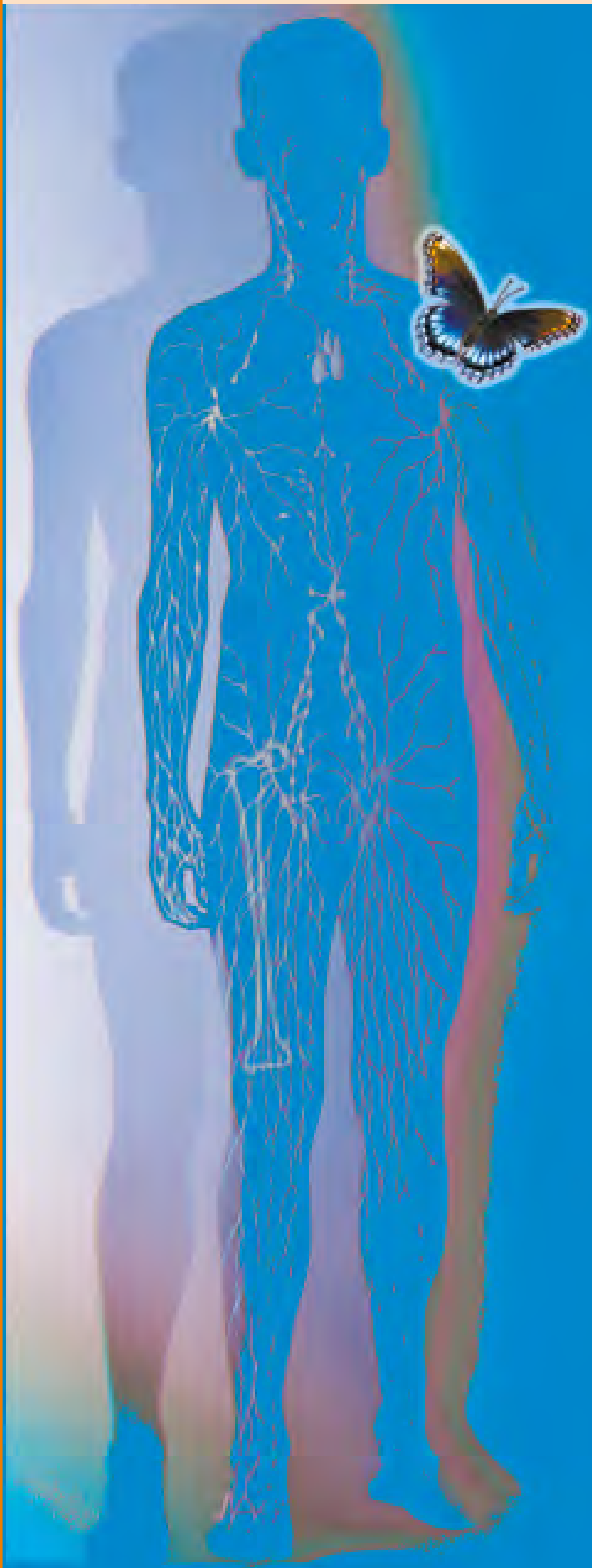
ФАРМАКОКИНЕТИКА и ФАРМАКОДИНАМИКА



№2.2017

www.PharmacoKinetica.ru

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№2
2017

Издательство ОКИ

Подписано в печать 24.07.2017 г. **Тираж** 400 экз.
ООО «МЕДИАКОЛОР», www.mediacolor.ru

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

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

СОДЕРЖАНИЕ

СОДЕРЖАНИЕ

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№2
2017

Издательство
ОКИ

Signed in print 24.07.2017 г. **Circulation** 400 copies.
Typography: LCC «MEDIACOLOR», www.mediacolor.ru

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

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

CONTENTS

CONTENTS

Уважаемые читатели!

В этом номере журнала представлены работы по изучению фармакодинамики, фармакокинетики и механизма действия в основном новых, создаваемых лекарственных средств. В частности, цикл работ посвящён изучению антиаритмической, противофибрилляторной активности, а также механизма действия нового соединения ЛГМ-124, содержащего антиаритмическое средство лаппаконитина гидробромид. Установлены особенности действия ЛГМ-124 в сравнении с известным антиаритмиком и его преимущества, позволяющие рекомендовать дальнейшее изучение его фармакологической активности.

В журнале представлены также интересные и важные результаты по изучению анксиолитической активности нового лекарственного средства ГБ-115, находящегося на II-фазе клинических исследований. Полученные результаты демонстрируют отсутствие побочных эффектов у ГБ-115, характерных для производных 1,4-бензодиазепина, что указывает на перспективу его внедрения в клиническую практику.

Представлены результаты сравнительного изучения противосудорожного действия нового производного пирролидона-2 (соединение ГИЖ-290) в сравнении с леветирацетамом. Выявленные при этом различия в фармакологической активности у различных линий мышей также указывают на перспективность дальнейшей разработки этого соединения.

Описана новая методика количественного определения фексофенадина в биоматериале с использованием ВЭЖХ, позволяющая проводить фармакокинетические исследования с этим тест-маркером по изучению влияния лекарственных препаратов на функциональную активность и экспрессию гликопротеина-P.

И, наконец, впервые представлены результаты изучения фармакокинетики основного метаболита нового лекарственного средства тропоксина у различных видов животных и человека. Установлены различия в элиминации исследуемого соединения у крыс, кроликов и человека, что может играть важную роль в проявлении основного действия тропоксина.

Главный редактор журнала
Жердев Владимир Павлович

Изучение электрофизиологических механизмов действия соединения ЛМГ-124

Цорин И.Б.[1], Зинченко В.П.[2], Теплов И.Ю.[2], Косенков А.М.[2], Муринов Ю.И.[3], Юнусов М.С.[3], Крыжановский С.А.[1]

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

[2] – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биофизики клетки Российской академии наук (ИБК РАН), г. Пущино

[3] – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт химии Российской академии наук (УфИХ РАН), г. Уфа

Резюме. В экспериментах *in vitro*, выполненных на изолированных нейронах гиппокампа крыс, изучали электрофизиологические механизмы, лежащие в основе антиаритмической активности комплексного соединения ЛМГ-124, содержащего в своём составе антиаритмическое средство IC класса классификации Vaughan Williams — лаппаконитина гидробромид. В качестве препарата сравнения использовали прототип – лаппаконитина гидробромид. Электрическую активность нейронов регистрировали методом patch-clamp в конфигурации whole cell. Показано, что соединение ЛМГ-124 эффективно ингибирует быстрый входящий Na^+ ток, протекающий через трансмембранные потенциал-зависимые быстрые Na^+ каналы. Этот эффект соединения ЛМГ-124 реализуется на уровне открытого Na^+ канала. Как следует из полученных данных, соединение ЛМГ-124, в отличие от лаппаконитина гидробромида, блокирует не только Na^+ каналы, но частично и K^+ каналы, в силу чего его можно отнести к антиаритмическим лекарственным средствам, потенциально обладающим свойствами антиаритмиков Ia класса, по классификации Vaughan Williams.

Ключевые слова: соединения ЛМГ-124, лаппаконитинна гидробромид, patch-clamp, Na^+ токи, K^+ токи

The study of electrophysiological mechanisms of the action compounds LMG-124

Tsorin I.B.[1], Zinchenko V.P.[2], Teplov I.Yu.[2], Kosenkov A.M.[2], Murinov Yu.I.[3], Yunusov M.S.[3], Kryzhanovskii S.A.[1]

[1] – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

[2] – FSBIS «Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy Sciences» (ICB RAS), Pushchno

[3] – FSBIS «Ufa Institute of Chemistry of the Russian Academy of Sciences» (UIC RAS), Upha

Resume. *In vitro* experiments performed on the isolated rats hippocampal neurons, the antiarrhythmic activity electrophysiological mechanisms of the complex compound LMG-124 containing an antiarrhythmic agent of the class I by Vaughan Williams, Lappaconitine hydrobromide, were studied. As the reference preparation, a prototype, Lappaconitine hydrobromide, was used. The electrical activity of the neurons was recorded by the patch-clamp method in the whole cell configuration. It is shown that the compound LMG-124 effectively inhibits the fast incoming Na^+ current flowing through transmembrane potential-dependent fast Na^+ channels. This effect of the LMG-124 connection is realized at the level of the open Na^+ channel. As follows from the data obtained, the LMG-124 compound, in contrast to Lappaconitine hydrobromide, blocks not only Na^+ channels, but also partially and K^+ channels, so that it can be attributed to antiarrhythmic drugs potentially possessing anti-arrhythmic properties of the Ia class by Vaughan classification Williams.

Keywords: LMG-124 compounds, Lappaconitine hydrobromide, patch-clamp, Na+ currents, K^+ currents

Автор, ответственный за переписку:

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

Введение

Лаппаконитин — алкалоид, получаемый из растения аконит белоустный (лат. *Aconitum leucostomum*) [1]. Созданный на его основе лекарственный препарат лаппаконитина гидробромид (син. аллапинин), согласно классификации Vaughan Williams, относится к антиаритмическим лекарственным средствам IC класса [2]. Антиаритмики IC класса — это т.н. мембраностабилизирующие препараты, являющиеся блокаторами трансмембранных потенциал-зависимых быстрых натриевых каналов [3]. Антиаритмическое действие этих препаратов основано на удлинении фаз быстрой деполяризации и медленной деполяризации [4, 5]. Эти фазы обеспечиваются работой натриевых каналов. Фаза быстрой деполяризации обеспечивает генерацию потенциала действия, когда в процесс вовлекается большое количество высокопороговых потенциал-зависимых натриевых каналов. Фаза медленной деполяризации — это фаза, предшествующая генерации потенциала действия. В это время открываются низкопороговые потенциал-зависимые натриевые каналы [6]. Функция этих каналов — поднять потенциал мембраны до порога, достаточного для генерации потенциала действия. Таким образом, удлинение фазы быстрой деполяризации увеличивает продолжительность переднего фронта потенциалов действия, а удлинение фазы медленной деполяризации увеличивает интервалы между ними и снижает частоту сердечных сокращений [7].

Антиаритмики IC вызывают выраженное угнетение скорости деполяризации и амплитуды фазы 0 потенциала действия кардиомиоцитов и, как следствие этого, замедление процессов проведения и возбуждения в миокарде предсердий и желудочков.

В клинике лаппаконитина гидробромид применяют для лечения желудочковой и наджелудочковой экстрасистолии; пароксизмальной наджелудочковой тахикардии, в том числе и при синдроме Вольфа–Паркинсона–Уайта; пароксизмах трепетания и мерцания предсердий; пароксизмальной желудочковой тахикардии в случае отсутствия органических изменений миокарда [8, 9]. Однако он, так же как и другие антиаритмики IC класса, обладает большим количеством побочных эффектов, в том числе и проаритмическим действием [10].

Цель настоящего исследования — изучение особенностей электрофизиологических механизмов действия нового оригинального отечественного комбинированного антиаритмического лекарственного средства ЛМГ-124, содержащего в своём составе лаппаконитина гидробромид, однако отличающегося от него тем, что оно реализует свои антиаритмические эффекты в более низких дозах и тем самым потенциально менее токсично.

Методы

Первичная культура клеток гиппокампа

В работе использовали смешанную нейроглиальную культуру клеток гиппокампа, выделенную из мозга новорождённых (P1-3) крыс линии Вистар. После декапитации извлекали мозг и переносили его в чашку Петри с холодным раствором Версена на льду. Мозг разрезали вдоль, удаляли сосудистые оболочки, средний и задний мозг. Извлекали гиппокамп и переносили в холодный раствор Версена. Далее ткань аккуратно измельчали ножницами и помещали в раствор Версена с добавлением 0,1% трипсина и инкубировали 10 мин при 37 °C на термошейкере при 600 об/мин. Затем кусочки ткани трижды отмывали нейробазальной средой (Neurobasal A) и диссоциировали путём энергичного пропускания через наконечник пипетки. Полученную суспензию центрифугировали 3 мин при 300 g. Супернатант удаляли, клетки ресуспендировали в нейробазальной среде с добавлением глутамина (0,5 мМ), Supplement B27 (2%), гентамицина (15 мкг/мл). Готовую суспензию помещали в стеклянные цилиндры со шлифованными торцами с внутренним диаметром 6 мм, поставленные на круглые покровные стекла диаметром 25 мм (VWR International), покрытые полиэтиленимином из расчёта 1 гиппокамп на 10 стекол и помещали в 35 мм чашки Петри (Greiner). В каждый цилиндр помещали 100 мкл суспензии клеток и оставляли на 1 ч для прикрепления в CO_2-инкубаторе при 37 °C. После этого цилиндры извлекали, а объём культуральной среды доводили до 1,5 мл. Дважды в неделю культуральную среду (2/3 объёма) меняли на свежую. В экспериментах использовали клетки как возрастом 1–3 дня (до образования нейронных сетей), так и возрастом 9–14 дней культивирования (после образования нейронных сетей).

Patch-clamp регистрация в конфигурации «whole cell»

Электрическую активность нейронов регистрировали методом patch-clamp в конфигурации whole cell, с помощью усилителя Axopatch 200 B (Axon Instruments), ЦАП-АЦП конвертера DigiData 1440A и пакета лицензионных программ pClamp 10,2 (Axon Instruments). Все эксперименты выполнялись при 24–27 °C. В качестве внеклеточного раствора использовали среду Хенкса (мМ): NaCl – 139, $NaHCO_3$ – 4,17, NaH_2PO_4 – 0,4, KCl – 2,1, KH_2PO_4, $CaCl_2$ – 1,25, $MgSO_4$ – 1,25, HEPES – 8, D-глюкоза – 8, pH – 7,4 (для доведения pH использовался раствор NaOH). Внутриклеточный раствор для заполнения микроэлектродов имел следующий состав в мМ: метансульфонат калия – 145, KCl – 20, Hepes – 10, EGTA – 0,5, $MgCl_2$ – 1, pH = 7,2 (для доведения pH использовался раствор KOH). Сопротивление кончика пипетки 4,5–6 МОм. Рассматривались лишь клетки со значением сопротивления доступа не более 25 МОм.

Для исследования натриевых токов использовалась культура нейронов гиппокампа возрастом 1–3 дня. Для записи натриевых токов использовался внутриклеточный раствор, в котором все соли калия были заменены на соли цезия с целью ингибирования калиевых токов (для доведения pH использовался раствор CsOH). Записи производились в режиме фиксации потенциала. После добавки вещества на клетку подавались ступеньки напряжения — 30 mV (ток достигал максимальных значений у большинства клеток при этом стимуле) продолжительностью 50 мс, с интервалом 5 с на протяжении 5 мин. Для стандартизации значений токов, результаты записи с каждой клетки делились на ёмкость данной клетки.

Для исследования влияния препарата ЛМГ-124 и прототипа лаппаконитина гидробромида на вызванные потенциалы действия и интервалы между ними были использованы культуры возрастом 9–10 дней. Записи производились в режиме фиксации тока. На клетки подавались токовые стимулы различных значений (от 10 до 200 pA с шагом 5 pA), продолжительность стимуляции составляла 500 мс, интервалы между стимулами 5 с. Регистрацию напряжения производили до и после 5-минутной стимуляции, аналогично опытам по регистрации тока. Эксперименты с каждой концентрацией веществ были повторены не менее чем на 3 культурах. Растворы исследуемых веществ каждый раз готовились непосредственно перед экспериментом.

Соединение ЛМГ-124 и прототип лаппаконитина гидробромид были представлены для исследований Федеральным государственным бюджетным учреждением науки Уфимский институт химии Российской академии наук (УфИХ РАН).

Результаты

Изучение влияния соединения ЛМГ-124 на трансмембранный Na^+ ток

В предварительных экспериментах было показано, что как лаппаконитина гидробромид, так и ЛМГ-124, обладают способностью постепенно ингибировать Na^+ каналы. Натриевый канал плазматической мембраны возбудимых клеток может находиться в открытом, закрытом и инактивированном состояниях. При достижении порога активации он открывается и инактивируется через 1–2 мс. В этом состоянии он пребывает всё оставшееся время, пока мембрана остаётся деполяризованной. Согласно литературным данным, лаппаконитина гидробромид связывается с Na^+ каналом тогда, когда тот находится в открытом состоянии [12]. Поэтому при регистрации суммарного эффекта ингибирование натриевого тока развивается во времени. Соответственно, чем чаще происходит стимуляция клетки, тем больше каналов будет заблокировано. В связи с этим, для получения концентрационных зависимостей действия лаппаконитина гидробромида и ЛМГ-124 на натриевый ток, клетки предварительно инкубировали с исследуемыми соединениями от 0 до 20 мин. Для увеличения времени нахождения Na^+ каналов в открытом состоянии клетки подвергались стимуляции с различной частотой на протяжении 5 мин. Концентрации изучаемых соединений изменяли от 50 до 500 мкМ.

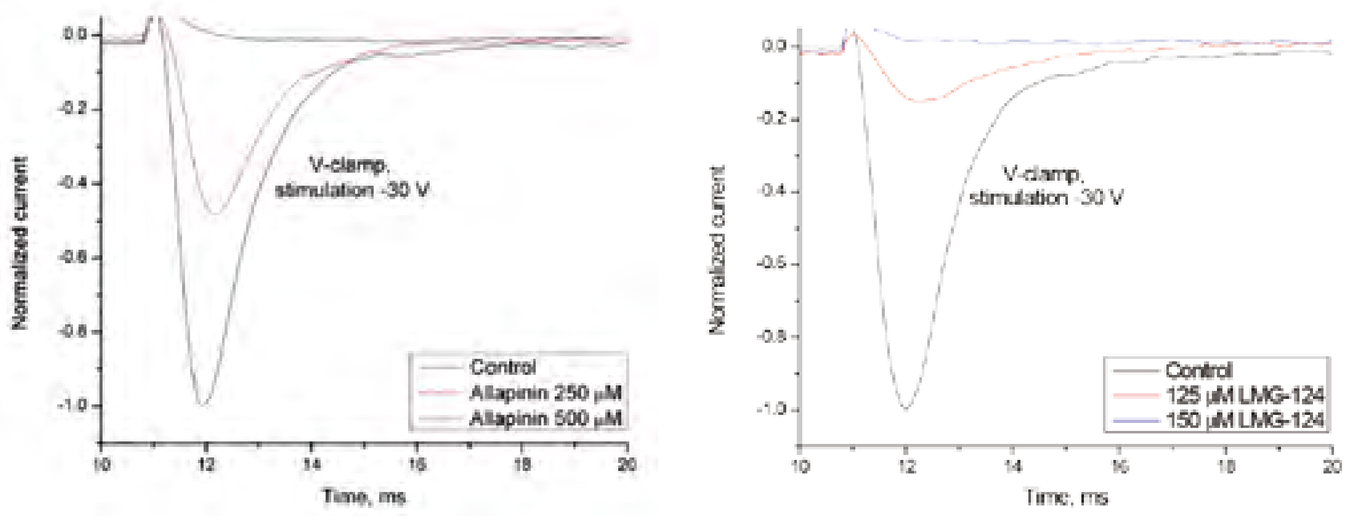
Полученные результаты свидетельствуют о том, что соединение ЛМГ-124 эффективно блокирует быстрый входящий Na^+ ток в концентрациях вдвое меньше, чем прототип — лаппаконитина гидробромид: соответственно 125–150 мкМ и 250–500 мкМ. На рис. 1 показаны изменения Na^+ тока после 5 мин стимуляции (деполяризация – 30 мV) с частотой 0,2 Гц в контроле и в присутствии 250 и 500 мкМ лаппаконитина гидробромида или 125 и 150 мкМ ЛМГ-124.

Как видно из рис. 1, оба соединения ингибируют амплитуду быстрого Na^+ тока. Полное ингибирование Na^+ тока в этих условиях наблюдалось при 500 μM лаппаконитина гидробромида и при 150 μM ЛМГ-124.

Кинетику увеличения степени ингибирования регистрировали в течение 20 мин в присутствии различных концентраций соединений. На рис. 2А показано изменение амплитуды Na^+ тока во времени, в течение 20 мин, при измерении каждые 5 мин в присутствии различных концентраций соединений. Показано, что ингибирование увеличивается в течение 20 мин после аппликации исследуемых соединений. Исходная амплитуда Na^+ тока в каждом эксперименте была принята за 1. Полное ингибирование натриевого тока за 20 мин достигалось для лаппаконитина гидробромида при концентрации 500 μM, а для ЛМГ-124 – при 150 μM.

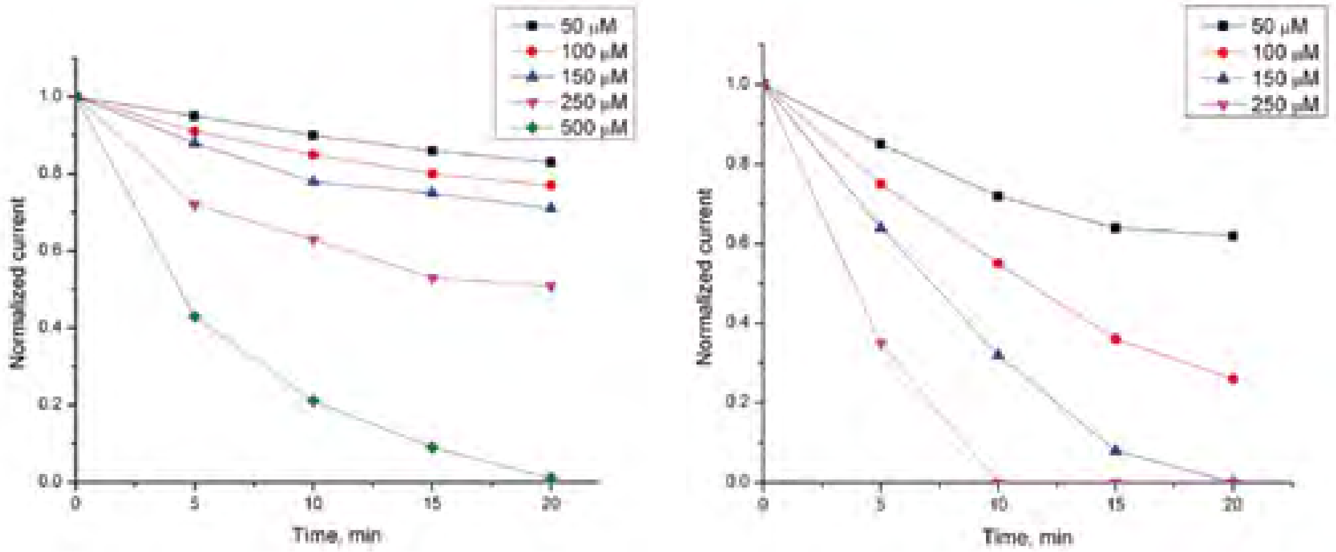
На рис. 2 демонстрируется постепенное нарастание степени ингибирования Na+ тока в течение 20 мин при стимуляции 1 раз в 5 мин в присутствии различных концентраций лаппаконитина гидробромида (рис. 2А) или ЛМГ-124 (рис. 2В). Нарастание ингибирования во времени объясняется тем, что лаппаконитина гидробромид и его производное (ЛМГ-124) связывается с Na^+ каналом, когда тот находится в открытом состоянии, т. е. ингибирование происходит, главным образом, в момент стимуляции клетки.

Для изменения времени нахождения канала в открытом состоянии в следующем эксперименте оценивали степень ингибирования канала при увеличенной частоте стимуляции. На рис. 3 демонстрируется постепенное нарастание степени ингибирования Na^+ тока в течение 5 мин при стимуляции с частотой 0,2 Гц в присутствии различных концентраций лаппаконитина гидробромида (рис. 3А) или ЛМГ-124 (рис. 3В).



