. Antidepressant activity of GSB-106 has already been established by oral and intraperitoneal administration in 0.1-5.0 mg/kg doses. Newly synthesized mimetics were studied in comparison with GSB-106 for antidepressant-like activity in the forced swim test on male Balb/c mice with a single intraperitoneal administration. It was found that only mimetic of the fourth brain-derived neurotrophic factor loop GSB-106Ac, varied from GSB-106 by replace monosuccinyl fragment to acetyl, has antidepressant activity in doses of 1.0 mg / kg and 5.0 mg / kg.

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

For citations:

Mezhlumyan AG, Tallerova AV, Povarnina PYu, Sazonova NM, Tarasiuk AV, Gudasheva TA. Screening study of nerve growth factor's and brain-derived neurotrophic factor's mimetics effects at the experimental depression model. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):11–17. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-11-17

Введение

В последнее десятилетие появилось много экспериментальных данных, связывающих развитие депрессии с нарушениями процессов нейропластичности в гиппокампе и префронтальной коре, обусловленными дефицитом нейротрофинов, в частности мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF) и фактора роста нервов (nerve growth factor, NGF) [1, 2]. Сниженный уровень BDNF и NGF в гиппокампе зарегистрирован у больных, страдавших депрессией, а также жертв суицида [3]. Показано антидепрессивноподобное действие при введении BDNF [4] и NGF [5] в экспериментах с использованием различных моделей депрессии на лабораторных животных.

Однако терапевтическое использование полноразмерных нейротрофинов ограничивается их не-

стабильностью в биологических жидкостях и низкой способностью проникать через гематоэнцефалический барьер в связи с их белковой природой.

Ранее в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова была высказана оригинальная гипотеза о том, что нейротрофины взаимодействуют со своими Tgk рецепторами с помощью петлеобразных структур, каждая из которых определяет особенности биологических эффектов [6]. При этом в качестве особо важных участков петель принимаются наиболее экспонированные участки – их β-изгибы. Для подтверждения этой гипотезы были сконструированы и синтезированы димерные дипептидные миметики β-изгибов отдельных петель NGF и BDNF [7–9] [Патент РФ №2410392, 2011; Патент США № 9683014 B2, 2017; Патент КНР №102365294 B, 2016; Патент ЕПВ EP 2397488, 2019; Патент Индии 296506, 2018].

Молекулы NGF и BDNF представляют собой симметричные гомодимеры, мономерные единицы которых содержат 7 β -тяжей, образующих три антипараллельные пары. При этом β -тяжи связаны тремя экспонированными наружу шпилькообразными участками, называемыми петлями 1 (остатки 28–36), 2 (43–49) и 4 (92–98) (рис. 1).

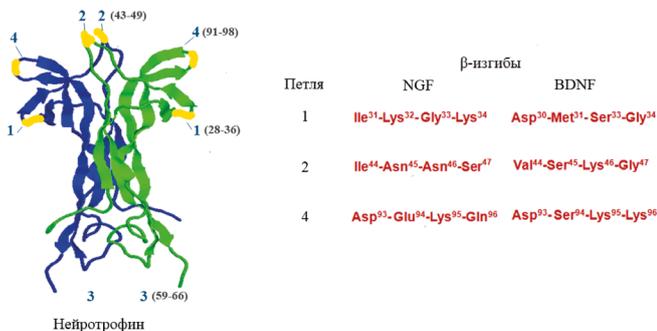


Рис. 1. Структура димера нейротрофина (PDB ID: 1btg)
 Примечания: Синим и зелёным выделены мономеры, жёлтым – β -изгибы петель нейротрофина. Указаны номера петель и в скобках номера входящих в них остатков

В качестве основы для моделирования были выбраны последовательности β -изгибов 1-й и 4-й петель NGF (-Lys³²-Gly³³-Lys³⁴-Glu³⁵-) и (-Asp⁹³-Glu⁹⁴-Lys⁹⁵-Gln⁹⁶-), соответственно, и 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF (-Asp³⁰-Met³¹-Ser³²-Gly³³-), (-Val⁴⁴-Ser⁴⁵-Lys⁴⁶-Gly⁴⁷-) и (-Asp⁹³-Ser⁹⁴-Lys⁹⁵-Lys⁹⁶-), соответственно (см. рис. 1). В структуре миметиков сохраняли центральный дипептидный фрагмент β -изгиба, который по геометрическим соображениям должен наиболее глубоко проникать в зону связывания рецептора и наиболее полно распознаваться им. Предшествующий аминокислотный остаток заменяли его биоизостером, так остатки Asp заменяли остатком янтарной кислоты, Val – остатком *n*-гексановой кислоты, а Lys – остатком 6-аминокапроновой кислоты. Основываясь на данных о взаимодействии нейротрофинов с Trk рецепторами в димерной форме, два миметика β -изгиба соответствующей петли были димеризованы голова-к-голове гекса- или гептаметилендиаминовым спейсером. Таким образом, были сконструированы димерные дипептидные миметики 1-й и 4-й петель NGF ГК-6 (гексаметилендиамид бис-(*N*-аминокапроил-глицил-*L*-лизина) и ГК-2 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина), и 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF ГСБ-214 (гептаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-метионил-*L*-серина), ГТС-201 (гексаметилендиамид бис-(*N*-гексаноил-*L*-серил-*L*-лизина) и ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-(*N*-моносукцинил-*L*-серил-*L*-лизина), соответственно. Сконструированные миметики были синтезированы с помощью классического пептидного синтеза в растворе [7–9].

Миметики NGF селективно активировали TrkA рецептор, а миметики BDNF – TrkB. В экспериментах

in vitro все миметики обладали нейропротекторной активностью в микро-наномолярных концентрациях и самыми активными являлись миметики наиболее экспонированной 4-й петли NGF и BDNF – ГК-2 и ГСБ-106, соответственно [6, 10–13]. Миметик 4-й петли NGF ГК-2 активировал PI3/Akt [12], а миметик 1-й петли ГК-6 – MAPK/ERK и PI3/Akt [13]. Миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106 активировал оба пути MAPK/ERK и PI3/Akt, а миметики 1-й и 2-й петель, ГСБ-214 и ГТС-201 активировали PI3/Akt и MAPK/ERK, соответственно [10, 11].

Ранее также было установлено, что миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106 оказывает антидепрессивноподобное действие в тесте вынужденного плавания на мышцах линии Balb/c [14], а также в тесте вынужденного плавания в сосуде с вращающимися колесами по Номура и в тесте подвешивания мышцей за хвост по Стеру на беспородных мышцах [15].

Целью данного исследования являлось изучение антидепрессивноподобных свойств аналога ГСБ-106 – ГСБ-106Ac, дипептидных миметиков других петель BDNF, а также дипептидных миметиков NGF с использованием теста вынужденного плавания на мышцах-самцах линии Balb/c.

Материалы и методы

Исследуемые димерные дипептиды были получены, как описано в [7–9, 14]. Их физико-химические характеристики представлены в табл. 1.

Животные. В экспериментах использовались мыши-самцы линии Balb/c массой 18–20 г из Центрального питомника Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Животные содержались в условиях вивария при естественной смене циклов «день/ночь» и со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. Содержание животных и проводимые с ними манипуляции осуществлялись в соответствии с требованиями Приказа Минздрава РФ от 01.04.2016 №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и Решения Совета ЕЭК №81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического Союза в сфере обращения лекарственных средств». Все манипуляции с животными согласованы и одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Антидепрессивную активность миметиков у мышей оценивали в тесте вынужденного плавания в соответствии с протоколом [16]. Установка для проведения теста представляет собой батарею из 5 заполненных водой цилиндров диаметром 10 см и высотой 30 см каждый, изготовленных из прозрачного пластика. Между цилиндрами установлены чёрные пластиковые непрозрачные перегородки, предотвращающие визуальный контакт животных в процессе проведения исследования. Позади цилиндров имеется чёрная

Таблица 1

Димерные дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF

Миметик	Химическое название	Петля нейротрофина	Удельный угол оптического вращения, $[\alpha]_D$, град.	Температура плавления, °C
<i>Миметики NGF</i>				
ГК-2 [9]	Гексаметилендиамид бис-(<i>N</i> -сукцинил- <i>L</i> -глутамил- <i>L</i> -лизина)	4-я	$[\alpha]^{22}_D = - 52,5^\circ$ (с 1,06; H ₂ O)	120–128 °C с разлож.
ГК-6 [Патент РФ № 2410392]	Гексаметилендиамид бис-(6-аминокапроил- <i>L</i> -глицил- <i>L</i> -лизина)	1-я	$[\alpha]^{27}_D = - 129,6^\circ$ (с 0,17; H ₂ O)	масло
<i>Миметики BDNF</i>				
ГСБ-106 [14]	Гексаметилендиамид бис-(<i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина)	4-я	$[\alpha]^{21}_D = - 42,3^\circ$ (с 1; H ₂ O)	153–161 °C
ГСБ-106Ac [7]	Гексаметилендиамид бис-(<i>N</i> -ацетил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина)	4-я	$[\alpha]^{30}_D = - 21,6^\circ$ (с 1; MeOH)	143–150 °C
ГСБ-214 [14]	Гептаметилендиамид бис-(<i>N</i> -моносукцинил- <i>L</i> -метионил- <i>L</i> -серина)	1-я	$[\alpha]^{25}_D = + 9,0^\circ$ (с 0,4; ДМФА)	162–163 °C
ГТС-201 [8]	Диацетат гексаметилендиамида бис-(<i>N</i> -гексаноил- <i>L</i> -серил- <i>L</i> -лизина)	2-я	$[\alpha]^{25}_D = - 14,9^\circ$ (с 0,6; MeOH);	110–125 °C с разлож.

пластиковая основа, поддерживающая перегородки и служащая фоном для наблюдения за поведением животных. Уровень воды (T = 22 °C) обеспечивает невозможность животному опираться на дно цилиндра лапами или хвостом. В процессе теста производится видеозапись на камеру, установленную на штативе перед установкой. Записи обрабатываются программой ANY-maze (Ирландия), в которой подсчитывают общее время иммобильности животных.

Дизайн эксперимента (рис. 2) включал:

- первую сессию плавания продолжительностью 10 мин;
- через 1 ч после первой сессии – введение миметика, препарата сравнения и физраствора;
- через 23 ч после введения – вторую сессию плавания продолжительностью 5 мин.

Миметики разводили в физрастворе и вводили внутривентриально (в/б):

- ГК-2 в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг;
- ГК-6 в дозах 1,0; 2,0 и 5,0 мг/кг;

- ГСБ-106 в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг;
- ГСБ-106Ac в дозах 0,1; 0,5; 1,0 и 5,0 мг/кг;
- ГСБ-214 в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг;
- ГТС-201 в дозах 0,1; 1,0 и 5,0 мг/кг.

Использованные дозы миметиков NGF были выбраны на основе проведённых ранее исследований другой фармакологической активности дипептидов [13, 17, 18]. ГСБ-106 вводили в дозах, в которых дипептид ранее демонстрировал антидепрессивноподобное действие в исследованиях на беспородных и линейных мышах [14, 15]. Дозы для других дипептидных миметиков BDNF были выбраны по аналогии с эффективными дозами ГСБ-106.

В качестве препарата сравнения в/б вводили раствор амитриптилина в дозе 10 мг/кг (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия; серия 20518) [19]. Контрольным животным в/б вводили 0,9 % раствор натрия хлорида (ООО «Мосфарм», Россия; серия 0130119).

Статистическую обработку результатов проводили в программе Prism (GraphPad Software Inc, США). Межгрупповые различия оценивали с использованием *U*-критерия Манна Уитни и поправки на множественность сравнения. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Тест вынужденного плавания на мышах является одним из наиболее широко применяемых методов для выявления соединений с потенциальным антидепрессивноподобным эффектом. Первоначально метод был разработан Роджером Порсолтом сначала для крыс [20], а затем – для мышей [21]. Тест основан

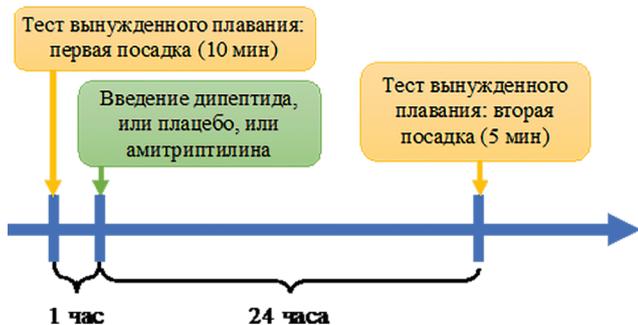


Рис. 2. Схема дизайна теста вынужденного плавания

Таблица 2

Активность дипептидных миметиков NGF и BDNF в тесте вынужденного плавания

Нейротрофин	Миметик		Доза внутривentricular введения	Время иммобильности, % от контрольной группы
	Петля, №	Шифр		
NGF	4	ГК-2	0,5 мг/кг	105,1
			1,0 мг/кг	111,3
	1	ГК-6	1,0 мг/кг	106,2
			2,0 мг/кг	86,7
			5,0 мг/кг	99,3
BDNF	4	ГСБ-106	0,1 мг/кг	76,7*
			1,0 мг/кг	80,2*
	4	ГСБ-106Ac	0,1 мг/кг	108,0
			0,5 мг/кг	95,8
			1,0 мг/кг	86,5*
			5,0 мг/кг	80,2*
	1	ГСБ-214	0,1 мг/кг	95,0
			1,0 мг/кг	93,0
	2	ГТС-201	0,1 мг/кг	105,7
			1,0 мг/кг	91,7
			5,0 мг/кг	100,0

Примечание: * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (U-критерий Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение)

на способности антидепрессантов снижать время иммобильности (неподвижной позы) при неизбежном плавании животного в цилиндре с водой, из которого нет возможности выбраться. Неподвижность животного расценивается как поведенческое отчаяние, а введение антидепрессантов вызывает сокращение

времени иммобильности по сравнению с животными, которым препараты не вводятся.

Использование мышей линии Balb/c обусловлено тем, что, согласно данным литературы, эти животные более чувствительны, чем другие, к эффектам антидепрессантов с различными механизмами действия [22]. Возможно, это объясняется тем фактом, что у мышей Balb/c увеличена экспрессия синапсоматального белка-переносчика серотонина, а также его способность обратного захвата нейромедиатора [23].

В серии опытов на мышах-самцах линии Balb/c у контрольных мышей, получавших физраствор, наблюдалась иммобильность в среднем в течение $240 \pm 4,9$ с. Амитриптилин во всех проведенных опытах статистически значимо снижал время иммобильности по сравнению с контрольными животными в среднем на 30-35 % ($p < 0,05$), что согласуется с имеющимися данными литературы [20, 24].

Результаты введения дипептидных миметиков BDNF и NGF представлены в табл. 2 и рис. 3. Среди исследуемых миметиков время иммобильности мышей в тесте вынужденного плавания снижали ГСБ-106 (миметик 4-й петли BDNF) в дозах 0,1 и 1,0 мг/кг на 23 и 19,8 %, соответственно, и его ацетильный аналог ГСБ-106Ac в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг на 14 и 20 %, соответственно. Миметики других петель BDNF не продемонстрировали антидепрессивноподобного эффекта. Не выявлено антидепрессивноподобного эффекта у миметиков NGF ГК-2 и ГК-6 при однократном в/б введении.

Таким образом, установлено, что при однократном в/б введении в тесте вынужденного плавания активность проявляют только миметики BDNF ГСБ-106 и ГСБ-106Ac.

Shirayama Y. и соавт. [25] было показано, что однократное введение BDNF непосредственно в зубчатую

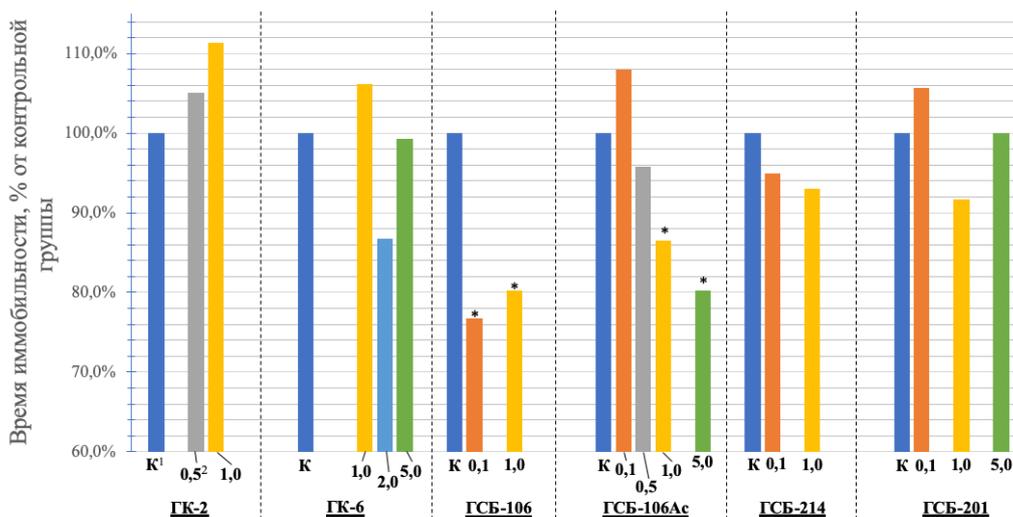


Рис. 3. Результаты введения миметиков нейротрофинов в тесте вынужденного плавания
Примечания: ¹К – контрольная группа животных; ²0,5 – все дозы представлены в мг/кг; * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой (U-критерий Манна–Уитни с поправкой на множественное сравнение).

извилину и CA3-зону гиппокампа крыс Sprague Dawley вызывает антидепрессивноподобный эффект в тесте вынужденного плавания. *Schmidt H. и Duman R.* [26] сообщали, что периферические подкожные инъекции BDNF в течение 14 дней вызывают антидепрессивный эффект у мышей в тесте вынужденного плавания.

В настоящее время в качестве потенциального антидепрессанта активно исследуется миметик BDNF – агонист высокоаффинного тирозинкиназного TrkB рецептора – 7,8-дигидроксифлавонон. Однократное в/б введение 7,8-дигидроксифлавонона мышам в модели 10-дневного социального стресса вызывает антидепрессивноподобный эффект, регистрируемый по снижению времени иммобильности [27]. Антидепрессивноподобный эффект миметика наблюдался также при 21-дневном пероральном введении мышам в тесте вынужденного плавания [28].

В экспериментальных исследованиях установлена способность 7,8-дигидроксифлавонона вызывать активацию TrkB рецепторов у мышей C57BL/6, нокаутных по BDNF^{+/-}, а также активировать пострецепторные PI3/Akt- и MAPK/ERK-сигнальные пути на культуре гиппокампальных нейронов [29].

Выявленная в тесте Порсолта антидепрессивноподобная активность миметика BDNF ГСБ-106 подтверждает результаты, полученные нами ранее с использованием других методов оценки антидепрессивной активности [15] и согласуется с вышеприведенными данными литературы о наличии антидепрессивноподобной активности у соединений-агонистов TrkB рецепторов, активирующих два основных пострецепторных сигнальных пути.

По-видимому, для проявления антидепрессивноподобной активности агонистами TrkB рецепторов требуется одновременная активация PI3/Akt- и MAPK/ERK-каскада, поскольку миметики BDNF ГСБ-214 и ГТС-201, активирующие преимущественно PI3/Akt- или MAPK/ERK-пути, соответственно, не показывают такой активности.

В отношении NGF опубликованы данные о том, что 14-дневное подкожное введение нейротрофина крысам линии Flinders Sensitive (генетическая модель депрессии на животных) способствует снижению времени иммобильности в тесте вынужденного плавания [5].

В нашем исследовании миметики NGF при однократном в/б введении мышам не проявляли активности в тесте вынужденного плавания. Возможно, однократного введения недостаточно для проявления антидепрессивноподобного эффекта миметиков NGF.

Таким образом, в исследовании показано, что выраженный антидепрессивноподобный эффект миметиков BDNF ассоциирован с активацией MAPK/ERK- и PI3/Akt-сигнальных каскадов. Для заключения об антидепрессивных свойствах миметиков NGF требуются дальнейшие исследования.

Вывод

В тесте вынужденного плавания на мышах-самцах Balb/c при однократном внутрибрюшинном введении выявлена антидепрессивноподобная активность вновь синтезированного миметика BDNF ГСБ-106Ac в дозах 1,0 и 5,0 мг/кг.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Межлумян Армен Гарикович

ORCID ID: 0000-0003-2218-1992

SPIN-код: 7888-2236

м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва

Таллерова Анна Вадимовна

ORCID ID: 0000-003-0845-9003

SPIN-код: 2826-2687

к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», Москва

Mezhlumyan Armen

ORCID ID: 0000-0003-2218-1992

SPIN code: 7888-2236

Junior researcher of the laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Tallerova Anna

ORCID ID: 0000-003-0845-9003

SPIN code: 2826-2687

PhD in Biology, Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Поварнина Полина Юрьевна

ORCID ID: 0000-0002-0463-2190

SPIN-код: 5498-6724

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

Povarnina Polina

ORCID ID: 0000-0002-0463-2190

SPIN code: 5498-6724

PhD in Biology, Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Сазонова Нелля Михайловна

ORCID ID: 0000-0002-7608-7419

SPIN-код: 8835-7887

к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Sazonova Nellya

ORCID ID: 0000-0002-7608-7419

SPIN code: 8835-7887

PhD Chemistry, Senior research scientist of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Тарасюк Алексей Валерьевич*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: tarasiuk86@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-9750-4157

SPIN-код: 9670-2415

н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Tarasiuk Aleksey*Corresponding author*

e-mail: tarasiuk86@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-9750-4157

SPIN code: 9670-2415

Researcher of laboratory of peptide bioregulators of medicinal chemistry 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

D.Sci. in Biology, professor, corresponding member of the RAS, Head of medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

- Chen Y, Lin P, Tu K. Significantly lower nerve growth factor levels in patients with major depressive disorder than in healthy subjects: a meta-analysis and systematic review. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 2015;11:925–933. DOI: 10.2147/ndt.s81432
- Mondal AC, Fatima M. Direct and indirect evidences of BDNF and NGF as key modulators in depression: role of antidepressants treatment. *Int. J. Neurosci.* 2019;129(3):283–296. DOI: 10.1080/00207454.2018.1527328
- Banerjee R, Ghosh A, Ghosh B, Bhattacharyya S. Decreased mRNA and Protein Expression of BDNF, NGF and their Receptors in the Hippocampus from Suicide: An Analysis in Human Postmortem Brain. *Clin. Med. Insights Pathol.* 2013;6:1–11. DOI: 10.4137/cpath.s12530
- Siuciak JA, Lewis DR, Wiegand SJ, Lindsay RM. Antidepressant-Like Effect of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF). *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1997;56(1):131–137. DOI: 10.1016/s0091-3057(96)00169-4
- Overstreet DH, Fredericks K, Knapp D, et al. Nerve growth factor (NGF) has novel antidepressant-like properties in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2010;94(4):553–560. DOI: 10.1016/j.pbb.2009.11.010
- Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Серединин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов // *Доклады Академии Наук.* – 2010. – Т. 434. – № 4. – С. 549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2010;434(4):549–552. (In Russ).] DOI: 10.1134/s160767291005011x
- Тарасюк А.В., Гудашева Т.А., Сазонова Н.М. и др. Анализ зависимости структура–активность в ряду аналогов ГСБ-106 – дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора // *Биоорганическая химия.* – 2014. – Т. 40. – № 2. – С. 142–156. [Tarasyuk AV, Gudasheva TA, Sazonova NM, et al. Study of structure-activity relationship among similar analogues of GSB-106, a dipeptide mimetic of a brain-derived neurotrophic factor. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2014;40(2):142–156. (In Russ).] DOI: 10.7868/S0132342314020134
- Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Шумский А.Н. и др. Синтез и нейропротекторная активность *in vitro* диастереомеров димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 // *Химико-фармацевтический журнал.* – 2018. – Т. 52. – № 8. – С. 25–31. [Sazonova NM, Tarasyuk AV, Shumskii AN, et al. Synthesis and *In Vitro* Neuroprotector Activity of Diastereoisomers of a Dimeric Dipeptide Mimetic of Nerve Growth Factor GK-2. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2018;52(8):25–31. (In Russ).] DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-8-25-31