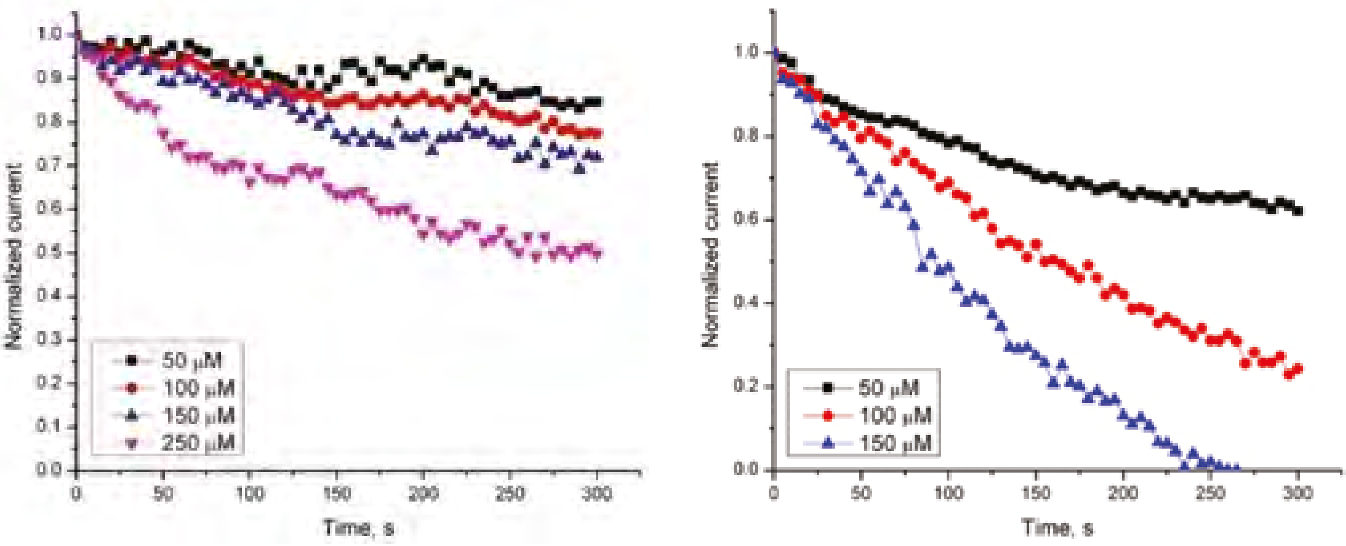
А Б

Рис. 1. Изменение входящего натриевого тока после 5 мин стимуляции (максимальная амплитуда тока в контроле принята за 1). В присутствии 250 и 500 мкМ лаппаконитина гидробромида (А) и 120–150 мкМ ЛМГ-124 (Б)



А Б

Рис. 2. Пассивное изменение амплитуды Na^+ тока в течение 20 мин. А – после добавки различных концентраций лаппаконитина гидробромида: Б – после добавки различных концентраций ЛМГ-124



А Б

Рис. 3. Изменение амплитуды натриевого тока в течение 5 мин стимуляции с частотой 0,2 Гц. А – в присутствии 50, 100, 150 и 250 мкМ лаппаконитина гидробромида; Б – в присутствии 50, 100 и 150 мкМ ЛМГ-124

И что важно, как следует из рис. 4, ЛМГ-124 гораздо эффективней подавляет Na+ ток, чем лаппаконитина гидробромид.

На рис. 4А, 4В суммированы данные зависимости эффекта ингибирования от концентрации для лаппаконитина гидробромида и ЛМГ-124 при низкой частоте стимуляции (4А). На рис. 4В эти же данные сравниваются с данными титровки при высокой частоте стимуляции. Как следует из полученных данных (рис. 4), максимальное ингибирование Na+ канала достигается тем быстрее, чем чаще производится стимуляция.

Действие ЛМГ-124 на вызванные потенциалы действия

Для исследования влияния ЛМГ-124 на частоту и различные фазы потенциалов действия были использованы культуры нейронов гиппокампа возрастом 9–10 дней, в режиме фиксации тока. Производилась контрольная запись вызванных потенциалов действия, после чего на «запэтченный» нейрон проводилась аппликация препарата, затем клетка подвергалась стимуляции на протяжении 5 мин (как в предыдущих экспериментах), далее запись вызванных потенциалов действия повторялась.

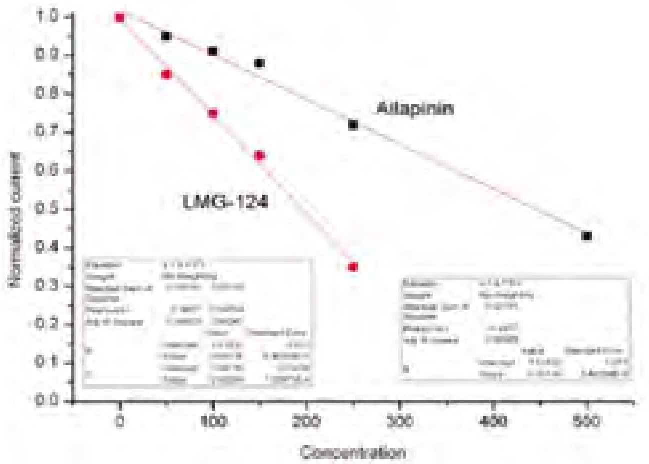


Рис. 4А. Линейная зависимость амплитуды Na^+ тока, измеренного через 5 мин инкубации с соединениями, от концентрации лаппаконитина гидробромид (чёрные квадраты) и ЛМГ-124 (красные кружочки). Здесь и далее в таблицах приведены данные линейной аппроксимации

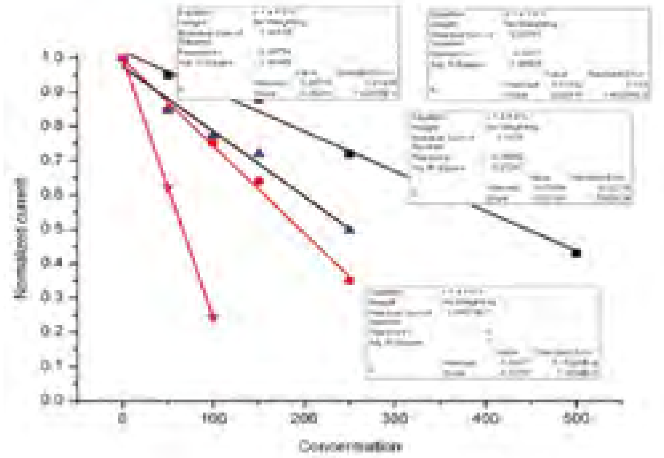
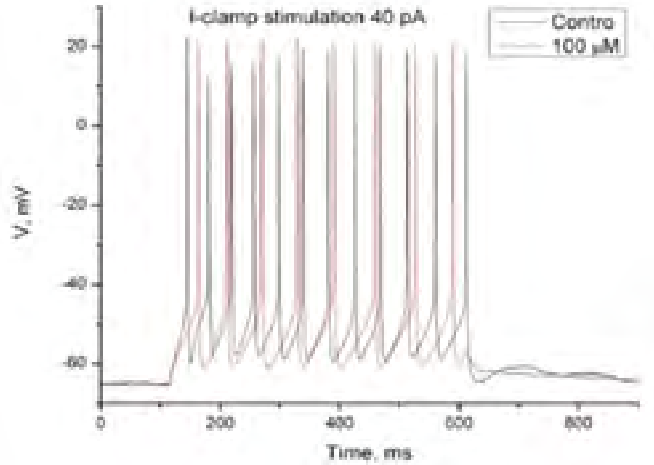
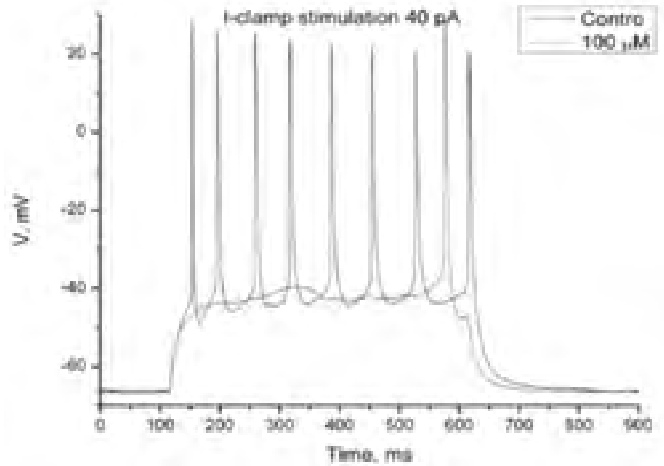


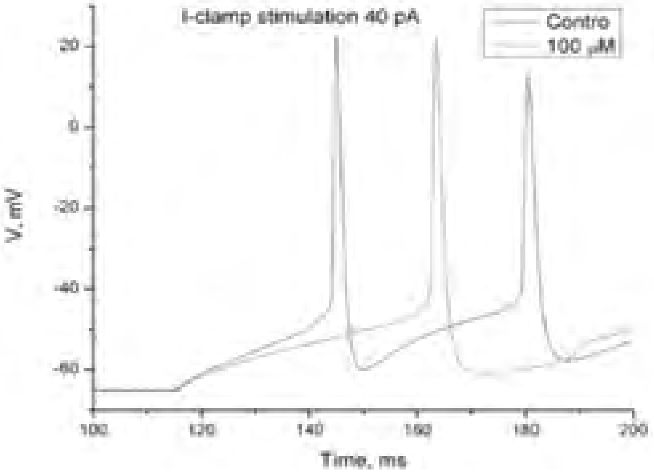
Рис. 4В. Линейная зависимость амплитуды Na+ тока, измеренного через 5 мин инкубации с соединениями, при стимуляции 1/5 мин и 60/5 мин (треугольники) (лаппаконитина гидробромид – чёрные прямые), (ЛМГ-124 – красные прямые). Пересечения с «Х» наблюдается при более 130, 380, 500, 900 мкМ, соответственно



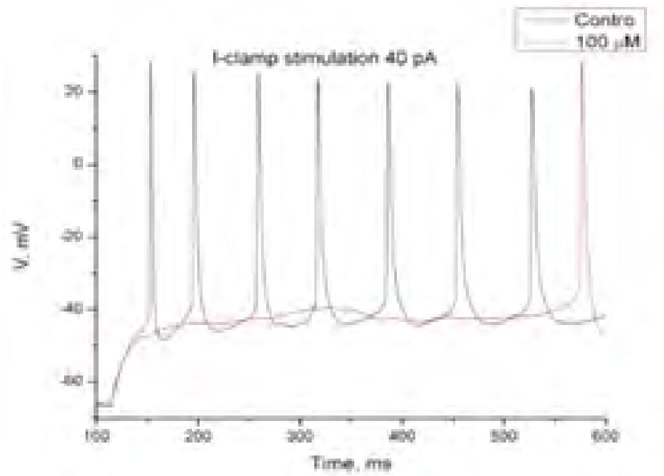
А1



Б1



А2



Б2

Рис. 5. Генерация потенциалов действия, вызванных деполяризующим током 40 pA в контроле и в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромида (А) и ЛМГ-124 (Б). На растянутом по времени рис. А2 видно, что соединения тормозят медленную фазу деполяризации без изменения амплитуды ПД. Показано, что в присутствии ЛМГ-124 (рис. Б2) требуется гораздо большее время до генерации первого потенциала действия

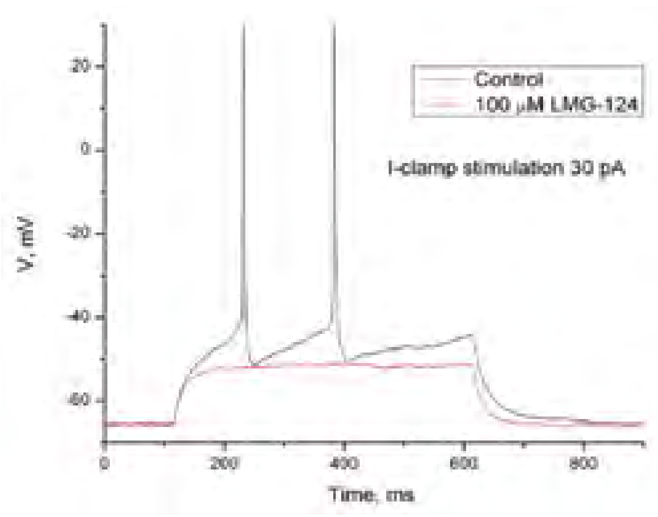


Рис. 6. Генерация ПД в контроле (control) и отсутствие генерации ПД на фоне 100 μM ЛМГ-124 (красная кривая) при постоянном токе 30 pA

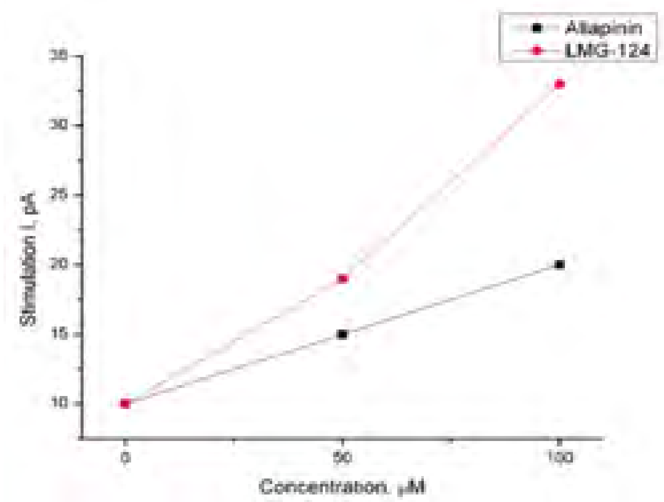
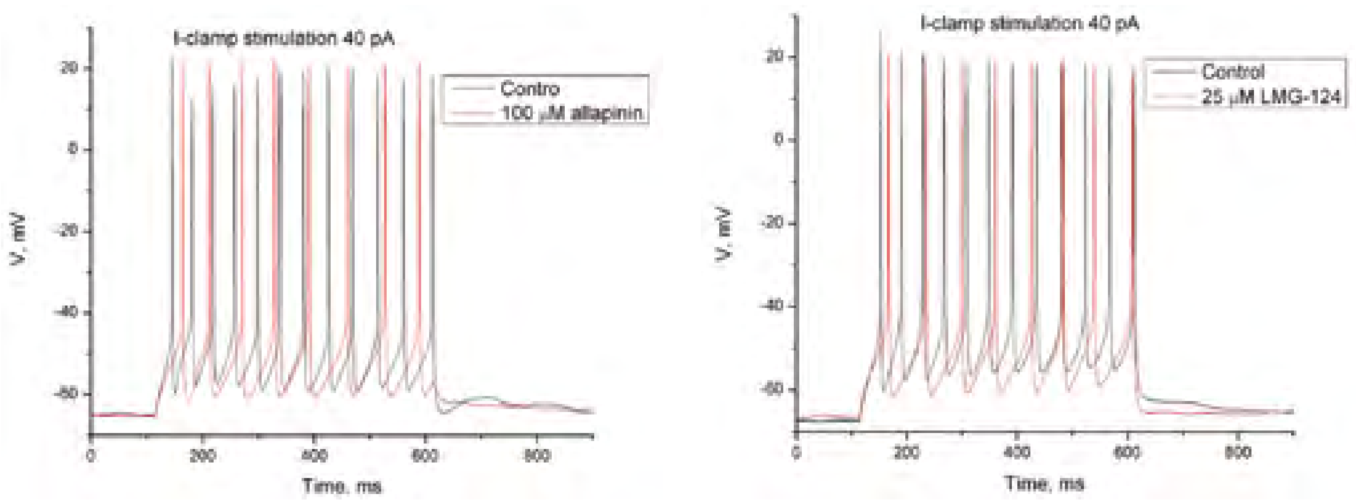


Рис. 7. Зависимость значений тока, необходимых для генерации клеткой 1-го потенциала действия, от концентрации препаратов



А Б

Рис. 8. Уменьшение частоты потенциалов действия в вызванной пачке в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромида (8А) и 25 мкМ ЛМГ-124 (8Б) при токе 40 pA

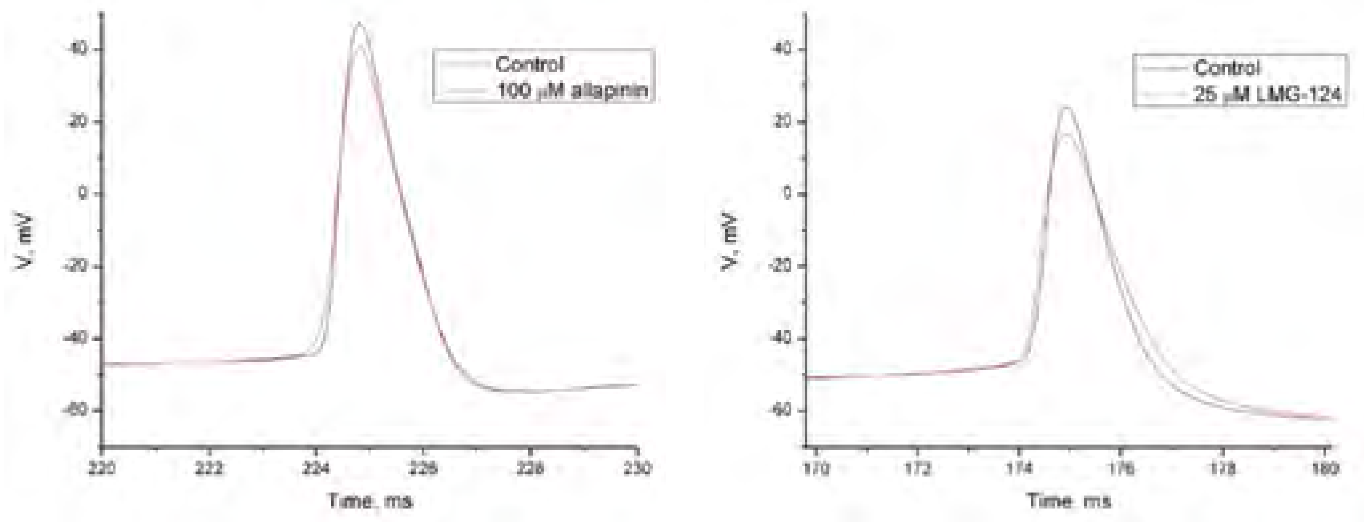
Как лаппаконитина гидробромид, так и ЛМГ-124 вызывают увеличение времени до генерации первого потенциала действия по сравнению с контролем. Это связано с замедлением медленной фазы деполяризации из-за блокировки Na^+ каналов. Как видно из рис. 6, ЛМГ-124 увеличивает время до генерации первого потенциала действия значительно сильнее. Таким образом, для деполяризации клетки до порогового уровня в присутствии соединений требуется больший токовый стимул, нежели в контроле (рис. 5, 6).

Это связано с тем, что в присутствии исследуемых соединений уменьшается число функционирующих Na^+ каналов и снижается проводимость мембраны клетки. На рис. 7 приведены зависимости значений тока, необходимых для генерации клеткой первого потенциала действия, от концентрации лаппаконитина гидробромида и ЛМГ-124. Показано, что эффект наблюдается для всех концентраций соединений.

Уменьшение частоты потенциалов действия под действием соединений

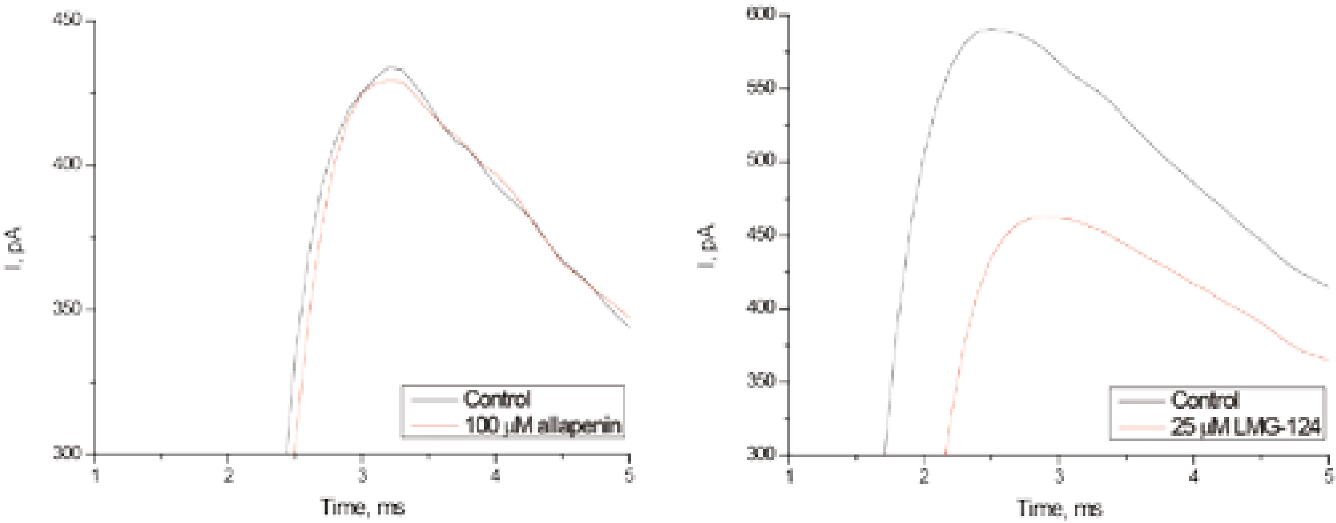
ЛМГ-124, так же как и лаппаконитина гидробромид, вызывает уменьшение частоты потенциалов действия в пачке. Как видно из рис. 5 и 8, уменьшение частоты связано, в основном, с увеличением продолжительности фазы медленной деполяризации.

Необходимо отметить, что, в отличие от лаппаконитина гидробромида, ЛМГ-124 вызывает более вы-



А Б

Рис. 9. Совмещение первых потенциалов действия в вызванной пачке в контроле (чёрные кривые) и в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромида (рис. 9А) и 25 мкМ ЛМГ-124 (рис. 9Б). В присутствии ЛМГ-124 заметно уменьшение крутизны, как в фазе деполяризации, так и в фазе реполяризации



А Б

Рис. 10. Изменение выходящего калиевого тока в контроле (чёрные кривые) и в присутствии 100 мкМ лаппаконитина гидробромида и 25 мкМ ЛМГ-124 через 5 мин стимуляции. Видно, что ЛМГ-124 заметно подавляет калиевый ток

раженное увеличение продолжительности потенциала действия, связанное с замедлением фазы реполяризации, за которую отвечают и K^+ каналы (рис. 9).

Для доказательства этого предположения мы измерили калиевый ток в контроле и в присутствии соединений. На рис. 10 показано изменение K^+ токов в присутствии 100 μМ лаппаконитина гидробромида и 25 μМ ЛМГ-124 через 5 мин стимуляции. ЛМГ-124 вызывает заметное снижение амплитуды K^+ тока, в то время как лаппаконитина гидробромид практически не влияет на K^+ ток.

Выводы

1. Соединение ЛМГ-124 эффективно ингибирует быстрый входящий Na^+ ток, протекающий через трансмембранные потенциал-зависимые быстрые Na^+ каналы.

2. Обнаруженный эффект постепенного ингибирования Na^+ канала характерен для обоих соединений (лаппаконитина гидробромида и соединения ЛМГ-124) и указывает на то, что их ингибирующий эффект реализуется на уровне открытого Na^+ канала.

3. Выявленные концентрационные зависимости действия (доза–ффект) лаппаконитина гидробромида и соединения ЛМГ-124 на натриевый ток свидетельствуют о том, что эффективная доза соединения ЛМГ-124 во всех случаях в 2М-4 раза ниже, чем у лаппаконитина гидробромида.

4. Соединение ЛМГ-124 более эффективно, чем лаппаконитина гидробромид, ингибирует медленную фазу деполяризации клеток, что приводит к уменьшению частоты потенциалов действия в пачке;

5. В отличие от лаппаконитина гидробромида, соединение ЛМГ-124 блокирует не только Na^+ каналы, но, частично и K^+ каналы, в силу чего его можно отнести к антиаритмическим лекарственным средствам, потенциально обладающим свойствами антиаритмиков Ia класса по классификации Vaughan Williams.

Литература

1. *Соколов С.Ф.* Аллапинин и современные подходы к лечению нарушений ритма сердца. РМЖ 2012, 4:177-184.

2. *Свиридова Н.В., Самсонова И.В.* Электрофизиологические эффекты и сфера клинического применения антиаритмического препарата аллапинин. Allapinin.ru/ images/electrofis.pdf

3. *Крыжановский С.А., Вититнова М.Б.* Антиаритмические лекарственные средства. М.: Академия; 2008.

4. *Соловьян А.Н., Михалева Т.В., Михалев К.А.* Классификация и механизмы действия антиаритмических препаратов. Ліки України 2015, 190(4): 12-20.

5. *Issa Z., Miller J., Zipes D.* Clinical arrhythmology and electrophysiology: A companion to Braunwald's heart disease. 1st ed. Philadelphia: Saunders; 2012.

6. *Sheets M.F., Fozzard H.A., Lipkind G.M., Hanck D.A.* Sodium channel molecular conformations and antiarrhythmic drug affinity. Trends Cardiovasc Med 2010, 20 (1): 16–21.

7. *Burashnikov A., Antzelevitch C.* Role of late sodium channel current block in the management of atrial fibrillation. Cardiovasc Drugs Ther 2013, 27 (1): 79–89.

8. *Соколов С.Ф., Джакханганов Ф.Н.* Антиаритмический препарат аллапинин: Обзор результатов клинических исследований. Кардиология 2002, 42 (7): 96–102.

9. *Соколов С.Ф., Бакалов С.А., Миронова Н.А., Рогова М.М., Малкина Т.А., Голицын С.П.* Эффективность и безопасность аллапинина в кратко- и долгосрочной терапии пациентов с нормальным сердцем и желудочковой экстрасистолией. Кардиология 2014; 54 (1): 20–26.

10. *Pratt C.M., Moye L.A.* The cardiac arrhythmia suppression trial: background, interim results and implication. Am J Cardiol 1990; 65 (4): 20B–29B.

11. *Greene H.L., Roden D.M., Katz R.J., Woosley R.L., Salerno D.M., Henthorn R.W.* The cardiac arrhythmia suppression trial: first CAST ... then CAST-II. J Am Coll Cardiol 1992; 19 (5): 894–8.

12. *Wright S.N.* Irreversible block of human heart (hH1) sodium channels by the plant alkaloid lappaconitine. Mol Pharmacol 2001; 59 (2): 183–92.

Сравнительное изучение антиаритмической активности лаппаконитина гидробромида и соединения ЛМГ-124 на модели аконитиновой аритмии

Столярук В.Н.[1], Цорин И.Б.[1], Вититнова М.Б.[1], Никифорова Т.Д.[1], Муринов Ю.И.[2], Юнусов М.С.[2], Крыжановский С.А.[1]

[1] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
[2] – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт химии Российской академии наук (УфИХ РАН), г. Уфа

Резюме. На двух моделях нарушений ритма сердца, вызванных аконитином, проведено сравнительное изучение антиаритмической и противофибрилляторной активности эталонного препарата лаппаконитина гидробромида и соединения ЛМГ-124. Показано, что оба соединения обладают антиаритмическим действием. Вместе с тем, соединение ЛМГ-124 реализует своё антиаритмическое действие в существенно меньшей дозе. При этом соединение ЛМГ-124 проявляет выраженную противофибрилляторную активность, в отличие от эталонного препарата лаппаконитина гидробромида, который в изученной дозе подобной активностью не обладает.
Ключевые слова: аконитин, лаппаконитина гидробромид, ЛМГ-124, аритмия, фибрилляция

The antiarrhythmic activity comparative study of Lappaconitine hydrobromide and LMG-124 on the model of aconitine arrhythmia

Stolyaruk V.N.[1], Tsorin I.B.[1], Vititnova M.B.[1], Nikiforova T.D.[1], Murinov Yu.I.[2], Yunusov M.S.[2], Kryzhanovskii S.A.[1]
[1] – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow
[2] – FSBIS «Ufa Institute of Chemistry of the Russian Academy of Sciences» (UIC RAS)

Resume. Two models of the aconitin-induced cardiac arrhythmias were used to compare the antiarrhythmic and antifibrillatory activity of the reference drug Lappaconitine hydrobromide and the LMG-124 compound. It is shown that both compounds have antiarrhythmic action. At the same time, the compound LMG-124 realizes its antiarrhythmic effect in a significantly lower dose. In this case, the compound LMG-124 shows a pronounced antifibrillatory activity, in contrast to the reference drug Lappaconitine hydrobromide, which in the studied dose does not exhibit similar activity.
Keywords: aconitine, Lappaconitine hydrobromide, LMG-124, arrhythmia, fibrillation

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

Введение

Уже более 30 лет для профилактики и лечения нарушений сердечного ритма в отечественной кардиологии используется антиаритмик IC класса (по классификации Vaughan Williams) лаппаконитина гидробромид (аллапинин) – бромистоводородная соль алкалоида лаппаконитина с сопутствующими алкалоидами, получаемая из растительного сырья. Лаппаконитина гидробромид обладает широким спектром антиаритмической активности, что позволяет применять его для профилактики и лечения различных наджелудочковых и желудочковых нарушений сердечного ритма [1–3], в том числе и у пациентов с ИБС [4, 5], за исключением случаев, когда желудочковые тахиаритмии сочетаются с наличием органических поражений сердца и при сердечной недостаточности (общее противопоказание для антиаритмиков I класса [6]).

Вместе с тем, клиническая эффективность применения лаппаконитина гидробромида представляется неоднозначной – его антиаритмическое действие, по разным оценкам, реализуется у 21–78% пациентов [4, 7]. Не менее важно и то, что при применении препарата достаточно высок риск развития как кардиальных (тахикардия, усиление экстрасистолии и др.), так и внекардиальных (головокружение, головная боль, диплопия, кожный зуд, диспепсические явления и др.) побочных эффектов, которые, согласно данным *Соколова С.Ф.*, развиваются у 31,2% больных, при этом в 22,4% случаев не позволяют достичь терапевтической дозы [1].

В связи с этим не ослабевает интерес к поиску новых, близких к лаппаконитину гидробромиду и/или содержащих его комбинированных соединений, которые, как минимум, не уступают ему по эффективности антиаритмического действия и при этом активны в меньших дозировках.

Целью исследования явилось сравнительное изучение антиаритмической активности лаппаконитина гидробромида и нового оригинального лекарственного препарата ЛМГ-124 на модели аконитиновой аритмии, патогномоничной для антиаритмических средств I класса, по классификации Vaughan Williams.

Методы

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 160–180 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая», которые имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животные содержались в стандартных условиях вивария при контролируемом освещении (12 ч – свет/12 ч – темнота), с принудительной 16-кратной в час вентиляцией, постоянной температуре (21–23°С) и относительной влажности воздуха 40–70%, на подстилке из простерилизованных древесных стружек в течение 10 сут до начала тестирования. Животные имели свободный доступ к воде и корму и получали стандартный (ГОСТ Р50258-92) брикетированный корм ПК-120-1 (ООО Лабораторснаб, РФ). Условия содержания животных соответствовали приказу МЗ РФ № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.2016 г. и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинкской декларации (2000). Работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур (СОП), принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123.

Экспериментальные модели:

1. В качестве экспериментальной модели была использована модель аконитиновой аритмии у крыс, которая воспроизводилась в соответствии с рекомендациями, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8] и принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» СОП. Животные были рандомизированы на 7 групп: 1-я (n = 13) — контроль, 2-я (n = 6) — получала лаппаконитина гидробромид (0,5 мг/кг, в/в), 3-я (n = 6) — лаппаконитина гидробромид (0,25 мг/кг, в/в), 4-я (n = 6) —лаппаконитина гидробромид (0,125 мг/кг, в/в), 5-я (n = 6) — ЛМГ-124 (0,5 мг/кг, в/в), 6-я (n = 6) — ЛМГ-124 (0,25 мг/кг, в/в), а 7-я (n = 6) — ЛМГ-124 (0,125 мг/кг, в/в).

Наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине на подогреваемом операционном столике. Катетеризировали левую бедренную вену для введения аконитина и изучаемых соединений. Перед началом эксперимента у животных регистрировали ЭКГ (стандартные отведения, калибровочный сигнал 20 мВ, скорость записи 50 мм/с, продолжительность записи 60 с). В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Поли-Спектр 8/В» (Россия). Затем подбирали дозу аконитина (n = 15, в/в, болюсом), которая во всех экспериментах в пределах 1–2 мин после окончания его введения вызывает политопную предсердно-желудочковую экстрасистолию; величина подобранной дозы – 30 мкг/кг. После подбора дозы аконитина, во всех сериях экспериментов изучаемые соединения вводили в/в (в 0,2–0,3 мл апирогенной воды для инъекций) за 2 мин до введения аконитина. Непрерывную регистрацию ЭКГ начинали за 2 мин до начала введения аконитина или исследуемых соединений и продолжали в течение 20 мин от момента окончания в/в введения аконитина.

В каждой экспериментальной группе подсчитывали количество животных, у которых возникала политопная экстрасистолия (ПЭС), и количество крыс с нарушениями ритма сердца (ПЭС + бигемения). Оценивали время возникновения нарушений ритма и на основе этого показателя проводили балльное шкалирование антиаритмической активности веществ: аритмии возникали в первые 5 мин после введения аконитина гидрохлорида в подобранной дозе — 0 баллов; нарушения ритма появлялись с 6-й по 10-ю минуту — 1 балл; аритмии возникали с 11-й по 15-ю минуту — 2 балла; нарушения ритма возникали с 16-й по 20-ю минуту наблюдения — 3 балла; аритмии не возникали в течение всего периода наблюдения (20 мин) — 4 балла.

Статистика. Статистическую обработку данных, измеренных в бинарной шкале, проводили с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений. Результаты, полученные с использованием балльного шкалирования, обрабатывали с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Крускалу-Уоллесу с дальнейшим анализом методом множественных сравнений по Данну. Результаты представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$. Расчёт ЕД50 выполнен по методу Финни.

2. В качестве экспериментальной модели была использована модель фибрилляции желудочков, вызванная аконитином у крыс, которая воспроизводилась в соответствии с рекомендациями, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8] и принятыми в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» СОП. Животные были рандомизированы на 5 групп: 1-я (n = 9) — контроль, 2-я (n = 6) — получала лаппаконитина гидробромид (0,5 мг/кг, в/в), 3-я (n = 6) — ЛМГ-124 (0,5 мг/кг, в/в), 4-я (n = 6) — ЛМГ-124 (0,375 мг/кг, в/в), а 5-я (n = 6) — ЛМГ-124 (0,25 мг/кг, в/в).

Исследования проводили, как и в предыдущем случае, за исключением того, что подбирали дозу аконитина (n = 12, в/в, болюсом), которая во всех экспериментах в пределах 1–2 мин после окончания его введения вызывает фибрилляцию желудочков сердца; величина подобранной дозы – 150 мкг/кг.

Для оценки противофибрилляторного действия в каждой экспериментальной группе животных подсчитывали количество крыс, у которых аконитина гидрохлорид в подобранной дозе (150 мкг/кг) вызывал фибрилляцию желудочков сердца (ФЖ).

Статистика. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Изучаемое соединение ЛМГ-124, а также лаппаконитина гидробромид и аконитина гидрохлорид получены в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Уфимский Институт химии Российской академии наук (УфИХ РАН).

Результаты и обсуждение

Результаты оценки антиаритмической активности соединения ЛМГ-124 и эталонного препарата лаппаконитина гидробромида на модели аконитиновой аритмии приведены в табл. 1. Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что соединение ЛМГ-124 в дозах 0,5 и 0,25 мг/кг обладало выраженным антиаритмическим действием (табл. 1.). Так, если в контрольной серии опытов политопная экстрасистолия после введения аконитина гидрохлорида возникала у всех 13 животных, то у крыс, получавших изучаемое соединение в дозах 0,5 и 0,25 мг/кг, подобные нарушения ритма сердца отсутствовали ($n = 6$, $p \leq 0,001$). В группе животных, получавших соединение ЛМГ-124 в дозе 0,25 мг/кг, у одной крысы возникла бигемения. В дозе 0,125 мг/кг изучаемое вещество не влияло на частоту возникновения нарушений ритма сердца.

Оценка антиаритмической активности с помощью балльного шкалирования подтвердила статистически значимый антиаритмический эффект изучаемого соединения в указанных выше дозах (табл. 1).

Эталонный препарат лаппаконитина гидробромид в дозе 0,5 мг/кг также обладал выраженным антиаритмическим эффектом, однако, в отличие от соединения ЛМГ-124, в дозе 0,25 мг/кг лаппаконитина гидробромид не предотвращал возникновения аритмий, вызываемых аконитином (табл. 1).

Для более объективного сравнения антиаритмической активности препаратов была рассчитана среднеэффективная доза ($ЕД_{50}$), которая для соединения ЛМГ-124 составила 0,176 (0,104÷0,280) мг/кг, а для лаппаконитина гидробромида — 0,268 (0,199÷0,361) мг/кг. Как видно из приведённых данных, соединение ЛМГ-124 реализует своё антиаритмическое действие в существенно меньшей дозе.

Результаты оценки противофибрилляторной активности изучаемого соединения и эталонного препарата лаппаконитина гидробромид на модели фибрилляции желудочков сердца, вызванной аконитином, приведены в табл. 2. Анализ полученных

Таблица 1

Влияние соединения ЛМГ-124 и лаппаконитина гидробромида на нарушения ритма сердца, вызываемые у крыс аконитина гидрохлоридом

Соединение	Доза, мг/кг	Количество крыс в группе	Количество крыс с нарушениями ритма	Количество крыс с политопными экстрасистолиями	Антиаритмическая активность (баллы)
Контроль	—	13	13	13	0 0÷0
ЛМГ-124	0,5	6	0 $p < 0,001$	0 $p < 0,001$	4 4÷4 $p = 0,008$
	0,25	6	1 $p = 0,002$	0 $p < 0,001$	4 4÷4 $p = 0,008$
	0,125	6	5 $p = 0,4737$	4 $p = 0,1754$	2 1÷2 $p = 0,6814$
Лаппаконитина гидробромид	0,5	6	0 $p < 0,001$	0 $p < 0,001$	4 4÷4 $p = 0,008$
	0,25	6	4 $p = 0,1754$	3 $p = 0,0618$	1 0÷4 $p = 1,0$
	0,125	6	6 $p = 1,0$	5 $p = 4737$	0 0÷1 $p = 1,0$

Примечание: *p* — указано по отношению к контролю.

Таблица 2

Влияние соединения ЛМГ-124 и лаппаконитина гидробромида на частоту возникновения фибрилляции желудочков сердца (ФЖ), вызываемой у крыс аконитина гидрохлоридом

Соединение	Доза, мг/кг	Количество крыс в группе	Количество животных, у которых возникли ФЖ
Контроль	–	9	9
ЛМГ-124	0,5	6	1 $p = 0{,}008$
	0,375	6	1 $p = 0{,}008$
	0,25	6	5 $p = 0{,}5330$
Лаппаконитина гидробромид	0,5	6	4 $p = 0{,}2858$

Примечание: *p* — указано по отношению к контролю.

результатов свидетельствует о том, что в контрольной серии экспериментов фибрилляция желудочков сердца возникала у всех животных ($n = 9$), в то время как у крыс, получавших соединение ЛМГ-124 в дозах 0,5 и 0,375 мг/кг, фибрилляция желудочков сердца возникла только в 1 случае из 6 ($p = 0{,}008$). В дозе 0,25 мг/кг изучаемое вещество на данной модели оказалось не эффективным (табл. 2). В отличие от соединения ЛМГ-124, эталонный препарат лаппаконитина гидробромид в дозе 0,5 мг/кг не оказывал статистически значимого эффекта на данной модели ($p = 0{,}2858$, табл. 2).

Заключение

Сравнительное изучение антиаритмической активности эталонного препарата лаппаконитина гидробромид и соединения ЛМГ-124 на модели аконитиновой аритмии, патогномоничной для антиаритмических средств I класса по классификации Vaughan Williams, свидетельствует о том, что оба соединения на этой модели обладают антиаритмическим действием. Вместе с тем, соединение ЛМГ-124 реализует своё антиаритмическое действие в существенно меньшей дозе. При этом соединение ЛМГ-124 на модели фибрилляции желудочков сердца, вызванной аконитином, проявляет выраженную противофибрилляторную активность, в отличие от эталонного препарата лаппаконитина гидробромида, который в изученной дозе подобной активностью не обладает.

Литература

1. *Соколов С.Ф.* Результаты клинического изучения препарата аллапинин и современные подходы к лечению больных с нарушениями ритма сердца. Вестник аритмологии 2011; 64: 60–70.
2. *Котляров А.А., Дмитриева О.А., Мосина Л.М., Карякина Т.Н.* Антиаритмическая терапия пароксизмальных тахикардий и экстрасистолий у больных с дисфункцией синусового узла. Клиническая медицина 2012, 9: 57–9.
3. *Канорский С.Г.* Антиаритмическая терапия у больных с пароксизмальной и персистирующей формами фибрилляции предсердий: определение достижимой цели и оценка имеющихся средств. Кардиология 2014; 54 (2): 60–5.
4. *Замотаев Ю.Н., Кремнев Ю.А., Гриненко Н.А., Подшибякин С.Е.* Оценка антиаритмической эффективности препарата аллапинин у больных ИБС с нарушениями ритма сердца при использовании суточного ЭКГ-мониторирования в качестве информационного метода контроля. Русский медицинский журнал 2003; 9: 518–22.
5. *Плечев В.В., Загидуллин Ш.З., Юнусов В.М., Зубарева И.Г., Николаева И.Е.* Профилактическое применение аллапинина у пациентов с ИБС в периоперационном периоде коронарного шунтирования. Кардиология 2013; 53 (8): 34–9.
6. *Zipes D.P., Camm A.J., Borggrefe M., et al.* ACC/AHA/ESC 2006 guidelines for management of patients with ventricular arrhythmias and the prevention of sudden cardiac death: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force and the European Society of Cardiology Committee for Practice Guidelines (Writing Committee to Develop Guidelines for Management of Patients With Ventricular Arrhythmias and the Prevention of Sudden Cardiac Death). Circulation. 2006; 114: e385- e484.
7. *Рахматуллов Ф.К., Пчелинцева С.А., Рахматуллова А.Ф., Грачева Ю.Н., Архипов А.Б.* Антиаритмическая терапия изолированной фибрилляции предсердий. Известия высших учебных заведений. Известия ВУЗов. Поволжский регион. Мед науки 2012; 3 (23): 90–104.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2013; 944.

Изучение противофибрилляторной активности соединения ЛМГ-124 и лаппаконитина гидробромида на модели реперфузионных аритмий у крыс

Столярук В.Н.[1], Цорин И.Б.[1], Вититнова М.Б.[1], Гусев В.П.[1], Муринов Ю.И.[2], Юнусов М.С.[2], Крыжановский С.А.[1]

[1] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва
[2] – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Уфимский Институт химии Российской академии наук (УфИХ РАН), г. Уфа

Резюме. Сравнительное изучение противофибрилляторной активности соединения ЛМГ-124 и эталонного препарата лаппаконитина гидробромид было выполнено на модели реперфузионных аритмий. Показано, что оба препарата проявляют антиаритмическую и противофибрилляторную активность, однако соединение ЛМГ-124 реализует своё действие в существенно меньшей дозе.
Ключевые слова: лаппаконитина гидробромид, ЛМГ-124, реперфузионные аритмии

The antifibrillatory activity study of the compound LMG-124 and lappaconitine hydrobromide on the reperfusion arrhythmias model

Stolyaruk V.N.[1], Tsorin I.B.[1], Vititnova M.B.[1], Gusev V.P.[1], Murinov Yu.I.[2], Yunusov M.S.[2], Kryzhanovskii S.A.[1]
[1] – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow
[2] – FSBIS «Ufa Institute of Chemistry of the Russian Academy of Sciences» (UIC RAS)

Resume. The antifibrillatory activity comparative study of the compound LMG-124 and the reference drug Lappaconitine hydrobromide was performed on the model of reperfusion arrhythmias. Both drugs are shown to exhibit antiarrhythmic and antifibrillatory activity, but the compound LMG-124 realizes its effect in a significantly lower dose.
Keywords: Lappaconitine hydrobromide, LMG-124, reperfusion arrhythmias

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

Введение

Размер инфаркта миокарда имеет важнейшее прогностическое значение у пациентов с острым коронарным синдромом и зависит не только от уровня окклюзии коронарной артерии, но и от длительности ишемии. В связи с этим, восстановление кровотока медикаментозным или хирургическим путём в максимально ранние сроки является основной стратегией лечения пациентов с острым инфарктом миокарда [1, 2]. Реперфузия призвана ограничить зону некроза, повысить выживаемость, препятствовать постинфарктному ремоделированию левого желудочка и предотвратить формирование сердечной недостаточности, т.е. минимизировать последствия острой ишемии. Однако, несмотря на это, она сама может вызывать дополнительное повреждение тканей и быть причиной возникновения злокачественных аритмий, в том числе и фибрилляции желудочков сердца [3, 4].

Важно отметить, что реперфузия может возникать и спонтанно, в быту, ещё до оказания пациенту медицинской помощи, вследствие эндогенного лизиса коронарного тромба, его реканализации, прекращения спазма коронарной артерии или усиления коллатерального кровотока в участке ишемии [5–7] и стать причиной возникновения злокачественных нарушений сердечного ритма, которые могут быть купированы приёмом антиаритмического препарата.

В связи с вышесказанным, представляет определённый интерес выявление в спектре антиаритмической активности препаратов способности препятствовать развитию реперфузионого поражения сердца.

Целью исследования явилось сравнительное изучение противофибрилляторной активности соединения ЛМГ-124 и его прототипа лаппаконитина гидробромида в условиях ишемии-реперфузии.

Методы

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 350–450 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая», которые имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животные содержались в стандартных условиях вивария при контролируемом освещении (12 ч – свет/12 ч – темнота), с принудительной 16-кратной в час вентиляцией, постоянной температуре (21–23 °C) и относительной влажности воздуха 40–70%, на подстилке из простерилизованных древесных стружек) в течение 10 сут до начала тестирования. Животные имели свободный доступ к воде и корму, и получали стандартный (ГОСТ Р50258-92) брикетированный корм ПК-120-1 (ООО Лабораторснаб, РФ). Условия содержания животных соответствовали приказу МЗ РФ № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04.2016 г. и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинкской декларации (2000). Работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур (СОП), принятых в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», соответствующих правилам Европейской Конвенции ETS 123.

Экспериментальная модель. В качестве экспериментальной модели была использована модель реперфузионных аритмий у крыс, которая воспроизводилась в соответствии с рекомендациями, изложенными в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [8] и принятыми в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» СОП. Животные были рандомизированы на 6 групп: 1-я ($n = 16$) – контроль, 2-я ($n = 10$) получала лаппаконитина гидробромид (0,5 мг/кг, в/в), 3-я ($n = 12$) – лаппаконитина гидробромид (0,25 мг/кг, в/в), 4-я ($n = 15$) – ЛМГ-124 (1,0 мг/кг, в/в), 5-я ($n = 15$) – ЛМГ-124 (0,5 мг/кг, в/в), а 6-я ($n = 15$) – ЛМГ-124 (0,25 мг/кг, в/в).

Наркотизированных (уретан 1300 мг/кг, в/б) животных переводили на искусственное дыхание при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия), после чего производили тороко- и перикардотомию и под левую нисходящую коронарную артерию сразу же после её выхода из-под ушка подводили лавсановую лигатуру. Ишемию миокарда вызывали одномоментной перевязкой коронарной артерии. Через 8 мин лигатуру снимали. Оценивали наличие/отсутствие фибрилляции желудочков сердца в течение 3 мин от момента начала реперфузии. Исследуемые соединения (в/в, в 0,2–0,3 мл апирогенной воды для инъекций), а в контрольной серии – апирогенную воду для инъекций, вводили за 5 мин до начала реперфузии. Регистрацию ЭКГ (II стандартное отведение) начинали за минуту до перевязки коронарного сосуда и продолжали в течение всего эксперимента. В работе использовали цифровой электрокардиограф Поли-Спектр-8В (Нейрософт, Россия).

Для оценки противофибрилляторного и антиаритмического действия в каждой группе подсчитывали количество животных, у которых возникали: необратимая фибрилляция желудочков сердца (ФЖ); опасные для жизни аритмии – обратимая фибрилляция желудочков сердца (ОФЖ) или желудочковая тахикардия; экстрасистолия. С помощью балльного шкалирования оценивали тяжесть аритмогенеза: отсутствие аритмий – 0 баллов; экстрасистолия – 1 балл; желудочковая тахикардия – 2 балла; ФЖ с последующим восстановлением ритма (обратимая фибрилляция ОФЖ) – 3 балла; ФЖ, приводящая к остановке сердца – 4 балла.