9. Сазонова Н.М., Тарасюк А.В., Курилов Д.В., и др. Синтез димерного дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2, потенциального нейротропического препарата // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2015. – Т. 49. – № 7. – С. 10–19. [Sazonova NM, Tarasyuk AV, Kurilov DV, et al. Synthesis of GK-2, a Dimeric Dipeptide Nerve Growth Factor Mimetic and Potential Neuroprotective Agent. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2015;49(7):10–19. (In Russ).] DOI: 10.1007/s11094-015-1301-1
10. 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, 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(3):346–348. (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565215030251
11. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М. и др. Новый дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора селективно активирует сигнальный путь МАРК/Erk // *Доклады академии наук*. – 2017. – Т. 476. – № 1. – С. 108–112. [Gudasheva TA, Tarasiuk AV, Sazonova NM, et al. A novel dimeric dipeptide mimetic of the BDNF selectively activates the MAPK-Erk signaling pathway. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017;476(1):108–112. (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565217250235
12. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Создание фармакологически активной малой молекулы, обладающей свойствами фактора роста нервов // *Журнал неврологии и психиатрии*. – 2015. – Т. 115. – № 6. – С. 63–70. [Seredenin SB, Gudasheva TA. The development of a pharmacologically active low-molecular mimetic of the nerve growth factor. *Zhurnal nevrologii i psikiatrii im. S.S. Korsakova*. 2015;115(6):63–70. (In Russ).] DOI: 10.17116/jnevro20151156163-70
13. Gudasheva TA, Povarnina PY, Antipova TA, et al. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. *J. Biomed. Sci*. 2015;22(1):1–10. DOI: 10.1186/s12929-015-0198-z
14. 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):280–290. (In Russ).] DOI: 10.1134/S1068162012030053
15. 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 Pt 19):116–120. (In Russ).] DOI: 10.32607/20758251-2013-5-4-105-109
16. Can A, Dao DT, Arad M, et al. The mouse forced swim test. *J. Vis. Exp*. 2012;(59):1–5. DOI: 10.3791/3638
17. Островская Р.У., Ягубова С.С., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Низкомолекулярный миметик NGF корригирует когнитивный дефицит и депрессивные проявления при экспериментальном диабете // *Acta Naturae*. – 2017. – Т. 9. – № 2(33). – С. 100–108. [Ostrovskaya RU, Yagubova SS, Gudasheva TA, Seredenin SB. Low-Molecular-Weight NGF Mimetic Corrects the Cognitive Deficit and Depression-like Behavior in Experimental Diabetes. *Acta Naturae*. 2017;9(2 Pt 33):100–108. (In Russ).] DOI: 10.32607/20758251-2017-9-2-94-102
18. Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А., Воронцова О.Н. Антипаркинсонические свойства дипептидного миметика фактора роста нервов ГК-2 в экспериментах *in vivo* // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2011. – Т. 151. – № 6. – С. 634–637. [Povarnina PY, Gudasheva TA, Vorontsova ON, et al. Antiparkinsonian properties of a nerve growth factor dipeptide mimetic GK-2 *in vivo* experiments. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2011;151(6):634–637. (In Russ).] DOI: 10.1007/s10517-011-1417-6
19. Gupta G, Jia Jia T, Woon LY, et al. Pharmacological Evaluation of Antidepressant-Like Effect of Genistein and Its Combination with Amitriptyline: An Acute and Chronic Study. *Adv. Pharmacol. Sci*. 2015;2015:1–6. DOI: 10.1155/2015/164943
20. Porsolt RD, Le Pichon M, Jalfre M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. *Nature*. 1977;266(5604):730–732. DOI: 10.1038/266730a0
21. Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M. Behavioural despair in rats: A new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur. J. Pharmacol*. 1978;47(4):379–391. DOI: 10.1016/0014-2999(78)90118-8
22. Crowley JJ, Blendy JA, Lucki I. Strain-dependent antidepressant-like effects of citalopram in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology*. 2005;183(2):257–264. DOI: 10.1007/s00213-005-0166-5
23. Tang M, He T, Meng Q, et al. Immobility responses between mouse strains correlate with distinct hippocampal serotonin transporter protein expression and function. *Int. J. Neuropsychopharmacol*. 2014;17(11):1737–1750. DOI: 10.1017/s146114571400073x
24. Povarnina PY, Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. Antidepressant effect of an orally administered dipeptide mimetic of the brain-derived neurotrophic factor. *Acta Naturae*. 2018;10(3 Pt 38):81–83. DOI: 10.32607/20758251-2018-10-3-81-84
25. Shirayama Y, Chen AC, Nakagawa S, et al. Brain-derived neurotrophic factor produces antidepressant effects in behavioral models of depression. *J. Neurosci*. 2002;22(8):3251–3261. DOI: 10.1523/jneurosci.22-08-03251.2002
26. Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF produces antidepressant-like effects in cellular and behavioral models. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35(12):2378–2391. DOI: 10.1038/npp.2010.114
27. Zhang JC, Yao W, Dong C, et al. Comparison of ketamine, 7,8-dihydroxyflavone, and ANA-12 antidepressant effects in the social defeat stress model of depression. *Psychopharmacology*. 2015;232(23):4325–4335. DOI: 10.1007/s00213-015-4062-3
28. Liu X, Chan C, Jang S, et al. A synthetic 7,8-dihydroxyflavone derivative promotes neurogenesis and exhibits potent antidepressant effect. *J. Med. Chem*. 2010;53(23):8274–8286. DOI: 10.1021/jm101206p
29. Jang SW, Liu X, Yepes M, et al. A selective TrkB agonist with potent neurotrophic activities by 7,8-dihydroxyflavone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010;107(6):2687–2692. DOI: 10.1073/pnas.0913572107

Исследования церебропротективной активности производных имидазола и индола и их влияния на эффекты антидепрессантов

Абрамец И. И., Зайка Т. О., Евдокимов Д. В., Кузнецов Ю. В., Сидорова Ю. В.

ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк

Аннотация. *Актуальность.* Лечение депрессивных расстройств недостаточно эффективно. Для повышения эффективности лечения используют эмпирически подобранные комбинации антидепрессантов с препаратами лития и другими, которые помимо психофармакологической обладают и церебропротективной активностью. *Цель.* Изучение спектров церебропротективной активности производных бензимидазола – диакамфа и пирроло-оксиндола – соединения Р-86, а также препарата сравнения пиррацетама и их влияния на способность антидепрессантов ослаблять проявления вызванной хроническим воспалением поведенческой депрессии. *Методы.* В опытах *in vitro* на срезах дорсального гиппокампа с помощью электрофизиологических методов исследовали влияние вводимых в течение 10 дней диакамфа, соединения Р-86 и пиррацетама на вызываемые аноксией/агликемией, 1 мМ Н₂О₂ и 50 мкМ N-метил-D-аспартата повреждения пирамидных нейронов. В опытах *in vivo* моделировали вызываемую хроническим воспалением поведенческую депрессию и исследовали влияние диакамфа, соединения Р-86 и пиррацетама на вызываемые антидепрессантами ослабления основных проявлений поведенческой депрессии. *Результаты.* Установлено, что хроническое в/б введение крысам диакамфа и соединения Р-86 в дозе 10 мг/кг, и пиррацетама в дозе 100 мг/кг ослабляло повреждения пирамидных нейронов дорсального гиппокампа, вызываемые аноксией/агликемией, оксидативным стрессом и N-метил-D-аспартатом, т. е. вещества обладают церебропротективной активностью. В поведенческих опытах исследуемые вещества потенцировали влияние имипрамина, амитриптилина и кетамина на время иммобилизации крыс и показатель предпочтения раствора сахарозы при вызванной хроническим воспалением поведенческой депрессии. *Заключение.* Вещества с церебропротективной активностью потенцируют эффекты традиционных и быстродействующих антидепрессантов.

Ключевые слова: церебропротекторы; антидепрессанты; взаимодействие; поведенческая депрессия

Для цитирования:

Абрамец И.И., Зайка Т.О., Евдокимов Д.В., Кузнецов Ю.В., Сидорова Ю.В. Исследования церебропротективной активности веществ и их влияния на эффекты антидепрессантов. // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2020. – № 1. – С. 18–24. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-18-24

Researches of the imidazole and indole derivatives cerebroprotective activity and its impact on effects of antidepressants

Abramets II, Zayka TO, Evdokimov DV, Kuznetsov YV, Sidorova YV
SEO HPE "M. Gorkiy Donetsk's National Medical University", Donetsk

Abstract. *Background.* Treatment of depression disorders is insufficiently effectively. It uses for increasing of treatment efficiency empirical selected combinations of antidepressants with preparations of lithium and certain others, which possess cerebroprotective aside from psychopharmacological activity. *Purpose.* A study the spectrums of cerebroprotective activity of derivatives of benzimidazole – diacamph and of pyrrolo-oxindole – substance R-86 and referent preparation piracetam as well as its impact on ability of antidepressants to weaken the manifestation of behavioral depression evoked by chronic inflammation. *Methods.* It was investigated on slices of dorsal hippocampus *in vitro* by means of electrophysiological methods the impact of administrated during 10 days diacamph, substance R-86 and piracetam on evoked by deprivation of oxygen and glucose, 1 mM H₂O₂ and 50 μM N-methyl-D-aspartate damages of pyramidal neurons. It was simulates in experiments *in vivo* behavioral depression evoked by chronic inflammation and researched impact of diacamph, substances R-86 and piracetam on evoked by antidepressants weakening of behavioral depression main manifestations. *Results.* It was ascertained, that chronic i/p administration diacamph, substance R-86 (10 mg/kg) and piracetam (100 mg/kg) rats reduced damages of hippocampal pyramidal neurons evoked by oxygen/glucose deprivation, oxidative stress and N-methyl-D-aspartate, i. e. drugs possess by cerebroprotective activity. In behavioral experiments investigate potentiating influence of diacamph and substance R-86 on affected imipramine, amitriptyline and ketamine duration of immobilization and marker of preference sucrose solution in rat behavioral depression evoked by chronic inflammation. *Conclusion.* Drugs with cerebroprotective action potentiate effects of traditional and fast-acting antidepressants.

Keywords: cerebroprotectors; antidepressants; interaction; behavioral depression

For citations:

Abramets II, Zayka TO, Evdokimov DV, Kuznetsov YV, Sidorova YV. Researches of the drugs cerebroprotective activity and it impact on effects of antidepressants. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2020;(1):18–24. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-18-24

Введение

Лечение большого депрессивного расстройства (в дальнейшем депрессия) является довольно сложной задачей. Действительно, при использовании наиболее популярных в настоящее время антидепрессантов – селективных ингибиторов обратного захвата серотонина – терапевтический эффект развивается у 1/3 больных после нескольких недель систематического введения препаратов; у другой 1/3 больных ослабление симптомов депрессии требует введения антидепрессантов на протяжении многих месяцев или года; наконец, оставшаяся 1/3 больных вообще не реагирует на введение двух или более антидепрессантов первой линии [1]. Низкая эффективность фармакотерапии депрессии обусловлена несколькими моментами. Во-первых, у каждого больного имеется индивидуальный набор синдромов и субсиндромов (эндофенотипов), формирующих общую картину заболевания и обладающих разной чувствительностью к действию одного и того же антидепрессанта [2, 3]. Во-вторых, экспериментальные данные указывают на то, что в основе заболевания лежит атрофия нейронов в кортикальных и лимбических структурах мозга, которые контролируют эмоции и настроение. Эти атрофические изменения проявляются уменьшением объёма пирамидных нейронов, упрощением ветвления дендритов, снижением количества дендритных шипиков и, следовательно, синапсов и уменьшением объёма коры и лимбических структур [4, 5]. Следовательно, для восстановления исходной структуры нейронов на фоне фармакотерапии требуется время.

Эффективность терапии антидепрессантами снижается при затяжном или хроническом типе течения депрессивного синдрома с циркулярностью в ремиссиях и медленно нарастающей прогрессивностью. Коррекция резистентности к антидепрессантам является достаточно сложной задачей. Наиболее часто предлагается применение комбинированной терапии с добавлением или ещё одного антидепрессанта («двойная терапия»), либо препарата из другой группы, усиливающего эффект основного антидепрессанта (усиленная терапия, аугментация). При двойной терапии к ранее применяемому добавляют другой антидепрессант, причём механизм действия последнего по возможности не должен перекрываться с механизмом действия первого. Усиленная терапия подразумевает добавление другого вещества, которое само по себе не используют в качестве специфического средства для лечения депрессии, но способно усилить действие принимаемого антидепрессанта. В качестве средств, усиливающих действие антидепрессантов, используют эмпирически подобные препараты лития, противосудорожные – вальпроаты, карбамазепин, ламотриджин и атипичные антипсихотики – оланзапин, респиридон [6, 7]. Существенно, что перечисленным препаратам,

помимо их психофармакологической активности, присуще церебропротективное действие [8].

Мы попытались выяснить, способны ли фармакологические вещества с установленной церебропротективной активностью (диакамф и соединение Р-86) усиливать действие традиционных (имипрамин, амитриптилин) и быстродействующих (кетамин) антидепрессантов при вызванной хроническим воспалением мягких тканей спины поведенческой депрессии у крыс.

Материалы и методы

Реактивы

Диакамф – (±)-цис-3-(2'-бензимидазол)-1,2,2-триметилциклопентан-карбоновой кислоты гидрохлорид, соединение Р-86 – 5'-(4-метилфенил)-3'-[2-(метилтио)этил]-3а',6а'-дигидро-2'Н-спиро[индол-3,1'-пироло [3,4-с]пирол]-2,4',6'(1Н,3'Н,5'Н)-трион 5 и 10 мг/кг в/б (оба препарата синтезированы в Харьковском НФУ); пирацетам 100 мг/кг в/б (НИКО, Украина), имипрамин 5 и 20 мг/кг в/б (EGYS, Венгрия), амитриптилин 5 и 20 мг/кг в/б (Zentiva a. s., Чешская Республика) – все препараты вводили 20 дней; кетамин 5 мг/кг в/б (Биолек, Украина) вводили за 1 ч до исследований. N-метил-D-аспартат 50 мкМ (Tocris Cookson, Великобритания), глицин 1 мкМ (Олайнфарма, Латвия), водорода перекись 1 мМ (Здоровье, Украина).

Животные

Исследования выполнены на белых инбредных крысах массой 200–250 г ($n = 114$). Животные были получены из Питомника лабораторных животных республиканской СЭС. Крыс содержали в условиях вивария (20–24 °С, относительная влажность 50–70 %, 12-часовой световой цикл) по 5–6 особей в пластиковых клетках со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены комиссией по биоэтике Донецкого национального медицинского университета на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными.

Исследование церебропротективной активности веществ на срезах гиппокампа

Церебропротективную активность диакамфа, соединения Р-86 и референтного препарата пирацетама исследовали *in vitro* на срезах дорсального гиппокампа крыс. Детали метода описаны ранее [9]. Животных наркотизировали кетаминем в дозе 50 мг/кг, декапитировали и из черепа выделяли головной мозг, который тотчас охлаждали в предварительно насыщенном карбогеном растворе Кребса при температуре 4–6 °С. Далее из заднего полюса мозга с помощью вибратора готовили срезы дорсального гиппокампа толщиной 400 мкм. Срезы переносили в инкубационную камеру,

где они перфузировались стандартным раствором Кребса постоянно аэрируемым карбогеном при температуре 25 °С в течение не менее 1,5 ч. Затем каждый отдельный срез переносили из инкубационной в рабочую камеру объемом 0,5 мл, в которой их перфузировали тем же раствором со скоростью 2 мл/мин при температуре 29 °С. С помощью заполненных 2 М раствором NaCl стеклянных микроэлектродов с сопротивлением кончика 2–5 МОм внеклеточно регистрировали электрическую активность пирамидных нейронов области CA1 дорсального гиппокампа. Синаптические потенциалы – популяционные (п)ВПСП вызывали при помощи нихромового биполярного электрода, который располагали над коллатеральными Шаффера, прямоугольными импульсами тока продолжительностью 0,1 мс, частотой 1 в 20 с. Синаптические потенциалы усиливали по переменному току, оцифровывали и сохраняли на жестком диске персонального компьютера.

Одна из основных функций нейронов – генерация потенциалов действия и синаптических потенциалов. Если данное воздействие вызывает необратимое снижение амплитуд синаптических потенциалов, мы оцениваем этот эффект как проявление повреждения нейронов. С другой стороны, если на фоне хронического введения крысам фармакологического вещества степень уменьшения амплитуды от того же воздействия (повреждение нейронов) достоверно уменьшается, в этом случае мы можем думать, что вещество обладает церебропротективным действием. В качестве повреждающих пирамидные нейроны гиппокампа мы использовали следующие процедуры: аноксию/агликемию (депривация кислорода и глюкозы), воздействие перекиси водорода (оксидативный стресс) и эксайтотоксическое действие N-метил-D-аспартата (НМДА).

Аноксию и агликемию моделировали по методу Tian G, Baker AJ [10] – срезы помещали в камеру с атмосферой азота в раствор Кребса, где глюкоза была замещена эквивалентным количеством маннита на 7,5 мин при температуре 32 °С. Затем срезы переносили в инкубационную камеру в аэрируемый стандартный раствор Кребса. В электрофизиологические исследования срезы брали через 1 ч после прекращения процедуры аноксии/агликемии. Оксидативный стресс моделировали по методу de Almeida LM, et al. [11], для чего на срезы воздействовали H₂O₂ в концентрации 1 мМ в течение 30 мин. После чего срезы переносили в инкубационную камеру и через 1 ч их брали в исследования. Эксайтотоксическое действие НМДА исследовали по методу, предложенному Liu Y, et al. [12]. Для этого на срезы гиппокампа воздействовали 50 мкМ НМДА в присутствии 1 мкМ глицина в течение 15 мин. После этого срезы переносили в инкубационную камеру, где они пребывали не менее 1 ч. В электрофизиологические исследования срезы брались через 1 ч после прекращения действия НМДА.

Опытным группам крыс в/б вводили диакамф и соединение Р-86 в дозе 10 мг/кг, референтный препарат пираретам в дозе 100 мг/кг, а контрольным группам – равный объем растворителя на протяжении 10 дней.

Моделирование поведенческой депрессии

Для исследования влияния веществ с церебропротективной активностью на эффекты антидепрессантов имипрамина, amitриптилина и кетамина моделировали поведенческую депрессию по методу, описанному *Тринусом Ф.П. и соавт.* [13]. Для этого животным под кожу спины вводили 0,5 мл 9 % уксусной кислоты; сразу после этого крысам внутрибрюшинно вводили декстран в дозе 200 мг/кг. Через 2–3 дня на месте введения уксусной кислоты появлялся воспалительный инфильтрат. Об интенсивности воспалительного процесса судили по увеличению лейкоцитов в крови (до $12,65 \pm 1,14$, в сравнении с контролем $4,77 \pm 0,52$), размеру воспалительного инфильтрата (до 3 см в диаметре), повышению ректальной температуры. К проведению поведенческих исследований приступали на десятые и двадцатые сутки после введения крысам флогена.

Уровень депрессивности животных определяли по разработанной *Porsolt RD, et al.* [14] общепринятой методике в тесте вынужденного плавания. Крыс помещали в аквариумы высотой 50 см, заполненные водой на 2/3 высоты с температурой воды 22–25 °С. Регистрировали наиболее информативный показатель теста – время иммобилизации крыс, которая проявлялась вертикальным положением крыс в воде, пассивным плаванием без движений конечностями, передние лапы были прижаты к груди, задние вытянуты. Регистрировали продолжительность иммобилизации в секундах в течение сеанса вынужденного плавания, продолжительностью 300 с.

Характеризующий гедоническое поведение крыс тест предпочтения сахарозы, отражающий оценку пищевого вознаграждения, реализовали по методу *Benelli A, et al.* [15]. Для этого в первые сутки крыс помещали в индивидуальные клетки с двумя поилками, заполненными 1 % раствором сахарозы. Следующие сутки в одной поилке была вода, а в другой – раствор сахарозы. На третьи сутки в течение 23 ч животных подвергали пищевой и водной депривации, а затем на 60 мин в клетку возвращали предварительно взвешенные 2 поилки, заполненные водой и раствором сахарозы. По истечению часа поилки взвешивали. В последующие 2 ч 4-х суток животные получали пищу и воду, после чего на 21 ч их лишали пищи и воды. Затем опять на 1 ч возвращали поилки и определяли показатель (%) предпочтения потребления раствора сахарозы.

Дизайн поведенческих исследований включает следующие моменты. В течение первых 4 дней у крыс определяли исходное время иммобилизации в тесте вынужденного плавания и показатель (%) предпочтения потребления сладкого раствора по сравнению с водой. Затем крысам под кожу спины вводили 9 %

раствор уксусной кислоты. Далее регистрировали изменения параметров поведения на 10- и 20-й дни после введения флоггена. Опытным крысам ежедневно в/б вводили имипрамин и амитриптилин в дозах 20 или 5 мг/кг, диакамф, соединение Р-86, диакамф + имипрамин, соединение Р-86 + амитриптилин в дозах 5 мг/кг на протяжении 20 дней. Контрольным крысам вводили равный объём растворителя. Кетамин в дозе 5 мг/кг на фоне хронического введения диакамфа, пираретама или растворителя вводили в/б за 1 час до поведенческих исследований.

Статистическая обработка результатов

Результаты исследований обработаны общепринятыми методами вариационной статистики с помощью лицензионной программы «Medstat». В работе использовались параметрические и непараметрические методы, с учётом предварительной проверки выборок на нормальность распределения по критерию Шапиро—Уилка. Для выявления различий между выборками применяли *t*-критерий Стьюдента для парных сравнений и с поправкой Бонферрони — для множественных сравнений. Статистически достоверными различия считали при значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Воздействие на срезы гиппокампа процедуры аноксии/агликемии в течение 7,5 мин вызывало необратимые повреждения пирамидных нейронов гиппокампа, судя по уменьшению амплитуд субмаксимальных пВПСП почти на 90 % (рис. 1). В тоже время на фоне хронического введения 10 мг/кг диакамфа и соединения Р-86 эта же процедура достоверно уменьшала

амплитуду пВПСП в меньшей степени на 78,6 и 73,0 %, соответственно (см. рис. 1). Используемый в практике препарат сравнения пираретам также уменьшал степень повреждения пирамидных нейронов до 83,3 % (рис. 1).

В условиях оксидативного стресса при воздействии на срезы 1 мМ Н₂О₂ амплитуда пВПСП пирамидных нейронов уменьшалась на 79,4 %. Диакамф и соединение Р-86 достоверно ослабляли повреждение нейронов, судя по уменьшению амплитуд на 55,7 и 48,2 %, соответственно; уменьшение амплитуд пВПСП пирамидных нейронов на фоне пираретама составило 53,5 % (см. рис. 1).

Наименее интенсивное повреждение пирамидных нейронов гиппокампа вызывало воздействие на срезы НМДА в течение 15 мин — амплитуда пВПСП уменьшалась на 51,5 %. Диакамф не оказывал достоверного влияния на эксайтотоксические повреждения нейронов (см. рис. 1). Соединение Р-86 и референтный препарат пираретам ослабляли эксайтотоксические повреждения пирамидных нейронов, поскольку снижение амплитуд пВПСП на их фоне составило 35,6 и 42,1 %, соответственно (см. рис. 1).

Таким образом, диакамф и соединение Р-86, подобно препарату сравнения пираретаму, обладают церебропротективной активностью, судя по их способности защищать нейроны гиппокампа от повреждений, вызываемых разнообразными неблагоприятными процедурами.

Далее мы исследовали влияние веществ с церебропротективной активностью на эффекты антидепрессантов, оцениваемые по изменению поведенческих реакций при вызванной хроническим воспалением поведенческой депрессии. Через 20 дней после введения уксусной кислоты выявлено увеличение времени иммобилизации в тесте вынужденного плавания до $117,4 \pm 6,2$ с против $59,4 \pm 3,4$ с в контроле, но снижение показателя предпочтения раствора сахарозы до $61,2 \pm 2,7$ % против $81,9 \pm 1,9$ % у контрольных крыс. Наряду с этим наблюдали возрастание уровня тревоги у крыс, судя по уменьшению их пребывания в открытых рукавах приподнятого крестообразного лабиринта до $50,6 \pm 3,7$ с против $136,3 \pm 25,2$ с у контрольных крыс, и снижение двигательной активности в открытом поле на 45,4 %. Все эти изменения характерны для депрессивного фенотипа поведения.

Хроническое введение имипрамина в дозе 20 мг/кг достоверно уменьшало время иммобилизации крыс от $117,4 \pm 6,2$ с до $45,2 \pm 1,8$ с; в меньшей дозе 5 мг/кг имипрамин не вызывал достоверных изменений этого показателя — $98,6 \pm 7,2$ с (рис. 2). Другой трициклический антидепрессант амитриптилин в этих же дозах вызывал сходные с имипрамином эффекты, изменяя время иммобилизации до $47,2 \pm 2,5$ и $108,2 \pm 5,3$ с в дозах 20 и 5 мг/кг, соответственно (см. рис. 2). Антидепрессанты ослабляли проявления ангедонии при вызванной хроническим воспалением поведенческой

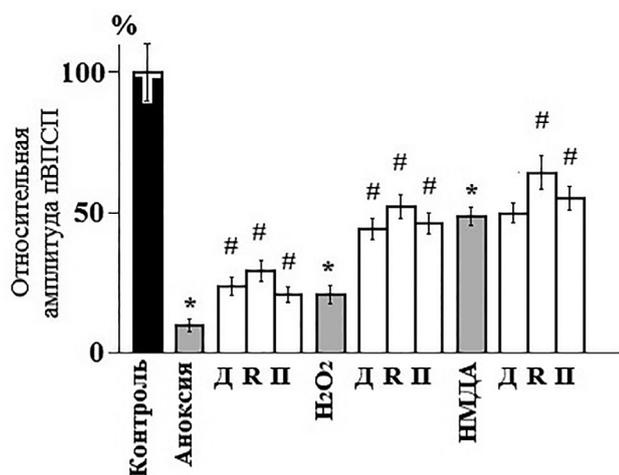


Рис. 1. Спектры церебропротективной активности диакамфа (Д), соединения Р-86 (R) и пираретама (П), оцениваемые по их способности ослаблять повреждения пирамидных нейронов гиппокампа, $M \pm SEM$

Примечания: по вертикальной шкале — относительная амплитуда пВПСП в %; * — величины достоверно отличаются от контроля; # — от повреждающего воздействия при $p < 0,05$. В каждой серии использовали по 6–8 срезов, взятых от 3–4 крыс.