Статистика. Статистическую обработку данных, измеренных в бинарной шкале, проводили с помо-

Таблица 1

Влияние соединения ЛМГ-124 и лаппаконитина гидробромида на частоту возникновения ФЖ и других нарушений ритма сердца, вызываемых окклюзией и последующей реперфузией коронарной артерии у наркотизированных крыс (уретан, 1 300 мг/кг, в/б)

Соединение	Доза, мг/кг	Количество крыс в группе	Количество крыс с экстрасистолией	Количество крыс с ОЖФ	Количество крыс с ФЖ	Тяжесть аритмогенеза в баллах
Контроль	–	16	16	13	12	3 3÷3
ЛМГ-124	1,0	15	7 $p = 0{,}004$	5 $p = 0{,}019$	4 $p = 0{,}015$	0 0÷3 $p = 0{,}014$
	0,5	15	7 $p = 0{,}004$	2 $p = 0{,}001$	1 $p = 0{,}001$	0 0÷1 $p = 0{,}003$
	0,25	15	8 $p = 0{,}006$	5 $p = 0{,}019$	2 $p = 0{,}003$	1 0÷2 $p = 0{,}007$
Лаппаконитина гидробромид	0,5	10	6 $p = 0{,}023$	2 $p = 0{,}010$	1 $p = 0{,}006$	1 0÷1 $p = 0{,}020$
	0,25	12	11 $p = 0{,}4286$	10 $p = 1{,}0$	5 $p = 0{,}121$	2 2÷3

Примечание: p – указано по отношению к контролю.

щью метода точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений. Результаты, полученные с использованием балльного шкалирования, обрабатывали с помощью непараметрического аналога дисперсионного анализа по Крускалу–Уоллесу с дальнейшим анализом методом множественных сравнений по Данну. Результаты представлены в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Различия считали значимыми при $p \leq 0{,}05$.

Изучаемое соединение ЛМГ-124, а также лаппаконитина гидробромид и аконитина гидрохлорид получены в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Уфимский Институт химии Российской академии наук (УфИХ РАН).

Результаты и обсуждение

Результаты оценки антифибрилляторной активности изучаемого соединения ЛМГ-124 и эталонного препарата лаппаконитина гидробромид на модели реперфузионных аритмий приведены в табл. 1.

Анализ полученных результатов свидетельствует о том, что в контрольной серии экспериментов ($n = 16$) в условиях окклюзии и последующей реперфузии коронарной артерии нарушения ритма сердца наблюдались во всех случаях, в том числе обратимая фибрилляция желудочков сердца или желудочковая тахикардия возникали у 13 животных, у 12 из которых желудочковая тахикардия переходила в необратимую фибрилляцию желудочков сердца. Следует отметить, что во всех случаях необратимая фибрилляция желудочков сердца возникала в условиях реперфузии. Соединение ЛМГ-124 в дозах 1,0; 0,5 и 0,25 мг/кг статистически значимо уменьшало частоту возникновения различных нарушений ритма сердца (табл. 1). Так, например, в группе крыс ($n = 15$), получавших соединения ЛМГ-124 в дозе 0,5 мг/кг, аритмии возникли только в 7 случаях ($p = 0{,}004$), в том числе обратимая фибрилляция желудочков сердца или желудочковая тахикардия наблюдались лишь у 2 животных ($p = 0{,}001$), из которых только у одного тахикардия перешла в необратимую фибрилляцию желудочков сердца ($p = 0{,}001$). Эталонный препарат лаппаконитина гидробромид, в отличие от соединения ЛМГ-124, был эффективен лишь в дозе 0,5 мг/кг.

Заключение

Таким образом, на модели реперфузионных аритмий у крыс эталонный препарат лаппаконитина гидробромид и соединение ЛМГ-124 проявляют антиаритмическую и противофибрилляторную активность, однако последнее реализует своё действие в существенно меньшей дозе.

Литература

1. *Van de Werf F., Bax J., Betriu A. et al.* Management of acute myocardial infarction in patients presenting with persistent ST-segment elevation: The Task Force on the management of ST-segment elevation acute myocardial infarction of the European Society of Cardiology. Eur Heart J 2008; 29: 2909–45.

2. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians and Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. O'Gara P.T., Kushner F.G., Ascheim D.D., Casey D.E., Chung M.K., de Lemos J.A., Ettinger S.M., Fang J.C., Fesmire F.M., Franklin B.A., Granger C.B., Krumholz H.M., Linderbaum J.A., Morrow D.A., Newby L.K., Ornato J.P., Ou N., Radford M.J., Tamis-Holland J.E., Tommaso C.L., Tracy C., Woo Y.J., Zhao D.X.; American College of Cardiology Foundation.; American Heart Association Task Force on Practice Guidelines.; American College of Emergency Physicians.; Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. Catheter Cardiovasc Interv 2013; 82 (1): E1–27.

3. *Turer A.T., Hill J.A.* Pathogenesis of myocardial ischemia-reperfusion injury and rationale for therapy. Am J Cardiol 2010; 106 (3):360–8.

4. *Aufderheide T.P.* Arrhythmias associated with acute myocardial infarction and thrombolysis. Emerg Med Clin North Am 1998, 6 (3): 583–600.

5. *Karaahmet T., Keles N., Gürel Y.E. et al.* Early spontaneous reperfusion in the right coronary artery of a patient with acute inferior myocardial infarction. Turk J Thorac Cardiovasc Surg 2011; 19 (3): 446–8.

6. *Bainey K.R., Fu Y., Wagner G.S. et al.* Spontaneous reperfusion in ST elevation myocardial infarction: comparison of angiographic and electrocardiographic assessments. Am. Heart J. 2008; 156 (2); 248–55.

7. *Schwartz H., Leiboff R.H., Bren G.B. et al.* Temporal evolution of the human coronary collateral circulation after myocardial infarction. J Am Coll Cardiol 1984; 4 (6): 1088–93.

8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2013; 944.

Дипептидный аналог холецистокинина-4 ослабляет тревожную реакцию у «высокоэмоциональных» мышей BALB/c и при моделировании алкогольной абстиненции у крыс: сравнение с феназепамом

Колик Л.Г., Надорова А.В., Гудашева Т.А., Мартьянов В.А., Середенин С.Б.

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

Резюме. Изучены анксиолитические свойства ГБ-115, дипептидного аналога эндогенного тетрапептида холецистокинина у животных с повышенным уровнем эмоциональности при пероральном введении в диапазоне доз 0,25–2,0 мг/кг. В тесте ПКЛ анксиолитическое действие ГБ-115, сопоставимое с феназепамом, установлено у инбредных мышей BALB/c и у «старых» крыс, потреблявших 10% раствор этанола в течение 33 недель на фоне алкогольной депривации. ГБ-115 в дозах 0,5–2,0 мг/кг не вызывал седативного действия, в то время как феназепам статистически значимо угнетал спонтанную двигательную активность мышей BALB/c в актометре. Полученные результаты демонстрируют наличие у ГБ-115 (таблетка 0,001) выраженных анксиолитических свойств, лишённых побочных эффектов, характерных для производных бензодиазепина, на экспериментальных моделях с повышенным уровнем тревожности

Ключевые слова: ГБ-115, анксиолитик, тревожность, алкогольная абстиненция, мыши BALB/c, крысы

Dipeptide cholecystokinin-4 analog attenuates anxiety in "high-emotional" mice BALB/c and in ethanol-withdrawn rats: comparison with phenazepam

Kolik L.G., Nadorova A.V., Gudasheva T.A., Martyanov V.A., Seredenin S.B.

Zakusov Research Institute of Pharmacology, Moscow

Resume. Anxiolytic effects of dipeptide endogenous cholecystokinin tetrapeptide analogue GB-115 at the dose range 0,25-2,0 mg/kg after oral administration were studied in rodents with high emotionality. In "elevated plus-maze" test GB-115 anxiolytic activity comparable with phenazepam was shown in inbred "anxious" BALB/c mice and "aged" rats with long-term 10% ethanol experience during ethanol withdrawal. GB-115 at the doses 0,5-2,0 mg/kg didn't induce sedation, in contrast phenazepam significantly suppressed spontaneous locomotor activity in BALB/c mice in Optovarimex. The data obtained show potent anxiolytic properties GB-115 (tablet 0,001) lacking benzodiazepine's side-effects in animal models with high emotionality.

Keywords: GB-115, anxiolytic, anxiety, alcohol withdrawal, mice BALB/c, rats

Автор, ответственный за переписку:

Колик Лариса Геннадьевна – д.б.н., профессор РАН, зав. лабораторией фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел.: +7 (495) 601-22-38; e-mail: lgkolik@mail.ru

Введение

Одним из современных направлений в области поиска и создания эффективных и безопасных психотропных средств для лечения нарушений в психоэмоциональной сфере рассматривается их разработка на основе эндогенных соединений регуляторных пептидов. Так, например, нейропептид окситоцин устраняет тревожную симптоматику, депрессию и психозы при шизофрении [1] и купирует проявления алкогольной абстиненции у больных наркологического профиля [2]. Анксиолитическая активность синтетического аналога тафтсина селанка оказалась сопоставимой с положительным действием медазепама при фармакотерапии больных с генерализованными тревожными расстройствами [3]. Согласно экспериментальным данным, фрагмент кортикотропина АКТГ4-10 семакс вызывает коррекцию негативных последствий неонатального стресса [4], нейропептид Y проявляет противотревожные свойства на модели пост-травматического стрессового расстройства [5]. Приведённые выше данные о психотропной активности пептидов и их аналогов описаны для интраназального способа введения, к недостаткам которого относят выраженные индивидуальные физиологические отличия, следствием которых является разная биодоступность препаратов, возможные осложнения, связанные с местным введением, ограниченность данных по оценке безопасности системно действующих лекарственных средств. Наличие специфических переносчик-опосредованных транспортных систем для коротких пептидов определяет их уникальную способность к всасыванию в кишечнике, что открывает перспективы создания пептидных препаратов для перорального применения [6].

Опираясь на экспериментальные и клинические данные о вовлечённости эндогенной холецистокининовой (ХЦК) системы в формирование тревожных состояний, в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в отделе химии (рук. член-корр. РАН Т.А. Гудашева) сконструирован, синтезирован и фармакологически изучен дипептидный аналог тетрапептида холецистокинина (ХЦК) амид N-(6фенилгексаноил) глицил-L-триптофана (соединение ГБ-115) [7]. ГБ-115 при парентеральном и пероральном введении обладает выраженными анксиолитическими свойствами у инбредных животных с генетически детерминированной «пассивной» реакцией на эмоциональный стресс [8], а также купирует тревожный компонент синдрома «отмены» у крыс со сформированной зависимостью от бензодиазепиновых транквилизаторов [8], не вызывая при этом толерантности и формирования синдрома «отмены» *per se* [9].

В ранее проведённых исследованиях методами фармакокинетики показана возможность перорального применения фармакологически активных дипептидов [10]. В опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (рук. проф. Б.М. Пятин) с учётом физико-химических свойств субстанции ГБ-115 был разработан и фармакологически изучен ряд фармацевтических композиций для изготовления твёрдой лекарственной формы ГБ-115 [11].

Цель настоящей работы — сравнительная оценка анксиолитических свойств дипептидного аналога ХЦК-4 и феназепама у животных с повышенным уровнем эмоциональности при введении в таблетированной форме.

Материалы и методы

Животные. Эксперименты выполнены на инбредных мышах-самцах линий BALB/c массой 18–20 г и беспородных крысах-самцах массой 450–530 г (филиал «Андреевка» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). Мышей содержали по 10 особей в клетке (370 × 200 × 150 мм) в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при регулируемом световом режиме (12 ч — свет/12 ч — темнота) и постоянной температуре (21–230 °С) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 сут до начала тестирования в соответствии с приказом МЗ РФ № 199н от 23.08.2010 «Об утреждении Правил лабораторной практики».

Препараты. Соединение ГБ-115 в таблетках 1,0 мг (ОТО ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»), феназепам в таблетках 1,0 мг (Валента Фармацевтика ОАО, Россия), спирт этиловый 96%, разбавленный водой дистиллированной до 10 об.% (ООО «Главспирт»).

Выбор эффективных доз ГБ-115 0,25–2,0 мг/кг основан на результатах ранее проведённых исследований [8]. Для человека суточная доза феназепама для лечения выраженной ажитации, страха и тревоги составляет 3,0 мг/сут, соответственно, расчёт дозы феназепама для животных (ЛСж) проводили на основе терапевтической дозы для человека по формуле:

доза ЛСж (мг/кг) = (Доза для человека (мг/кг) × × коэффициент человека)/коэффициент животного,

где: коэффициент человека — 37, коэффициент мыши — 3, коэффициент крысы — 6 [12].

Все вещества вводили из расчёта 0,1 мл/10 г массы тела (мыши) и 0,1 мл/100 г массы тела (крысы) животных.

Методики. Оценку тревожности в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) проводили в соответствии с методикой, описанной ранее для мышей [13] и для крыс [14]. Животных помещали на центральную площадку и в течение последующих 300 с фиксировали основные параметры, а именно время нахождения в открытых рукавах (в с), число заходов в открытые рукава, число заходов в закрытые рукава. Показатели «время в открытых рукавах» и «число заходов в открытые рукава» сравнивали в процентах, которые рассчитывали по формуле: время в открытых рукавах (в %) = (время в открытых рукавах в с / 300 с) × × 100%; число заходов в открытые рукава в % = (число заходов в открытые рукава / общее число заходов в открытые и закрытые рукава) × 100%.

Увеличение времени нахождения в открытых рукавах при отсутствии изменений двигательной активности (общее число заходов в открытые и закрытые рукава) рассматривали как проявление анксиолитического эффекта.

Спонтанную двигательную активность регистрировали в актометре Opto-Varimex-4 (США) в соответствии с ранее описанной методикой [15].

Для моделирования состояния алкогольной абстиненции беспородным крысам-самцам (n = 38), содержащимся в индивидуальных клетках (370 × 200 × × 150 мм) в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» со свободным доступом к брикетированному корму с предоставлением 10% раствора этанола в качестве единственного источника жидкости. К концу 33-й недели потребление этанола составляло в среднем 4,80 ± 0,11 г/кг. Анксиолитическое действие феназепама и ГБ-115 оценивали в ПКЛ через 48 ч после отмены этанола у животных со «средним» уровнем алкогольной мотивации, который определяли по показателю алкоголь-депривационного эффекта [15].

Статистическая обработка. Оценку достоверности полученных результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим использованием LSD теста, а также непараметрического U критерия Манна–Уитни для независимых групп.

Межгрупповые сравнения с использованием LSD теста осуществляли при условии, что значимый эффект был выявлен процедурой дисперсионного анализа. Данные представлены в виде M±SEM.

Результаты

Исходя из гипотезы, согласно которой для реализации противотревожного действия антагонистов ХЦК-рецепторов необходимо наличие нейрохимического «субстрата», определяющего изначально высокий уровень тревоги и страха [16, 17], изучали фармакологическую активность ГБ-115, одной из первичных мишеней действия которого являются центральные ХЦК-рецепторы [18], с использованием релевантных экспериментальных моделей. Опыты выполнены на инбредных мышах линии BALB/c, характеризующихся повышенным уровнем эмоциональности в условиях новизны и смены окружающей обстановки, и беспородных крысах со сформированной алкогольной зависимостью в условиях индуцированного отменой этанола анксиогенеза.

Сравнительная оценка влияния феназепама (таблетка 1,0 мг) и ГБ-115 (таблетка 1,0 мг) на поведение мышей BALB/c в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

В первой серии экспериментов был проведён подбор анксиолитической дозы феназепама для последующего сопоставления эффектов дипептидного аналога ХЦК-4 ГБ-115 с классическим бензодиазепиновым транквилизатором. Показано, что феназепам при введении *per os* в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг за 60 мин до тестирования дозозависимо препятствует формированию симптомов тревожной реакции у мышей BALB/c, статистически значимо увеличивая время пребывания животных в открытых рукавах лабиринта ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно), количество выходов в открытые рукава лабиринта ($p < 0,05$ и $p < 0,01$, соответственно), снижая в дозе 1,0 мг/кг двигательную активность, оцениваемую по количеству заходов в закрытые рукава ПКЛ ($p < 0,05$) (рис.1).

При изучении влияния ГБ-115 в диапазоне доз 0,25–2,0 мг/кг при введении *per os* за 60 мин до тестирования на тревожное поведение мышей BALB/c в тесте ПКЛ установлена дозо-зависимая анксиолитическая активность с максимально выраженным эффектом в дозе 1,0 мг/кг (рис. 1). Установлено, что дипептидный анксиолитик статистически значимо увеличивал время пребывания в открытых рукавах ($F(4, 49) = 18,944$, $p = 0,00000$) и число выходов в открытые рукава ($F(4, 49) = 15,975$, $p = 0,00000$), не влияя на общую двигательную активность животных. При сопоставлении анксиолитических свойств дипептида ГБ-115 и феназепама очевидно, что ГБ-115 в эффективной дозе 1,0 мг/кг не уступает референтному препарату в дозе 0,5 мг/кг в тесте ПКЛ (рис. 1). Дипептид увеличивает время нахождения в открытых рукавах лабиринта в 6,2 раза, в то время как феназепам в дозе 0,5 мг/кг – в 2,8 раза. Далее, ГБ-115 значительно увеличивает число выходов в открытые рукава по сравнению с феназепамом (в 3,4 раза, $p < 0,001$ и в 1,6 раз, $p < 0,05$, соответственно) и не влияет на общую двигательную активность, что свидетельствует о выраженных анксиолитических свойствах дипептидного анксиолитика при отсутствии побочного седативного эффекта. По скорости наступления эффекта ГБ-115 при пероральном введении не уступает феназепаму и может быть использован для быстрого купирования приступов тревоги и страха. Поскольку в ранее проведённых исследованиях ГБ-115 при различных способах введения не оказывал влияния на двигательную активность животных, для сравнительной оценки его действия был выбран феназепам в дозе 0,5 мг/кг.

Сравнительная оценка влияния ГБ-115 и феназепама на тревожное поведение крыс при отмене этанола в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

Опыты выполнены на беспородных крысах-самцах со сформированной алкогольной мотивацией. При моделировании синдрома отмены этанола, прежде всего, необходимо было доказать, что при данном режиме потребления алкоголя у крыс развивается тревожная реакция в ответ на лишение доступа к ал-

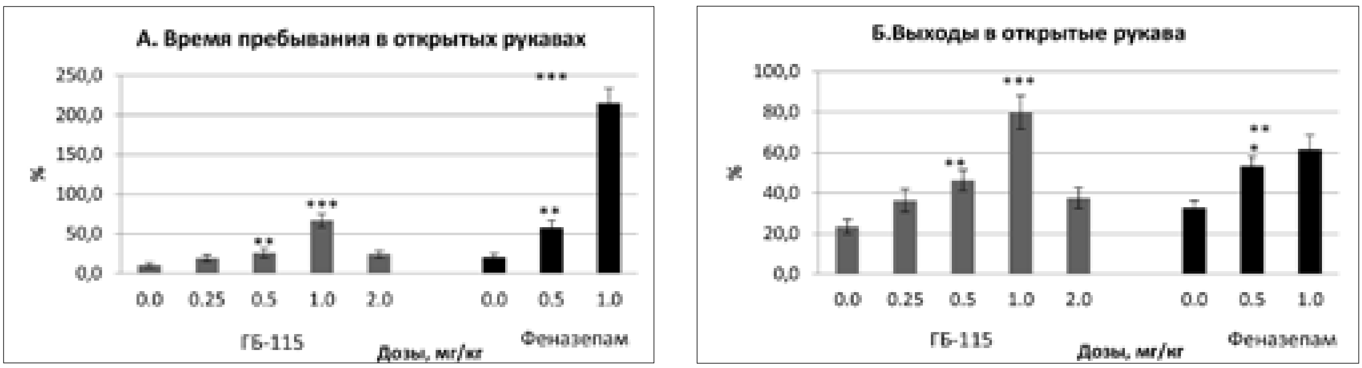


Рис. 1. Сравнительная оценка эффективности ГБ-115 (таблетка, 1,0 мг) и феназепама (таблетка, 1,0 мг) у мышей BALB/c в тесте ПКЛ.

Примечание: Данные представлены как M±SEM; **, *** – $p < 0,01$, $p < 0,001$ статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, ANOVA, LSD-тест.

Таблица 1

Влияние ГБ-115 и феназепама на поведение беспородных крыс в условиях алкогольной депривации в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

Параметры поведения в ПКЛ	Интактные *n* = 11	Отмена этанола *n* = 10	Отмена этанола + феназепам 0,25 мг/кг *n* = 8	Отмена этанола + ГБ-115 0,7 мг/кг *n* = 9	Отмена этанола + ГБ-115 0,9 мг/кг *n* = 9
Время в открытых рукавах, с	85,5±30,4	5,3±2,5 ***	36,2±16,8 ##	41,1±23,3	137,0±45,5 #
Время в открытых рукавах, %	28,2±10,1	1,8±0,8 ***	12,1±5,6 ##	13,7±7,8	45,7±15,2 #
Заходы в открытые рукава	1,7±0,3	0,5±0,2 **	1,5±0,3 #	1,8±0,8	1,1±0,3
Заходы в открытые рукава, %	44,6±7,4	19,2±6,8 *	50,1±4,1 ##	32,1±8,8	48,1±11,8
Время в центре	11,4±3,3	7,4±3,2	14,6±11,1	10,8±5,5	4,2±2,7
Заходы в закрытые рукава	3,2±0,8	1,6±0,3	1,5±0,4	2,2±0,7	1,3±0,4
Общее число заходов в рукава лабиринта	4,9±1,0	2,1±0,3 *	3,0±0,6	4,0±1,3	2,4±0,7

Примечание: Данные представлены как M±SEM; *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ статистически значимые различия по сравнению с группой «интактные»; #, ## – $p < 0,05$, $p < 0,01$ статистически значимые различия по сравнению с группой «отмена этанола». Согласно непараметрическому критерию Манна–Уитни; *n* – число животных в группе.

коголю. На фоне 48-часовой алкогольной депривации у животных выявлен выраженный анксиогенез в тесте ПКЛ (табл. 1), который проявлялся в сокращении времени пребывания в открытых рукавах ($p < 0,001$) и числа выходов в открытые рукава лабиринта ($p < 0,01$) при снижении общей двигательной активности ($p < 0,05$) по сравнению с интактными крысами того же возраста, что позволяет сделать вывод об адекватности выбранной модели «алкоголизации».

Стандартный препарат для купирования симптомов алкогольной абстиненции феназепам (таблетки 1,0 мг) при пероральном введении за 45 мин до тестирования в дозе 0,25 мг/кг проявлял анксиолитическую активность у крыс через 48 ч после отмены этанола в тесте ПКЛ, увеличивая время пребывания и число заходов в открытых рукавах ПКЛ ($p < 0,01$ и $p < 0,05$, соответственно) (см. табл. 1). ГБ-115 в дозах 0,7 и 0,9 мг/кг при однократном введении за 45 мин до тестирования также существенно влиял на основные параметры тревожного поведения, статистически значимо увеличивая время пребывания в открытых рукавах ПКЛ в дозе 0,9 мг/кг ($p < 0,05$) по сравнению с группой «отмена этанола» и на 60% повышая данный показатель по сравнению с интактными животными, что указывает на выраженное противотревожное действие дипептидного аналога ХЦК-4.

Выраженность фармакологических эффектов ГБ-115 имела дозовую зависимость. В условиях данного эксперимента феназепам и ГБ-115 не влияли на общую двигательную активность животных, оцениваемую по общему числу заходов в рукава ПКЛ (см. табл. 1).

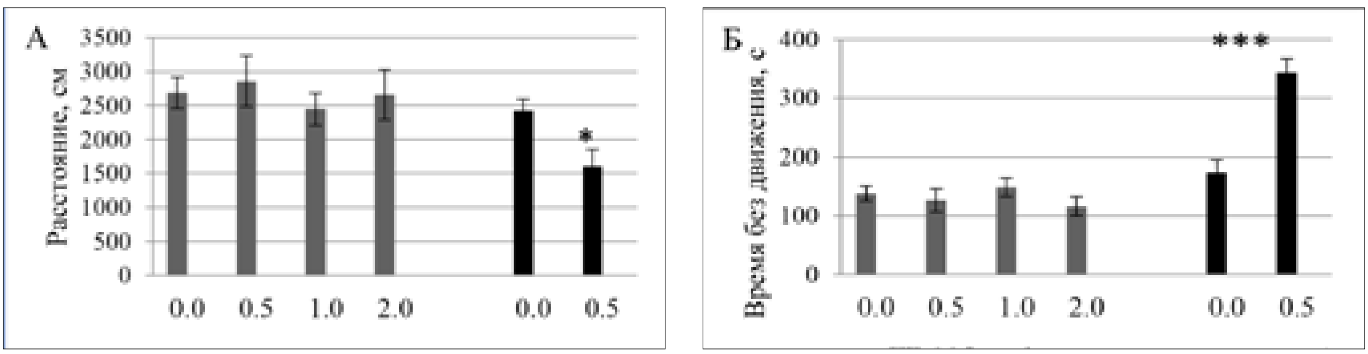


Рис. 2. Влияние ГБ-115 и феназепама на общее расстояние (А) и время нахождения без движений (Б) у мышей BALB/c при оценке спонтанной двигательной активности.
Примечание: Данные представлены как M±SEM; *, *** – $p < 0,05$, $p < 0,001$ статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, ANOVA, LSD-тест; число животных в группе – 8–10.

Сравнительная оценка влияния ГБ-115 и феназепама в анксиолитических дозах на спонтанную двигательную активность

С целью исключения возможных седативных или психостимулирующих свойств, изучено влияние ГБ-115 (таблетки 1,0 мг) в диапазоне доз 0,5—2,0 мг/кг на спонтанную двигательную активность «высоко-тревожных» мышей BALB/c. ГБ-115 в изученных дозах при однократном введении за 60 мин до тестирования не оказывал влияния на спонтанную двигательную активность мышей BALB/c в течение 10 мин наблюдения (рис. 2).

Феназепам (таблетки 1,0 мг) в дозе 0,5 мг/кг через 60 мин после однократного введения значительно изменял поведенческий профиль мышей BALB/c, статистически значимо сокращая общее пройденное расстояние ($p < 0,05$) и увеличивая продолжительность пребывания животных без движения ($p < 0,001$) (рис. 2). Согласно данным, представленным в табл. 2, в отличие от ГБ-115 феназепам в эффективной анксиолитической дозе значительно снижал общую и исследовательскую активность, увеличивая при этом время нахождения мышей BALB/c без движения, что свидетельствует о выраженном седативном действии и соответствует клиническим наблюдениям [19].

Обсуждение

Показанная анксиолитическая активность пептида ГБ-115 при пероральном введении в твёрдой лекарственной форме согласуется с результатами ранее выполненных фармакокинетических исследований. Рассчитанные параметры полувыведения 63,86 мин, среднее время удержания пептида в неизменном состоянии 95,75 мин, достижение максимальной концентрации через 15 мин после введения фармацевтической композиции свидетельствуют об устойчивости дипептида к действию протеолитических ферментов по сравнению с природными нейропептидами [11]. Высокая биодоступность устойчивых к энзиматической деградации ди- и трипептидов определяется их взаимодействием с транспортёрами пептидов, которые представляют собой белки, обеспечивающие их перемещение через биологические мембраны посредством направленного внутрь протонного градиента и отрицательного мембранного потенциала. В опытах на изолированных фрагментах кишечника для дипептида глицилсаркозина (Gly-Sar) установлена предельная проницаемость и специфичность для протон-сопряжённого олигопептидного транспортёра PepT1[20]. Наряду с этим, активно обсуждается в научной литературе подход для повышения биодоступности биологически активных соединений, в частности увеличения абсорбции в кишечнике, основанный на создании «про-лекарств» путём присоединения дипептидов в качестве субстратов для транспортёра hPepT1, обеспечивающего перенос коротких пептидов и пептидомиметиков [21].

Полученные в настоящей работе результаты подтверждают современные исследования, обосновываю-

Таблица 2

Влияние ГБ-115 и феназепама в эффективных дозах на параметры спонтанной двигательной активности «высокотревожных» мышей BALB/c

Параметры поведения	Контроль $n = 8$	Феназепам 0,5 мг/кг $n = 6$	ГБ-115 1,0 мг/кг $n = 10$
Общее расстояние, см	2421,2±170,5	1599,8±253,0 *	2447,0±238,0 #
Время без движения, с	173,7±21,5	343,2±24,1 ***	148,1±15,7 ###
Время стереотипии, с	125,2±9,7	76,2±6,9 **	129,5±8,5 ###
Количество эпизодов стереотипии	88,0±5,4	57,7±4,6 ***	96,1±4,4 ###
Горизонтальные перемещения	1939,5±162,8	1181,8±159,7 *	1890,9±195,8 #
Вращения по часовой стрелке	19,6±1,9	12,8±1,1 *	22,6±1,9 ##
Вращения против часовой стрелки	20,6±1,6	10,8±1,2	20,5±1,6 ###
Вертикальная активность	2421,2±170,5	86,2±29,1 **	327,3±71,7 #

Примечание: Данные представлены как M±SEM; *, **, *** – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой; #, ##, ### – $p < 0,05$, $p < 0,01$, $p < 0,001$ статистически значимые различия по сравнению с группой «феназепам», ANOVA, LSD-тест; n – число животных в группе.

щие целесообразность и перспективу использования коротких пептидов с целью купирования тревожных состояний.

Так, дипептид Tyr-Leu в диапазоне доз 0,3–3,0 мг/кг при введении *per os* проявлял анксиолитические свойства в ПКЛ в опытах на мышах посредством активации серотониновых 5-НТ(1А), дофаминовых D(1) и ГАМК(А)-рецепторов [22]. Дипептид Met-His (wheylin-1), синтезированный низкомолекулярный фрагмент бета-лактоглобулина(145-146), демонстрировал противотревожную активность, обусловленную активацией ГАМК(А)-рецепторов, сопоставимую с диазепамом при пероральном введении, при этом замена аминокислотной последовательности на His-Met приводила к утрате биологической активности у ретро-пептида [23].

Помимо самостоятельного терапевтического потенциала короткие пептиды с анксиолитической активностью могут использоваться в качестве адьювантов при назначении классических транквилизаторов с целью снижения выраженности и/или минимизации таких побочных эффектов производных бензодиазепинов, как седация, нарушение памяти, расстройство сна и т. д.), на что указывает положительный опыт совместного применения селанка и феназепама в клинической практике [19].

На основании проведённых исследований при использовании животных с генетически детерминированной «пассивной» реакцией на эмоциональный стресс и в условиях индуцированного анксиогенеза установлено, что дипептидный аналог эндогенного холецистокинина-4 соединение ГБ-115 в таблетках по 1,0 мг обладает выраженным анксиолитическим действием, сопоставимым с феназепамом, при отсутствии седативной реакции, характерной для производных 1,4-бензодиазепинов.

Литература

1. *Hofmann S.G., Fang A., Brager D.N.* Effect of intranasal oxytocin administration on psychiatric symptoms: A meta-analysis of placebo-controlled studies. Psychiatry Res. 2015; 228: 3: 708–714.
2. *Pedersen C.A., Smedley K.L., Leserman J. et al.* Intranasal oxytocin blocks alcohol withdrawal in human subjects. Alcohol Clin Exp Res. 2013; 37: 3: 484–489.
3. *Зозуля А.А., Незнамов Г.Г., Сюняков Т.С. и соавт.* Эффективность и возможные механизмы действия нового пептидного анксиолитика селанка при терапии генерализованного тревожного расстройства и неврастении. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2008; 108: 4: 38–48.
4. *Volodina M.A., Sebentsova E.A., Glazova N.Y. et al.* Correction of long-lasting negative effects of neonatal isolation in white rats using semax. Acta Naturae. 2012; 4: 1: 86–92.
5. *Serova L., Laukova M., Alaluf L. et al.* Intranasal neuropeptide Y reverses anxiety and depressive-like behavior impaired by single prolonged stress PTSD model, European Neuropsychopharmacology. 2014; 24: 142–147.
6. *Liu Z., Wang C., Liu Q. et al.* Uptake, transport and regulation of JBP485 by PEPT1 in vitro and in vivo. Peptides. 2011; 32: 4: 747–754.
7. *Гудашева Т.А., Лезина В.П., Кирьянова Е.П. и соавт.* Синтез, конформационный анализ и анксиолитическая активность ретропептидных аналогов холецистокинина-4. Химико-фармацевтический журнал. 2006; 40: 7: 21–26.
8. *Колик Л.Г.* Разработка оригинального анксиолитика с антиалкогольной активностью на основе фармакологического изучения новых производных холецистокинина [Диссертация]. М.: НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, 2012.
9. *Колик Л.Г., Гарибова Т.Л., Литвинова С.А. и соавт.* Отсутствие толерантности и синдрома отмены у нового L-триптофансодержащего дипептидного анксиолитика ГБ-115. Вестник РАМН. 2011; 7: 37–42.
10. *Гудашева Т.А.* Стратегия создания дипептидных лекарств. Вестник РАМН. 2011; 7: 8–16.
11. *Жердев В.П., Бойко С.С., Константинопольский М.А. и соавт.* Фармакокинетика и фармакодинамика фармацевтических композиций дипептидного анксиолитика ГБ-115. Химико-фармацевтический журнал. 2016; 50: 5: 42–46.
12. *Reagan-Shaw S., Nihal M., Ahmad N.* Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J. 2008; 22: 3: 659–661.
13. *Lister R.G.* The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. Psychopharmacology. 1987; 92: 180–185.
14. *Pellow S. and S. File S.* Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. J.Neurosci. Methods. 1985; 14: 149–167.
15. *Колик Л.Г., Надорова А.В., Козловская М.М.* Эффективность пептидного анксиолитика селанка при моделировании синдрома отмены у крыс с устойчивой алкогольной мотивацией. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2014; 157: 1: 61–65.
16. *Wang H., Wong P.T., Spiess J., Zhu Y.Z.* Cholecystokinin-2 (CCK2) receptor-mediated anxiety-like behaviors in rats. Neurosci Biobehav Rev. 2005; 29: 8: 1361–73.
17. *Яркова М.А., Середенин С.Б.* Временные характеристики стрессиндуцированного падения бензодиазепиновой рецепции у мышей линий C57BL/6 и BALB/c. Бюллетень Экспериментальной Биологии и Медицины. 2014; 157: 6: 733–735.
18. *Kolik L.G., Gudasheva T.A., Seredenin S.B.* Dipeptide anxiolytic GB-115: new receptor targets. European Neuropsychopharmacology. 2011; 21: S2: S146.
19. *Медведев В.Э., Терещенко О.Н., Кост Н.В. и соавт.* Оптимизация терапии тревожных расстройств пептидным препаратом селанк. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015; 115: 6–1: 33–40.
20. *Jappar D., Wu S.P., Hu Y., Smith D.E.* Significance and regional dependency of peptide transporter (PEPT) 1 in the intestinal permeability of glycylsarcosine: in situ single-pass perfusion studies in wild-type and Pept1 knockout mice. Drug Metab Dispos. 2010; 38: 10: 1740–1746.
21. *Bueno A.B., Collado I., de Dios A. et al.* Dipeptides as effective prodrugs of the unnatural amino acid (+)-2-aminobicyclo[3.1.0]hexane-2,6-dicarboxylic acid (LY354740), a selective group II metabotropic glutamate receptor agonist. J Med Chem. 2005; 48: 16: 5305–5320.
22. *Kanegawa N., Suzuki C., Ohinata K.* Dipeptide Tyr-Leu (YL) exhibits anxiolytic-like activity after oral administration via activating serotonin 5-HT1A, dopamine D1 and GABAA receptors in mice. FEBS Lett. 2010; 584: 3: 599–604.
23. *Yamada A., Mizushige T., Kanamoto R., Ohinata K.* Identification of novel β-lactoglobulin-derived peptides, wheylin-1 and -2, having anxiolytic-like activity in mice. Mol. Nutr. Food Res. 2014; 58: 2: 353–358.

Изучение эффектов леветирацетама и нового производного 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 в закрытом крестообразном лабиринте у мышей линий BALB/c и C57BL/6

ГКовалёв И.Г.[2], Васильева Е.В.[1], Боков Р.О.[1], Салимов Р.М.[1], Ковалёв Г.И.[1]

[1] – Лаборатория радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

[2] – Лаборатория психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва

Резюме. Целью исследования явилось сравнительное изучение эффектов противосудорожных веществ леветирацетама и нового производного пирролидона-2 соединения ГИЖ-290 на спектр поведенческой активности инбредных мышей BALB/c и C57BL/6 в условиях теста «закрытый крестообразный лабиринт». Установлено, что леветирацетам (600 мг/кг/день, 5 дней, в/б) ухудшает когнитивные функции у мышей линии C57BL/6, усиливает тревожность и уменьшает двигательную активность у мышей линии BALB/c. Соединение ГИЖ-290 (5 мг/кг/день, 5 дней, в/б) не оказывает влияния на поведение мышей линии C57BL/6, а у мышей BALB/c снижает локомоторную активность.

Ключевые слова: противоэпилептический препарат, леветирацетам, соединение ГИЖ-290, мыши BALB/c и C57BL/6, ноотропное действие, тревожность, двигательная активность, закрытый крестообразный лабиринт

The effects of levetiracetam and a new 4-phenylpyrrolidone derivative GIZh-290 in a closed cross-maze in BALB/c and C57BL / 6 mice

Kovalev I.G.[2], Vasileva E.V.[1], Bokov R.O.[1], Salimov R.M.[1], Kovalev G.I.[1]

[1] – Laboratory of Radioizotopic Research Methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

[2] – Laboratory of Psychopharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The study was aimed to compare the psychopharmacological effects of 2 anticonvulsant drugs levetiracetam ((S)-2-(2-oxopyrrolidin-1-yl) butanamide) and the new compound, GIZh-290 (2-oxo-4-phenylpyrrolidine-1-yl) acetic acid) on behavioral spectra of inbred mice BALB/c and C57BL/6 under conditions of "closed cross-maze" test. It was found that after 5-fold i.p. injections levetiracetam (600 mg/kg/day) reduced the cognitive and motor ability of C57BL/6 mice, while in BALB/c mice the drug increased anxiety and diminished motor activity. In contrast, the substance GIZh-290 (5 mg/kg/day, i.p.) had no effect in C57BL/6. Compound GIZh-290 (5 mg/kg/day, 5 days, ip) does not affect the behavior of C57BL/6 mice, but depressed the motor activity in BALB/c mice.

Keywords: anticonvulsant, levetiracetam, 4-phenylpyrrolidone derivative, mice, BALB/c, C57BL/6, nootropic action, anxiety, motor activity, closed cross-maze test

Автор, ответственный за переписку:

Ковалёв Иван Георгиевич – аспирант, Лаборатория радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел.: +7 (966) 121-23-31; vanneit@yandex.ru

Введение

Леветирацетам ((S)-2-(2-оксопирролидин-1-ил) бутанамид) является противоэпилептическим препаратом 2-го поколения, используемым в лечении эпилепсии как у детей, так и у взрослых. Соединение ГИЖ-290 (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты) имеет сходство по химическому строению с леветирацетамом и синтезирован в Отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (зав. член-корр. РАН профессор *Гудашева Т.А.*). Установлено, что ГИЖ-290 обладает выраженным противосудорожным действием и превосходит леветирацетам по активности и эффективности и, кроме того, ГИЖ-290 оказывает положительное влияние на обучаемость и воспроизведение навыка в тесте «водного лабиринта Морриса» [1]. Известно, что течению эпилепсии сопутствуют поведенческие и психиатрические отклонения, в частности тревожность, депрессия и нарушение когнитивных функций [2, 3]. Адекватной моделью для исследования этих поведенческих нарушений в эксперименте является методика «закрытого крестообразного лабиринта», при использовании которой установлено, что мыши линии BALB/c характеризуются в сравнении с мышами линии C57BL/6 когнитивным дефицитом и повышенной тревожностью [4].

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния леветирацетама и соединения ГИЖ-290 на спектр поведенческой активности мышей BALB/c и C57BL/6 в условиях теста «закрытый крестообразный лабиринт».

Материалы и методы

Исследования проводили на самцах мышей линий C57BL/6 и BALB/c массой 25–30 г, которые были поставлены питомником «Столбовая» (Московская обл., РФ) и были помещены в условия с контролируемой постоянной температурой и влажностью (40–60%) воздуха, регулярно сменяемым циклом «день–ночь» (12 ч – 12 ч), свободным доступом к воде и еде. Организация экспериментов соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург; Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19 июня 2003 г. М., 2003).

Препараты применяли в дозах, соответствующих их противосудорожному эффекту [1]. Леветирацетам (600 мг/кг/день) и соединение ГИЖ-290 (5 мг/кг/день) вводили внутрибрюшинно, в течение 5 дней. Вещества растворяли в физиологическом растворе. Контрольным животным вводили 0,9% NaCl.

Тест закрытого крестообразного лабиринта (ЗКЛ) основан на врождённой способности мышей к спонтанному поведению в незнакомой обстановке, исключающей элемент предварительного обучения, преимуществом которого является минимальная степень инвазивности [4, 5]. Закрытый крестообразный лабиринт состоял из 4 пластмассовых закрытых пустых отсеков, соединённых с центральным отсеком с помощью входных отверстий. Мышь помещали в центральный отсек лабиринта и в полуавтоматическом режиме с помощью программы Behaviour регистрировали последовательность и продолжительность её переходов из одного рукава в другой. Последующий анализ данных позволял выделить ряд показателей эффективности исследовательского поведения (когнитивные функции), тревожности и двигательной активности.

Показатели величины 1-го цикла патрулирования (F_PtrN) и числа циклов патрулирования (PatrN) используются для оценки ноотропного действия веществ: чем больше число заходов требуется мыши, чтобы посетить все 4 боковых рукава (совершить один цикл патрулирования), тем менее «систематично» и менее эффективно исследование лабиринта. Число циклов патрулирования, совершённых за время эксперимента, ещё один показатель эффективности исследовательского поведения. Чем больше циклов патрулирования, тем более «систематично» и более эффективно исследование лабиринта животным.

Латентный период (F_ChTm) и продолжительность 1-го визита в боковой отсек (F_GITm) – показатели, которые отражают уровень тревожности животного в новой обстановке и могут рассматриваться как показатель баланса между любопытством и тревогой животного в новой обстановке. Эти показатели отрицательно коррелируют с продолжительностью пребывания животного в открытых рукавах в известном тесте приподнятого крестообразного лабиринта, что позволяет использовать избирательное изменение этих показателей в качестве индикатора тревожности.

Общее время, проведённое животным в центральном и боковых отсеках лабиринта (T_ChTm и T_GITm) – это показатели, которые отражают уровень двигательной активности, а также характеризуют интенсивность обследования новой среды и могут быть использованы для оценки стимулирующего (тимолептического) или, наоборот седативного эффекта веществ.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 с привлечением методов параметрической и непара-

Таблица 1

Поведенческие эффекты препарата леветирацетам (600 мг/кг) и вещества ГИЖ-290 (5 мг/кг) в тесте «закрытый крестообразный лабиринт» при внутрибрюшинном введении мышам BALB/c и C57BL/6

Линия мышей	Вещества	Ноотропная активность		Тревожность		Двигательная активность	
		длина 1-го цикла патрулирования (число заходов, F_PtrN)	количество циклов патрулирований (полных обходов, PatrN)	латентный период 1-го захода F_ChTm (с)	продолжительность 1-го захода в боковой отсек, F_GITm (с)	время пребывания в центральном отсеке T_ChTm (с)	время пребывания в боковых отсеках, T_GITm (с)
BALB/c	Контроль	6,15±0,54	1,77±0,12#	9,73±2,06#	10,72±2,08	41,34±3,15	107,45±11,07#
	Леветирацетам	5,92±0,46	1,85±0,19	**19,03±3,34***	11,83±2,29	48,29±6,72	**154,73±19,48***
	ГИЖ-290	6,00±0,49	1,67±0,14	9,07±2,16	15,7±4,29	35,13±3,97	**143,78±13,51***
C57BL/6	Контроль	5,13±0,38	2,25±0,11#	3,88±0,56#	20,11±3,90	37,78±1,84	177,49±20,15#
	Леветирацетам	6,11±0,40	**1,67±0,12***	4,72±0,75	13,92±2,17	**45,61±2,19***	181,31±15,16
	ГИЖ-290	5,67±0,33	2,11±0,08	3,37±0,35	13,98±2,13	40,07±3,18	184,78±21,03

Примечание: # – межлинейное различие (Wald-Wolfovitz, $p < 0,05$); * – отличие от контроля (t-тест Стьюдента, $p < 0,05$).

метрической статистики (t-тест Стьюдента, тест Манна–Уитни, критерий Колмогорова–Смирнова, тест Вальда–Вольфовица).

Результаты

Анализ поведенческих параметров мышей контрольных групп обеих инбредных линий C57BL/6 и BALB/c подтвердил наличие межлинейных различий, описанных нами ранее [4]: мыши C57BL/6 превосходили мышей линии BALB/c по ноотропной активности, оцениваемой по эффективности исследовательской (более высокое количество полных обходов всех боковых отсеков, PatrN) и уступали по общей двигательной активности (большее суммарное время нахождения в отсеках за сессию, T_GITm), тогда как мыши линии BALB/c проявляли существенно большую тревожность в незнакомой обстановке (меньший латентный период 1-го захода в боковой отсек, (F_ChTm) (табл. 1).

Леветирацетам (600 мг/кг/день, 5 дней) не обладал ноотропной активностью у мышей BALB/c, что выражалось в отсутствии изменения показателей: числа заходов 1-го цикла (F_PtrN, 5,92±0,46 против 6,15±0,54 в контроле) и числа полных обходов (PatrN, 1,85±0,19 против 1,77±0,12 в контроле). У мышей C57BL/6 леветирацетам не влиял на 1-й показатель ноотропной активности (F_PtrN), однако уменьшал число полных обходов с 2,25±0,11 до 1,67±0,12 ($p < 0,05$; Student's t-test), что означает ухудшение эффективности исследовательской активности, а следовательно и ког-

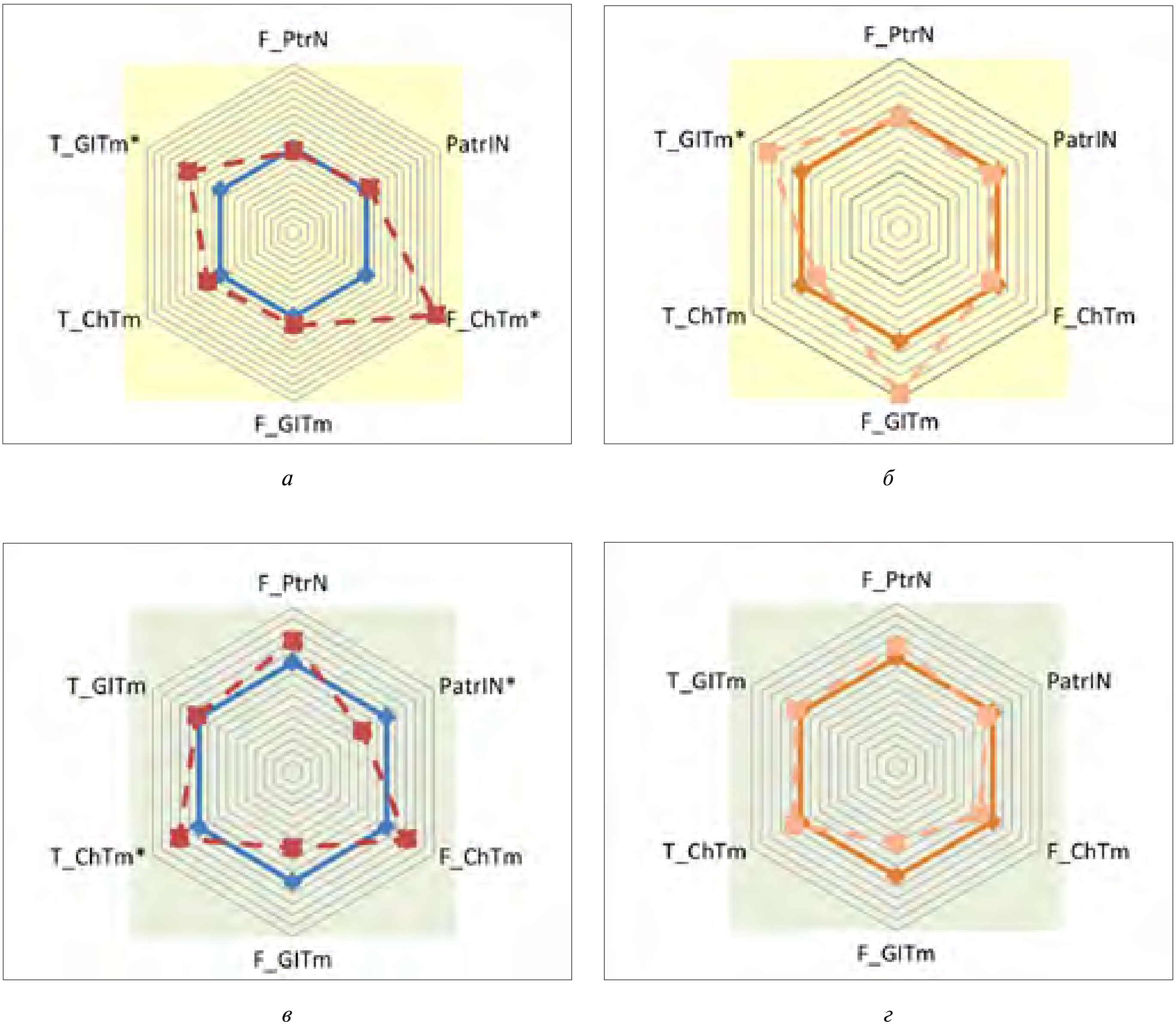


Рис.1. Сравнительные поведенческие спектры эффектов 5-кратного введения леветирацетама (*а*, *в*) и ГИЖ-290 (*б*, *г*) у инбредных мышей BALB/c (а, б) и C57BL/6 (в, г) в закрытом крестообразном лабиринте (% к контролю).
Примечание: за 100% приняты показатели в группах контроль (сплошная линия); достоверное отличие от контроля по t-тесту Стьюдента ($p < 0,05$).