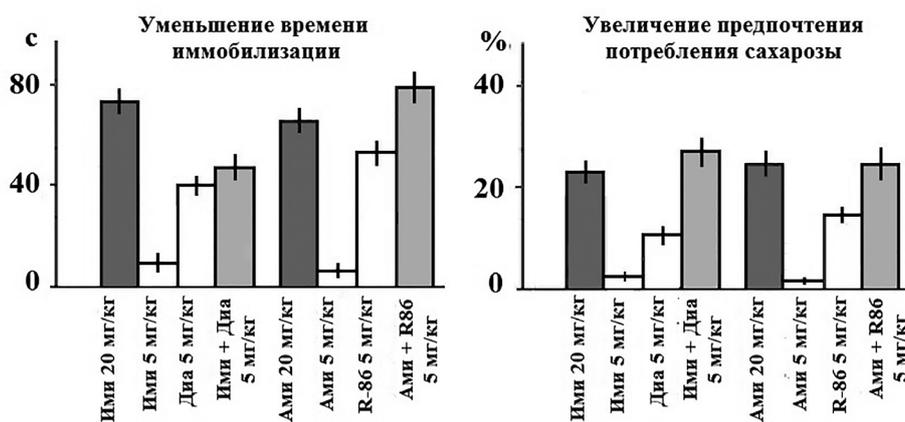


Рис. 2. Влияние различных доз антидепрессантов при раздельном и совместном с церебропротекторами хроническом введении на параметры поведения крыс, $M \pm SEM$.

Примечания: Ими – имипрамин, Ами – amitriptilin, Диа – диакаамф, R-86 – соединение P-86. По вертикальной шкале слева – время иммобилизации в с, справа – показатель предпочтения потребления сахаразы в %. Число животных (n) в каждой серии – 6.

депрессии. Так, хроническое введение имипрамина в дозе 20 мг/кг увеличивало показатель предпочтения потребления сахаразы до $84,2 \pm 5,3$ % против $61,2 \pm 3,5$ % у контрольных крыс, а меньшая доза имипрамина 5 мг/кг на этот показатель не влияла – $53,3 \pm 2,6$ % (рис. 2). Amitriptilin в дозе 20 мг/кг уменьшал проявления ангедонии – $85,5 \pm 3,4$ %, а в дозе 5 мг/кг был неэффективен – $60,1 \pm 2,7$ % (рис. 2).

Церебропротекторы диакаамф и соединение P-86 в условиях хронического в течение 20 дней введения в дозе 10 мг/кг обнаруживали антидепрессантоподобное действие, уменьшая время иммобилизации до $48,2 \pm 3,6$ с и $55,2 \pm 3,6$ с, а показатель предпочтения сахаразы увеличивая до $80,2 \pm 3,1$ % и $78,9 \pm 3,4$ %, соответственно. В половинной дозе – 5 мг/кг их активность была ниже – $65,8 \pm 3,4$ и $52,7 \pm 3,8$ с, а также $71,6 \pm 2,9$ и $77,6 \pm 3,5$ %, соответственно (рис. 2). При совместном хроническом введении 1/4 дозы имипрамина (5 мг/кг) и 1/2 дозы диакаамфа (5 мг/кг) наблюдали эффект меньший, нежели эффект от полной (20 мг/кг) дозы имипрамина, по их влиянию на время иммобилизации, но эффект равнялся сумме эффектов обоих веществ (рис. 2). Т. е. в этом случае имел место аддитивный синергизм. При совместном хроническом введении 1/4 дозы amitriptilina (5 мг/кг) и 1/2 дозы соединения P-86 (5 мг/кг) наблюдали уменьшение времени иммобилизации крыс даже в большей степени, нежели от полной (20 мг/кг) дозы amitriptilina (см. рис. 2), что указывает на потенцированный синергизм. При совместном хроническом введении 1/4 дозы имипрамина и 1/2 дозы диакаамфа, а также 1/4 дозы amitriptilina и 1/2 дозы соединения P-86 наблюдали такое же увеличение показателя предпочтения сахаразы, как и от полных (20 мг/кг) доз антидепрессантов (см. рис. 2).

Препарат сравнения пирacetam подобно соединению P-86 потенцировал влияние имипрамина на время иммобилизации и показатель предпочтения потребления сахаразы (не иллюстрировано). Таким образом, вещества с церебропротективной активностью потенцируют антидепрессивное действие имипрамина и amitriptilina при вызванной хроническим воспалением поведенческой депрессии.

Вещества с церебропротективной активностью облегчают и усиливают поведенческие эффекты не только классических трициклических антидепрессантов, но и быстродействующего антидепрессанта кетамина. Действительно, введение кетамина в дозе 5 мг/кг на фоне хронического введения диакаамфа в дозе 10 мг/кг вызывало достоверно большее снижение времени иммобилизации крыс в тесте вынужденного плавания до $57,7 \pm 3,4$ с против $70,3 \pm 3,4$ с у крыс, которым вводили растворитель (таб.). В меньшей степени кетамин в условиях хронического введения диакаамфа увеличивал показатель предпочтения потребления сахаразы до $70,9 \pm 1,8$ % против $64,3 \pm 2,5$ % у получавших растворитель крыс (см. таб.). Сходным действием обладал церебропротектор соединение P-86. Препарат в условиях хронического в течение 10 дней введения уменьшал вызываемое введением кетамина время иммобилизации крыс до $53,4 \pm 3,7$ с, а показатель предпочтения потребления сладкого раствора увеличивал до $76,5 \pm 3,4$ % против $70,3 \pm 3,4$ с и $64,3 \pm 2,5$ %, соответственно, у крыс, которым кетамин вводили на фоне хронического введения растворителя (таб.). Результаты этой серии опытов указывают на то, что вещества с церебропротективной активностью усиливают поведенческие эффекты и кетамина, как быстродействующего антидепрессанта при вызванной хроническим воспалением поведенческой депрессии.

Таблица

Влияние кетамина на фоне хронического введения диакамфа и пирацетама на параметры поведения у крыс при вызванной хроническим воспалением поведенческой депрессии. М ± SEM

Вводимые препараты	Время иммобилизации (с)	% предпочтения раствора сахарозы
Контроль (растворитель)	59,4 ± 3,4 (6)	81,9 ± 1,9 (6)
10-й день воспаления (растворитель)	123,2 ± 8,6* (8)	51,7 ± 2,4* (8)
Кетамин 5 мг/кг через 1 час после введения	70,3 ± 3,4# (8)	64,3 ± 2,5# (8)
Кетамин 5 мг/кг на фоне хронического введения соединения R-86 10 мг/кг	53,4 ± 3,7+ (6)	76,5 ± 3,4+ (6)
Кетамин 5 мг/кг на фоне хронического введения диакамфа 10 мг/кг	57,7 ± 3,4+ (6)	70,9 ± 1,8+ (6)

Примечания: В скобках указано количество животных. Показатели достоверно ($P < 0,05$) отличаются от контроля (*); от показателей на фоне воспаления (#) и от показателей при введении только кетамина (+).

По общепринятым представлениям аддитивный синергизм комбинируемых фармакологических веществ наблюдается в том случае, когда эти вещества действуют на одни и те же молекулярные мишени. В основе более выгодного с практической точки зрения потенцированного синергизма комбинируемых веществ

лежит их влияние на разные молекулярные мишени [16]. Можно думать, что потенцирование эффектов имипрамина и амитриптилина соединением Р-86 может быть обусловлено их влиянием на разные аспекты регуляции функциональной активности НМДА глутаматных рецепторов. Вероятно, соединение Р-86 неконкурентно блокирует эти рецепторы, а антидепрессанты при хроническом введении угнетают экспрессию мРНК субъединиц НМДА рецепторов и снижает их плотность в синапсах [17]. Потенцирование же антидепрессивного действия неконкурентного блокатора НМДА глутаматных рецепторов кетамина церебропротекторами может быть связано либо с присущим веществам антианоксическим, либо, более вероятно, с антиоксидантным действием.

Заключение

Таким образом, новые препараты диакамф и особенно соединение Р-86, для которых установлены индивидуальные спектры церебропротективной активности, заслуживают внимания как потенциальные лекарственные вещества. Кроме того, поскольку церебропротекторы способны ослаблять вызываемые различными воздействиями повреждения центральных нейронов, они могут быть рекомендованы для совместного применения с антидепрессантами с целью усиления действия последних.

Источник финансирования – бюджет университета.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Абрамец Игорь Игоревич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: abramets4141@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-2229-7541

SPIN-код: 9381-1762

д. м. н., профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии им. профессора И. В. Комиссарова ГОУ ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк

Abramets Igor

Corresponding author

e-mail: abramets4141@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-2229-7541

SPIN code: 9381-1762

D. Sci. in Medicine, professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology named after I.V. Komissarov SEO HPE "M. Gorkiy Donetsk's National Medical University, Donetsk

Зайка Тамара Олеговна

ORCID ID: 0000-0003-0950-5999

SPIN-код: 8344-1556

Ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии им. профессора И. В. Комиссарова ГОУ ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк

Zayka Tamara

ORCID ID: 0000-0003-0950-5999

SPIN code: 8344-1556

Assistant lecturer of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology named after I.V. Komissarov SEO HPE "M. Gorkiy Donetsk's National Medical University, Donetsk

Евдокимов Дмитрий Владимирович

ORCID ID: 0000-0003-2989-7811

SPIN-код: 2998-0084

к. м. н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии им. профессора И. В. Комиссарова ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк

Evdokimov Dmitriy

ORCID ID: 0000-0003-2989-7811

SPIN code: 2998-0084

PhD in Medicine, Associate professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology named after I.V. Komissarov, SEO HPE "M. Gorkiy Donetsk's National Medical University, Donetsk

Кузнецов Юрий Васильевич

ORCID ID: 0000-0002-8368-5644

SPIN-код: 1285-4151

к. м. н., доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии им. профессора И. В. Комиссарова ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк

Kuznetsov Yuriy

ORCID ID: 0000-0002-8368-5644

SPIN code: 1285-4151

PhD in Medicine, Associate professor of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology named after I.V. Komissarov, PhD in Med. Sciences SEO HPE "M. Gorkiy Donetsk's National Medical University, Donetsk

Сидорова Юлия Владимировна

ORCID ID: 0000-0002-1006-5217

SPIN-код: 9598-0838

к. м. н., ассистент кафедры фармакологии и клинической фармакологии им. профессора И. В. Комиссарова ГОО ВПО «Донецкий национальный медицинский университет им. М. Горького», Донецк

Sidorova Yuliya

ORCID ID: 0000-0002-1006-5217

SPIN code: 9598-0838

PhD in Medicine, Assistant lecturer of the Department of Pharmacology and Clinical Pharmacology named after I.V. Komissarov SEO HPE "M. Gorkiy Donetsk's National Medical University, Donetsk

Литература / References

1. Trivedi MH, Rush A, Wisniewsky SR, et al. Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement-based care in STAR*D: implications for clinical practice. *Am J Psychiatry*. 2006;(163):28–40. DOI: 10.1176/appi.ajp.163.1.28
2. Гарибова Т.Л., Крайнева В.А., Воронина Т.А. Поведенческие экспериментальные модели депрессии // *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. – 2017. – № 3. – С.14–19. [Garibova TL, Krajevna VA, Voronina TA. Behavioral experimental models of depression. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2017;(3):14–19. (In Russ).]
3. Marmorstein NR. Associations between subtypes of major depressive episodes and substance use disorders. *Psychiatry Res*. 2011;(186):248–253. DOI: 10.1016/j.psychres.2010.10.003
4. Duman RS, Aghajanian GK. Synaptic dysfunction in depression: potential therapeutic targets. *Science*. 2012;(338):68–72. DOI: 10.1126/science.1222939
5. Savitz J, Drevets WC. Bipolar and major depressive disorder: neuroimaging the developmental-degenerative divide. *Neurosci Biobehav Rev*. 2009;(33):699–771. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2009.01.004
6. Быков Ю.В., Беккер Р.А., Резников М.К. *Депрессии и резистентность: практическое руководство для врачей*. – М.: Риор: инфра-м. – 2013; 374 с. [Bykov YV, Bekker RA, Reznikov MK. *Depressiya i rezistentnost: prakticheskoe rukovodstvo dlya vrachey*. Moscow: Riор: infra-m. 2013; 374 p. (In Russ).]
7. Дамулин И.В., Суворова И.А. Современная концепция повышения эффективности терапии антидепрессантами // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2015. – № 115. – С. 106–112. [Damulin IV, Suvorova IA. Modern conception of increasing efficacy of therapeutics by antidepressant. *SS Korsakov Zhurnal Neurology and Psychiatry*. 2015;(115):106–112. (In Russ).]
8. Chuang DM, Priller J. Potential use of lithium in neurodegenerative disorders. In: Bauer M, Grof P, Muler-Oerlingausen B (eds). *Lithium in Neuropsychiatry: The Comprehensive Guide*. Taylor & Francis: London. 2006; p. 381–397.

9. Абрамец И.И., Евдокимов Д.В., Талалаенко А.Н. и др. Центральная глутаматергическая синаптическая передача при поведенческой депрессии у крыс // *Нейронауки: теор. та клін. аспекти*. – 2006. – № 2. – С. 22–30. [Abramets II, Evdokimov DV, Talalayenko AN, et al. Central glutamatergic synaptic transmission under behavioral depression in rats. *Neyronauki: teor ta klin aspekty*. 2006;(2):22–30. (In Russ).]
10. Tian G-F, Baker AJ. Protective effect of high glucose against ischemia-induced synaptic transmission damage in rat hippocampal slices. *J Neurophysiol*. 2002;88:236–248. DOI: 10.1152/jn.00572.2001
11. de Almeida LM, Leite MC, Tomazi AP, et al. Rosveratrol protects against oxidative injury induced by H₂O₂ in acute hippocampal slice preparations from Wistar rats. *Arch Biochem Biophys*. 2008;480:27–32. DOI: 10.1016/j.abb.2008.09.006
12. Liu Y, Wong TP, Aarts M, et al. NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death *in vitro* and *in vivo*. *J Neurosci*. 2007;27:2846–2857. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0116-07.2007
13. Тринус Ф.П., Мохорт Н.А., Клебанов Б.М. *Нестероидные противовоспалительные средства*. – Киев: Здоровья; 1975. [Trinus FP, Mokhort NA, Klebanov BM. *Nesteroidnye protivovospalitel'nye sredstva*. Kiev: Zdorov'ya; 1975. (In Russ).]
14. Porsolt RD, Bertin A, Jalfre M. "Behavioural despair" in rats and mice: strain differences and the effects of imipramine. *Eur J Pharmacol*. 1978;51:291–294. DOI: 10.1016/0014-2999(78)90414-4
15. Benelli A, Filafferro M, Bertolini A, et al. Influence of S-adenosyl-L-methionine on chronic mild stress-induced anhedonia in castrated rats. *Brit J Pharmacol*. 1999;127:645–654. DOI: 10.1038/sj.bjp.0702589
16. Харкевич Д.А. *Фармакология: учебник для ВУЗов*. 12-е изд. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017: с. 62–71. [Kharkevich DA. *Pharmacologiya: uchebnik dlya VUZov*. 12-e izd. Moscow: GEOTAR-Media; 2017: p. 62–71. (In Russ).]
17. Skolnick P, Popik P, Trullas R. Glutamate-based antidepressants: 20 years on. *Trends Pharmacol Sci*. 2009;30:563–569. DOI: 10.1016/j.tips.2009.09.002

Взаимосвязь между содержанием потенциального психофармакологического средства цикло-*L*-пролилглицина в мозге экспериментальных животных и его антигипоксическим эффектом

Жердев В. П., Бойко С. С., Колясникова К. Н.

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

Аннотация. При изучении структурной и внутриклеточной локализации цикло-*L*-пролилглицина (ЦПГ) в мозге в эксперименте на белых беспородных крысах-самцах установлено, что ЦПГ в большей степени определяется в гиппокампе и коре головного мозга с преимущественной локализацией в ядерной фракции мозга крыс; в митохондриальной и микросомальной фракциях ЦПГ определяется примерно в одинаковой концентрации с небольшим количественным преимуществом во фракции микросом. В эксперименте с использованием инбредных мышей 2 линий – C57Black/6 и BALB/c, различающихся по поведению, противоположной эмоциональной реакции на стресс и гипоксическому воздействию показано, что содержание ЦПГ в мозге мышей линии C57Black/6 на 39 % больше, чем в мозге мышей стресс-неустойчивой линии BALB/c, что, вероятно, и связано с различиями в проявлении его антигипоксического эффекта.

Ключевые слова: цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ); содержание ЦПГ в мозге; антигипоксический эффект ЦПГ; инбредные мыши C57Black/6 и BALB/c

Для цитирования:

Жердев В.П., Бойко С.С., Колясникова К.Н. Взаимосвязь между содержанием потенциального психофармакологического средства цикло-*L*-пролилглицина в мозге экспериментальных животных и его антигипоксическим эффектом // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 1. – С. 25–29. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-25-29

The relationship between the content of the potential psychopharmacological agent cyclo-*L*-prolylglycine in the brain of experimental animals and its antihypoxic effect

Zherdev VP, Boyko SS, Kolyasnikova KN

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. In the study of structural and intracellular distribution of cyclo-*L*-prolylglycine (CPG) in brain rats in experiments on mongrel white male rats, it was found that CPG determined more in the hippocampus and cerebral cortex with predominant localization in the nuclear fraction of the rat brain, in the mitochondrial and microsomal fractions CPG is distributed approximately equivalently with a small quantitative predominance in the microsomal fraction. In an experiment using inbred mice of 2 lines: C57Black/6 and BALB/c, differing in behavior, opposite emotional response to stress, hypoxic influence. It was shown that the content CPG mice of the C57black/6 line are 39 % larger than in the brains of mice of the stress-unstable BALB/c line, which is probably due to differences in the manifestation of its it was shown that the content of CPG in the brain of stress-resistant mice C57Black/6 more than 39 % compared with the content of GPG in brain of mice BALB/c and the relationship between the quantitative content of CPG in the brain of these experimental animals and the manifestation of its antihypoxic effect was established.

Keywords: cyclo-*L*-prolylglycine (CPG); content of CPG in brain; antihypoxic effect of CPG; inbred mice C57Black/6 and BALB/c

For citations:

Zherdev VP, Boyko SS, Kolyasnikova KN. The relationship between the content of the potential psychopharmacological agent cyclo-*L*-prolylglycine in the brain of experimental animals and its antihypoxic effect. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):25–29. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-25-29

Введение

Циклические дипептиды широко распространены в природе, являются продуктами энзиматического расщепления концевых фрагментов природных нейропептидов, обладают собственной фармакологической активностью и вносят свой вклад в реализацию фармакологических эффектов эндогенных нейропептидов. Новый дипептид циклической структуры – цикло-*L*-пролилглицин (ЦПГ) был впервые обнаружен нами при изучении фармакокинетики ноотропного препарата ноопепт в качестве его активного метаболита [1, 2], затем ЦПГ был идентифицирован как эндогенное соединение в мозге крыс, определено его количествен-

ное содержание, которое составило 2,8 нм/г влажной массы мозга крыс. Показана методами GC-HPLC-MS-MS идентичность метаболита ноопепта и эндогенного соединения циклической структуры – дипептида ЦПГ [3, 4]. При изучении фармакологической активности синтезированного аналога эндогенного ЦПГ показано, что он проявляет ноотропный, нейропротективный и анксиолитический эффекты [5–7], для анксиолитической активности была выявлена селективная зависимость эффекта от фенотипа экспериментальных животных и различного содержания ЦПГ в мозге мышей 2-линий – C57Black/6 и BALB/c [8, 9]. В данной работе представлены результаты изучения антигипоксического эффекта ЦПГ у беспородных и инбредных

мышей линий C57Black/6 и BALB/c, отличающихся по типу эмоционально-стрессовой реакции, поведению и реакции на введение лекарственных веществ и фармакологических препаратов. Целью данной работы явилось количественное определение содержания ЦПГ в целом мозге беспородных и инбредных животных указанных линий, а также изучение его региональной локализации и внутриклеточного распределения по структурам головного мозга и сопоставление с его антигипоксическим эффектом.

Методы исследования

Исследование содержания ЦПГ в целом мозге экспериментальных животных и его региональной и внутриклеточной локализации проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 220–250 г и мышьях-самцах 2 линий – C57Black/6 и BALB/c массой 18–22 г. Идентификацию и количественное определение ЦПГ в целом мозге и его структурах у беспородных крыс, а также в мозге линейных животных проводили методами ГЖХ-ВЭЖХ-МС/МС [3, 4]. Антигипоксический эффект ЦПГ изучали с использованием метода нормобарической гипоксии, который оценивали по продолжительности жизни экспериментальных животных [10, 11]. Все экспериментальные животные были получены из Центрального питомника лабораторных животных Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, Московская область. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и нормативным документам «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев», утверждённым Главным Государственным санитарным врачом 06.04.1973 г. №1045-73 и Приказом МЗ РФ № 199 от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Эксперименты проводили с 10 до 16 ч. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Результаты и обсуждение

Ранее было показано, что ЦПГ, обнаруженный в качестве активного метаболита ноотропного препарата ноопепт, в мозге крыс определяется в более высокой концентрации по сравнению с плазмой, имеет продолжительный период полувыведения из мозга крыс [1, 2, 10], что свидетельствует о его энзиматической устойчивости и высокой тропности к ткани мозга крыс. Кроме того, величина площади под фармакокинетической кривой в мозге была на 39 % выше по сравнению с этим параметром в плазме крови крыс, что также свидетельствует о хорошей абсорбции ЦПГ тканью мозга крыс, высокой тканевой биодоступности мозга к этому нейропептиду, его энзиматической устойчивости и косвенно указывает на

его возможную структурную близость к эндогенным нейропептидам мозга крыс. При анализе полученных экспериментальных данных методами ВЭЖХ- и ГЖХ-масс-спектрометрии была показана идентичность метаболита ноопепта ЦПГ эндогенному нейропептиду и определено его количественное содержание в целом мозге, которое составило 2,8 нмоль/г влажной массы мозга беспородных крыс [3, 4]. В дальнейшем было проведено изучение региональной и внутриклеточной локализации эндогенного ЦПГ в структурах мозга крыс, связанных с реализацией его основных фармакологических эффектов, и было показано его неравномерное распределение как по структурам, так и субклеточным фракциям мозга крыс. Полученные результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Региональная локализация и внутриклеточное распределение эндогенного ЦПГ в мозге беспородных белых крыс-самцов

Региональная локализация ЦПГ	ЦПГ, нмоль/г	Внутриклеточное распределение ЦПГ	Содержание ЦПГ, %
Целый мозг	2,82 ± 0,68	Ядерная фракция	60 ± 0,65
Кора мозга	3,89 ± 0,85	Митохондриальная фракция	18 ± 0,28
Гиппокамп	12,64 ± 3,24	Фракция синапсом (нейрональная фракция)	22 ± 0,32

Так, в наиболее высокой концентрации ЦПГ определяется в гиппокампе и, в меньшей степени, в коре головного мозга – структурах, принимающих участие в реализации основных фармакологических эффектов лекарственных веществ и осуществлении когнитивных и антистрессорных процессов. Сходное распределение в мозге крыс с преимущественной локализацией в коре и гиппокампе известно и для других эндогенных нейропептидов [11–13]. При изучении субклеточного распределения ЦПГ было показано, что 60 % ЦПГ определяется в ядерной фракции мозга крыс, что может указывать на его взаимодействие с ядерными рецепторами, в то время как в синапсомальной и митохондриальной фракциях его содержание было существенно ниже и распределено почти эквивалентно с небольшим преимуществом в нейрональной фракции мозга крыс. Аналогичная локализация и внутриклеточное распределение показано также для *cyclo-His-Pro* – фрагмента тиреолиберина [12]. Полученные данные могут иметь значение при изучении фармакологических эффектов ЦПГ.

Ранее была показана селективность анксиолитического эффекта ЦПГ, в большей степени проявляющегося у мышей линии BALB/c, которая исходно характеризуется более высоким уровнем тревожности по сравнению со стресс-устойчивой линией C57Black/6,

и взаимосвязь этого эффекта с содержанием ЦПГ в мозге этих животных: так, содержание ЦПГ в мозге активной линии C57Black/6 было на 39 % выше по сравнению с его содержанием в мозге мышей линии BALB/c с противоположной реакцией на стресс [8, 9]. В табл. 2 представлены результаты изучения количественного определения содержания ЦПГ в целом мозге инбредных мышей.

Таблица 2

Содержание эндогенного ЦПГ в мозге мышей 2 линий

Масса мозга (г) C57Black/6	Масса мозга (г) BALB/c	Содержание ЦПГ, нМ/1 г влажной массы мозга C57Black/6	Содержание ЦПГ, нМ/1 г влажной массы мозга BALB/c
0,373 ± 0,038	0,343 ± 0,042	0,073 ± 0,058	0,045 ± 0,06

Достоверность различий при $p < 0,05$. В эксперименте объединяли образцы мозга от 3 особей.

Антигипоксический эффект ЦПГ сначала был изучен у беспородных мышей после его внутрибрюшинного введения в максимально эффективной дозе 1 мг/кг. Было показано, что ЦПГ обладает быстро наступающим (в течение 5 мин) после введения и продолжительным, сохраняющимся в течение 1 ч антигипоксическим эффектом [7]. Продолжительность эффекта ЦПГ свидетельствует о его энзиматической стабильности и соответствует представлению об устойчивости циклических дипептидов к воздействию протеолитических ферментов [10, 13]. Принимая во внимание полученные результаты и, учитывая фармакогенетическую концепцию о межлинейных различиях реакции на внешние воздействия 2 линий животных C57Black/6 и BALB/c, антигипоксический эффект ЦПГ был изучен у мышей указанных линий. Результаты изучения антигипоксического эффекта ЦПГ у линейных мышей в сравнении с беспородными представлены в табл. 3.

При сравнении антигипоксической активности ЦПГ было установлено, что в контрольной груп-

Таблица 3

Антигипоксический эффект ЦПГ в максимально эффективной дозе 1 мг/кг в тесте нормобарической гипоксии у беспородных и инбредных мышей

Животные	Контроль (время жизни, в мин)	ЦПГ (1мг/кг)	Активность в % от контроля
Белые беспородные мыши	20,89 ± 1,46	25,00 ± 1,75	120 ^{##}
Мыши C57Black/6	29,14 ± 2,33	28,00 ± 1,95	96
Мыши BALB/c	28,14 ± 1,91	31,71 ± 2,25	113 [#]

Примечания: # – $p < 0,05$, ## – $< 0,01$ по сравнению с контролем.

пе беспородных мышей продолжительность жизни меньше, чем у линейных животных, при этом, антигипоксический эффект ЦПГ в группе беспородных животных наиболее выражен: продолжительность жизни увеличивается на 120 %. У мышей линии BALB/c продолжительность жизни при введении ЦПГ в тесте нормобарической гипоксии увеличивалась несколько меньше и составляла 113 %, при этом ЦПГ практически не влиял на этот тест у мышей линии C57Black/6 [7], что находится в соответствии со значительно более высоким уровнем ЦПГ у устойчивой к гипоксии линии мышей C57Black/6, который на 39 % больше по сравнению с его содержанием у мышей линии BALB/c [8, 9]. Эти данные по различному проявлению антигипоксического эффекта у линейных животных аналогичны результатам изучения анксиолитического эффекта, для которого установлена его селективность у мышей с противоположной реакцией на стресс [8, 9]. Таким образом, полученные результаты о различном проявлении антигипоксического эффекта и ранее выявленной селективности анксиолитического эффекта у мышей линий C57Black/6 и BALB/c свидетельствуют о связи между разным содержанием ЦПГ в мозге линейных мышей и разной реакцией на стресс и гипоксическое воздействие. В большей степени эта реакция выражена у мышей линии BALB/c, у которых содержание ЦПГ в мозге значительно меньше, чем у животных линии C57Black/6. Дефицит эндогенного ЦПГ у стресс-неустойчивых животных приводит к изменению поведения животных, нарушению их когнитивных функций, в связи с чем можно предположить, что ЦПГ выполняет физиологическую роль эндогенного анксиолитика. Таким образом, как антигипоксический, так и анксиолитический эффекты ЦПГ связаны с его содержанием в мозге экспериментальных животных. Однако указанные эффекты в полной мере не определяются только различием содержания ЦПГ в мозге инбредных животных, но указывают на его возможное влияние на NMDA и ГАМК-рецепторы, а также другие системы, связанные с реализацией этих эффектов [14–16].

Заключение

Открытие ЦПГ в мозге экспериментальных животных дополнило имеющиеся данные литературы об уже известных дипептидах циклической структуры, являющихся продуктами гидролитического расщепления концевых групп природных нейропептидов, обладающих собственной фармакологической активностью и, кроме того, выполняющих физиологическую роль, связанную с синтезом эндогенных нейропептидов «de novo». Наиболее изученным из известных дипептидов является дипептид цикло-His-Pro – концевой фрагмент эндогенного нейропептида тиреолиберина, для него и некоторых других дипептидов изучено их распределение в организме экспериментальных живот-

ных, в том числе в мозге и его структурах [11–13]. Что касается ЦПГ, то имеются зарубежные публикации о том, что он предположительно является метаболитом энзиматически нестабильного N-концевого трипептида Gly-Pro-Glu инсулиноподобного фактора роста IGF-1, который циклизуется с образованием ЦПГ [17]. При изучении антигипоксической активности ЦПГ показано, что ЦПГ обладает быстро нарастающим и сохраняющимся в течение 1 ч после введения антигипоксическим эффектом у беспородных животных и проявляется в большей степени у мышей менее устойчивой к гипоксии линии BALB/c, что соответствует низкому уровню ЦПГ у этой линии животных по сравнению с его содержанием у мышей линии C57Black/6, устойчивых к гипоксии и стрессу, а также к воздействию фармакологических препаратов и лекарственных веществ (мексидолу, бемитилу, пантогаму, семаксу, леветирацетаму, пирарцетаму и др.). Полученные данные указывают на непосредственное

участие ЦПГ в реализации антигипоксического и анксиолитического эффектов, интенсивность проявления которых связана с фенотипом мышей и с различным содержанием ЦПГ в мозге экспериментальных животных.

Выводы

1. Установлено, что ЦПГ в большей степени определяется в гиппокампе и коре головного мозга беспородных крыс-самцов с преимущественной локализацией в ядерной фракции мозга.

2. Установлена зависимость антигипоксического и анксиолитического эффектов ЦПГ от фенотипа инбредных животных и содержания ЦПГ в мозге животных, а именно, у стресс-устойчивых и устойчивых к гипоксии мышей линии C57Black/6 содержание ЦПГ значительно выше (на 39 %) по сравнению с его содержанием в мозге мышей линии BALB/c.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Бойко Светлана Семёновна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: svboyko@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN-код: 8755-7666

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

Boyko Svetlana

Corresponding author

e-mail: svboyko@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2177-2010

SPIN code: 4176-8921

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

Жердев Владимир Павлович

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN-код: 2213-9592

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

Zherdev Vladimir

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN code: 2213-9592

D., Sci. in Medicine, professor, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Колясникова Ксения Николаевна

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN-код: 5682-2035

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

Koliasnikova Ksenia

ORCID ID: 0000-0001-6797-692X

SPIN code: 5682-2035

PhD in Biology, Research scientist of laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Бойко С.С., Жердев В.П., Гудашева Т.А., Островская Р.У. и др. Фармакокинетика дипептидного аналога пирарцетамы с ноотропной активностью ГВС-111 и его основных метаболитов // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 1997. — Т. 72. — № 2. — С. 3–6. [Boyko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, et al. Pharmacokinetics of dipeptide analog pyracetame with nootropic activity GWS-111 and its main metabolites. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 1997;72(2):3–6. (In Russ).]

2. Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А., и др. Фармакокинетика нового потенциального ноотропного дипептидного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс // *Химико-фармацевтический журнал*. — 2001. — Т. 35. — № 9. — С. 11–13. [Boyko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA, et al. Pharmacokinetics of new potential dipeptide nootrope GWS-111 and its main metabolites in rat brain. *Khimico-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2001;35(9):11–13. (In Russ).] DOI:10.1023/A^10140824082406443

3. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine

in rat brain. *FEBS Leters.* 1996; 391(1-2):149–152. DOI 10.1016/0014-5793(96)00722-311.

4. Gudasheva TA, Boyko SS, Ostrovskaya RU, et al. The major metabolite of dipeptide piracetam analogue GVS-111 in rat brain and similarity to endogenous neuropeptide cyclo-prolylglycine. *Eur. J. Drug Metabol. and Pharmacokin.* 1997;22(3):245–252. DOI: 1007/BF03189814

5. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С. и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 1999. — Т. 128. — № 10. — С. 411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. New endogenous dipetide cycloprolyl-glicine is similar to piracetam by its mnemotropic selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 1999;128(10):411–413. (In Russ).]

6. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* — 2002; — Т. 65. — № 5. — С. 66–72. [Ostrovskaya RU, Gudasheva TA, Seredenin SB. The Novel Nootropic and Neuroprotector Drug Noopept (GVS-111) *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2002;65(5):66–72. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2002-65-5-66-7211

7. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова П.Н. и др. Сходство ЦПГ с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротективному эффектам // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* — 2012. — Т. 75. — № 9. — С. 3–6. [Kolyasnicova KN, Gudasheva TA, Nasarova GA, et al. Similarity of cycloprolylglycine to piracetam in antigypoxic and neuroprotective effects. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2012;75(9):3–6. (In Russ).]

8. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Бойко С.С., Ковалев Г.И., и др. Эндогенный дипептид циклопролилглицин проявляет селективную анксиолитическую активность у животных с выраженной реакцией страха // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2002. — Т. 4. — С. 417–419. [Seredenin SB, Gudasheva TA, Boyko SS, Kovalev GI, et al. Endogenous dipeptide cycloprolylglicine shows selektivnyuyu anksioliticescuyu activity in animals with a pronounced fear reaction. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2002;(4):417–419. (In Russ).]

9. Бойко С.С., Гудашева Т.А., Жердев В.П., Середенин С.Б. Региональная и субклеточная локализация циклопролилглицина в мозге крыс // *Бюлл. exper. биол. и мед.* — 2010. — Т. 149. — № 6. — С. 648–650. [Boiko SS, Gudasheva TA, Zherdev VP, Seredenin SB. Regional and subcellular localization of cycloprolylglycine in the rat brain. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 2010;149(6):648–650. (In Russ).]

10. Ковалев Г.И., Золотарев Ю.А., Дадаян А.К. и др. Изучение фармакокинетики 3 Н —циклопролилглицина в крови крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* — 2018. — № 3. — С. 48–54. [Kovalev GI,

Zolotarev YuA, Dadayan AK, et al. The Study of Cycloprolylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;(30):48–54. (In Russ).] DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10024

11. Судаков С.К., Теребилина Н.Н., Медведева О.Ф. и др. Изменение содержания субстанции Р, пептида, угнетающего связывание диазепам, и нейропептида Y в мозге высокотревожных и низкотревожных инбредных мышей в условиях стресса // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 1999. — № 9. — С. 254–257. [Sudakov SK, Terebilina NN, Medvedeva OF, et al. Changes in the content of substance P, peptide inhibiting the binding of diazepam, and neuropeptide Y in the brain of high-anxiety and low-anxiety inbred rats under stress. *Bulletin of experimental biology and medicine.* 1999; (9):254–257. (In Russ).]

12. Prasad CH, Mori M, Pierson W, et al. Development changes in the distribution of rat brain pyroglutamate aminopeptidase, a possible determinant of endogenous cyclo (HIS-PRO) concentrations. *Neurochemical Research.* 1983;8(3):389–399.

13. Prasad CH. Bioactive Cyclic Dipeptides. *Peptides.* 1995;16(1):151–164. DOI: 10.1016/0196-9781(94)00017-Z.

14. Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Незнамов Г.Г., Ковалев Г.И. Сравнение поведенческих и нейрорецепторных эффектов пантогама и бемитила при одно- и многократном введении мышам C57BL/6 и Balb/c // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* — 2015. — № 1. — С. 44–51. [Kondrakhin EA, Salimov RM, Nesnamov GG, Kovalev GI. Comparison of behavior and neuroreceptor effects of pantogam and bemil with single and multiply injections in mice of C57BL/6 and Balb/c. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2015;(1):44–51. (In Russ).]

15. Ковалев И.Г., Васильева Е.В., Боков Р.О., Ковалев Г.И. Изучение эффектов леветирацетама и нового производного 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 в закрытом крестообразном лабиринте у мышей линий Balb/c и C57BL/6 // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* — 2017. — № 2. — С. 25–29. [Kovalev IG, Vasileva EV, Bokov RO, Kovalev GI. The effects of levetiracetam and a new 4-phenylpyrrolidone derivate GIZh-290 in a closed cross-maze in BALB/c and C57 Bl/6 mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2017;(2):25–29. (In Russ).]

16. Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Ковалев Г.И. Сравнение фармакологических эффектов гептапептида селанка при внутривентральном и интраназальном введении мышам Balb/c и C57BL // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* — 2017. — № 3. — С. 3–6. Vasileva EV, Salimov RM, Kovalev GI. Comparison of pharmacological effects of heptapeptide selank in intraperitoneale and intranasale injection. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2017;(3):3–6. (In Russ).]

17. Guan J, Gluchman P, Yang P, et al. Cyclic glycine-proline regulates IGF-1 homeostasis by altering the binding of IGFBR-3 to IGF-1. *Sci. Rep.* 2014;(4):4388. DOI: 10.1038/srep0488

Исследование аллергизирующих свойств и иммуно-токсичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106

Коваленко Л. П., Коржова К. В., Журиков Р. В., Никитин С. В., Дурнев А. Д.

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

Аннотация. Проведено исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия готовой лекарственной формы препарата ГСБ-106. Исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия ГСБ-106 выполнено на самцах морских свинок альбиносов массой 250–300 г и на самцах мышей линий СВА, С57BL/6, гибридах F1 (СВАхС57BL/6). При оценке иммунотоксичности ГСБ-106 вводили мышам перорально 14 дней в дозах 2,2 мг/кг и 22 мг/кг, при изучении аллергенности ГСБ-106 морским свинкам альбиносам вводили препарат в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, согласно стандартным схемам иммунизации. Результаты проведенного исследования иммунотоксичности и аллергенности ГСБ-106 позволяют заключить, что введение готовой лекарственной формы препарата ГСБ-106 в диапазоне изученных доз не оказывает иммунотоксического действия и не обладает аллергизирующими свойствами.

Ключевые слова: готовая лекарственная форма ГСБ-106; фагоцитоз; хемилюминесценция; гуморальный иммунный ответ; клеточный иммунный ответ; иммунотоксичность; реакция системной анафилаксии; гиперчувствительность замедленного типа; реакция воспаления на Кон А

Для цитирования:

Коваленко Л.П., Коржова К.В., Журиков Р.В., Никитин С.В., Дурнев А.Д. Исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксичности готовой лекарственной формы дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 1. – С. 30–33. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-30-33

Evaluation of allergenic properties and immunotoxicity of dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106

Kovalenko LP, Korzhova KV, Zhurikov RV, Nikitin CB, Durnev AD

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Abstract. The study of allergenic properties and immunotoxic effects of the ready-to-use drug form of GSB-106 was carried out. The study of allergenic properties and immunotoxicity of GSB-106 was performed on male albino guinea pigs weighing 250-300 g and on male CBA, C57BL / 6, F1 hybrids (CBAxС57BL / 6) mice. When assessing immunotoxicity, GSB-106 was inject to mice per os for 14 days in doses of 2.2 mg / kg and 22 mg / kg. When studying the allergenicity, GSB-106 was injected to albino guinea pigs in doses of 1 mg / kg and 10 mg / kg according to standard regimens of immunization. The results of the study of the immunotoxicity and allergenicity of GSB-106 allow us to conclude that the injection of the ready-to-use drug form of GSB-106 in the range of studied doses does not have an immunotoxic effect and does not have allergenic properties.

Keywords: dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106; phagocytosis; chemiluminescence; humoral immune response; cellular immune response; immunotoxicity; systemic anaphylaxis; delayed hypersensitivity; concanavalin A-induced inflammation

For citations:

Kovalenko LP, Korzhova KV, Zhurikov RV, Nikitin CB, Durnev AD. Evaluation of allergenic properties and immunotoxicity of dipeptide mimetic of brain-derived neurotrophic factor GSB-106. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):30–33. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-30-33

Введение

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезирован димерный дипептидный миметик 4-й петли BDNF ГСБ-106 (гексаметилен-диамид бис(моносукцинил-серил-лизина). ГСБ-106 обладает нейротрофической активностью и создан для лечения нейродегенеративных и психических заболеваний, включая депрессию, биполярные расстройства и шизофрению [1].

Целью данной работы являлось изучение аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия готовой лекарственной форма ГСБ-106.

Материалы и методы

Исследование аллергизирующих свойств и иммунотоксического действия готовой лекарственной формы ГСБ-106 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 «Столбовая» и «Андреевка».

При оценке иммунотоксичности ГСБ-106 мышам опытных групп 14 дней перорально вводили лекарственную форму препарата в дозах 2,2 мг/кг и 22 мг/кг (активного вещества), при изучении аллергенности

ГСБ-106 морским свинкам альбиносам вводили препарат в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг, согласно стандартным схемам иммунизации. При изучении иммунотоксичности в качестве контроля мышам контрольных групп вводили дистиллированную воду, при изучении аллергенности – воду для инъекций. Каждая группа включала 10 животных.

При изучении иммунотоксичности ГСБ-106 использовали следующие методы:

- определение массы и клеточности органов иммунной системы мышей-гибридов F₁ (СВАхС57ВL/6);
- оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов мышей-гибридов F₁ (СВАхС57ВL/6);
- оценка активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции на мышах-гибридах F₁ (СВАхС57ВL/6);
- постановка реакции гиперчувствительности замедленного типа на мышах-гибридах F₁ (СВАхС57ВL/6);
- постановка реакции гемагглютинации на мышах линии СВА и линии С57ВL/6 [3, 4].

При оценке аллергенности ГСБ-106 проводили постановку реакции общей системной анафилаксии и активной кожной анафилаксии на морских свинках альбиносах; при изучении реакции гиперчувствительности замедленного типа морских свинок альбиносов иммунизировали ГСБ-106 в смеси с полным адьювантом Фрейнда. Наличие псевдоаллергических реакций на готовую лекарственную форму ГСБ-106 изучали в реакции воспаления на неиммунологический активатор конканавалин А (Кон А) на мышах линии СВА [2]. Для всех показателей иммунотоксикологических исследований с нормальным распределением проводили межгрупповые сравнения по непарному *t*-критерию Стьюдента. Для множественных сравнений показателей с распределением, отличающимся от нормального, применяли непарметрический критерий Манна–Уитни, различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При оценке иммунотоксичности ГСБ-106 выявлено, что 14-дневное пероральное введение в дозе 2,2 мг/кг мышам-гибридам F₁ (СВАхС57ВL/6) не оказывало значимого влияния на массу тимуса, селезёнки и подколленных лимфатических узлов. Введение ГСБ-106 в дозе 22 мг/кг значимо ($p < 0,05$) увеличивало индекс массы селезёнки в 1,8 раза по сравнению с контрольными особями, получавшими дистиллированную воду, и не влияло на индекс массы тимуса и подколленных лимфатических узлов.

Курсовое введение ГСБ-106 в дозе 2,2 мг/кг значимо ($p < 0,05$) увеличивало фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов в 1,6 раза по сравнению с контрольной группой, получавшей дистиллированную воду (табл. 1). 14-дневное введение ГСБ-106 в дозе 2,2 мг/кг не приводило к значимому изменению по-

Таблица 1

Влияние препарата ГСБ-106 на фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов при пероральном введении в течение 14 дней

Группы, $n = 10$	ФИ (усл. ед.)
Контроль	3,0 ± 0,3
ГСБ-106, 2,2 мг/кг	4,8 ± 0,3**
ГСБ-106, 22 мг/кг	3,8 ± 0,1

Примечание: n – число животных; ** – $p < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой по непарному *t*-критерию Стьюдента.

казателей хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на опсонизированный зимозан. Введение ГСБ-106 в дозе 22 мг/кг значимо ($p < 0,05$) увеличивало уровень активированной зимозаном хемилюминесценции в 8,2 раза и значимо в 6,6 раза ($p < 0,01$) увеличивало интегральный показатель хемилюминесценции S по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Таблица 2

Влияние препарата ГСБ-106 на показатели хемилюминесцентного ответа нейтрофилов на зимозан при пероральном введении в течение 14 дней

Группы, $n = 10$	ΔI , (mv)	S, (ед.) / 10 ⁴	t_{max}
Контроль	20 (12÷35)	2,9 (2,3÷4,6)	949,1 ± 96,9
ГСБ-106, 2,2 мг/кг	56 (24÷72)	3,4 (3,0÷4,2)	925,5 ± 102,0
ГСБ-106, 22 мг/кг	163,5* (48÷320)	19,0** (6,7÷36,8)	1031,3 ± 45,2

Примечание: n – число животных; ΔI – показатель уровня активированной хемилюминесценции; S – интегральный показатель хемилюминесценции; t_{max} – время достижения максимальной интенсивности ХЛ после добавления стимула. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – достоверность различий по сравнению с контрольной группой.

Введение препарата ГСБ-106 перорально 14 дней в дозе 22 мг/кг мышам линии СВА значимо увеличивало антителообразование по сравнению с данными контрольной группы животных. Двухнедельное пероральное введение ГСБ-106 в дозах 2,2 мг/кг и 22 мг/кг мышам гибридам F₁ (СВАхС57ВL/6) в течение 14 дней не вызывало значимой стимуляции клеточного иммунитета по сравнению с контрольной группой.

Результаты проведённого исследования иммунотоксичности ГСБ-106 позволяют заключить, что введение лекарственной формы препарата ГСБ-106 в диапазоне изученных доз не оказывает иммунотоксического действия.

При оценке аллергенности введение ГСБ-106 по стандартной схеме иммунизации в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг (активного вещества) не вызывало у морских свинок альбиносов системной реакции анафилаксии и реакции активной кожной анафилаксии. После иммунизации морских свинок препаратом ГСБ-106 в

дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг в смеси с полным адьювантом Фрейнда (ПАФ) на 21-й день опыта у всех животных опытных групп при внутрикожном введении разрешающей дозы препарата не выявлено аллергических реакций замедленного типа. Однократное пероральное введение ГСБ-106 в доза 2,2 мг/кг и 22 мг/кг мышам линии СВА не вызывало значимого уменьшения реакции воспаления на Кон А по сравнению с данными контрольной группы.

Заключение

Результаты проведенного комплексного исследования позволяют заключить, что готовая лекарственная

форма дипептидного миметика мозгового нейротрофического фактора ГСБ-106 в диапазоне изученных доз не оказывает иммунотоксического действия, не вызывает системной реакции анафилаксии, активной кожной анафилаксии, гиперчувствительности замедленного типа и псевдоаллергических реакций.

Проведенное исследование не установило данных, препятствующих клиническому испытанию готовой лекарственной формы ГСБ-106.

Исследование выполнено в рамках Федеральной целевой программы "Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу".

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
 D. Sci. in Biology, Leading Researcher of drug toxicology department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», 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 Ksenia
 ORCID ID: 0000-0002-8087-4976
 SPIN code: 3831-3782
 Junior researcher of laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Журиков Руслан Валерьевич
 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 laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Никитин Сергей Васильевич
 ORCID ID: 0000-0001-7630-7816
 к. х. н., с. н. с. отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Nikitin Sergei
 ORCID ID: 0000-0001-7630-7816
 PhD Chemistry, Senior research officer of the medicinal chemistry department FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Дурнев Андрей Дмитриевич
 ORCID ID: 0000-0003-0218-8580
 SPIN-код: 8426-0380
 д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. отдела лекарственной токсикологии, директор ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Durnev Andrei
 ORCID ID: 0000-0003-0218-8580
 SPIN code: 8426-0380
 D. Sci. in Medicine, professor, corresponding member of the RAS, Head of the department of drug toxicology, Director FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Доклады Академии наук. — 2013. — Т. 451. — № 5. — С. 577–580. [Gudasheva TA, Logvinov IO, Antipova TA, Seredenin SB. *Academy of Science Reports*, 2013;451(5):577–580. (In Russ).]

2. Коваленко Л.П., Федосеева В.Н., Дурнев А.Д. и др. Методические рекомендации по оценке аллергизирующих свойств лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К; 2012,1(2), 51–63. [Kovalenko LP, Fedoseeva VN, Durnev AD, et al. *Metodicheskie rekomendacii po otsenke allergiziruyushchih svoystv lekarstvennih sredstv. Rukovodstvo po provedeniiu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennih sredstv. Ch. I.* Moscow: Grif i K; 2012, 1(2), 51–63. (In Russ).]

3. Хаитов Р.М., Иванова А.С., Коваленко Л.П. и др. Методические рекомендации по оценке иммуотоксического действия фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К; 2012, 1(3), 64–79. [Haitov RM, Ivanova AS, Kovalenko LP, et al. *Metodicheskie rekomendacii po otsenke immunotoksicheskogo deystviya farmakologicheskikh veshchestv. Rukovodstvo po provedeniiu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennih sredstv. Ch. I.* Moscow: Grif i K; 2012, 1(3), 64–79. (In Russ).]

4. Хаитов Р.М., Гушчин И.С., Пинегин Б.В. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению иммуотропной активности фармакологических веществ «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К; 2012, 1(38), 626–656. [Haitov RM, Gushchin IS, Pinegin BV, et al. *Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniiu immunotropnoi aktivnosti farmakologicheskikh veshchestv. Rukovodstvo po provedeniiu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennih sredstv. Ch. I.* Moscow: Grif i K; 2012, 1(38), 626–656. (In Russ).]