нитивных функций (табл. 1). Соединение ГИЖ-290 (5 мг/кг/день, 5 дней) не оказывало влияния на показатели, отражающие ноотропный эффект (см. табл. 1).

У мышей BALB/c, исходно более тревожных в незнакомой обстановке теста, леветирацетам ещё более увеличивал латентное время 1-го захода (с 9,73±2,06 с в контроле до 19,03±3,34 с в опыте; $p < 0,05$), что свидетельствует о способности леветирацетама повышать уровень тревожности (см. табл. 1). Леветирацетам не изменял уровень тревожности у мышей линии C57BL/6, а ГИЖ-290 не изменял показатели тревожности у мышей обеих линий.

Леветирацетам и ГИЖ-290 у мышей BALB/c повышали показатель общего времени пребывания в боковых отсеках, соответственно до 154,73±19,48 с и 143,78±13,51 с по сравнению с контролем (107,45±11,07 с; $p < 0,05$), что отражало снижение двигательной активности. Кроме того, у мышей C57BL/6 леветирацетам повышал показатель общего времени пребывания и в центральном отсеке: с 37,78±1,84 с в контроле до 45,61±2,19 с в опыте (см. табл. 1).

Изменение профилей поведенческой активности мышей линий BALB/c и C57BL/6 под влиянием леветирацетама и ГИЖ-290 представлены на рис. 1. Из представленных графиков следует, что эффекты обоих веществ во многом зависят от исходного поведенческого паттерна линии мышей. Так, у мышей BALB/c, исходно характеризующихся высокими уровнями тревожности и двигательной активности, леветирацетам способствовал ещё большему усилению тревожности (+96% относительно контроля, рис. 1, *а*), тогда как ГИЖ-290 не оказывал влияния на тревожность (рис. 1, *б*). При этом оба вещества не изменяли показателей тревожности у мышей линии C57BL/6 (рис. 1, *в*, *г*).

Качественное совпадение эффектов наблюдалось и в отношении двигательной активности: у мышей BALB/c как леветирацетам, так и ГИЖ-290 она снижалась за счёт возрастания суммарного времени пребывания в боковых отсеках лабиринта T_GlTm на 44 и 34% (см. рис. 1, *а*, *б*), соответственно. У мышей C57BL/6, спонтанно менее «быстрых», некоторое снижение перемещений по показателю суммарного времени пребывания в центральном отсеке (T_ChTm) вызывал лишь леветирацетам.

В этой же группе мышей было обнаружено ухудшение показателя эффективности исследовательского поведения (-26%) (рис. 1, *в*).

Таким образом, леветирацетам (600 мг/кг/день, 5 дней, в/б) у мышей BALB/c усиливал тревожность и снижал двигательную активность, а у мышей линии C57BL/6 ухудшал когнитивные функции и уменьшал двигательную активность (табл. 2). Соединение ГИЖ-290 (5 мг/кг/день, 5 дней, в/б) существенно не изменяло профилей поведения мышей линий BALB/c и C57BL/6, за исключением снижения двигательной активности у мышей линии BALB/c (см. табл. 2).

Известно, что наиболее типичными психиатрическими расстройствами при эпилепсии являются тревожность, депрессия, эмоциональная лабильность, ажитация, враждебность [2, 6] и когнитивный дефицит [7]. В настоящем исследовании показано, что леветирацетам может усиливать эти патологические состояния, что подтверждается отдельными клиническими наблюдениями [8–10]. Соединение ГИЖ-290 не оказывает существенного влияния на психоэмоциональные показатели поведения мышей как линии BALB/c, так и линии C57BL/6, демонстрирующих различные паттерны поведения в тесте закрытого крестообразного лабиринта, что позволяет предполагать отсутствие у него негативного влияния на психиатрические коморбидные состояния, сопровождающие эпилепсию у пациентов, и свидетельствует о преимуществе нового соединения перед леветирацетамом.

Выводы

1. Леветирацетам (600 мг/кг/день, 5 дней, в/б) в тесте закрытого крестообразного лабиринта у мышей линии BALB/c усиливает тревожность и снижает двигательную активность, а у мышей линии C57BL/6 ухудшает когнитивные функции и уменьшает двигательную активность.
2. Соединение ГИЖ-290 (5 мг/кг/день, 5 дней, в/б) в тесте закрытого крестообразного лабиринта не оказывает влияния на уровень тревожности и на когнитивные функции у мышей линий BALB/c и C57BL/6 и лишь незначительно понижает двигательную активность у мышей линии BALB/c.

Таблица 2

Сопоставление психофармакологической активности леветирацетама и ГИЖ-290 на инбредных мышах

Линия мышей	**BALB/c**			**C57BL/6**		
Активность	Ноотропная	Тревожность	Двигательная	Ноотропная	Тревожность	Двигательная
Леветирацетам	0	↑	↓	↓	0	↓
ГИЖ-290	0	0	↓	0	0	0

Примечание: ↓/↑/0 – снижение/увеличение/отсутствие эффекта.

Литература

1. *Ковалёв И.Г., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В.* Сравнение противосудорожных и мнемотропных свойств новых производных 4-фенилпирролидона, леветирацетама и пирацетама. Эксперим. и клин. Фармакол. 2017; (в печати).

2. *Jones J.E.* Treating anxiety disorders in children and adolescents with epilepsy: What do we know? Epilepsy & Behavior. 2014; 39: 137–142.

3. *Brand Ch., Mula M.* Anxiety disorders in people with epilepsy. Epilepsy & Behavior. 2016; 59: 87–91.

4. *Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И.* Влияние интраназального и внутрибрюшинного введений пептидов семакса и ноопепта на поведенческие характеристики мышей BALB/c. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 2: 31–36.

5. *Salimov R.M.* Behavioral patterns related to alcohol use in rodents: a factor analysis. Alcohol. 1999; 17: 157–162.

6. *Kanner A.M., Hesdorffer D.C.* Neuropsychiatric complications of epilepsy. In: H.Stefan and W.H. Theodore, editors. Handbook of Clinical Neurology, Vol.107 (3rd series) Epilepsy, Part I. Elsevier B.V.; 2012; 461–482.

7. *Ortinski P., Meador K.J.* Cognitive side effects of antiepileptic drugs. Epilepsy & Behavior. 2004; 5: S60-S65.

8. *Mukhin K.Y., Pylaeva O.A.* Efficacy and Tolerability of Levetiracetam (Keppra®) in the Treatment of Epilepsy: Review of Literature. Russian Journal of Child Neurology. 2015; 2 (10): 38.

9. *Cramer J.A., De Rue K., Devinsky O. et al.* A systematic review of the behavioral effects of levetiracetam in adults with epilepsy, cognitive disorders, or an anxiety disorder during clinical trials. Epilepsy Behav 2003; 4 (2): 124–32.

10. *Mula M., Sander J.W.* Negative effects of antiepileptic drugs on mood in patients with epilepsy. Drug Safety. 2007; 30(7): 555–67.

Сравнительное изучение фармакокинетики метаболита тропоксина у различных видов животных и человека

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

Лаборатория фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» г. Москва

Резюме. Представлены результаты изучения фармакокинетики метаболита тропоксина (оксима тропинона; М-1) у экспериментальных животных (кролики и крысы) и человека после введения/применения различных доз тропоксина. Сравнительный анализ фармакокинетических параметров, характеризующих интенсивность образования метаболита, у животных и человека выявил следующую закономерность: время достижения C_{max} метаболита М-1 в плазме крови возрастает в ряду крыса>человек>кролик. Скорость элиминации М-1 замедлялась в ряду крыса>кролик>человек.

Ключевые слова: тропоксин, биотрасформация, оксим тропинона, противомигренозная активность

Pharmacokinetic comparative study of tropoxine metabolite in miscellaneous animal species and humans

Zherdev V.P., Kolyvanov G.B., Litvin A.A., Bochkov P.O., Shevchenko R.V., Grybakina O.G., Ganshina T.S.

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow

Resume. Results of pharmacokinetic study of tropoxine metabolite (tropinone oxime; M-1) in experimental animals (rats, rabbits) and humans after administration several doses of tropoxine. Comparative analysis of the pharmacokinetic parameters characterizing of the metabolite formation intensity, i.e. Cmax of metabolite M-1 in the blood plasma increased in series: rats>humans> rabbits. Elimination rate of M-1 was decreased in series: rats>rabbits>humans

Keywords: tropoxine, biotransformaion, tropinone oxime, antimigraine activity

Автор, ответственный за переписку:

Литвин Александр Алексеевич – д.б.н. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; e-mail: litbiopharm@yandex.ru

Введение

К наиболее распространённым хроническим нейроваскулярным заболеваниям относится мигрень, которая поражает от 11 до 30% населения разных стран в наиболее работоспособном возрасте. В современном мире количество пациентов с данным заболеванием ежегодно растёт, а имеющиеся в распоряжении неврологов фармакологические препараты не лишены существенных побочных эффектов [1, 6–8].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» разработано лекарственное средство из группы производных оксима тропинона, обладающее противомигреневой антисеротониновой активностью — тропоксин [2, 4, 5]. При создании новых лекарственных средств необходимым этапом является изучение их фармакокинетики на доклиническом уровне.

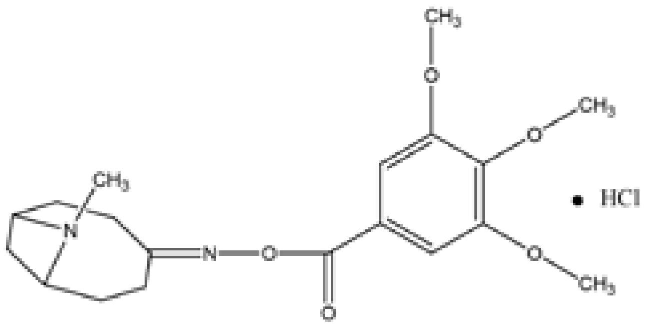
Известно, что в организме экспериментальных животных и человека биотрансформация лекарственных средств протекает с различной интенсивностью. Для выявления возможных межвидовых различий и общих закономерностей в фармакокинетике и метаболизме нового лекарственного средства тропоксина изучена его фармакокинетика у крыс, кроликов и здоровых добровольцев.

Цель настоящего исследования — изучение межвидовых различий в фармакокинетике основного метаболита тропоксина в организме крыс, кроликов и человека.

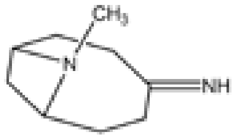
Материалы и методы

В качестве стандартных веществ использовали:

фармацевтическую субстанцию тропоксина — 3-(3,4,5-триметоксибензоилоксиимино)-8-метил-8-азабицикло-[3,2,1]октана гидрохлорида:



и фармацевтическую субстанцию 3-оксиимино-8-метил-8-азабицикло [3,2,1] октана:



Синтез исследуемых веществ осуществлён в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Исследование проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 200±20 г (n = 5), кроликах-самцах породы шиншилла массой 2,8–3,0 кг (n = 4).

Животные получены из питомника «Столбовая» (Московская область), содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при 12-часовом световом режиме. Работа с животными проводилась с соблюдением международных правил (Директива 86/629/ ЕЕС) и правилами работы с животными, утверждёнными этической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Изучение фармакокинетики на добровольцах (возраст 26,3±4,6 лет; масса тела 76,6±6,4 кг; рост 168,8±6,2 см) проведено в рамках I фазы клинических исследований по стандартизованному протоколу № Т-Ф1 «Открытое исследование I фазы по изучению безопасности, переносимости и фармакокинетики препарата «Тропоксин» таблетки 50 мг у здоровых добровольцев» (Разрешение № 494 от 09.09.2015 г.).

Доза тропоксина у добровольцев (10 человек) составила 50 мг (1 таблетка).

Препарат вводили крысам внутрибрюшинно (в/б) в дозе 10 мг/кг, кроликам – внутрь в дозе 30 мг/кг. Образцы крови отбирали через дискретные временные интервалы: у добровольцев через 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 6,0; 8,0; 12,0 и 24,0 ч с помощью кубитального катетера, у крыс через 0; 0,08; 0,17; 0,25; 0,33; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0 ч – декапитацией, у кроликов – 0; 0,25; 0,50; 0,75; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0 ч – из краевой ушной вены. Полученные пробы крови центрифугировали на лабораторной центрифуге в течение 15 мин при 1 500 g и 4 °C. Отбор плазмы крови проводили в стерильные пластиковые пробирки. Плазму крови хранили при температуре –18 °C.

Концентрации тропоксина и/или его метаболита определяли в образцах плазмы крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием [3].

Полученные данные подверглись математической статистической обработке. Расчёт фармакокинетических параметров проводили модельно-независимым методом. Расчёт фармакокинетических параметров у крыс проводили по усреднённым фармакокинетическим профилям.

Результаты и обсуждение

Хроматомасс-спектрометрический анализ всех образцов плазмы крови добровольцев показал, что в анализируемых образцах отсутствует характеристический молекулярный ион, соответствующий неизменённой молекуле тропоксина-основания, с m/z = 363 (протонированный ион). Однако на масс-спектрограммах зарегистрирован дочерний молекулярный ион с m/z = 153, который соответствует метаболиту тропоксина – оксиму тропинона; метаболит М-1). Другими словами, тропоксин после его перорального применения добровольцами подвергается интенсивному процессу биотрансформации, и в плазме крови регистрируются лишь его метаболиты. Поэтому дальнейший фармакокинетический анализ полученных данных производили по основному метаболиту М-1 с m/z = 153.

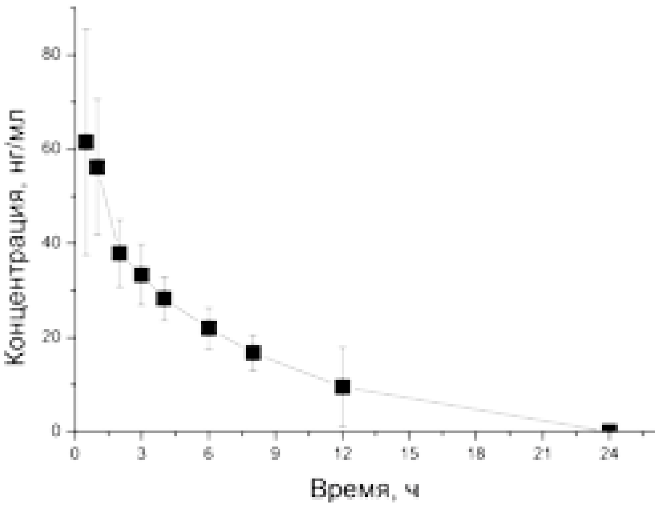


Рис. 1. Усреднённый фармакокинетический профиль метаболита тропоксина М-1 в плазме крови здоровых добровольцев после однократного перорального приёма таблеток тропоксина в дозе 50 мг (n = 10; $\bar{x}$ ± SD)

На рис. 1 представлены усреднённые фармакокинетические профили метаболита М-1 тропоксина с m/z = 153 в плазме добровольцев после однократного перорального приёма таблеток тропоксина в дозе 50 мг.

Из рис. 1 видно, что измеренные концентрации анализируемого вещества представляют собой сильно вариабельные величины (CV% на начальной и на терминальной частях кривой составил выше 30%). Снижение концентраций метаболита лекарственного вещества носит монофазный характер.

Метаболит тропоксина определялся в плазме крови всех 10 добровольцев на протяжении 8 ч и 6 добровольцев – на протяжении 12 ч после приёма препарата.

В табл. 1 представлены фармакокинетические параметры метаболита М-1 тропоксина в плазме крови добровольцев после однократного приёма таблеток тропоксина в дозе 50 мг. Как видно из табл. 1, рассчитанные фармакокинетические параметры представляют собой сильно вариабельные величины. Так, коэффициент вариации (CV%) для C_{max} составил 32,09 %, T_{max} – 35,14%, k_{el} – 40,23%.

Таблица 1

Фармакокинетические параметры метаболита тропоксина М-1 в плазме крови добровольцев после однократного перорального приёма таблеток тропоксина в дозе 50 мг

№/№	C_{max} (нг/мл)	T_{max} (ч)	AUC_T (нг/мл×ч)	$AUC_{0\to\infty}$ (нг/мл×ч)	% экстраполяции	k_{el} ($ч^{-1}$)	$t_{1/2}$ (ч)	MRT (ч)
G101	78,9	0,5	307,65	431,76	28,75	0,1305	5,31	8,83
G102	85,8	0,5	242,40	322,62	24,87	0,2094	3,31	5,39
G103	52,8	1,0	210,90	339,12	37,81	0,1381	5,02	7,84
G104	81,0	1,0	360,60	528,51	31,77	0,1126	6,16	9,92
G105	108,6	0,5	264,60	295,23	10,37	0,2742	2,53	3,61
G106	50,4	0,5	248,49	325,86	23,74	0,1779	3,90	4,36
G107	74,1	0,5	340,80	439,77	22,50	0,1455	4,76	7,62
G108	51,0	0,5	279,99	403,59	30,63	0,1116	6,21	9,72
G109	46,2	0,5	303,60	423,84	28,37	0,1073	6,46	9,19
G110	43,5	0,5	315,90	595,26	46,93	0,0677	10,25	15,04
$\bar{x}$	67,23	0,6	287,49	410,56	28,75	0,1475	5,39	8,2
SD	21,58	0,2	46,74	95,95	24,87	0,0593	2,1	3,3
CV%	32,09	35,14	16,26	23,37	37,81	40,23	39,72	40,38

Примечание: C_{max} (нг/мл) – максимальная концентрация лекарственного вещества в моче после перорального приёма; T_{max} (ч) – время достижения максимальной концентрации лекарственного вещества после перорального приёма; k_{el} ($ч^{-1}$) – константа скорости элиминации; $t_{1/2}$ (ч) – период, за который выводится половина введённой и всосавшейся дозы лекарственного вещества; MRT (ч) – среднее время пребывания лекарственного вещества в организме; $AUC_{0\to\infty}$ (нг/мл×ч) площадь под фармакокинетической кривой (площадь под кривой «концентрация лекарственного вещества – время») после перорального приёма. $AUC_{0\to\infty}$ рассчитывается от момента приёма до бесконечности

Время достижения C_{max} – T_{max} метаболита тропоксина в плазме крови в среднем составило 0,6±0,2 ч, а её величина (C_{max}) – 67,77±21,58 нг/мл. При этом индивидуальные значения T_{max} метаболита колебались от 0,5 до 1,0 ч. Метаболит достаточно медленно выводится из плазмы крови. Так, период полувыведения ($t_{1/2}$) оксима тропинона в среднем составил 5,39±2,10 ч, а его среднее время удерживания в организме (MRT) – 8,2±3,3 ч, соответственно. При этом следует отметить, что величину MRT рассчитывали с учётом $AUC_{0\to\infty}$, а вклад экстраполированной части площади под фармакокинетической кривой в величину данного параметра в среднем составил 28,75%. Следовательно, полученные значения MRT нельзя рассматривать, как достоверные.

Площадь под фармакокинетической кривой (AUC_T) метаболита составила 287,49±46,74 нг/мл×ч.

Следует отметить, что такие параметры, как общий плазменный клиренс и кажущийся объём распределения для метаболитов лекарственных веществ рассчитать в принципе невозможно, поскольку неизвестна пероральная доза анализируемого вещества (метаболита М-1).

Фармакокинетика метаболита тропоксина в плазме крови крыс после его однократного внутрибрюшинного введения

Изучение фармакокинетики метаболита тропоксина М-1 в плазме крови крыс проводилось после его в/б введения в дозе 10 мг/кг.

Усреднённая фармакокинетическая кривая метаболита тропоксина М-1 в плазме крови крыс представлена на рис. 2. Поскольку на каждую временную точку использовали по 5 животных, результирующая фармакокинетическая кривая была построена по усреднённым концентрациям, поэтому при расчётах фармакокинетических параметров отсутствует статистическая обработка результатов. Фармакокинетические параметры исследуемого вещества после однократного в/б введения представлены в табл. 2.

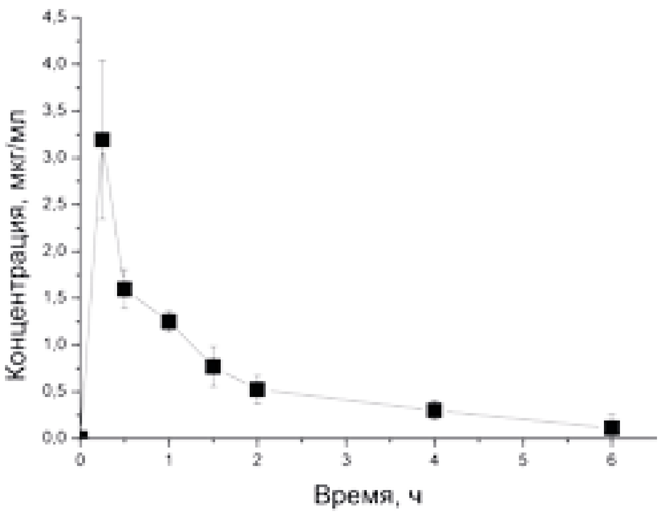


Рис. 2. Фармакокинетический профиль метаболита тропоксина М-1 в плазме крови крыс после однократного в/б введения тропоксина в дозе 10 мг/кг (n = 5, $\bar{x}$±SD)

Таблица 2

Фармакокинетические параметры метаболита тропоксина М-1 в плазме крови крыс после однократного в/б введения тропоксина в дозе 10 мг/кг

Параметры	Значения
C_{max} (мкг/мл)	3,193
T_{max} (ч)	0,25
$AUC_{0\to t}$ (мкг/мл×ч)	3,769
k_{el} ($ч^{-1}$)	0,5181
$AUC_{0\to\infty}$ (мкг/мл×ч)	3,980
$t_{1/2}$ (ч)	1,34
MRT (ч)	1,37

После в/б введения тропоксина животным метаболит тропоксина определяется в плазме крови на протяжении 6 ч. Учитывая, что период полуэлиминации метаболита не превышал 1,3 ч тропоксин можно отнести к группе лекарственных веществ со средним периодом полувыведения. Об этом так же свидетельствуют такие фармакокинетические параметры, как среднее время удерживания вещества в организме (MRT – 1,4 ч).

Максимальная концентрация (C_{max}) метаболита тропоксина в плазме крови регистрировалась через 0,25 ч (T_{max}) после введения препарата, а её величина составила 3,193 мкг/мл.

Фармакокинетика метаболита тропоксина в плазме крови кроликов после его однократного введения внутрь

Изучение фармакокинетики тропоксина проводили на кроликах после однократного введения внутрь субстанции препарата 30 мг/кг (в виде раствора).