Исследование острой токсичности таблеток Гомеовокс, покрытых оболочкой, гомеопатических

Мирошкина И. А.¹, Сорокина А. В.¹, Волкова А. В.¹, Забродина В. В.¹, Качалов К. С.¹,
Захаров А. Д.¹, Алексеева С. В.¹, Лапицкая А. С.²

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

² – ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

Аннотация. Актуальность. Оценка острой токсичности является необходимым этапом доклинического исследования таблеток Гомеовокс гомеопатических для лечения ларингитов и нарушений голоса. Цель настоящей работы – изучение острой токсичности таблеток Гомеовокс гомеопатических. Методы. Гомеовокс вводили однократно перорально и внутривентриально мышам и крысам в максимально возможных объемах для каждого из способов введения и для каждого из видов животных, в максимально возможных концентрациях. Животные контрольных групп получили эквивалентный объем 1 % раствора крахмала. Регистрировались сроки развития интоксикации животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины. Эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие проводили через 14 сут после введения препарата. Результаты. Определение средних смертельных доз не представлялось возможным из-за отсутствия гибели животных в условиях достижения максимально возможных концентраций и максимально допустимых объемов введения. Морфологическая картина внутренних органов, обнаруженная при патологоанатомическом вскрытии всех экспериментальных животных, не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных. Заключение. Установлено, что Гомеовокс при пероральном и внутривентриальном введении является практически нетоксичным веществом и по классификации Сидорова К.К. (1973 г.) может быть отнесен к 5 классу токсичности. В соответствии с ГОСТом 12.1.007-76 Гомеовокс относится к 4 классу опасности для перорального способа введения.

Ключевые слова: Гомеовокс; острая токсичность; мыши; крысы

Для цитирования:

Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Волкова А.В., Забродина В.В., Качалов К.С., Захаров А.Д., Алексеева С.В., Лапицкая А.С. Исследование острой токсичности таблеток Гомеовокс, покрытых оболочкой, гомеопатических // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 1. – С. 34–41. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-34-41

Study of acute toxicity of the drug Homeovox

Miroshkina IA¹, Sorokina AV¹, Volkova AV¹, Zabolodina VV¹, Kachalov KS¹, Zakharov AD¹, Alekseeva SV¹, Lapitskaya AS²

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Gabrichevsky institute of epidemiology and microbiology

Abstract. *Relevance.* Assessment of acute toxicity is a necessary stage of preclinical research of a tablets Homeovox homeopathic. *The aim* of present research is study of acute toxicity Homeovox. *Methods.* Homeovox was administered once orally and intraperitoneally to mice and rats in the maximum possible volumes for each of the administration methods and for each animal species, at the highest possible concentrations. Equivalent volume of 1 % starch solution was administered to animals of the control groups. Euthanasia and pathoanatomical dissection were performed 14 days after drug administration. Periods of animals intoxication with a detailed description of the observed clinical picture were registered. *Results.* The median fatal doses were not identified because Homeovox did not cause death of animals at introduction of the maximum allowable volumes and maximum allowable concentrations. The morphological view of the internal organs, detected during pathoanatomical dissection of all experimental animals, did not differ from that observed in control animals. *Conclusion.* It was determined that Homeovox at oral and intraperitoneal introduction concerns to practically non-toxic substances. According to classification Sidorov KK this homeopathic tablets may be related to 5th toxicity class. According to GOST 12.1.007-76 Homeovox may be related to 4th danger class.

Keywords: Homeovox; acute toxicity; mice; rats

For citations:

Miroshkina IA, Sorokina AV, Volkova AV, Zabolodina VV, Kachalov KS, Zakharov AD, Alekseeva SV, Lapitskaya AS. Study of acute toxicity of the drug Homeovox. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):34–41. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-34-41

Введение

Оценка острой токсичности является необходимым этапом доклинического исследования безопасности таблеток Гомеовокс гомеопатических, предназначенных для лечения ларингитов и нарушений голоса [1].

Целью настоящей работы явилось изучение острой токсичности таблеток Гомеовокс гомеопатических.

Задачи исследования – установить среднелетальные дозы таблеток Гомеовокс, оценить выраженность его токсического действия и переносимость при однократном пероральном и внутривентриальном введении,

зарегистрировать сроки развития интоксикации и гибели животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины, а также определить класс токсичности таблеток Гомеовокс.

Материалы и методы

В эксперименте использовали таблетки Гомеовокс гомеопатические, двояковыпуклой формы, покрытые белой оболочкой, без запаха, номер серии М7100100. Масса одной таблетки составляла 300 мг, состав представлен в табл. 1.

Таблица 1

Состав таблеток Гомеовокс гомеопатических 300 мг, 1 таб.

Активные вещества	Количество, мг
Aconitum napellus, C3	0,091
Arum triphyllum, C3	0,091
Ferrum phosphoricum, C3	0,091
Calendula officinalis, C3	0,091
Spongia tosta, C3	0,091
Belladonna, C3	0,091
Mercurius solubilis, C3	0,091
Hepar sulphur, C3	0,091
Kalium bichromicum, C3	0,091
Populus candicans, C3	0,091
Bryonia, C3	0,091
Вспомогательные компоненты	Количество, мг
Сахароза	73,7 мг
Лактоза	87,1 мг
Крахмал	18,3 мг
Магния стеарат	0,9 мг
Вспомогательные компоненты оболочки	Количество, мг
Акации камедь	1,0 мг
Желатин	следы
Сахароза	104,0 мг
Тальк	15,0 мг
Воск пчелиный	следы
Воск карнаубский	следы

Данный объект исследования был предоставлен ООО «Буарон». Таблетки измельчали в фарфоровой ступке, готовили суспензию Гомеовокс *ex tempore* дисперсионным методом на 1 % растворе крахмала (далее суспензия Гомеовокс).

Исследование проводили на белых аутбредных мышах ($n = 48$, масса 18–20 г) и белых аутбредных крысах ($n = 48$, масса 180–220 г) обоего пола в соотношении 1:1. Все животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с мышами и крысами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [2] на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123. Животные были акклиматизированы в помещении вивария в течение 5 дней до начала проведения испытаний. Во время данного периода ежедневно проводили осмотр внешнего состояния животных, патологических отклонений у крыс и мышей не было обнаружено [2–4]. Группы животных формировали методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака (разброс по исходной массе между и внутри групп в пределах одного пола не превышал $\pm 10\%$).

Гомеовокс вводили однократно в дозах: 15 г/кг перорально самкам и самцам мышей и крыс; 5 г/кг (внутрибрюшинно самкам и самцам мышей), 4 г/кг (внутрибрюшинно самкам и самцам крыс). Гомеовокс вводили в максимально возможных объёмах для каждого из способов введения и для каждого из видов животных (мышь – 0,5 мл перорально и 1 мл внутрибрюшинно; крысы – 5 мл перорально и 5 мл внутрибрюшинно), в максимально возможных для введения концентрациях суспензии, проходящих через зонд или иглу, соответственно (60 % при пероральном введении мышам, 75 % при пероральном введении крысам, 10 % при внутрибрюшинном введении мышам, 23 % при внутрибрюшинном введении крысам). Животные контрольных групп получили эквивалентный объём 1 % раствора крахмала однократно. Суспензию Гомеовокс или 1 % раствор крахмала вводили перорально с помощью металлического атравматического зонда и внутрибрюшинно с помощью одноразовых шприцов и игл (0,6×25 для мышей и 0,8×40 для крыс) [4, 5].

Далее наблюдали за животными опытных и контрольных групп в течение 14 сут. Первые 8 ч после введения препарата каждая особь находилась в индивидуальной, прозрачной, пластиковой камере для непрерывного визуального наблюдения. Затем животных помещали в клетки группового содержания и осматривали ежедневно утром и вечером с целью выявления их возможной гибели, а также описания их общего состояния и особенностей поведения [6]. Массу тела животных определяли с помощью электронных весов SPU 601 (ОНАУС Согр., США) перед введением суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала. В первую неделю наблюдения мышей и крыс взвешивали ежедневно, со второй недели наблюдения и до окончания эксперимента – еженедельно. Суточное потребление корма и воды фиксировали до введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала, а также в первые, седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента. Животных, павших в ходе исследования, вскрывали. Эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие всех животных проводили через 14 сут после введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала [3].

Все регистрируемые характеристики животных до и после исследования представлены в таблицах в виде частотных и/или процентных показателей или при помощи среднего, стандартного отклонения, медианы, верхней (75 %) и нижней квартили (25 %), в зависимости от типа переменной. Проверка на нормальность распределения проводилась с применением общепринятых методов (критерий Шапиро–Уилка, критерий Колмогорова–Смирнова). В случае не Гауссовского распределения для сравнения показателей использовали непараметрические методы оценки. Для проверки гипотезы об однородности групп исследования в исходном периоде проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи

t-критерия Стьюдента (для интервальных показателей с нормальным распределением в исследуемой популяции), критерия Манна–Уитни (для ординальных показателей или для интервальных показателей с распределением, отличающимся от нормального). При сравнении частотных показателей зависимых выборок применяли точный критерий Фишера. Результаты считались статистически значимыми, если значение *p* для теста было меньшим или равным 0,05.

Результаты и обсуждение

При изучении острой токсичности суспензии Гомеовокс на аутбредных белых мышах и крысах обоего пола при пероральном или внутрибрюшинном введении определение средней смертельной дозы не представлялось возможным из-за отсутствия гибели животных в условиях достижения максимально возможных концентраций и максимально допустимых объёмов введения.

В ходе эксперимента у мышей, получивших Гомеовокс перорально или внутрибрюшинно, развивалась следующая клиническая картина. В течение первых 1–2 мин после введения животные были активны, перемещались по периметру камер наблюдения, периодически отмечался груминг (до 30–60 с непрерывного груминга в группе внутрибрюшинного введения). Далее, в течение 10–12 мин после введения суспензии Гомеовокс большинство животных сидело, сторбившись. В течение данного времени не было отмечено нарушений ушного и корнеального рефлексов, рефлекс Штрауба отсутствовал. В дальнейшем периоде наблюдения за мышами, получившими Гомеовокс, отмечалось чередование активного перемещения животных в индивидуальных камерах с состоянием покоя, когда они спали, иногда просыпаясь и меняя положение тела. Мыши, получившие Гомеовокс внутрибрюшинно, периодически ложились на живот, вытягивали задние лапы, бока были втянуты. Во время перемещения по камерам индивидуального наблюдения животные приподнимались на лапах, стараясь не касаться животом пола. Видимые слизистые и кожные покровы у мышей данной группы были более бледными, чем у мышей после перорального введения.

Когда через 8 ч мышей перемещали в клетки группового содержания, самки, получившие Гомеовокс перорально, и самцы, получившие Гомеовокс внутрибрюшинно, были гиперактивны, подпрыгивали и вокализировали во время тактильного контакта. У всех мышей шерсть была взъерошена. Мыши, получившие Гомеовокс внутрибрюшинно, горбились, у отдельных животных бока были втянуты. Первые четверо суток наблюдения шерсть у мышей оставалась взъерошенной. В дальнейшем общее состояние животных стабилизировалось: дыхание, сердечно-сосудистая деятельность, состояние шерстного покрова, кожи и видимых слизистых оболочек, реакция на внешние раздражители

соответствовали норме. Поведение не отличалось от обычно наблюдаемого у контрольных животных.

В ходе эксперимента у крыс при однократном пероральном или внутрибрюшинном введении суспензии Гомеовокс развивалась следующая клиническая картина. Сразу после введения препарата у животных не отмечалось снижения двигательной активности, периодически у них наблюдался груминг, у части животных дыхание было частым и поверхностным. Шерсть у животных была взъерошенной. Не было отмечено нарушений ушного и корнеального рефлексов и рефлекса Штрауба. Через 10–20 мин после введения исследуемого препарата дыхание нормализовалось, крысы спокойно сидели в своих камерах, большинство из них спали. В дальнейший период наблюдения крысы спали, иногда просыпаясь и меняя положение тела. Крысы, получившие Гомеовокс внутрибрюшинно, иногда во время движения втягивали животы и приподнимались на лапах, стараясь не касаться животом пола. У некоторых крыс регистрировали нетипичное положение тела в пространстве, когда животные сидели, расставив задние лапы, и пытались вылизывать место инъекции.

Когда через 8 ч крыс перемещали в клетки группового содержания, животные, получившие Гомеовокс перорально, были гиперактивны, возбужденно бегали по периметру клеток, некоторые держали хвост на весу, параллельно полу. Наблюдалась повышенная реакция на звуковые раздражители. Крысы, получившие Гомеовокс внутрибрюшинно, были среднеактивны, бока у данных животных были втянуты, шерсть взъерошена. Утром, к началу вторых суток после введения, повышенная двигательная активность у животных, получивших Гомеовокс перорально, ещё сохранилась, но была менее выраженной. У самцов этой группы уровень возбудимости был выше, чем у самок. У самок крыс, получивших Гомеовокс внутрибрюшинно, уровень возбудимости был выше, чем у самцов в 1-е сутки наблюдения. Первые четверо суток крысы, получившие Гомеовокс перорально, были пугливы, у них наблюдалась повышенная реакция на звуковые сигналы и тактильные контакты. Все крысы горбились, их шерсть была взъерошена. В дальнейшем, с 3–4 дня, и вплоть до окончания эксперимента, общее состояние животных стабилизировалось: дыхание, сердечно-сосудистая деятельность, состояние шерстного покрова, кожи и видимых слизистых оболочек, реакция на внешние раздражители соответствовали норме. Поведение не отличалось от обычно наблюдаемого у контрольной группы животных.

После однократного перорального или внутрибрюшинного введения мышам и крысам контрольных групп 1 % раствора крахмала (в максимально возможных объёмах) у животных не наблюдалось снижения двигательной активности. Через 2–3 мин у большинства мышей и крыс отмечали активный груминг. Через 8 ч после начала эксперимента, при

перемещении в клетки группового содержания мыши, получившие 1 % раствор крахмала внутрибрюшинно, двигались, вытягивая лапы, вокализировали при тактильном контакте. Животные данной группы были чуть сторблены, шерсть была взъерошена. У мышей и крыс остальных контрольных групп состояние шерсти, кожи и видимых слизистых оболочек, а также реакция на внешние раздражители соответствовали норме. Во всех контрольных группах не было отмечено нарушений ушного и корнеального рефлексов и рефлекса Штрауба. В течение первых суток наблюдения все животные оставались активными, охотно потребляли корм, пили воду. В дальнейшем, в течение 14-дневного наблюдения за мышами и крысами контрольных групп нарушений рефлексов и других отклонений в состоянии не было установлено.

Динамика массы. Большинство мышей, получивших Гомеовокс перорально или внутрибрюшинно, в течение 1–2 сут после введения теряли в массе (до 9–10 % от массы тела в группе внутрибрюшинного введения). Прирост массы по отношению к первоначальной массе был отрицательным. Начиная с 2–3 сут исследования масса у мышей всех опытных групп восстанавливалась (рис. 1 а-г). У мышей, получивших Гомеовокс внутрибрюшинно, показатели прироста массы тела имели отрицательное значение в течение 3–4 сут от начала эксперимента. На 7-й день эксперимента показатель прироста у самцов мышей данной группы был в 3 раза ниже, чем в контроле (рис. 1 в, г).

У самцов крыс, получивших Гомеовокс перорально в дозе 15 г/кг, показатель прироста массы на 4-й день эксперимента был на 38 % ниже, чем у контрольных животных. В остальные дни наблюдения показатели массы тела и её прироста у самок и самцов опытных крыс были на уровне контрольной группы (рис. 1 д, е). У самок и самцов крыс, получивших Гомеовокс внутрибрюшинно в дозе 4 г/кг, в течение 2 сут после введения отмечалось резкое снижение массы тела и её прироста по сравнению с контролем. Масса тела и прирост массы тела животных этой группы начинали возрастать со 2–3-х суток эксперимента. Показатели прироста массы тела достигли положительных значений только на 4–6-е сутки (рис. 1 ж, з).

К окончанию эксперимента (14-е сутки после однократного введения суспензии Гомеовокс) не было выявлено закономерных различий в показателях прироста массы тела у опытных животных по сравнению с контрольными значениями. Исключение составили самки, получившие Гомеовокс внутрибрюшинно, у которых в течение всего 14-дневного периода показатели массы тела были значимо ниже, чем в контроле.

Потребление корма и воды. В ходе наблюдений за самками и самцами мышей, получивших Гомеовокс перорально в дозе 15 мг/кг, не было выявлено закономерных различий в потреблении корма и воды с контрольной группой. Самцы мышей, получивших однократно внутрибрюшинно Гомеовокс в дозе 5 г/кг,

до введения суспензии потребляли значимо меньше корма, чем мыши контрольной группы (на 18 %). Эти различия сохранились и после введения суспензии Гомеовокс на весь период наблюдения, за исключением первых суток, когда потребление корма у опытных самцов было в 4 раза ниже значения контрольной группы. Не было выявлено закономерных различий в потреблении корма и воды самками данной группы с контрольными животными. Показатели потребления воды, регистрируемые у самок мышей после внутрибрюшинного введения препарата Гомеовокс в дозе 5 г/кг, на 1- и 7-е сутки были значимо ниже таковых у контрольной группы. Однако на 14-е сутки опытные самки пили в 1,5 раза больше воды по сравнению с животными контрольной группы, и, наоборот, потребление жидкости самцами в течение всего эксперимента было на уровне группы контроля, за исключением последнего дня, когда опытные самцы употребили на 39 % меньше жидкости, чем мыши контрольной группы (табл. 2).

В ходе наблюдений за самками и самцами крыс, получивших Гомеовокс перорально в дозе 15 мг/кг, не было выявлено закономерных различий в потреблении корма и воды с контрольной группой. Самки и самцы крыс, получивших Гомеовокс внутрибрюшинно в дозе 4 мг/кг, в 1-е сутки после введения суспензии потребовали значительно меньше корма и воды (в 3–7 раза), чем крысы контрольной группы. В последующие дни регистрации данных показателей (7- и 14-е сутки) не было выявлено закономерных различий по сравнению с контрольными значениями (см. табл. 2).

Таким образом, в показателях потребления корма и воды в опытных группах мышей и крыс к окончанию исследования не было выявлено закономерных различий с контрольными группами.

Результаты патологоанатомического вскрытия

При наружном осмотре тушек мышей и крыс, выведенных из эксперимента спустя 14 сут после однократного перорального или внутрибрюшинного введения суспензии Гомеовокс, было установлено, что все животные были пропорционального телосложения, удовлетворительной упитанности. Шерсть экспериментальных мышей и крыс была гладкой, блестящей. Выпадения или иных повреждений шерстного покрова на голове, тушке и конечностях не было обнаружено. Состояние шерсти вокруг естественных отверстий также не представляло изменений. Молочные железы самок без уплотнений на ощупь, выделений из сосков не было. Кожа мошонки самцов без повреждений и отёков. Видимые слизистые оболочки ротовой и носовой полости, а также конъюнктивы были беловато-розовыми. Зубы были сохранены у всех животных, глазные щели без особенностей. Глазное яблоко у всех мышей и крыс было характерной формы и величины, без внешних повреждений. Инъекция сосудов была умеренной. Морфологическая картина грудной и

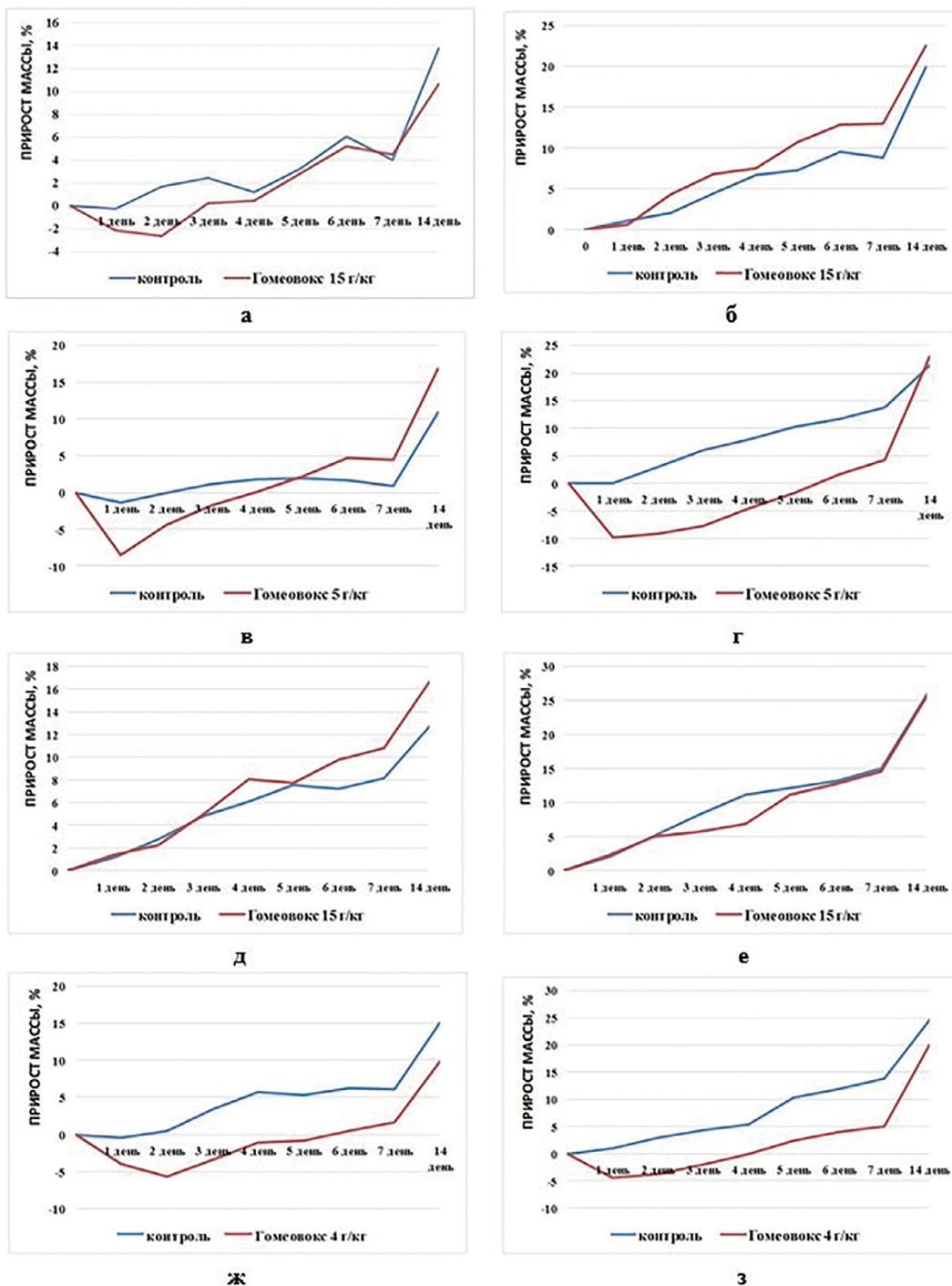


Рис. 1. Динамика прироста массы тела (%) у экспериментальных животных:

а – мыши самки после перорального введения суспензии Гомеовокс в дозе 15 г/кг; б – мыши самцы после перорального введения суспензии Гомеовокс в дозе 15 г/кг; в – мыши самки после внутрибрюшинного введения суспензии Гомеовокс в дозе 5 г/кг; г – мыши самцы после внутрибрюшинного введения суспензии Гомеовокс в дозе 5 г/кг; д – крысы самки после перорального введения суспензии Гомеовокс в дозе 15 г/кг; е – крысы самцы после перорального введения суспензии Гомеовокс в дозе 15 г/кг; ж – крысы самки после внутрибрюшинного введения суспензии Гомеовокс в дозе 4 г/кг; з – крысы самцы после внутрибрюшинного введения суспензии Гомеовокс в дозе 4 г/кг

Таблица 2

Оценка суточного потребления воды и корма у мышей и крыс в течение двух недель после введения суспензии Гомеовокс

Вид животных	Мыши								
	Группа	Корм				Вода, мл			
		до введения	1 день	7 день	14 день	до введения	1 день	7 день	14 день
Контроль <i>Per os</i> ♀	3,4 3,3÷3,4	3,4 3,2÷3,4	3,8* 3,6÷4,0	1,7* 1,5÷1,8	5,0 4,9÷5,1	6,7* 6,3÷6,9	9,1* 8,6÷9,5	4,2* 3,8÷4,5	
Гомеовокс, <i>Per os</i> 15 г/кг ♀	3,2* 3,1÷3,2	2,8** 2,8÷2,9	3,3* 3,2÷3,5	3,5** 3,4÷3,8	3,3* 3,2÷3,4	7,5** 7,3÷7,7	7,5** 7,3÷8,0	10,0** 9,8÷10,7	
Контроль <i>Per os</i> ♂	4,9 4,8÷4,9	6,6* 6,5÷6,9	5,3* 5,2÷5,4	4,6 4,4÷4,9	6,7 6,6÷6,8	7,5* 7,3÷7,8	10,7* 10,6÷11,0	8,2* 7,8÷8,7	
Гомеовокс, <i>Per os</i> 15 г/кг ♂	4,8 4,7÷4,9	4,8* 4,8÷4,9	5,3* 4,9÷5,3	5,0 4,5÷5,0	8,4* 8,1÷8,5	8,4* 8,2÷8,5	9,3** 8,8÷9,5	8,6 7,7÷8,7	
Контроль в/бр ♀	3,2 3,1÷3,3	2,5* 2,5÷2,6	3,5* 3,5÷3,5	4,0* 3,9÷4,1	5,1 5,0÷5,2	8,3* 8,2÷8,6	8,3* 8,2÷8,4	5,8* 5,7÷5,9	
Гомеовокс, в/бр 5 г/кг ♀	3,7* 3,5÷3,9	1,4** 1,3÷1,4	4,3** 4,0÷4,4	4,2* 4,0÷4,2	5,1 4,8÷5,3	4,3** 4,0÷4,3	7,7** 7,3÷7,9	8,7** 8,3÷8,8	
Контроль в/бр ♂	5,4 5,2÷5,6	6,0* 5,8÷6,2	6,2* 5,8÷6,5	7,7* 7,3÷8,1	7,5 7,3÷7,8	8,3* 8,1÷8,6	10,8* 10,2÷11,4	16,8* 15,8÷17,6	
Гомеовокс, в/бр 5 г/кг	4,4* 4,4÷4,5	1,5** 1,4÷1,6	5,3** 5,0÷5,8	6,1** 5,6÷6,3	8,2* 8,1÷8,4	8,2 8,0÷8,6	10,7* 10,1÷11,7	10,2** 9,3÷10,6	
Вид животных	Крысы								
	Группа	Корм				Вода, мл			
		до введения	1 день	7 день	14 день	до введения	1 день	7 день	14 день
Контроль <i>Per os</i> ♀	20,1 19,1÷20,5	17,1* 16,5÷17,4	16,9* 16,4÷17,6	18,6* 18,1÷19,0	31,9 30,2÷32,4	31,5 30,5÷32,2	30,4* 29,5÷31,6	34,6* 33,6÷35,3	
Гомеовокс, <i>Per os</i> 15 г/кг ♀	19,4 17,9÷19,8	18,0* 16,6÷18,4	19,5** 18,5÷20,4	20,8** 20,0÷21,9	27,0 24,9÷27,5	30,3* 27,9÷30,9	36,8** 34,9÷38,6	29,5** 28,3÷31,0	
Контроль <i>Per os</i> ♂	27,9 27,7÷28,3	25,0* 24,5÷25,5	23,3* 22,1÷23,7	23,3* 22,5÷23,8	39,8 39,5÷40,4	33,1* 32,5÷33,8	40,3 38,2÷41,0	36,9* 35,6÷37,7	
Гомеовокс, <i>Per os</i> 15 г/кг ♂	28,4 27,8÷29,5	20,5** 19,9÷21,3	23,6* 22,4÷24,1	26,1** 24,0÷26,7	42,6* 41,8÷44,3	31,2* 30,3÷32,4	41,5* 39,5÷42,4	36,8* 33,8÷37,6	
Контроль в/бр ♀	18,8 18,5÷18,9	13,5* 13,3÷13,8	17,5* 16,6÷17,9	20,3* 19,8÷20,8	24,9 24,5÷25,1	24,7 24,4÷25,3	26,6* 25,4÷27,3	32,2* 31,3÷33,0	
Гомеовокс, в/бр 4 г/кг ♀	16,8* 16,5÷17,5	2,3** 2,3÷2,4	18,9* 17,7÷19,5	18,9* 18,3÷20,3	21,6* 21,2÷22,6	21,7* 21,3÷22,7	30,1** 28,2÷31,1	32,0* 31,0÷34,4	
Контроль в/бр ♂	31,2 29,5÷33,1	22,9* 21,6÷24,7	27,5* 25,5÷30,3	24,9* 22,8÷27,2	43,2 40,8÷45,8	31,3* 29,5÷33,8	38,9* 36,0÷42,9	33,2* 30,3÷36,3	
Гомеовокс, в/бр 4 г/кг ♂	29,7 29,2÷30,0	6,9** 6,8÷7,0	24,9* 24,6÷26,7	27,8* 26,0÷28,5	37,1* 36,5÷37,5	13,5** 13,3÷13,6	30,7** 30,3÷32,9	59,6** 55,9÷61,1	

Примечания: Оценку значимости различий между выборочными средними осуществляли при условии, что статистическая совокупность включает не менее 4 наблюдений (числовых значений); * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных, получавших 1 % раствор крахмала; ** – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными.

брюшной полости, полости черепа, органов кровообращения, дыхания, пищеварения, кроветворения, мочевыводящей, половой и эндокринной систем, опорно-двигательного аппарата, обнаруженная после эвтаназии и патологоанатомического вскрытия всех экспериментальных мышей и крыс, не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

Заключение

На 14-е сутки от начала эксперимента у всех животных, получивших Гомеовокс перорально или внутривентриально в указанных дозах, не было обнаружено изменений общего состояния, внешнего вида и пове-

дения по сравнению с контролем. Все мыши и крысы опытных групп активно потребляли корм и воду, набирали массу тела. Морфологическая картина внутренних органов мышей и крыс опытных групп не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

В результате исследования установлено, что Гомеовокс, таблетки, покрытые оболочкой, гомеопатические, при пероральном и внутривентриальном введении является практически нетоксичным веществом и по классификации *Сидорова К.К.* (1973 г.) может быть отнесен к 5 классу токсичности. В соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 Гомеовокс относится к 4 классу опасности для перорального способа введения.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошкина Ирина Александровна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: iris10.81@mail.ru

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

Corresponding author

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

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

Сорокина Александра Валериановна

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

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

PhD in Biology, Leading researcher of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Волкова Анна Валерьевна

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

Volkova Anna

Senior Research Officer of laboratory of psychopharmacology 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

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

Качалов Кирилл Сергеевич

SPIN-код: 2992-6789

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

Kachalov Kirill

SPIN code: 2992-6789

Engineer of the 1st category of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow; student of the pharmaceutical faculty of the Moscow medical university «Reaviz», Moscow

Захаров Алексей Дмитриевич
 SPIN-код: 9013-6228
 м. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zakharov Aleksei
 SPIN code: 9013-6228
 Junior 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 toxicologist FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Лапицкая Анастасия Сергеевна
 SPIN-код: 7966-8750
 к. б. н., с. н. с., лаборатории диагностики и профилактики инфекционных заболеваний ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

Lapitskaya Anastasiya
 SPIN code: 7966-8750
 PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory of diagnostics and prevention of infectious diseases MRIEM, Moscow

Литература / References

1. Радциг Е.Ю., Ермилова Н.В. Нарушения голоса в различные периоды его становления: причины и алгоритм ведения пациентов // *РМЖ. Оториноларингология*. – 2016. – № 4. – С. 217–220. [Radtsig EYu, Ermilova NV. Voice disorders at different stages of its maturation: the causes and patient management. *RMJ. Otorhinolaryngology*. 2016;(4):217–220 (In Russ).]
2. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910
3. Бельский М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kii MB. Elementy kolichestvennoi otsenki farmakologicheskogo effekta. Leningrad: Medgiz; 1963. (In Russ).]
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Методические рекомендации по изучению

- общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. – М.: Гриф и К; 2012. С. 15–17. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie ostroi toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012. P. 15–17 (In Russ).]
5. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств. РД 64-126-91. – М.: МЗ России, ФК; 1992. [Pravila doklinicheskoi otsenki bezopasnosti farmakologicheskikh sredstv. RD 64-126-91. Moscow: Rosminzdrav, FK; 1992.]
 6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. – М.: Медицина; 2005. С. 41–47. [Guideline for Experimental (Preclinical) Studying of New Pharmacological Substances. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya farmakologicheskikh veshchestv. Moscow: Medicine; 2005. P. 41–47 (In Russ).]

Исследование хронической токсичности таблеток Гомеовокс

Мирошкина И. А.¹, Сорокина А. В.¹, Волкова А. В.¹, Забродина В. В.¹, Качалов К. С.¹,
Захаров А. Д.¹, Алексеева С. В.¹, Лапицкая А. С.²

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

² – ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

Аннотация. *Актуальность.* Исследование хронической токсичности является необходимым этапом доклинического исследования таблеток Гомеовокс гомеопатических, применяемых для лечения ларингитов различной этиологии. *Целью* настоящей работы явилось изучение хронической токсичности таблеток Гомеовокс гомеопатических. *Методы.* Гомеовокс вводили ежедневно самцам и самкам крыс и кроликов перорально в дозах 100 и 1 000 мг/кг, в течение трёх месяцев. Наблюдали за внешним видом и общим состоянием животных, оценивали динамику массы тела, потребление корма и воды, поведенческие реакции, ректальную температуру, состояние сердечно-сосудистой системы (электрокардиография, измерение артериального давления), проводили гематологические, биохимические и патоморфологические исследования для определения возможных токсических эффектов и их обратимости, возможных органов-мишеней и местного раздражающего действия. *Результаты.* Параметры, регистрируемые в проведённых исследованиях, не выходили за пределы референтных значений для данных видов животных. Гомеовокс в условиях настоящего эксперимента не вызывал закономерных изменений структуры внутренних органов крыс и кроликов. *Заключение.* Гомеовокс, вводимый крысам и кроликам в течение трёх месяцев перорально ежедневно в дозах 100 и 1 000 мг/кг, не продемонстрировал токсических эффектов и местного раздражающего действия. Исследование, проведённое в соответствии с методическими рекомендациями, не установило данных, препятствующих клиническому испытанию таблеток Гомеовокс, покрытых оболочкой гомеопатических.

Ключевые слова: Гомеовокс; хроническая токсичность; крысы; кролики

Для цитирования:

Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Волкова А.В., Забродина В.В., Качалов К.С., Захаров А.Д., Алексеева С.В., Лапицкая А.С. Исследование хронической токсичности таблеток Гомеовокс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 1. – С. 42–52. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-42-52

Study of chronic toxicity of potential anxiolytic Homeovox

Miroshkina IA¹, Sorokina AV¹, Volkova AV¹, Zabrodina VV¹, Kachalov KS¹, Zakharov AD¹, Alekseeva SV¹, Lapitskaya AS²

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Gabrichevsky institute of epidemiology and microbiology

Abstract. *Relevance.* Assessment of chronic toxicity is a necessary stage of preclinical research a tablets Homeovox homeopathic. *The aim* of present research is study of chronic toxicity of a tablets Homeovox homeopathic. *Methods.* Homeovox was administered orally to males and females of rats and rabbits in doses of 100 and 1 000 mg / kg for three months. The appearance and the general state of animals were observed, the dynamics of body weight, feed and water consumption, behavioral reactions, rectal temperature, state of the cardiovascular system (electrocardiography, blood pressure measurement) were evaluated, hematological, biochemical and pathomorphological examinations were conducted to determine possible toxic effects and their reversibility, possible target organs and local irritant effect. *Results.* Parameters registered in the conducted studies did not get out the limits of the reference values for these species of animals. Homeovox did not cause any regular changes in the structure of the internal organs of rats and rabbits. *Conclusion.* Homeovox, administered to rats and rabbits for three months orally daily in doses of 100 and 1 000 mg / kg, did not demonstrate toxic effects and local irritant effect.

Keywords: Homeovox; chronic toxicity; rats; rabbits

For citations:

Miroshkina IA, Sorokina AV, Volkova AV, Zabrodina VV, Kachalov KS, Zakharov AD, Alekseeva SV, Lapitskaya AS. Study of chronic toxicity of potential anxiolytic Homeovox. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):42–52. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-42-52

Введение

Исследование хронической токсичности является необходимым этапом доклинической оценки безопасности таблеток Гомеовокс гомеопатических, применяемых для лечения ларингитов различной этиологии [1].

патических. Задачи исследования – определить возможные токсические эффекты таблеток Гомеовокс при ежедневном пероральном введении в течение трёх месяцев, возможные органы-мишени токсических воздействий, местное раздражающее действие и обратимость возможных токсических эффектов.

Цель исследования

Целью настоящей работы явилось изучение хронической токсичности таблеток Гомеовокс гомео-

Материалы и методы

Исследуемое вещество. В эксперименте использовали таблетки Гомеовокс гомеопатические, двойковыпу-

кой формы, покрытые белой оболочкой, без запаха, номер серии М7100100. Масса одной таблетки составляла 300 мг, в её состав входили: *Aconitum napellus*, СЗ – 0,091 мг; *Arum triphyllum*, СЗ – 0,091 мг; *Ferrum phosphoricum*, СЗ – 0,091 мг; *Calendula officinalis*, СЗ – 0,091 мг; *Spongia tosta*, СЗ – 0,091 мг; *Belladonna*, СЗ – 0,091 мг; *Mercurius solubilis*, СЗ – 0,091 мг; *Hepar sulphur*, СЗ – 0,091 мг; *Kalium bichromicum*, СЗ – 0,091 мг; *Populus candicans*, СЗ – 0,091 мг; *Bryonia*, СЗ – 0,091 мг; вспомогательные компоненты (сахароза – 73,7 мг; лактоза – 87,1 мг; крахмал – 18,3 мг; магния стеарат – 0,9 мг), вспомогательные компоненты оболочки (акации камедь – 1,0 мг; желатин – следы; сахароза – 104,0 мг; тальк – 15,0 мг; воск пчелиный – следы; воск карнаубский – следы). Данный объект исследования был предоставлен Обществом с ограниченной ответственностью «Буарон», гарантировавшим качество и подлинность препарата. Таблетки измельчали в фарфоровой ступке, готовили суспензию *ex tempore* дисперсионным методом на 1 % растворе крахмала (далее суспензия Гомеовокс).

Животные. Исследование проводили на белых аутбредных крысах обоего пола ($n = 56$), а также кроликах породы шиншилла обоего пола ($n = 36$), как на видах, общепринятых для доклинических исследований лекарственных средств и доказавших свою релевантность в таких экспериментах. Все животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с крысами и кроликами выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными [2] на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123. Крыс разделили на 4 группы: 1-я группа – контроль; 2-я группа – Гомеовокс в фармакологически эффективной дозе (100 мг/кг); 3-я группа – Гомеовокс в дозе, превышающей фармакологически эффективную в 10 раз (1 000 мг/кг); 4-я группа – Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг («отставленная группа», сформированная для оценки обратимости возможных токсических эффектов). Кроликов делили на 3 группы: 1-я группа – контроль; 2-я группа – Гомеовокс в дозе 100 мг/кг; 3-я группа – Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг. Животные контрольных групп получали 1 % раствор крахмала в эквивалентном объёме. Суспензию Гомеовокс в 1 % растворе крахмала в экспериментальных группах или 1 % раствор крахмала в контроле вводили перорально (в соответствии с планируемым в клинике способом введения) с помощью металлического атравматического зонда крысам и с помощью одноразовых шприцов кроликам [3–5] ежедневно, в течение трёх месяцев. Перед каждым введением суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала оценивали внешний вид и поведение экспериментальных животных [6].

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

Суточное потребление корма и воды у крыс всех групп определяли до начала введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала, далее еженедельно, а также через 24 ч (крысы групп №№ 1–4), через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного их введения.

Изучение поведенческих реакций у крыс проводили в течение 2 мин по тесту «Открытое поле» до начала введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала, через 24 ч (крысы групп №№ 1–3) или через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного их введения. Эксперименты проводили с помощью установки «Открытое поле», представляющей собой круглую арену диаметром 93 см, со стенками высотой 42 см, с отверстиями в полу диаметром 2 см. Установка освещалась бестеневой лампой мощностью 150 ватт, расположенной над центральной её частью. Оценивали следующие характеристики: ориентировочно-исследовательские реакции (локомоторная или горизонтально-двигательная активность), количество пересечённых 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) [7].

Электрокардиографические исследования (ЭКГ) у крыс проводили с помощью компьютерного электрокардиографа для ветеринарии «Поли-Спектр-8/В» во втором стандартном отведении. На нефиксированное животное надевали жилетку с беспроводным усилителем и электродами. Регистрацию данных проводили через 24 ч (крысы групп №№ 1–3) и через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала.

Неинвазивное измерение пульса и артериального давления (АД) у крыс проводили с использованием модулей аппаратного комплекса ADInstruments и программного обеспечения LabChart (Австралия). На хвост бодрствующей крысы помещали манжету с преобразователем пульса, по которой определяли АД, основываясь на периодичности окклюзии крови в хвосте. Определяли пульс, систолическое, диастолическое и среднее артериальное давление. Исследования проводились до начала введения суспензии Гомеовокс

или 1 % раствора крахмала, через 24 ч (крысы групп №№ 1–3) и через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного их введения.

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

Клиническое исследование крови у крыс и кроликов.

Определяли следующие гематологические показатели периферической крови: количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрит, тромбокрит, средний объём эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCH), средняя концентрация гемоглобина (MCHC) в эритроците [8, 9]. Подсчёт форменных элементов крови и гемоглобина осуществляли с помощью автоматического гематологического анализатора «Abacus Unior vet», Австрия (крысы), автоматического гематологического анализатора BC-2800 «MINDRAY», Китай (кролики). Количество ретикулоцитов подсчитано на мазках (окраска во влажной камере, микроскоп «Nikon Eclipse E200», Япония). Соотношение различных видов лейкоцитов (окраска мазков крови по Романовскому) и морфометрические параметры эритроцитов были проанализированы на компьютеризированной микроскопической системе МЕКОС-Ц2. Для стандартизации процесса приготовления мазков крови использовали автоматическое устройство для приготовления мазков крови V-SAMPLER (Австрия). Препараты крови фиксировали и окрашивали автоматически на приборе-автомате ЭМКОСТЕЙНЕР-АВТО, АФОМК8-В-01, производитель Россия. Взятие материала проводили до начала введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала, через 24 ч (крысы групп №№ 1–3 и кролики всех групп) и через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного их введения.

Исследование гемостаза у крыс и кроликов проводили с использованием коагулометра TS 4000 (США). Определяли активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ), количество фибриногена. Взятие материала проводили через 24 ч (крысы групп №№ 1–3 и кролики всех групп) и через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала.

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

трансферазы. Взятие материала проводили через 24 ч (крысы групп №№ 1–3 и кролики всех групп) и через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала.

Клинико-биохимические исследования мочи у крыс. Определяли удельный вес, кислотность, содержание глюкозы, белка (полуколичественный метод анализа) диагностическими полосками LabStrip U1116 (Венгрия), с помощью анализатора мочи «Pro DocUReader 2» (Венгрия), а также содержание креатинина и мочевины с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «Chem Well 2910 Combi» (США) и наборов реагентов «SPINREACT S.A.» (Испания) для диагностики «*in vitro*». Взятие материала проводили до начала введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала, через 24 ч (крысы групп №№ 1–3) и через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного их введения.

Патоморфологические исследования. Все животные опытных и контрольных групп были подвергнуты эвтаназии и патологоанатомическому вскрытию с последующей оценкой микроскопической картины внутренних органов [3, 10], через 24 ч (крысы и кролики групп №№ 1–3) и через один месяц (только крысы «отставленной» группы № 4) после заключительного введения суспензии Гомеовокс или 1 % раствора крахмала. Образцы внутренних органов фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина (фрагменты сердца, лёгких, трахеи, пищевода, желудка, тонкого и толстого кишечника, печени, поджелудочной железы, почек, мочевого пузыря, надпочечников, щитовидной железы, парашитовидной железы, тимуса, селезёнки, семенников и придатков семенников самцов, яичников и маточных труб самок крыс и кроликов) или 96 % этаноле (фрагменты головного мозга крыс). После окончания фиксации и стандартной гистологической проводки (автоматизированный тканевой процессор Leica TP1020, Германия) образцы заливали в парафиновые блоки (система заливки тканей с графическим дисплеем Tissue-Tek®ТЕК™, США). Готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм (микротом ротационный Accu-Cut®SPM™, США), которые помещали на стекло с полилизинным покрытием (Menzel). Окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской 1 % водным раствором эозина. Срезы микроскопировали (микроскоп Nikon eclipse 55i,) в проходящем свете [11–14].

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

Статистическая обработка результатов

Проверка на нормальность распределения проводилась с применением общепринятых методов (критерий Шапиро–Уилка, критерий Колмогорова–Смирнова). При подтверждении гипотезы о нормальности распределения изучаемых количественных показателей проводили анализ на равенство внутригрупповых дисперсий с помощью теста Левена для одиночных и множественных сравнений. В случае не Гауссовского распределения использовали непараметрические методы оценки. Для проверки гипотезы об однородности групп исследования в исходном периоде проводили тестирование отсутствия различий между группами при помощи *t*-критерия Стьюдента (для интервальных показателей с нормальным распределением в исследуемой популяции), критерия Манна–Уитни (для ординальных показателей или для интервальных показателей с распределением, отличающимся от нормального). При межгрупповой оценке выборок животных использованы критерий χ^2 (для частотных показателей), однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) для непрерывных показателей. При невозможности использования данного метода анализа подбирали соответствующие непараметрические аналоги (ранговый критерий Краскела–Уоллиса для оценки разностей между медианами с поправкой Бонферрони для множественных сравнений) и проводили коррекцию с учётом множественности сравнений. Если основной тест показывал наличие значимой разницы, проводили дальнейшую обработку: для независимых выборок с помощью критерия Данна, для зависимых выборок – по Даннету. В случае множественных сравнений зависимых выборок применяли тест Фридмана, далее при установлении значимых различий использовали критерий Вилкоксона. При сравнении частотных показателей зависимых выборок применяли точный критерий Фишера.

Полученные результаты представляли в таблицах в виде частотных и/или процентных показателей или при помощи среднего, стандартного отклонения, медиан и нижнего и верхнего квартилей в зависимости от типа переменной. Во всех случаях различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Гомеовокс при ежедневном пероральном введении в течение трёх месяцев в дозах 100 и 1 000 мг/кг крысам и кроликам не вызывал изменений их общего состояния и внешнего вида.

Исследование динамики массы тела. Гомеовокс в изученных дозах при ежедневном пероральном введении в течение трёх месяцев не влиял на динамику массы экспериментальных крыс и кроликов.

Суточное потребление корма и воды у крыс. В ходе исследования было установлено, что крысы 1-й (контрольной) группы в течение всего эксперимента по-

требляли меньше корма, чем до введения 1 % раствора крахмала. Крысы 2-й группы (Гомеовокс в дозе 100 мг/кг) потребляли больше корма, чем животные контрольной группы (самки – в течение всего эксперимента, самцы – на 2 и 3 месяцах). Следует отметить, что у самок к окончанию эксперимента показатели потребления корма были выше показателей в контрольной группе на 17 %, у самцов – на 8 %. У животных 3-й группы (Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг) регистрировали такую же динамику снижения показателей потребления корма, как и в контрольной группе. Однако данные по потреблению корма были значимо выше контрольных в первый месяц у самок (на 33 %) и во второй месяц эксперимента у крыс обоего пола (у самок – на 31 %, у самцов – на 35 %). К окончанию эксперимента потребление корма животными этой группы не имело значимых различий с контрольной группой. Крысы «отставленной» 4-й группы, обследованные через месяц после отмены суспензии Гомеовокс, потребляли больше корма, чем животные контрольной и 3-й групп (табл. 1).

Потребление воды у животных 1-й (контрольной) группы в течение всего эксперимента было значимо меньше, чем до введения 1 % раствора крахмала. Колебание показателей потребления воды крысами опытных групп, получавших в течение трёх месяцев Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг, не имело закономерных различий с контрольной группой и исходными данными. Через месяц после отмены суспензии Гомеовокс самки и самцы «отставленной» 4-й группы пили закономерно больше воды, чем животные контрольной группы.

Следует отметить, что перечисленные изменения показателей потребления корма и воды не выходили за пределы обычных колебаний, наблюдаемых у лабораторных крыс.

Изучение поведенческих реакций у крыс. Гомеовокс в изученных дозах не вызывал значимых изменений показателей ориентировочно-исследовательской, вертикально-двигательной активности, количества пересечённых периферических секторов и эмоционального состояния крыс опытных групп в тесте «Открытое поле».

Электрокардиографические исследования у крыс. Гомеовокс в изученных дозах не вызывал значительных изменений, регистрируемых по показателям ЭКГ во втором отведении у экспериментальных животных.

Неинвазивное измерение пульса и АД у крыс. Было установлено, что при исследовании пульса и АД у крыс контрольной и опытных групп изученные показатели не выходили за пределы физиологической нормы для данного вида животных. Таким образом, Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг при ежедневном пероральном введении в течение трёх месяцев не вызывал изменений пульса и АД у экспериментальных крыс.