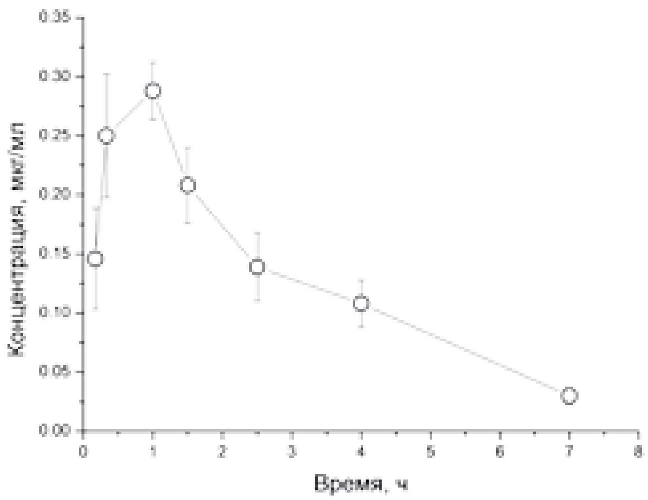


Рис. 3. Усреднённые кривые концентрации метаболита М-1 после однократного введения кроликам субстанции тропоксина в дозе 30 мг/кг ($n = 4$, $\bar{x}$ ±SD)

На рис. 3 представлены усреднённые концентрационные кривые метаболита тропоксина М-1 после однократного введения внутрь кроликам субстанции тропоксина.

В табл. 3 представлены основные фармакокинетические параметры метаболита тропоксина М-1 в плазме крови кроликов после однократного введения субстанции тропоксина в дозе 30 мг/кг.

Таблица 3

Фармакокинетические параметры метаболита тропоксина М-1 в плазме крови кроликов после однократного перорального введения субстанции препарата в дозе 30 мг/мг

Параметры	1	2	3	4	$\bar{x}$	SD	CV%
C_{max}, мкг/мл	0,294	0,307	0,318	0,261	0,295	0,025	8,37
T_{max}, ч	1,000	0,330	1,000	1,000	0,833	0,335	40,24
AUC_T мкг/мл×ч	0,922	0,895	1,078	0,759	0,914	0,131	14,32
k_{el}, $ч^{-1}$	0,416	0,344	0,337	0,348	0,361	0,037	10,18
AUC_{oo} мкг/мл×ч	0,974	0,985	1,191	1,156	1,077	0,113	10,50
$t_{1/2}$, ч	1,668	2,015	2,056	1,989	1,932	0,178	9,22
MRT, ч	2,717	2,965	3,179	2,965	2,957	0,189	6,39

Установлено, что тропоксин в организме крыс, кроликов и человека метаболизируется с образованием двух основных метаболитов. Биотрансформация тропоксина как у животных, так и человека осуществляется через разрыв сложноэфирной группировки исходной молекулы противомигренозного средства с образованием оксима тропинона с m/z = 153 (3-оксиимино-8-метил-8-азабицикло[3,2,1] октан; М-1) и 3,4,5-триметоксибезойной кислоты с m/z = 213 (М-2).

Сравнительный анализ фармакокинетических параметров, полученных на экспериментальных животных и добровольцах, проводили по метаболиту М-1.

Сравнение дозонезависимых фармакокинетических параметров метаболита М-1 у животных и добровольцев, характеризующих интенсивность образования метаболита в организме, выявило следующие межвидовые различия: у кроликов метаболит М-1 достигает максимальной концентрации (C_{max}) в плазме крови через 0,83 ч после введения препарата, в плазме крови крыс C_{max} отмечается уже через 0,25 ч, тогда как T_{max} у добровольцев составило 0,60 ч.

Таким образом, сравнительный анализ фармакокинетических параметров, характеризующих интенсивность образования метаболита, у животных и человека выявил следующую закономерность: время достижения C_{max} метаболита М-1 в плазме крови возрастает в ряду крыса>человек>кролик.

Сопоставление фармакокинетических параметров, отвечающих за выведение анализируемого вещества из организма животных и человека показало, что период полувыведения ($t_{1/2}$) метаболита М-1 у человека в 2,8 раз превышал аналогичный параметр, полученный у кроликов, и в 4,0 раза – у крыс.

Величина MRT для крыс составила 1,37 ч, для кроликов – 2,96 ч и для добровольцев – 8,20 ч, соответственно.

Таким образом, сравнительный анализ фармакокинетических параметров у животных и человека выявил следующую закономерность: скорость элиминации оксима тропинона замедляется в ряду крыса>кролик>человек.

Выводы

1. Тропоксин не определяется в плазме крови добровольцев и экспериментальных животных даже в следовых количествах.

2. Сравнительный анализ фармакокинетических параметров, характеризующих интенсивность образования метаболита, у животных и человека выявил следующую закономерность: время достижения Cmax метаболита М-1 в плазме крови возрастает в ряду: крыса>человек кролик. Скорость элиминации оксима тропинона замедляется в ряду крыса>кролик>человек.

Литература

1. *Амелин А.В., Игнатов Ю.Д., Скоромец А.А.* Мигрень (патогенез, клиника, лечение). Санкт-Петербургское медицинское издательство. 2001; 200.

2. *Ганьшина Т.С., Горбунов А.А., Гнездилова А.В. и др.* Хим.-фарм. журн., 2016; 50 (1), 19–23.

3. *Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. и др.* Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 3, 21–25.

4. *Косточка Л.М., Мирзоян Р.С., Ганьшина Т.С., Середенин С.Б.* Хим.-фарм. журн. 2010; 44 (9), 6–9.

5. *Мирзоян Р.С., Середенин С.Б., Ганьшина Т.С. и др.* Эксперим. и клин. фармакол. 1998; 61 (2): 28 – 31.

6. *Dent W., Stelzhammer B., Meindl M. et al.* Headache, 2011; 51 (10): 1483-1492. doi: 10.1111/j. 1526-4610. 2011.

7. *Pezzini A., Del Zotto E., Giossi A., et al.* Stroke Res. Treatment. 2010; 9; 361–365. doi:10.4061/2011/304921.

8. *Rist P.M., Buring J.E., Kase C.S. et al.* Circulation. 2010; 122 (24); 2551–2557.

Разработка ВЭЖХ-методики количественного анализа фексофенадина в плазме крови

Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Гацанога М.В.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России, Кафедра фармакологии с курсом фармации ФДПО, г. Рязань

Резюме. Описана методика количественного анализа гистаминолитика III поколения – фексофенадина в плазме крови людей методом ВЭЖХ с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Анализ выполнялся в изократическом режиме на хроматографической системе Stayer с применением обращенно-фазной колонки Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4,6 мм) с размером частиц сорбента 4 мкм и подвижной фазы (ацетонитрил–вода–кислота уксусная ледяная–триэтиламин в соотношении 267:128:4,7:7) с pH 6,15. Время удерживания фексофенадина составило 14,91±0,25 мин. Экстракция фексофенадина из плазмы крови осуществлялась ацетонитрилом (2 мл плазмы и 4 мл ацетонитрила) путём встряхивания на приборе Shaker при 400 об/мин 15 мин, центрифугирования при 3 500 об/мин 15 мин и упаривания супернатанта на роторно-вакуумном испарителе при 50 °С. Коэффициент экстракции фексофенадина составил 84,14%. Разработанная методика характеризуется чувствительностью, специфичностью, простотой выполнения, воспроизводимостью и линейностью в интервале плазменных концентраций после перорального применения 180 мг вещества (таблетки, покрытые оболочкой Аллегра, 180 мг, Sanofi-Aventis, США) здоровыми добровольцами.

Ключевые слова: фексофенадин, ВЭЖХ, гликопротеин-Р, фармакокинетика

Design of HPLC methods of fexofenadine quantitative analysis in blood plasma

Yakusheva E.N., Chernykh I.V., Shulkin A.V., Gatsanoga M.V.

Ryazan State Medical University, Ryazan

Resume. The article describes a method of quantitative analysis of III generation gistamine antagonist – fexofenadine in human blood plasma by HPLC with UV detection at 220 nm. The analysis was performed in isocratic mode using Stayer chromatography system and a reversed-phase column Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 x 4,6, 4 μm) and a mobile phase (acetonitrile-water-glacial acetic acid-triethylamine in the ratio 267-128-4,7-7) at pH 6,1. The retention time of fexofenadine was 14,70±0,04 min. Fexofenadine extraction from plasma carried using acetonitrile (2 ml plasma and 4 ml acetonitrile) by shaking on Shaker apparatus at 400 vol./min for 15 minutes, centrifuging at 3 500 rpm. for 15 minutes and evaporation of the supernatant on a vacuum rotary evaporator at 50 °C. The recovery was 84,14%. The developed method is characterized by sensitivity, specificity, ease of implementation, reproducibility and linearity in the range of plasma concentrations during oral administration of 180 mg of fexofenadine (Allegra coated tablets, 180 mg, Sanofi-Aventis, USA) healthy volunteers.

Keywords: fexofenadine, HPLC, glycoprotein-P, pharmacokinetics

Автор, ответственный за переписку:

Щулькин Алексей Владимирович — к.м.н., ассистент кафедры ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Минздрава России; 390026, г. Рязань, ул. Высоковольтная, д. 9; тел.: +7 (920) 952-00-24; e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

Введение

Гликопротеин-Р (Pgp, ABCB1-белок) представляет собой АТФ-зависимый мембранный транспортёр, принадлежащий к суперсемейству ABC-транспортёров (Adenosine-Binding-Cassete), функционирующий как эффлюксный насос, удаляющий из клеток во внеклеточное пространство липофильные вещества эндогенной и экзогенной природы. Спектр его субстратов включает большое число лекарственных средств разных фармакологических групп [1]. В связи с вариабельной активностью, которая может изменяться под действием различных факторов, в том числе в результате приёма лекарственных средств, а также полиморфизмом кодирующего его гена MDR1 (MultiDrug Resistance), необходимо оценивать интенсивность функционирования ABCB1-белка для прогнозирования возможных межлекарственных взаимодействий.

Одним из методов оценки функциональной активности ABCB1-белка *in vivo* является изучение фармакокинетики его маркерных субстратов в динамике [2]. К числу маркерных субстратов ABCB1-белка относятся фексофенадин, дигоксин, домперидон и др. средства (ссылка на FDA).

Фексофенадин – гистаминолитик III поколения, широко применяющийся для симптоматической терапии аллергического ринита и крапивницы [3]. Препарат является активным метаболитом терфенадина – лекарственного средства предыдущего поколения, поэтому он практически не подвергается метаболизму в организме. В его энтеральной абсорбции, распределении и экскреции ведущая роль принадлежит ABCB1-белку [1, 4], в связи с чем фексофенадин считается его маркерным субстратом. Изменение фармакокинетики препарата отражает изменение функционирования транспортёра.

Преимуществами фексофенадина как маркерного субстрата являются:

• отсутствие биотрансформации;
• большая широта терапевтического действия;
• достаточно высокие концентрации в плазме крови при введении в терапевтической дозе;
• низкая частота неблагоприятных побочных реакций
• отсутствие кумуляции в организме;
• доступная стоимость оригинального препарата;
• безрецептурный отпуск из аптек.

Указанные свойства позволяют использовать фексофенадин в качестве маркерного субстрата как в эксперименте, так и в клинике, что делает целесообразным разработку ВЭЖХ-методики количественного анализа фексофенадина в плазме крови людей.

Методы

Для количественного определения фексофенадина в плазме крови с помощью ВЭЖХ использовали хроматографическую систему Stayer (Аквилон, Россия) с УФ-спектрофотометрическим детектором UVV 104, петлевым краном-дозатором PEEK с петлей ввода на 100 мкл, аналитическим ручным инжектором для ввода пробы модели 7725i (Rheodyne, США) при длине волны 220 нм. Использовали обращенно-фазную хроматографическую колонку: Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 × 4,6) с зернением 4 мкм и термостатированием при 35 °С. Ввод проб в петлю хроматографа производили с помощью шприца «Microsyringes» (Германия).

В качестве вспомогательного оборудования при подготовке проб применяли деионизатор «Водолей» (Аквилон, Россия), центрифугу «Elmi CM 6M» (Elmi, Латвия), встряхиватель пробирок «Shaker S 3.01» (Elmi, Латвия), встряхиватель лабораторный медицинский «Vortex» (Elmi, Латвия), роторно-вакуумный испаритель «VV – Micro» (Heidolph, Германия).

В качестве стандарта использовали субстанцию фексофенадина гидрохлорида, производства Sigma. Субстанция имела сертификат качества, подтверждающий количественное содержание фексофенадина гидрохлорида 99,2%. Рабочий раствор (100 мкг/мл) готовили на метаноле и хранили при температуре 40 °С.

Определение концентрации фексофенадина в плазме крови выполняли методом абсолютной калибровки по площади пиков. Калибровочные растворы готовили путём добавления к интактной плазме крови рассчитанного объёма раствора стандарта фексофенадина гидрохлорида с концентрацией 10 мкг/мл.

Калибровочную зависимость площади хроматографического пика от концентрации фексофенадина определяли в диапазоне концентраций 100–1000 нг/мл по 6 точкам (указанный диапазон концентраций наблюдается при пероральном приёме 180 мг фексофенадина [5], для каждой точки выполняли по 5 измерений.

Для экстракции фексофенадина из плазмы крови и приготовления подвижной фазы применяли следующие реактивы: ацетонитрил «для ВЭЖХ» (Merck, Германия), кислота уксусная ледяная ХЧ (Экос-1, Россия), триэтиламин «для ВЭЖХ» (Lab-Skan, Польша).

Для расчёта метрологических характеристик разработанной методики, а также её основных валидационных параметров (точность, прецизионность) применяли программы «Statistica 7.0» и «Microsoft Excel», а также руководство Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation (2013) [6]. Характер распределения данных оценивали по критерию Шапиро-Уилка. Для оценки зависимости плазменной концентрации фексофенадина от площади хроматографического пика использовали коэффициент корреляции Пирсона.

Результаты

Анализ ряда существующих методик [7–14] показал, что большинство из них мало пригодны для анализа фармакокинетики фексофенадина у людей в большинстве отечественных лабораторий.

Исследование выполняли в изократическом режиме. В качестве подвижной фазы применяли смесь ацетонитрил–вода–кислота уксусная ледяная–триэтиламин в соотношении 267:128:4,7:7 с pH 6,15. Время удерживания фексофенадина составило 14,91±0,25 мин. Критическим параметром для времени удерживания оказалось значение pH. Предел определения и предел детектирования составили соответственно 69,24 и 31,61 нг/мл.

Экстракцию фексофенадина из плазмы крови осуществляли ацетонитрилом (2 мл плазмы и 4 мл ацетонитрила) путём встряхивания на приборе Shaker при 400 об/мин 15 мин, центрифугирования при 3 500 об/мин 15 мин и упаривания супернатанта при 50 °С. Коэффициент экстракции составил 84,14%.

Метрологические характеристики методики представлены в табл. 1.

В указанном диапазоне концентраций зависимость «концентрация фексофенадина – площадь пика» носила линейный характер (рис. 1). Коэффициент детерминации составил 0,9998. Уравнение регрессии имело вид: $y = 3{,}3737 \times x + 11{,}724$, где x – площадь хроматографического пика, а y – концентрация фексофенадина.

Образцы полученных хроматограмм представлены на рис. 2–3. Пики фексофенадина отделены от пиков эндогенных соединений, что позволяет достоверно определить исследуемое вещество.

Коэффициент разделения (разрешения) пика фексофенадина и ближайшего пика соэкстрактивных веществ (см. рис. 3) вычисляли как разность времен удерживания указанных пиков, разделённых на сумму их широт на половине высот. Данный параметр составил 1,3.

На рис. 4 представлен участок хроматограммы, демонстрирующий пределы обнаружения и количественного определения аналита, которые вычислялись

Таблица 1

Метрологические характеристики разработанной методики количественного определения фексофенадина в плазме крови

Концентрация стандартного раствора фексофенадина в плазме крови, нг/мл	Результаты статистической обработки полученных данных				
	$\bar{x}$	Δx	$\bar{x} + \Delta x_{ср}$	v, % (прецизионность)	$\varepsilon_{ср}$, % (точность)
100,00	99,67	3,35	99,67±9,12	3,36	0,33
200,00	193,1	9,2	193,1±22,45	4,77	3,45
400,00	409,83	16,52	409,83±40,26	4,03	2,46
600,00	603,77	33,44	603,77±81,48	5,54	0,63
800,00	790,23	17,90	790,23±43,61	2,26	1,22
1000,00	1002,61	53,50	1002,61±130,36	5,34	0,26

Примечание: $\bar{x}$ – среднее арифметическое; Δx – стандартное отклонение; $\Delta x + \Delta x_{ср}$ – 95%-й доверительный интервал; $\Delta x_{ср}$ – стандартное отклонение; v – коэффициент вариации; $\varepsilon_{ср}$ – стандартная ошибка измерения

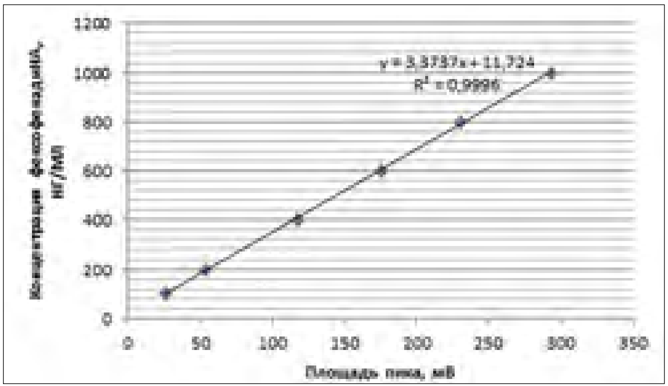


Рис. 1. График зависимости «концентрация фексофенадина – площадь пика»

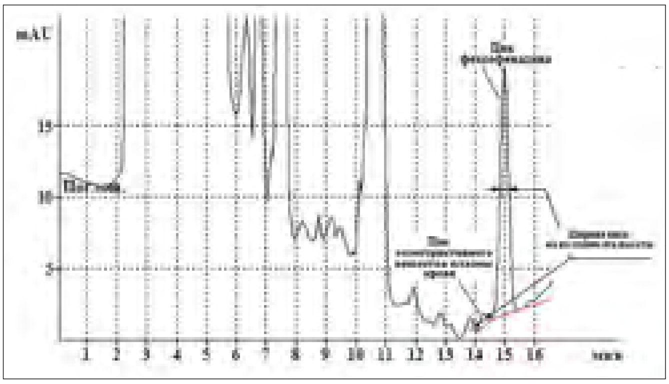


Рис. 3. Хроматограмма пробы плазмы крови через 4 ч после однократного перорального приёма фексофенадина в дозе 180 мг

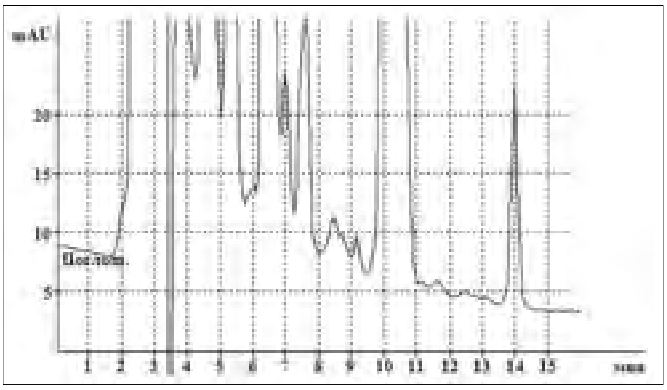


Рис. 2. Хроматограмма пробы интактной плазмы крови

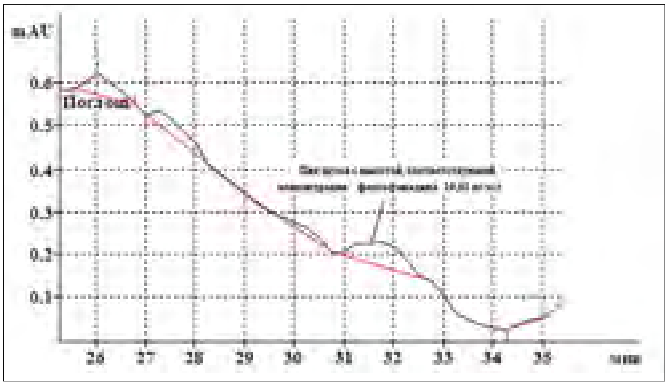


Рис. 4. Участок хроматограммы после инжекции чистой подвижной фазы

как концентрации аналита, дающие, соответственно, пики с высотами, 3-кратно и 10-кратно превышающими высоту пиков шума на расстоянии, 20-кратно превышающем ширину пика на половине его высоты. Ширина пика пробы с концентрацией 1 000 нг/мл на половине его высоты составляла 0,25 мин, что соответствует 10-минутному участку хроматограммы [15].

Обсуждение

FDA требует все потенциально выходящие на рынок лекарственные средства подвергать анализу на их возможную принадлежность к субстратам и модуляторам функциональной активности ABCB1-белка [16]. Причём, анализ *in vivo* рекомендовано осуществлять по фармакокинетике маркерных субстратов транспортера.

Ведущим методом исследования фармакокинетики лекарственных средств как на доклиническом, так и на клиническом этапах является ВЭЖХ. Причём, универсальным и экономически доступным для большинства лабораторий является УФ-детектирование.

В научной литературе представлен широкий спектр ВЭЖХ-методик анализа фексофенадина в плазме крови как животных, так и людей. Однако большинство из них предназначено для исследования растворов лекарственных форм фексофенадина [12, 13], т. е. не учитывает необходимость его отделения от балластных веществ матрицы (плазмы крови). Многие авторы рекомендуют применение дорогостоящего масс-спектрофотометрического детектора [10, 11, 14], что требует значительных материальных затрат. Также ряд методик апробированы для животных, но не для людей [8, 14]. Большинство зарубежных авторов также предлагают использование экономически малодоступной твёрдофазной экстракции [9] и градиентный режим элюирования [14], что усложняет анализ.

Предлагаемая методика лишена указанных выше недостатков и характеризуется чувствительностью, специфичностью, простотой выполнения, высокой разрешающей способностью, воспроизводимостью и линейностью в диапазоне рабочих концентраций. Её применение рекомендуется для оценки фармакокинетики фексофенадина – маркерного субстрата ABCB1-белка при анализе функциональной активности данного белка-транспортёра в клинических исследованиях.

Литература

1. *Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Попова Н.М., Черных И.В., Титов Д.С.* Структура, функции гликопротеина-Р и его значение для рациональной фармакотерапии. Обзоры по клин фармакол и лекарств тер. 2014; 12 (2): 3–11.

2. *Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Попова Н.М.* Гликопротеин-Р: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности. Усп физиол наук 2014; 45 (4): 90–99.

3. *Inami A., Matsuda R., Grobosch T. , Komamura H., Takeda K., Yamada Y. et al.* A simulated car-driving study on the effects of acute administration of levocetirizine, fexofenadine, and diphenhydramine in healthy Japanese volunteers. Hum Psychopharmacol. 2016; 31 (3): 167–177.

4. *Li F., Howard K.D., Myers M.J.* Influence of P-glycoprotein on the disposition of fexofenadine and its enantiomers. J Pharm Pharmacol. 2017; 69 (3): 274-284.

5. *Кукес В.Г., Сычев Д.А., Бруслик Т., Хилова Р., Гасанов Н.А.* Изучение транспортеров лекарственных средств как новая возможность персонализации фармакотерапии. Врач, 2007; 5: 2–5.

6. Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). London; 2013.

7. *Раменская Г.В., Скуридина Е.А., Красных Л.М.* Разработка методики количественного определения маркера активности Р-гликопротеина фексофенадина в плазме крови. Хим-фарм журн. 2006; 40 (12): 47–50.

8. *Гацанога М.В., Черных И.В., Щулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М.* Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-Р на самках кроликов породы Шиншилла? «Наука молодых» (Eruditio Juvenium) 2016; 4(4): 5–10.

9. *Kanthiah S., Kannappan V.* D-Optimal mixture design optimization of an HPLC method for simultaneous determination of commonly used antihistaminic parent molecules and their active metabolites in human serum and urine. Biomed Chromatogr. 2017, doi: 10.1002/bmc.3932 [Epub ahead of print].

10. *Bosilkovska M. , Samer C.F., Déglon J., Rebsamen M., Staub C., Daye P. et al.* Geneva cocktail for cytochrome p450 and P-glycoprotein activity assessment using dried blood spots. Clin Pharmacol Ther. 2014; 96 (3): 349–359.