Измерения ректальной температуры у крыс. В ходе проведённого эксперимента не было выявлено зна-

Таблица 1

Влияние препарата Гомеовокс в дозах 100 мг/кг и 1000 мг/кг в течение трёх месяцев на суточное потребление корма и воды у крыс

Группа	Корм, г					Вода, мл					
	до введения	1 месяц	2 месяц	3 месяц	4 месяц	до введения	1 месяц	2 месяц	3 месяц	4 месяц	
Контрольная (1 группа)	♀	19,3 19,1÷20,1	13,0* 12,8÷13,2	12,6* 11,7÷12,9	17,3* 16,2÷18,0		35,0 34,7÷36,5	15,6* 15,3÷15,7	29,1* 27,0÷29,8	21,7* 20,2÷22,6	
	♂	21,8 21,6÷22,1	18,8* 18,3÷19,0	15,8* 15,5÷16,6	18,6* 17,7÷18,9		35,2 34,9÷35,6	29,7* 29,0÷30,1	16,9* 16,6÷17,8	25,7* 24,6÷26,2	
Гомеовокс, 100 мг/кг (2 группа)	♀	18,1* 17,2÷18,6	18,2* 17,2÷18,5	16,2** 16,0÷17,1	20,3** 19,4÷21,7		25,9* 24,6÷26,6	23,2** 22,0÷23,6	26,8* 26,4÷28,3	28,4** 27,2÷30,3	
	♂	21,3 19,8÷23,6	18,6* 18,3÷21,0	19,5* 19,0÷22,2	20,1* 19,7÷23,7		29,6* 27,6÷32,8	27,2 26,8÷30,7	27,5* 26,7÷31,2	21,7* 21,3÷25,6	
Гомеовокс, 1000 мг/кг (3 и 4 группы)	♀	20,5* 20,1÷20,7	17,3** 16,5÷18,1	16,5** 15,2÷17,8	16,7* 15,1÷18,1	18,7**♦ 18,4÷22,5	34,2* 33,5÷34,6	24,4* 16,0÷35,2	18,6** 15,5÷23,6	24,6* 22,4÷27,2	26,8** 26,3÷32,1
	♂	23,6 22,9÷23,8	18,3* 17,1÷19,2	21,3** 18,9÷23,1	17,2* 14,9÷20,4	27,8**♦ 26,1÷29,5	35,9 35,0÷36,3	25,4* 22,1÷31,4	26,5** 23,6÷31,0	20,9* 16,4÷26,7	33,527,8**♦ 31,4÷35,6

Примечание: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; * – различие с фоновыми данными достоверно при уровне значимости $p < 0,05$; ** – различие с контрольной группой достоверно при уровне значимости $p < 0,05$; ♦ – статистически значимые различия между 3- и 4-й группой при уровне значимости $p < 0,05$. Межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела–Уоллиса; для проверки различий между связными выборками применялся критерий Вилкоксона.

чимых различий ректальной температуры у животных контрольной и опытных групп. Исследуемый показатель находился в пределах физиологической нормы у крыс.

Лабораторно-клиническое исследование крови у крыс и кроликов

Крысы. Через три месяца введения 1 % раствора крахмала у крыс 1-й (контрольной) группы регистрировали значимое снижение числа ретикулоцитов на 43–45 %. У самцов наблюдалось незначительное (6 %) увеличение МСНС. У самок к окончанию эксперимента отмечали уменьшение количества тромбоцитов (24 %) и, соответственно, процентного снижения количества этих клеток в объёме крови. Также у самок контрольной группы выявлено снижение уровня лейкоцитов на 30 %. В лейкоцитарной формуле регистрировали 5-кратное увеличение эозинофилов. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов у крыс 1-й группы не наблюдалось значимых различий с исходными данными, за исключением незначительного уменьшения уровня анизоцитоза у самцов и повышения диаметра эритроцитов у крыс обоего пола. Следует отметить, что изменения всех показателей находились в референтных пределах для данного вида животных.

Через три месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 100 мг/кг у крыс 2-й группы не отмечено значимых различий с контрольной группой, за исключением 2-кратного увеличения эозинофилов в лейкоцитарной формуле у самок и сохранившегося с начала эксперимента низкого показателя среднего объёма тромбоцитов у самцов. В периферической крови животных этой группы отмечено снижение уровня лейкоцитов в среднем на 22 %. В лейкоцитарной формуле произошел сдвиг в сторону гранулоцитов: увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов, и, соответственно, уменьшение содержания лимфоцитов в лейкограмме. У самцов к окончанию эксперимента уменьшилось содержание тромбоцитов. Однако изменения всех этих показателей были незначительны и находились в референтных пределах для данного вида животных. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через три месяца введения препарата в дозе 100 мг/кг не было выявлено значимых различий с контрольной группой.

До начала эксперимента у крыс 3-й группы содержание гемоглобина в крови было выше значения, наблюдаемого в контрольной группе. Через три месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг у крыс этой группы не было отмечено значимых различий в исследуемых показателях по сравнению с контрольной группой. При сопоставлении с исходными данными наблюдались схожие со 2-й группой изменения показателей красной крови. У самцов количество тромбоцитов снизилось на 29 % и, соответственно, понизился уровень тромбокриты. Так же, как и у крыс

2-й группы, наблюдалось уменьшение числа лейкоцитов (значимое у самок на 47 %). В лейкоцитарной формуле у самок регистрировали увеличение числа сегментоядерных нейтрофилов и эозинофилов на фоне снижения количества лимфоцитов.

Через месяц после отмены препарата у самцов крыс «отставленной» 4-й группы регистрировали увеличение содержания эритроцитов и гемоглобина по сравнению с контрольной группой и данными, полученными к окончанию трёхмесячного введения суспензии Гомеовокс крысам 3-й группы. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через три месяца введения препарата в дозе 1 000 мг/кг у крыс 3-й группы не наблюдалось значимых различий с контрольной группой. По сравнению с исходными данными, у самцов отмечали повышение диаметра эритроцитов. Следует отметить, что, хотя изменение этого показателя и было статистически значимым, оно было невелико (с 6,37 мкм до 6,64 мкм) и не выходило за пределы обычных колебаний, наблюдаемых у лабораторных крыс. Через месяц после отмены препарата у крыс «отставленной» 4-й группы не было зарегистрировано различий с контрольной группой, фоном и с данными, полученными к окончанию трёхмесячного введения препарата (3-я группа).

Таким образом, Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг не оказывал повреждающего действия на систему крови экспериментальных крыс.

Кролики. Через три месяца введения 1 % раствора крахмала у кроликов контрольной группы регистрировали увеличение содержания гемоглобина и остальных показателей красной крови: количество эритроцитов в среднем на 21 %, гематокрита на 24 %, МСН и МСНС на 6 %. К окончанию эксперимента у кроликов контрольной группы количество тромбоцитов и показатель тромбокриты понизились в среднем на 53 и 30 %, соответственно. Следует отметить, что колебания этих показателей часто встречаются у лабораторных животных данного вида и не выходят за референтные уровни.

При исследовании морфометрических показателей эритроцитов у кроликов контрольной группы через три месяца введения 1 % раствора крахмала не отмечено значимых различий в показателях с исходными данными, за исключением снижения уровня анизохромии у самцов на 19 %.

У кроликов 2-й группы к окончанию эксперимента не было выявлено значимых различий с данными контрольной группы. По сравнению с исходными значениями через три месяца введения суспензии Гомеовокс у самок этой группы регистрировали те же изменения показателей красной крови, что и в контрольной группе. У самцов вырос уровень эритроцитов на 16 % и, соответственно, их соотношение к общему объёму крови увеличилось на 19 %. Следует отметить, что колебания перечисленных выше показателей, хотя и были значимыми, не выходили

за границы референтных значений для данного вида животных.

При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через три месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 100 мг/кг у самцов 2-й группы было выявлено значимое уменьшение числа дискоидных эритроцитов и, соответственно, возрастание числа пойкилоцитных форм по сравнению с данными контрольной группы. Однако колебания этих показателей не превышали 4 % и были характерны для лабораторных кроликов. Также у самцов выявлено снижение уровня анизозитоза эритроцитов на 15 % по сравнению с исходными данными.

У самок 3-й группы через три месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг показатели периферической крови не имели значимых различий с контрольной группой. У самцов показатели МСН и МСНС были выше уровня контрольной группы на 14 и 7 %. По сравнению с исходными данными у самцов было отмечено увеличение (в пределах нормы) количества гемоглобина и эритроцитов. При исследовании морфометрических показателей эритроцитов через три месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг у самцов в цитоархитектонике клеток был зарегистрирован более низкий уровень нормальных (дискоидных) эритроцитов по сравнению с аналогичными показателями, наблюдаемыми в контрольной группе. У самок не выявлено значимых различий с контрольной группой. По сравнению с исходными данными отмечали небольшое, но статистически значимое понижение количества дискоцитов у самок (с 97,0 до 95,4 %), уменьшение количества анизохромных эритроцитов у самцов (с 16,5 до 13,0 %).

Колебания перечисленных выше показателей не выходили за границы референтных значений для данного вида животных.

Таким образом, Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг не оказывал повреждающего действия на систему крови экспериментальных кроликов. Обобщенный анализ данных проведенных гематологических исследований не выявил эффектов, которые могли бы быть обусловлены токсическим действием суспензии Гомеовокс у крыс и кроликов.

Исследование гемостаза у крыс и кроликов. Через три месяца введения суспензии Гомеовокс крысам в дозах 100 и 1 000 мг/кг у самок и самцов 2-й группы, а также самок 3-й группы не было выявлено значимых различий по сравнению с животными 1-й (контрольной) группы. У самцов 3-й группы, получавших Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг, наблюдалось значимое удлинение ТВ на 50,3 % по сравнению с контрольной группой. У самцов 4-й («отставленной») группы через месяц после отмены введения суспензии Гомеовокс наблюдалось значимое укорочение ТВ на 28 % по сравнению с крысами 3-й группы. У самок данной группы было установлено значимое удлинение ПВ по сравнению с контрольной (35,7 %) и 3-й группой

(21,9 %). Следует отметить, что вариабельность показателей протромбинового и тромбинового времени свертывания крови у крыс находились в пределах обычно наблюдаемых значений. Таким образом, у крыс, получавших Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг, все показатели гемостаза находились в пределах физиологической нормы.

Через три месяца введения суспензии Гомеовокс кроликам в дозах 100 и 1 000 мг/кг у экспериментальных животных не было выявлено значимых различий по сравнению с контрольной группой, за исключением самок, получавших Гомеовокс в дозе 100 мг/кг, у которых было отмечено значимое укорочение ПВ на 11,7 % по сравнению с кроликами контрольной группы. Наблюдаемое укорочение данного показателя находилось в границах допустимой вариабельности физиологической нормы для кроликов.

Таким образом, Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг не оказывал повреждающего действия на систему свертывания крови крыс и кроликов.

Биохимические исследования крови у крыс и кроликов. При биохимическом исследовании сыворотки крови крыс контрольной и опытных групп все показатели находились в границах обычно наблюдаемых значений.

Через 3 месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 100 мг/кг у крыс 2-й группы были выявлены значимые различия по сравнению с контрольной группой по всем исследуемым показателям, за исключением уровня АСТ. У самок наблюдалось значимое повышение содержания глюкозы (50,4 %), общего белка (31,3 %), альбумина (30 %), мочевины (34 %), креатинина (28,6 %) и активности АЛТ (56,9 %). У самцов было отмечено достоверное повышение концентрации глюкозы (25,8 %), общего белка (24,8 %), альбумина (30 %) и мочевины (53,3 %) по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы (табл. 2).

Через три месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг у крыс 3-й группы не было выявлено значимых различий в биохимическом составе крови по сравнению с контрольной группой. Через месяц после отмены введения суспензии Гомеовокс у самок и самцов 4-й «отставленной» группы было отмечено статистически значимое повышение уровня биохимических показателей крови аналогичное изменениям, наблюдаемым в крови крыс 2-й группы, получавших Гомеовокс в дозе 100 мг/кг. У самок было зафиксировано значимое повышение содержания глюкозы (52,2 %), общего белка (31,4 %), альбумина (34 %), мочевины (30,1 %) и активности АСТ (в 2,1 раза). У самцов было отмечено статистически значимое повышение концентрации глюкозы (14,5 %), общего белка (23,7 %), альбумина (40 %), мочевины (38,8 %) и активности АЛТ (36,5 %) по сравнению с аналогичными показателями у животных контрольной группы. Также у самок и самцов 4-й «отставленной» группы были выявлены значимые различия с крысами 3-й группы

Таблица 2

Влияние препарата Гомеовокс в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг на биохимические показатели крови крыс

Показатели	Контроль Ме (25-75 %)	Гомеовокс, 100 мг/кг Ме (25-75%)	Гомеовокс, 1 000 мг/кг Ме (25-75 %)	Гомеовокс, 1 000 мг/кг (отст. группа) Ме (25-75 %)
Группа	1	2	3	4
Глюкоза ♀	5,75 (5,17÷6,33)	8,65* (7,86÷9,7)	6,22 (5,27÷7,01)	8,75 *♦ (7,73÷9,83)
ммоль/л ♂	6,75 (5,70÷7,12)	8,49 * (7,28÷9,07)	5,38 (4,90÷6,17)	7,73 *♦ (7,22÷8,64)
Общий белок ♀	59,01 (55,19÷62,24)	77,50 * (72,81÷80,44)	71,34 (49,03÷76,92)	77,56 * (72,54÷78,12)
г/л ♂	59,30 (58,42÷65,47)	73,98 * (71,63÷79,56)	54,60 (51,08÷67,23)	73,38 * (70,87÷77,56)
АСТ ♀	25,18 (23,01÷27,80)	32,74 * (31,51÷35,52)	31,51 (21,01÷34,44)	33,74 * (31,07÷36,41)
Ед/л ♂	22,55 (21,78÷24,40)	29,19 * (28,88÷30,12)	20,23 (18,07÷24,40)	31,57 *♦ (30,74÷32,57)
АЛТ ♀	23,40 (19,50÷36,60)	50,30 (23,70÷56,00)	35,70 (24,90÷47,80)	49,30 * (41,90÷60,40)
Ед/л ♂	40,40 (34,70÷48,70)	51,80 (38,10÷64,50)	27,90 (25,8÷63,6)	34,20 (33,90÷46,60)
Мочевина ♀	38,66 (35,68÷49,66)	60,66 * (51,74÷66,61)	52,63 (41,33÷57,39)	58,58 (41,33÷66,61)
ммоль/л ♂	49,66 (48,77÷53,53)	55,61 (44,31÷69,88)	61,85 (45,79÷73,15)	67,80 * (60,66÷73,75)
Креатинин ♀	5,75 (4,16÷6,41)	7,71 * (7,08÷9,06)	6,63 (4,57÷6,86)	7,48 *♦ (6,78÷8,19)
мкмоль/л ♂	5,42 (4,96÷6,44)	8,31 * (7,82÷8,67)	6,41 (5,23÷6,69)	7,52 * (6,81÷8,31)

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; * – различие с контрольной группой достоверно при уровне значимости $p < 0,05$; ♦ – различия между 3 и 4 группой при уровне значимости $p < 0,05$. Межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела–Уоллиса.

по содержанию биохимических показателей в крови. У самок было отмечено повышение концентрации глюкозы на 40,7 % и мочевины на 12,8 %, а у самцов глюкозы на 43,7 %, альбумина на 56 % и мочевины на 12,8 % по сравнению с аналогичными показателями у крыс 3-й группы (см. табл. 2).

Выявленные колебания биохимических показателей крови крыс всех опытных групп, получавших Гомеовокс, находились в пределах обычно наблюдаемых значений, характерных для этого вида животных.

При изучении сыворотки крови кроликов контрольной и опытных групп все исследуемые биохимические показатели находились в пределах физиологической нормы. У самок кроликов, получавших препарат в дозе 1 000 мг/кг, было установлено значимое повышение уровня АЛТ на 39,9 % по сравнению с контрольной группой (табл. 3). Наблюдаемое изменение данного показателя находилось в пределах референтных значений для кроликов.

Таким образом, исследование показало, что Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг не приводит к откло-

нению биохимических показателей крови от физиологической нормы у крыс и кроликов.

Биохимические исследования мочи у крыс. Исследование исходных физико-химических свойств мочи крыс 1-й (контрольной) группы в начале эксперимента не выявило отклонений биохимических показателей от референтных значений. Через три месяца введения 1% раствора крахмала у крыс 1-й группы не было зафиксировано значимых различий по биохимическим показателям мочи, за исключением статистически значимого повышения диуреза у самок в 2,2 раза, а у самцов в 2,9 раз по сравнению с исходными данными.

Через 3 месяца введения суспензии Гомеовокс в дозе 100 мг/кг у крыс 2-й группы наблюдалось статистически значимое увеличение диуреза: у самок в 4,3 раза, а у самцов в 1,7 раз, по сравнению с исходными данными. У самцов 2-й группы было отмечено значимое снижение концентрации мочевины на 40,7% и креатинина на 29% по сравнению с животными контрольной группы.

Таблица 3

Влияние препарата Гомеовокс в дозах 100 мг/кг и 1 000 мг/кг на биохимические показатели крови кроликов

Показатели	Контрольная (1 группа) Ме (25–75 %)	Гомеовокс, 100 мг/кг (2 группа) Ме (25–75 %)	Гомеовокс, 1 000 мг/кг (3 группа) Ме (25–75 %)
Группа	1	2	3
Глюкоза ♀	8,10 (7,62÷8,68)	8,82 (8,46÷9,63)	8,57 (8,23÷9,02)
ммоль/л ♂	7,98 (7,67÷8,74)	8,74 (8,01÷8,85)	7,81 (7,67÷8,12)
Общий белок ♀	73,10 (67,35÷85,76)	71,52 (69,36÷75,69)	71,66 (68,5÷77,42)
г/л ♂	67,64 (63,32÷72,81)	70,08 (69,07÷71,95)	68,21 (67,63÷68,50)
АСТ ♀	51,40 (43,00÷54,40)	43,90 (42,10÷44,20)	46,30 (43,00÷55,90)
Ед/л ♂	47,35 (45,70÷47,80)	51,10 (47,50÷56,80)	58,30 (51,40÷77,50)
АЛТ ♀	56,51 (44,61÷63,64)	63,94 (56,20÷82,97)	79,10 * (63,04÷83,86)
Ед/л ♂	69,59 (63,04÷71,37)	55,31 (49,07÷61,26)	65,13 (60,37÷67,50)
Мочевина ♀	9,10 (8,64÷9,86)	10,39 (7,93÷11,53)	8,50 (8,13÷10,14)
ммоль/л ♂	8,33 (7,57÷8,64)	8,25 (7,74÷8,76)	8,02 (7,23÷8,87)
Креатинин ♀	72,29 (52,97÷84,29)	62,27 (38,60÷93,54)	56,77 (46,21÷78,32)
мкмоль/л ♂	102,26 (45,36÷112,4)	83,67 (36,91÷98,04)	96,35 (59,45÷102,26)

Примечания: Данные представлены в виде медиан групп и 25 и 75 % квартилей; * – различие с контрольной группой достоверно при уровне значимости $p < 0,05$. Межгрупповая множественная оценка равенства медиан проводилась с применением критерия Краскела–Уоллиса.

В начале эксперимента у самцов крыс 3-й группы было выявлено значимое снижение содержание мочевины на 68,5 % по сравнению с контрольной группой. Через 3 мес введения суспензии Гомеовокс в дозе 1 000 мг/кг у самок крыс 3-й группы наблюдалось достоверное повышение диуреза в 4,3 раза по сравнению с исходными данными. У самцов 3-й группы было отмечено значимое увеличение диуреза в 2,9 раз и снижение концентрации креатинина на 25,6 % по сравнению с исходными показателями. Одновременно, у самцов этой группы было зарегистрировано

значимое снижение содержание мочевины на 35,5 % и креатинина на 30,1 %, по сравнению с крысами контрольной группы. Через месяц после отмены введения суспензии Гомеовокс у крыс 4-й «отставленной» группы сохранялось значимое повышение диуреза по сравнению с исходными данными и снижение концентрации креатинина у самцов по сравнению с результатами, полученными сразу после окончания трёхмесячного введения.

У самок 4-й «отставленной» группы объём диуреза значимо повысился в 4,7 раз, а у самцов в 3,4 раза, по сравнению с исходными значениями. У самцов 4-й группы было выявлено значимое снижение уровня креатинина на 36 % по сравнению с результатами, наблюдаемыми до отмены введения суспензии Гомеовокс.

Следует отметить, что наблюдаемые в контрольных и опытных группах изменения концентрации мочевины и креатинина не превышали физиологических значений, характерных для данного вида животных. Увеличение диуреза можно считать физиологическим, т. к. с увеличением общей массы животных увеличивается объём выделяемой мочи. Таким образом, проведённые биохимические исследования мочи не выявили токсического действия суспензии Гомеовокс.

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

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

толстого отделов кишечника крыс и кроликов экспериментальных групп, получавших Гомеовокс в дозах 100 и 1 000 мг/кг, не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных крыс и кроликов, получавших 1 % раствор крахмала. Таким образом, Гомеовокс в изученных дозах не оказывал местного раздражающего действия на органы желудочно-кишечного тракта экспериментальных животных.

Заключение

Гомеовокс, вводимый крысам и кроликам перорально в дозах 100 и 1 000 мг/кг в течение трёх месяцев, не продемонстрировал токсических эффектов и местного раздражающего действия в комплексном исследовании, выполненном в объёме, рекомендованном Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [3].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошкина Ирина Александровна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: iris10.81@mail.ru

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

Corresponding author

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

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

Волкова Анна Валерьевна

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

Volkova Anna

Senior Research Officer of laboratory of psychopharmacology 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

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

Качалов Кирилл Сергеевич

SPIN-код: 2992-6789

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

Kachalov Kirill

SPIN code: 2992-6789

Engineer of the 1st category of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow; student of the pharmaceutical faculty of the Moscow medical university «Reaviz», Moscow

Захаров Алексей Дмитриевич

SPIN-код: 9013-6228

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

Zakharov Aleksei

SPIN code: 9013-6228

Junior 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

Лапицкая Анастасия Сергеевна

SPIN-код: 7966-8750

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

Lapitskaya Anastasiya

SPIN code: 7966-8750

PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory of diagnostics and prevention of infectious diseases MRIEM, Moscow

Литература / References

1. Радциг Е.Ю., Ермилова Н.В. Нарушения голоса в различные периоды его становления: причины и алгоритм ведения пациентов // *РМЖ. Оториноларингология*. – 2016. – № 4. – С. 217–220. [Radtsig EYu, Ermilova NV. Voice disorders at different stages of its maturation: the causes and patient management. *RMJ. Otorhinolaryngology*. 2016;(4):217–220 (In Russ).]
2. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «хронической» токсичности. – М.: Медицина; 2005. 47-54. [Guideline for Experimental (Preclinical) Studying of New Pharmacological Substances. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya farmakologicheskikh veshchestv. Izuchenie «khronicheskoi» toksichnosti. Moscow: Medicine; 2005. P. 41–47 (In Russ).]
4. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств. РД 64-126-91. – М.: МЗ России, ФК; 1992. [Pravila doklinicheskoi otsenki bezopasnosti farmakologicheskikh sredstv. RD 64-126-91. Moscow: Rosminzdrav, FK; 1992.]
5. Diehl KH, Hull R, Morton D. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 2001 Jan-Feb;21(1):15-23. DOI: 10.1002/jat.727
6. 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. – С. 17–19. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part I. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie khronicheskoi toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).]

7. Бальнина Е.С., Березовская И.В. Сравнительная оценка методов определения ориентировочной реакции крыс в токсикологическом эксперименте // *Фарм. и Токсикол.* – 1976. – № 5. – С. 635–638. [Balykina ES, Berezovskaya IV. Sravnitel'naya otsenka metodov opredeleniya orientirovochnoi reaktzii krysv v toksikologicheskom eksperimente. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 1976;(5):635–638. (In Russ).]
8. Тэмл Х., Диам Х., Хаферлах Т. Атлас по гематологии. – М.: МЕДпресс-информ; 2010. [Theml H, Diem H, Haferlach T. Color Atlas of Hematology. Moscow: MEDpress-inform; 2010. (In Russ).]
9. 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).]
10. Бельский М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kii MB. Elementy kolichestvennoi otsenki farmakologicheskogo effekta. Leningrad: Medgiz; 1963. (In Russ).]
11. 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).]
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. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство / А. Г. Сапожников, А. Е. Доросевич. – Смоленск: САУ; 2000. [Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo. Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. Smolensk: SAU; 2000. (In Russ).]
14. Rolls GO. 101 Steps to Better Histology — a Practical Guide to Good Histology Practice. Leica Biosystems. 2008.

Исследование острой и хронической токсичности гомеопатического сиропа Стодаль

Алексеева С. В.¹, Сорокина А. В.¹, Забродина В. В.¹, Мирошкина И. А.¹, Лапицкая А. С.²

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

² – ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва

Аннотация. Проведено исследование острой и хронической токсичности гомеопатического препарата сироп Стодаль, производства Лаборатории Буарон, Франция, широко используемого во врачебной практике как эффективное противокашлевое средство. Стодаль при однократном внутривнутреннем введении аутбредным мышам и крысам в дозах 5, 10, 15, 20 и 25 мл/кг и внутривнутреннем введении крысам в дозах 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5 мл/кг не вызывал гибели животных. В опытах на мышах у самок при внутривнутреннем введении сиропа гомеопатического Стодаль LD₅₀ составила 17,2 (13,1–22,6) мл/кг, у самцов LD₅₀ составила 19,6 (16,1–24,0) мл/кг. Гомеопатический сироп Стодаль при ежедневном пероральном введении крысам и кроликам в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг в течение одного месяца не вызывал изменений общего состояния, поведения внешнего вида и выраженных изменений массы тела животных. Токсических эффектов сиропа Стодаль не отмечено при клинико-лабораторном, патоморфологическом и гистологическом исследованиях, выполненных в общепринятом объёме.

Ключевые слова: Стодаль; гомеопатический сироп; хроническая токсичность; острая токсичность, мыши, крысы; кролики

Для цитирования:

Алексеева С.В., Сорокина А.В., Забродина В.В., Мирошкина И.А., Лапицкая А.С. Исследование острой и хронической токсичности гомеопатического сиропа Стодаль // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2020. – № 1. – С. 53–58. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-53-58

Study of acute and chronic toxicity of homeopathic syrup Stodal

Alekseeva SV¹, Sorokina AV¹, Schroeder OV¹, Zabrodina VV¹, Miroshkina IA¹, Lapitskaya AS²

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Gabrichevsky institute of epidemiology and microbiology

Abstract. The study of acute and chronic toxicity of the homeopathic preparation syrup Stodal, produced by the Laboratory of Boiron, France, widely used in medical practice as an effective antitussive agent. Stodal with a single intragastric administration to outbred mice and rats at doses of 5, 10, 15, 20 and 25 ml / kg and intraperitoneal administration to rats at doses of 2.5; 5; 7.5; 10 and 12.5 ml / kg did not cause death of animals. In experiments on mice in females with intraperitoneal administration of homeopathic syrup Stodal LD₅₀ was 17.2 (13.1 – 22.6) ml/kg and in males LD₅₀ was 19.6 (16.1 – 24.0) ml/kg. Homeopathic syrup Stodal with daily oral administration to rats and rabbits in doses of 1 ml / kg and 10 ml/kg for one month did not cause changes in the General condition, behavior, appearance and pronounced changes in body weight of animals. Toxic effects of stodal syrup were not observed in clinical and laboratory, pathomorphological and histological studies performed in the conventional volume.

Keywords: Stodal; homeopathic syrup; chronic toxicity; acute toxicity; mice; rats; rabbits

For citations:

Alekseeva SV, Sorokina AV, Schroeder OV, Zabrodina VV, Miroshkina IA, Lapitskaya AS. Study of acute and chronic toxicity of homeopathic syrup Stodal. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(1):53–58. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-1-53-58

Введение

Гомеопатические препараты широко используются в профилактике и лечении многих заболеваний, многие авторы отмечают их эффективность и безопасность [1–3]. В нашей стране использование гомеопатических препаратов в медицинской практике законодательно обосновано в первую очередь Приказом Министерства здравоохранения № 335 от 29.11.95 года «Об использовании метода гомеопатии в практическом здравоохранении» [4]. Также понятие гомеопатического лекарственного средства содержится в Федеральном законе РФ «Об обращении лекарственных средств».

Среди крупнейших производителей гомеопатических препаратов французская компания «Буарон». Одним из гомеопатических средств этой компании является сироп Стодаль, давно применяемый как эф-

фективное противокашлевое средство. Кашель – один из частых симптомов при респираторной патологии и отмечается приблизительно в 70 % случаев при острых респираторных вирусных инфекциях [5, 6].

Стодаль – многокомпонентный препарат на основе ряда природных активных веществ, обладающих комбинированным противовоспалительным, противоотёчным и муколитическим действием, что особенно актуально при острых респираторных заболеваниях [7, 8]. Исследование острой и хронической токсичности данного гомеопатического препарата является установленной процедурой доклинического изучения безопасности лекарств [9, 10].

Подобные исследования гомеопатических средств сложны тем, что выйти на летальные дозы при исследовании острой токсичности и обнаружить органы-мишени при проведении хронического эксперимента

практически невозможно. Однако бывают исключения, которые чаще всего не связаны с активностью действующих веществ, а вызваны несоблюдением сигнатурных рекомендаций.

Цель исследования

Целью исследования была оценка острой и хронической токсичности гомеопатического сиропа Стодаль. Задачи исследования: определить среднелетальные дозы, установить выраженность токсического действия и переносимость препарата при однократном введении, зарегистрировать сроки развития интоксикации и гибели животных, определить класс токсичности гомеопатического сиропа Стодаль; выявить возможные токсические эффекты при его ежедневном пероральном введении в течение одного месяца, возможные органы-мишени токсических воздействий и местное раздражающее действие.

Материалы и методы

В эксперименте использовали готовую лекарственную форму (сироп гомеопатический), серия МО0113611, по 200 мл во флаконе из коричневого стекла типа III, производитель – Лаборатория Буарон, Франция.

В 100 г сиропа содержатся такие активные компоненты, как Pulsatilla C6-0,95; Rumexcrispus C6-0,95; Bryonia C3-0,95; I песа C3-0,95; Spongiatosta C3-0,95; Stictapulmonaria C3-0,95; Antimoniumtartaricum C6-0,95; Miocardе C6-0,95; Coccusacti C3-0,95; Drosera MT-0,95; вспомогательные компоненты – Толу, сироп Полигала, карамель, бензойная кислота, этанол 96 %, сироп сахарозы.

Животные (мыши, крысы и кролики), использованные в экспериментах, были получены из сертифицированных питомников и содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044–2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Работы с животными выполняли в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными на основе стандартных операционных процедур, принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123 [12, 13].

Исследование острой токсичности было проведено на белых беспородных мышях ($n = 120$, масса 18–20 г) и белых беспородных крысах ($n = 120$, масса 180–200 г).

Сироп Стодаль вводили однократно в желудок с помощью металлического атравматического зонда в дозах 5, 10, 15, 20 и 25 мл/кг. Введение Стодаля в дозе 25 мл/кг осуществлялось в максимальном для однократного внутрижелудочного введения объеме для каждого из видов лабораторных животных (мыши — 0,5 мл, крысы — 5 мл). При внутрибрюшинном введении для обеспечения прохождения через иглу сироп

разбавляли стерильной дистиллированной водой в соотношении 1:1. Полученный раствор вводили однократно с использованием стерильных одноразовых шприцев самкам и самцам мышей в дозах 5, 10, 15, 20 и 25 мл/кг, крысам — 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5 мл/кг. Следует отметить, что введение сиропа Стодаль в дозе 12,5 мл/кг осуществлялось в максимальном объеме для однократного внутрибрюшинного введения 5 мл на крысу массой 200 г [14].

Общая продолжительность наблюдения за всеми экспериментальными животными в остром эксперименте составляла 14 сут. Первые 8 ч после введения препарата каждое животное находилось в индивидуальной, прозрачной, пластиковой камере и было доступно для непрерывного визуального наблюдения. Через 8 ч все животные перемещались в клетки группового содержания. В последующие сутки для выявления возможной гибели, а также для регистрации общего состояния и поведения животных осматривали ежедневно утром и вечером. На 15-е сутки после однократного введения гомеопатического сиропа Стодаль была осуществлена эвтаназия декапитацией всех выживших мышей и крыс. На основании результатов, полученных при регистрации смертности в течение эксперимента, вычисляли LD_{50} , LD_{16} , $LD_{84} \pm$ стандартная ошибка по методу Литчфилда и Уилкоксона в среде соответствующего программного обеспечения [12, 15].

Исследование хронической токсичности было проведено на двух видах животных: белых беспородных крысах обоего пола ($n = 36$) и кроликах породы шиншилла обоего пола ($n = 36$). Стодаль вводили крысам внутрижелудочно, ежедневно в течение одного месяца с помощью металлического атравматического зонда и кроликам перорально с помощью одноразовых шприцев. В эксперимент были введены три группы крыс и кроликов: 1-я группа – контроль; 2-я группа – препарат в фармакологически эффективной дозе 1 мл/кг; 3-я группа – препарат, превышающей фармакологически эффективную — в 10 раз дозу 10 мл/кг. Животным контрольной группы (1-я группа) вводили 1 % раствор крахмала.

Ежедневно перед введением препарата оценивали внешний вид, общее состояние и поведение экспериментальных животных [10, 11]. Ежедневно регистрировали динамику массы тела. Изучение поведенческих реакций крыс контрольной и опытных групп проводилось по тесту "открытое поле" до начала эксперимента и спустя 24 ч после заключительного введения препарата. Поле представляет собой круглую арену диаметром 93 см с отверстиями в полу диаметром 2 см, с высотой стенок поля 42 см. Освещение – бес-теневая лампа 150 Вт в центре арены. Регистрацию физиологических параметров проводили до начала эксперимента, через 24 ч после заключительного введения Стодаля. Влияние сиропа Стодаль на сердечно-сосудистую систему оценивали на компьютерном

электрокардиографе «Поли-Спектр-8/В» во втором стандартном отведении. Гематологические исследования выполняли с помощью автоматического гематологического анализатора «AbacusUniorvet», Австрия (крысы) и автоматического гематологического анализатора «MINDRAY», Германия (кролики). 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 [12]. Количество ретикулоцитов подсчитано на мазках (окраска во влажной камере, микроскоп «NikonEclipse E200», Япония). Соотношение различных видов лейкоцитов (окраска мазков крови по Романовскому) и морфометрические параметры эритроцитов были проанализированы на компьютеризированной микроскопической системе МЕКОС-Ц1. Взятие проб проводили до начала введения и через 24 ч после заключительного введения сиропа Стодаль или 1 % раствора крахмала [17, 18].

Исследование системы гемостаза экспериментальных животных осуществляли на коагулометре TS 4000, США до начала эксперимента и через месяц, спустя 24 ч после последнего введения сиропа Стодаль. Влияние препарата на гемостаз оценивали по следующим показателям: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), тромбиновое время (ТВ), протромбиновое время (ПВ) и количество фибриногена.

Взятие материала для биохимического исследования крови крыс и кроликов проводили через один месяц, спустя 24 ч после заключительного введения гомеопатического сиропа Стодаль. Для оценки влияния препарата на функциональное состояние внутренних органов были изучены следующие биохимические показатели крови крыс и кроликов: содержание сахара, общего белка, аланин- и аспаратаминотрансферазы, креатинина и мочевины. Биохимические исследования крови осуществляли с помощью автоматического биохимического и иммуноферментного анализатора «ChemWell 2910 Combi», США). Биохимическое исследование мочи крыс проводили до начала эксперимента и через один месяц, спустя 24 ч после заключительного введения препарата. Клинико-биохимическое исследование мочи крыс включало определение удельного веса, кислотности, определение количества эритроцитов и гемоглобина (анализатор мочи ClinitekStatus с диагностическими полосками Bayer), содержания креатинина и мочевины (автоматический биохимический и иммуноферментный анализатор «ChemWell 2910 Combi», США) [16].

Все животные опытных и контрольных групп были подвергнуты эвтаназии способом декапитации и патологоанатомическому вскрытию с последующей оценкой микроскопической картины внутренних органов, через 24 ч. после заключительного введения.

Для гистологического изучения был произведён забор образцов тканей жизненно важных внутренних органов: головного мозга, сердца, аорты, лёгких, трахеи, пищевода, желудка, тонкого и толстого кишечника, печени, поджелудочной железы, почек, мочевого пузыря, надпочечников, щитовидной железы, тимуса, селезёнки, яичников, матки, семенников, придатков семенников и других органов и тканей [19].

Образцы тканей, отобранные для гистологического исследования, фиксировали в 10 % водном растворе формалина. Гистологические срезы толщиной 10 мкм готовили с помощью замораживающего микротомата. Все гистологические срезы внутренних органов окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской водным раствором эозина. Кусочки головного мозга фиксировали в этаноле, далее осуществляли стандартную проводку и заливку в гомогенизированную парафиноподобную среду Histomix. Гистологические срезы головного мозга толщиной 4–6 мкм получали с помощью роторного микротомата «Accu-CutSRM 200», Япония. Гистологические срезы головного мозга окрашивали толуидиновым синим по Нисслию. Микроскопировали в проходящем свете. Возможное местное раздражающее действие гомеопатического сиропа Стодаль при пероральном внутрижелудочном введении оценивали клинически, затем макроскопически при проведении патологоанатомического вскрытия, а также микроскопически при исследовании гистологических срезов пищевода, желудка, тонкой и толстой кишки [19].

При статистической обработке полученных данных нормальность распределения определяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий – с помощью критерия Левена. Если нормальность распределения отсутствовала или дисперсии выборок статистически различались, использовали непараметрические методы статистики. В случае независимых выборок сравнение проводили с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Краскел–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Фридмана с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету. Полученные результаты выражали в виде медиан, нижнего и верхнего квартилей. Во всех случаях различия считали значимыми при $p \leq 0,05$ [12, 15].

Результаты

В результате исследований после однократного перорального введения гомеопатического сиропа Стодаль (мыши, крысы) в дозах 5, 10, 15, 20 и 25 мл/кг и внутрибрюшинного введения (крысы) в дозах 2,5; 5; 7,5; 10 и 12,5 мл/кг в максимально допустимых объёмах определение средней смертельной дозы не представлялось возможным из-за отсутствия гибели

животных. Животные после перорального введения сиропа сохраняли активность, не было установлено нарушений рефлексов. Дыхание, сердечно-сосудистая деятельность, состояние шерстного покрова, кожи и видимых слизистых оболочек, реакция на внешние раздражители соответствовали норме. Поведение крыс и мышей в течение всего 14-дневного наблюдения не отличалось от поведения здоровых животных. При внутрибрюшинном введении сиропа Стодаль крысам во всех дозах отмечалась сходная клиническая картина. Сразу после введения сиропа Стодаль у крыс наблюдалось снижение двигательной активности – животные были вялыми, малоподвижными. Дыхание было частым и поверхностным. Шерсть крыс была взъерошена. Состояние кожи и видимых слизистых оболочек, а также реакция на внешние раздражители соответствовали норме. Не отмечено нарушений ушного и корнеального рефлексов и рефлекса Штрауба. Через 15–30 мин, двигательная активность крыс восстанавливалась. У животных наблюдался активный груминг. В дальнейшем, в течение всего 14-дневного периода наблюдения не было зарегистрировано ни одного случая гибели крыс и не наблюдалось выраженных признаков интоксикации.

При однократном внутрибрюшинном введении гомеопатического сиропа Стодаль мышам в дозах 5, 10, 15, 20 и 25 мл/кг отмечалась гибель части животных (табл. 1, 2 и 3). Были определены среднесмертельные дозы: у самок LD₅₀ составила 17,2 (13,1–22,6) мл/кг, LD₁₆ – 12,2 (11,7–12,8) мл/кг, LD₈₄ – 24,2 (23,1–25,3) мл/кг и у самцов LD₅₀ составила 19,6 (16,1–24,0) мл/кг, LD₁₆ – 15,3 (14,9–15,8) мл/кг, LD₈₄ – 25,2 (24,5–25,9) мл/кг.

Таблица 1

Динамика смертности самок мышей, получавших внутрибрюшинно сироп гомеопатический Стодаль

Доза препарата	Сроки наблюдения					
	24 ч	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	14 сут
5 мл/кг	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
10 мл/кг	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
15 мл/кг	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6
20 мл/кг	0/6	1/6	3/6	4/6	4/6	4/6
25 мл/кг	0/6	1/6	6/6	6/6	6/6	6/6

Таблица 2

Динамика смертности самцов мышей, получавших внутрибрюшинно сироп гомеопатический Стодаль

Доза препарата	Сроки наблюдения					
	24 ч	2 сут	3 сут	4 сут	5 сут	14 сут
5 мл/кг	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
10 мл/кг	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
15 мл/кг	0/6	1/6	1/6	1/6	1/6	1/6
20 мл/кг	0/6	2/6	2/6	3/6	3/6	3/6
25 мл/кг	1/6	2/6	5/6	5/6	5/6	5/6

Таблица 3

Итоговые показатели гибели мышей при внутрибрюшинном введении гомеопатического сиропа Стодаль

№	Мыши самки			№	Мыши самцы		
	Доза, мл/кг	Ответ	В группе		Доза, мл/кг	Ответ	В группе
1	5	0	6	1	5	0	6
2	10	0	6	2	10	0	6
3	15	1	6	3	15	1	6
4	20	4	6	4	20	3	6
5	25	6	6	5	25	5	6

Степень выраженности клинической картины интоксикации, наблюдаемой у мышей после однократного внутрибрюшинного введения препарата, прямо зависела от его дозы. После введения препарата мыши сильно втягивали живот. Дыхание было частым, поверхностным. Через 1–3 мин после введения мыши становились вялыми, малоподвижными. У животных всех групп отмечалась бледность видимых слизистых оболочек и кожных покровов. У мышей, которым сироп Стодаль вводили в дозах 5 и 10 мл/кг, отмечали повышенную реакцию на внешние раздражители. При тактильном воздействии животные подпрыгивали, метались по камере наблюдения, и через 8 ч при перемещении их в клетки общего содержания эти гиперреакции были сохранены. У одного самца, получавшего Стодаль в дозе 10 мл/кг, наблюдали кратковременный тремор. Через 30–40 мин после введения сиропа в дозе 15 мл/кг часть мышей вздрагивала. У животных, которым ввели сироп в дозах 15, 20 и 25 мл/кг, наблюдалось заметное вздутие живота. Восстановление двигательной активности и груминг у мышей отмечали через 20 мин (5 и 10 мл/кг) – 4 ч (15 и 20 мл/кг) после внутрибрюшинного введения Стодаля. После введения сиропа Стодаль в дозе 25 мл/кг у 11 животных фиксировали отсутствие двигательной активности, которое не восстановилось вплоть до гибели мышей. Гибель животных, получивших Стодаль, фиксировали на 1–2 сут (25 мл/кг) и 2–4 сут (15 и 20 мл/кг). Все погибшие животные перед смертью были малоактивными, не потребляли корм, одна самка мыши (20 мл/кг) и 11 мышей (25 мл/кг) были в коматозном состоянии. Активность всех выживших в ходе эксперимента мышей восстанавливалась на вторые–третьи сутки наблюдения. Первые трое суток у животных (15, 20 и 25 мл/кг) отмечалось сильное втягивание живота, в дальнейшем внешний вид и состояние животных улучшилось. Значимость этих наблюдений невелика, поскольку парентеральный (внутрибрюшинный) способ введения гомеопатического сиропа Стодаль не показан для клинического применения. Необходимость его использования вытекала из формального требования, определяющего использование двух путей введения при оценке острой токсичности [9, 10].

При исследовании хронической токсичности сиропа Стодаль при ежедневном пероральном введении крысам и кроликам в дозах 1 мл/кг и 10 мл/кг в течение одного месяца не вызывал изменений общего состояния, внешнего вида и выраженных изменений массы тела экспериментальных животных. Стодаль не влиял на поведения экспериментальных крыс в тесте «открытое поле». В результате проведенного исследования у крыс не было выявлено патологических изменений сердечно-сосудистой системы, регистрируемых по показателям электрокардиограммы во втором стандартном отведении. Стодаль не оказывал повреждающего действия на систему крови экспериментальных животных, не вызывал существенных изменений биохимических показателей сыворотки крови экспериментальных животных и физико-химических свойств мочи у крыс. В результате проведенного

патологоанатомического вскрытия, последующих макроскопических и микроскопических исследований установлено, что гомеопатический сироп Стодаль не вызывает изменений строения внутренних органов крыс и кроликов, а также головного мозга крыс. Сироп гомеопатический Стодаль не обладал местнораздражающим действием.

Заключение

Готовая лекарственная форма гомеопатический сироп Стодаль может быть отнесена к 6 классу токсичности — относительно безвредные соединения (по классификации *Сидорова К.К.* — 1973 г.). Данные проведенных токсикологических исследований не устанавливают препятствий для клинических исследований гомеопатического сиропа Стодаль.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Алексеева Светлана Витальевна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

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

Corresponding author

e-mail: alexeeva.sv@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-1262-6997

SPIN code: 8985-3418

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

Сорокина Александра Валериановна

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

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

PhD in Biology, Leading researcher 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

PhD in Biology, Research scientist of the 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

Лапицкая Анастасия Сергеевна

SPIN-код: 7966-8750

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

Lapitskaya Anastasiya

SPIN code: 7966-8750

PhD in Biology, Senior Research Officer of laboratory of diagnostics and prevention of infectious diseases MRIEM, Moscow

Литература / References

1. Гомеопатия. Часть I. Основные положения гомеопатии / Г. Кёллер. — Смоленск: Гомеопатическая медицина; 1997. [*Gomeopatiya. CHast' I. Osnovnye polozheniya gomeopatii*. G. Köhler. Smolensk: Homeopathy medicine; 1997. (In Russ).]

2. Крылов А.А., Песонина С.П., Крылова Г.С. Гомеопатия для врачей общей практики. — СПб: Питер Паблишинг; 1997. [Krylov AA, Pesonina SP, Krylova GS. Gomeopatiya dlya vrachej obshchej praktiki. Saint-Petersburg: Piter Publishing; 1997. (In Russ).]

3. Никифорова Г.Н., Свистушкин В.М. Возможности использования комплексных гомеопатических препаратов в лечении и профилактике острых респираторных вирусных инфекций // *Лечащий врач*. 2012. [Nikiforova GN, Svistushkin VM. Vozможности ispol'zovaniya kompleksnyh gomeopaticheskikh preparatov v lechenii i profilaktike ostryh respiratornyh virusnyh infekcij. *Lvrach*. 2012. (In Russ).] Доступно по: <https://www.lvrach.ru/2012/04/15435409/>. Ссылка активна на 24.03.2020.

4. Об использовании метода гомеопатии в практическом здравоохранении». Приказ МЗ №335 от 29.11.95 года. [Ob ispol'zovanii metoda gomeopatii v prakticheskom zdravoohranenii». Order of the Ministry of health No. 335 of 29.11.95. (In Russ).] Доступно по: <http://docs.cntd.ru/document/9015924> Ссылка активна на 24.03.2020.

5. Карпова Е.П. Возможности симптоматической терапии кашля при оториноларингологической патологии у детей // *РМЖ*. — 2015. — № 18. — С.1083–1085. [Karpova EP. Vozможности simptomaticheskoy terapii kashlya pri otorinolaringologicheskoy patologii u detej. *RMJ*. 2015;(18):1083–1085. (In Russ).]

6. Локшина Э.Э., Зайцева О.В., Зайцева С.В. и др. Опыт применения натуропатического препарата у детей с острыми респираторными заболеваниями // *Педиатрия*. — 2016. — Т. 95. — № 3. — С. 158–163. [Lokshina EE, Zaytseva OV, Zaytseva SV, et al Experience of naturopathic medication using in children with acute respiratory infections. *Pediatrics*. 2016;95(3):158–163. (In Russ).]

7. Захарова И.Н., Коновалов И.К., Енев И., др. Советы гомеопата // *Клиническая гомеопатия и практическая медицина*. — 2017. — № 19. — С. 62–67. [Zaharova IN, Konovalov IK, Enev I, et al. Sovety gomeopata. *Klinicheskaya gomeopatiya i prakticheskaya medicina*. 2017;(19):62–67. (In Russ).]

8. Методические рекомендации. Возможности клинической гомеопатии в комплексной терапии острых воспалительных заболеваний верхних дыхательных путей / Карнеева О.А., Рязанцев С.В., Радциг Е.Ю., Ким И.А. — Москва—Санкт-Петербург: 2017. [Metodicheskie rekomendacii. Vozможности klinicheskoy gomeopatii v kompleksnoj terapii ostryh vospalitel'nyh zabolevanij verhnih dyhatel'nyh putej. Karneeva OA, Ryazancev SV, Radcig EYu, Kim IA. Moscow—Saint Petersburg: 2017. (In Russ).]

9. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. Изучение хронической токсичности. — М.: Гриф и К; 2012. — С. 15–19. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. CH. 1. Metodicheskie rekomendacii po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya lekarstvennyh sredstv. Izuchenie ostroj toksichnosti. Izuchenie hronicheskoy toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).]

10. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. Изучение «острой» токсичности. Изучение «хронической» токсичности. — М.: Медицина; 2005. — С. 41–54. [Rukovodstvo po eksperimental'nomu (doklinicheskomu) izucheniyu novyh farmakologicheskikh veshchestv. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo dejstviya farmakologicheskikh veshchestv. Izuchenie «ostroj» toksichnosti. Izuchenie «hronicheskoy» toksichnosti. Moscow: Medicine; 2005. (In Russ).]

11. Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека / Г. Н. Красовский, Ю. А. Рахманин, Н. А. Егорова. — М.: Медицина; 2009. [Ekstrapolyaciya toksikologicheskikh dannyh s zhivotnyh na cheloveka / G. N. Krasovskij, Yu. A. Rahmanin, N. A. Egorova. Moscow: Medicina; 2009]

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

13. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств. РД 64-126-91. — М.: МЗ России, ФК; 1992. [Pravila doklinicheskoi otsenki bezopasnosti farmakologicheskikh sredstv. RD 64-126-91. Moscow: Rosminzdrav, FK; 1992.]

14. Бельский М.Б. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kii MB. Elementy kolichestvennoy otsenki farmakologicheskogo effekta. Leningrad: Medgiz; 1963. (In Russ).]

15. Diehl KH, Hull R, Morton D. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Toxicol*. 2001 Jan-Feb;21(1):15-23. DOI: 10.1002/jat.727

16. Тэмл Х., Диам Х., Хаферлах Т. Атлас по гематологии. — М.: МЕДпресс-информ; 2010. [Theml H, Diem H, Haferlach T. Color Atlas of Hematology. Moscow: MEDpress-inform; 2010. (In Russ).]

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

18. Rolls GO. 101 Steps to Better Histology — a Practical Guide to Good Histology Practice. Leica Biosystems. 2008.

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>



Издательство ОКИ

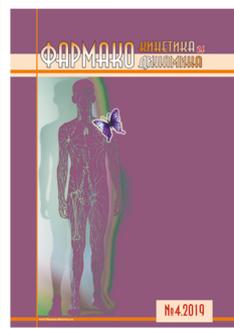
ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей,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

Сайт издательства: www.izdat-oki.ru



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

Сайт журнала: www.clinvest.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

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