11. *Muppavarapu R., Guttikar S., Rajappan M., Kamarajan K., Mullangi R.* Sensitive LC-MS/MS-ESI method for simultaneous determination of montelukast and fexofenadine in human plasma: application to a bioequivalence study/ Biomed Chromatogr. 2014; 28 (8):1048–1056.

12. *Hadir M.M., Maha A.S., Ileana V.O.* Development of validated stability-indicating chromatographic method for the determination of fexofenadine hydrochloride and its related impurities in pharmaceutical tablets. Chem Cent J, 2011; 5: 76.

13. *Karakus S., Kucukguzel I., Kucukguzel S.G.* Development and validation of a rapid RP-HPLC method for the determination of cetirizine or fexofenadine with pseudoephedrine in binary pharmaceutical dosage forms. J Pharm Biomed Anal. 2008;4 6 (2): 295–302.

14. *Tanaka Y., Yoshikawa Y., Yasui H.* Development of a highly sensitive methodology for quantitative determination of fexofenadine in a microdose study by multiple injection method using ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Biol Pharm Bull. 2012; 35 (5): 698–704.

15. *Эпштейн Н.А.* Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор). Хим-фарм журн. 2004; 38 (4): 40–56.

16. U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluationand Research. Guidance for industry: drug interaction studiesdstudy design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations. Available at: http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm292362.pdf.

Коррекция Лаеннеком хронической перегрузки железом печени, почек и головного мозга

Назаренко О.А.[1], Громова О.А.[1], Гришина Т.Р.[1], Торшин И.Ю.[2], Демидов В.И.[1], Томилова И.К.[1], Алексахина Е.Л.[1], Гоголева И.В.[1]

[1] – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново
[2] – ФГБОУ ВО «Московский физико-технический институт», г. Долгопрудный

Резюме. Представлены результаты экспериментального исследования эффектов препарата Лаеннек на фоне хронической перегрузки железом. Длительное (2 мес) применение сульфата железа или железа в составе полимальтозного комплекса приводило к хронической перегрузке железом (гемосидероз). Нарушения функции печени и почек более выражены при использовании сульфата железа и несколько менее – при использовании полимальтозного комплекса. Лаеннек приводил к снижению повреждения гепатоцитов (снижались уровни АЛТ). По данным гистологического анализа, применение Лаеннека снижало отложение железа в печени и почках и полностью предотвращало формирование отложений железа в головном мозге.

Ключевые слова: гемосидероз, болезни перегрузки железом, сульфат железа, полимальтозные комплексы железа, Лаеннек, инсулиноподобный фактор роста 1

Correction by Laennec of chronic iron overload liver, kidneys and brain

Nazarenko O.A.[1], Gromova O.A.[1], Grishina T.R.[1], Torshin I.Yu.[2], Demidov V.I.[1], Tomilova I.K.[1], Aleksakhina E.L.[1], Gogoleva I.V.[1]

[1] – FGBOU IN «Ivanovo State Medical Academy» Russian Ministry of Health, Ivanovo
[2] – FGBOU IN «Moscow Institute of Physics and Technology», Dolgoprudny

Resume. The results of experimental investigations of the effects of Laennec on chronic iron overload. Long-term (2 weeks) application of iron sulfate or iron polymaltose complex composition caused chronic iron overload (hemosiderosis). The liver and kidneys is more pronounced when using iron sulfate and a few less – when using polymaltose complex. Laennec decreased the damage of hepatocytes (decreased ALT levels). According to histological analysis application Laennec reduced iron deposition in the liver and kidneys and completely prevented the formation of iron deposits in the brain.

Keywords: hemosiderosis, a disease of iron overload, iron sulfate, polymaltose iron complex, Laennec, insulin-like growth factor 1

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

Введение

Перегрузка железом (гемосидероз) — патофизиологический процесс, связанный с формированием отложений *гемосидерина* (тёмно-жёлтого пигмента на основе оксида железа). Гемосидероз начинается, прежде всего, в тканях печени, а, в последующем, развивается и в других тканях организма (почках, миокарде головном мозге и др.). Гемосидероз стимулирует формирование провоспалительных реакций, интенсификацию оксидативного стресса (в т. ч. перекисного окисления липидов), повреждение паренхимы органов с развитием фиброза и др.

Возможен как первичный, наследственно обусловленный гемосидероз («первичный гемохроматоз», «бронзовый диабет»), так и вторичный, в частности, связанный с длительным бесконтрольным приёмом препаратов железа. Последнее представляет собой серьёзную проблему, т.к. препараты железа используются для лечения железодефицитной анемии — самой распространённой формы анемии.

Лечение гемосидероза является комплексным и включает препараты, связывающие железо (дефероксамин), глюкокортикоиды, витамины, ангио- и гепатопротекторы и т. д. В частности, имеются данные о возможной эффективности при гемосидерозе печени препарата Лаеннек. Лаеннек представляет собой мультикомпонентный высокоочищенный препарат на основе гидролизата плаценты человека и содержит факторы роста (например, фактор роста гепатоцитов, инсулиноподобный), интерлейкины, интерфероны, витамины (B_1, B_2, PP, B_{12}, C), нуклеотиды, аминокислоты (например, цистеин), различные макро- и микроэлементы (фосфор, серу, бром, кобальт, цинк, селен и др.) [1]. В настоящее время данный препарат применяется в гинекологии, косметологии и дерматологии, геронтологии и гепатологии [2–5].

Входящий в состав Лаеннека ИФР-1 способен непосредственно влиять на печёночный гомеостаз железа и способствовать восстановлению нормальной регуляции гомеостаза железа, регенерации печени и выведению гемосидерина из тканей печени [5–7]. При этом, в отличие, например, от хелатирующих препаратов, Лаеннек не только нормализует гомеостаз и транспорт железа, но и восстанавливает функцию гепатоцитов [5].

Целью настоящей работы является изучение эффективности Лаеннека при хронической перегрузке железом при длительном применении препаратов железа с низкой биоусвояемостью (сульфат железа, полимальтозный комплекс железа) в максимальных терапевтических дозах.

Материалы и методы

Опыты были проведены на 30 белых крысах массой 200–250 г, разделённых на 5 групп (по 6 особей в каждой группе). Группа 1 служила интактным контролем. Группы 2, 4 получали сульфат железа (актиферрин) в виде сиропа в дозе 0,6 мл/кг (4,12 мг/кг железа) в желудок через зонд в течение 60 сут. Группы 3, 5 получали полимальтозат железа (мальтофер) в виде сиропа в дозе 0,5 мл/кг (5 мг/кг железа) в желудок через зонд 60 сут. Группам 4 и 5 на протяжении последующих 60 сут вводили Лаеннек (в/б, 0,1 мл/кг).

После окончания эксперимента (день 120) животных всех групп помещали на сутки в обменные клетки для определения выделительной функции почек. В крови определяли активность АЛТ, АСТ, билирубин, общий белок и креатинин, в моче — концентрацию белка (с помощью стандартных наборов). Производили забор печени, почек и головного мозга на гистологическое исследование.

В патогистологической лаборатории наличие отложений железа в исследуемых тканях идентифицировали посредством реакции Перльса («берлинская лазурь»). После краниотомии головной мозг извлекался целиком, печень и почки также эвисцерировались целиком. Все органы фиксировались в 10% растворе нейтрального формалина. Проводка тканей осуществлялась по стандартной схеме (обезвоживание в этиловом спирте, ксилоле) с последующим изготовлением парафиновых блоков.

Изготовленные на санном микротоме «Microm» гистологические срезы толщиной 5–6 мкм окрашивались гематоксилином и эозином. Дубликаты срезов с помощью набора реактивов компании «Биовитрум» окрашены по Перльсу для выявления в тканях трёхвалентного железа, результатом проведённой реакции должно быть образование окрашенной соли – берлинской лазури ($4Fe^{3+} + 3K4Fe(CN)6 = Fe4(Fe(CN)6)3 + 12K^{+}$). Морфологическое исследование гистологических срезов проводилось на анализаторе изображения «BioVision» (Австрия), микрофотографии получены с помощью исследовательского микроскопа «Micros MC 200» и цифровой окулярной камеры DCM 900.

Для анализа полученных данных использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия Хи-квадрат, Т-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни и теста Стьюдента. Использовалась прикладная программа STATISTICA 6.0 и электронные таблицы Microsoft Excel.

Результаты исследования и обсуждение результатов

Результаты биохимического исследования образцов крови и мочи от экспериментальных животных суммированы в табл. 1. Биохимическое исследование крови выявило статистически значимое повышение активности АЛТ в группе крыс, получавших Актиферрин (82±15 Ед/л, интактные — 53±10 Ед/л), что свидетельствует о выраженном гепатотоксическом действии сульфата железа и повреждении гепатоцитов (факт, подтверждённый в результате гистологических исследований, см. далее). Кроме того, приём сульфата железа был также ассоциирован с достоверным понижением уровней креатинина в крови (132±11 мкмоль/л, интактные — 167±8 мкмоль/л, $p = 0,00012$) и с повышением уровней белка в моче (38±31 мг/100 мл, интактные – 15±10 мг/100 мл, $p = 0,051$).

Результаты гистологического исследования показали, что у интактных крыс (группа 1) в головном мозге и почках при проведении реакции Перльса

Таблица 1

Результаты биохимического исследования крови и мочи в исследованных группах (день 120)

Группа Показатель	АЛТ, Ед/л	АСТ, Ед/л	Общий белок крови, г/л	Креатинин крови, мкмоль/л	Суточный диурез, мл	Белок мочи, мг/100 мл
1. Интактные	53±10	131±15	72±6	167±8	3,2±2,8	15±10
2. Актиферрин	82±15**	116±25	68±5	132±11**	4,1±1,6	38±31*
3. Мальтофер	49±21#	121±16	70±6	123±20**	5,6±2,3*	31±30*
4. Актиферрин+Лаеннек	31±10##,**	132±53	71±3	114±32*	8,0±2,2*,#	24±9
5. Мальтофер+Лаеннек	29±6*,§§	127±36	72±2	132±27*	8,4±2,5*,§	20±12

Примечание: * $p < 0,05$ по сравнению с интактной группой; ** $p < 0,005$ по сравнению с интактной группой; # $p < 0,05$ по сравнению с группой получавших Актиферрин (группа 2); ## $p < 0,005$ по сравнению с группой получавших Актиферрин (группа 2); § $p < 0,05$ по сравнению с группой получавших Мальтофер (группа 3); §§ $p < 0,005$ по сравнению с группой получавших Мальтофер (группа 3).

образования берлинской лазури не наблюдалось. Гистологическое исследование ткани печени показало, что во всех наблюдениях цитоплазма гепатоцитов содержала равномерно распределённые мелкодисперсные гранулы берлинской лазури, что, вероятно, объясняется наличием резервного железа в клетках печени в виде ферритина (рис. 1).

При гистологическом анализе эффектов воздействия сульфата железа (крысы, получавшие препарат Актиферрин, группа 2) обнаружены изменения в печени. В условиях полнокровия центральных вен и синусоидов прецентральной зоны печёночных долек гепатоциты находились в состоянии умеренно выраженной гидропической (вакуольной) дистрофии (рис. 2А). Проведение реакции Перльса позволило выявить умеренно выраженную пролиферацию и фагоцитарную активность купферовских клеток (звёздчатых ретикулоэндотелиоцитов); в цитоплазме гепатоцитов, расположенных вблизи центральной вены, обнаруживались кристаллы берлинской лазури (рис. 2Б).

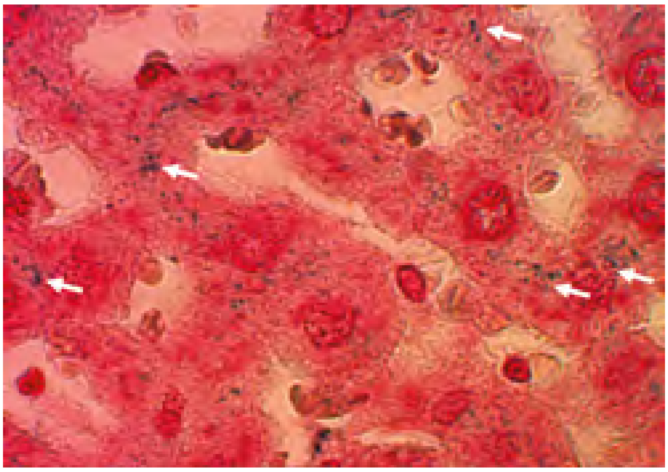


Рис. 1. Мелкодисперсные гранулы берлинской лазури в цитоплазме гепатоцитов прецентральной зоны печёночной дольки

Примечание: Стрелками отмечены мелкодисперсные отложения берлинской лазури, возникшие в результате проведения реакции Перльса. Увеличение × 1200

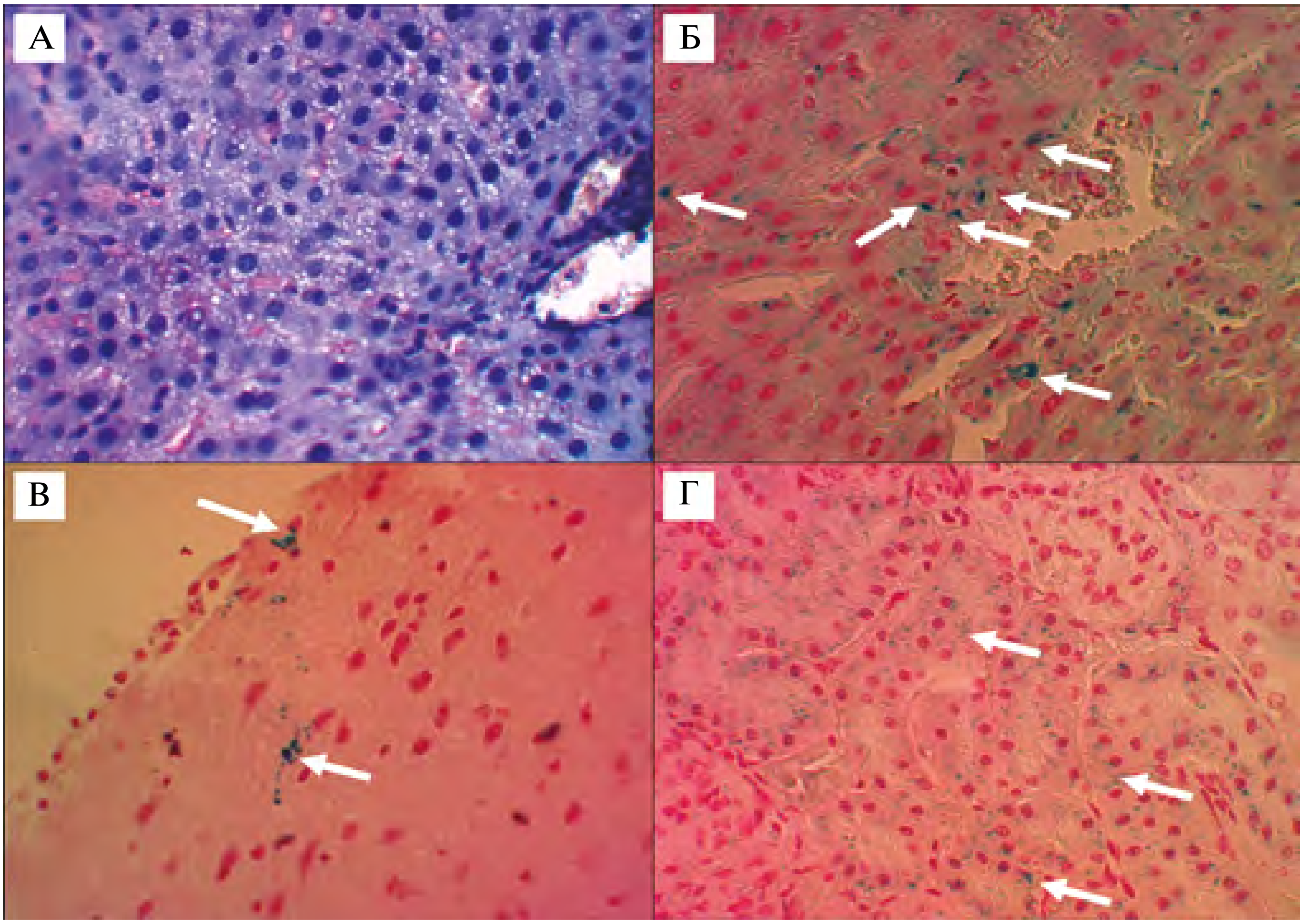


Рис. 2. Патогистологическая картина воздействия сульфата железа на ткани различных органов. Увеличение × 480. (А) Гидропическая дистрофия гепатоцитов на фоне застойного полнокровия. Окраска гематоксилином и эозином. (Б) Пролиферация купферовских клеток, фагоцитирующих железосодержащие продукты. Гранулы берлинской лазури в цитоплазме гепатоцитов центра печёночной дольки. Реакция Перльса. (В). Очаговые скопления гранул берлинской лазури в паравентрикулярной зоне большого полушария головного мозга. Реакция Перльса. (Г). Мелкодисперстные гранулы берлинской лазури в цитоплазме нефроцитов проксимальных извитых канальцев. Реакция Перльса

При исследовании с помощью реакции Перльса тканей головного мозга животных, получавших сульфат железа, в одном наблюдении выявлено очаговое образование берлинской лазури в субэпендимарном отделе (паравентрикулярной зоне) левого полушария большого мозга (рис. 2В). В почках 4 животных реакция Перльса дала положительный результат, который выражался распространённым образованием мелкодисперсных гранул берлинской лазури в цитоплазме нефроцитов проксимальных извитых канальцев (рис. 2Г) и, вероятно, поражениями функциями нефроцитов, на что указывает повышением уровней белка в моче (38±31 мг/100 мл, интактные – 15±10 мг/100 мл, $p = 0{,}051$). Таким образом, длительный приём сульфата железа приводит к накоплению железа (вероятно, в виде гемосидериновых гранул) во всех исследованных тканях – печени, головном мозге, почках, что соответствует классической картине перегрузки организма железом.

При применении полимальтозного комплекса (Мальтофер, группа 3) активность АЛТ не отличалась от показателя интактных животных (см. табл. 1). Однако, как и в случае сульфата железа, уровни креатинина в крови также достоверно снижались (123±20 мкмоль/л, интактные – 167±8 мкмоль/л, $p = 0{,}0009$). У крыс, получавших Мальтофер, также отмечено более высокое значение суточного диуреза (5,6±2,3 мл, интактные – 3,2±2,8 мл, $p = 0{,}05$). Таким образом, сульфат железа, очевидно, намного более гепатотоксичен, чем полимальтозный комплекс железа.

Гистологический анализ тканей посредством реакции Перльса показал, что у крыс, получавших препарат Мальтофер, образования берлинской лазури в ткани головного мозга не наблюдалось. Патогистологические изменения печени у крыс этой группы характеризовались очаговой вакуольной дистрофией гепатоцитов центральной зоны печёночной дольки. Реакция Перльса оказалась положительной и носила очаговый характер в пределах центров печёночных долек, где выявлялись мелкие гранулы берлинской лазури в цитоплазме отдельных гепатоцитов (рис. 3А). Исследование почек показало, что в 3 наблюдениях железосодержащие включения обнаруживались в цитоплазме нефроцитов проксимальных извитых канальцев в виде мелкодисперсных гранул (рис. 3Б). По всей видимости, накопление этих гранул соответствовало частичным поражениям функции почек, т.к. приём Мальтофера был ассоциирован с повышением уровней белка в моче (31±30 мг/100 мл, интактные – 15±10 мг/100 мл, $p = 0{,}055$).

Введение Лаеннека после 60-дневного курса интоксикации железом оказывало гепатопротекторный эффект и было ассоциировано с достоверным снижением уровней активности АЛТ – маркёра повреждения гепатоцитов (см. табл. 1). В случае интоксикации сульфатом железа снижение уровней АЛТ при применении Лаеннека было наиболее выраженным (Актиферрин 82±15 Ед/л, Актиферрин+Лаеннек – 31±10 Ед/л, $p = 5{,}3 \cdot 10\text{-}5$). Совместное применение Лаеннека с полимальтозным комплексом также снижало уровни АЛТ (Мальтофер – 49±21 Ед/л, Мальтофер+Лаеннек – 29±6 Ед/л, $p = 0{,}034$). Интересно отметить, что при использовании Лаеннека достигаемые уровни АЛТ были даже ниже, чем в группе интактных животных (53±10 Ед/л). Иначе говоря, Лаеннек приводил не только к существенному уменьшению повреждения гепатоцитов, возникающего в результате перегрузки печени железом, но и улучшал функционирование гепатоцитов.

Гистологический анализ показал, что у животных, получавших Лаеннек после перегрузки сульфатом железа, поражение печени железом было заметно ниже. На это указывает, в частности, ограниченное накопление берлинской лазури макрофагами и гепатоцитами в пре-

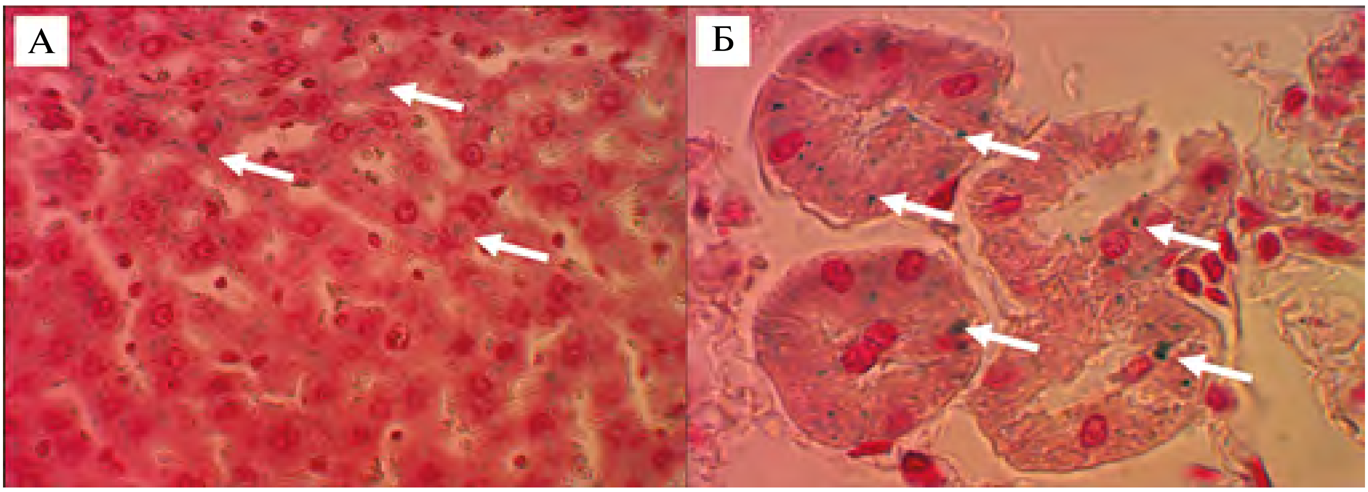


Рис. 3. Эффекты воздействия полимальтозного комплекса на накопление железа в различных тканях. (А) Цитоплазма гепатоцитов содержит мелкие гранулы берлинской лазури. Реакция Перльса. Увеличение × 480. (Б) Отдельные нефроциты содержат мелкие гранулы берлинской лазури. Реакция Перльса. Увеличение × 1200

делах перипортальных зон печёночных долек (рис. 4А). Интенсивность почечной реабсорбции железа в группе «Актиферрин+Лаеннек» была значительно ниже и характеризовалась всего лишь локальным накоплением мелкодисперсных гранул берлинской лазури в нефроцитах извитых канальцев (рис. 4Б). В головном мозге реакция Перльса была отрицательной, т. е. применение Лаеннека полностью предотвращало формирование гемосидероза в головном мозге.

Использование Лаеннека после интоксикации Мальтофером приводило к полному отсутствию прокрашивания берлинской лазурью тканей почек и головного мозга у всех животных группы 5. При исследовании тканей печени отмечался незначительный уровень фагоцитарной активности купферовских клеток, а мелкодисперсные гранулы берлинской лазури обнаруживались в цитоплазме всего лишь отдельных гепатоцитов центральных отделов печёночной дольки (рис. 5).

Таким образом, длительное (в течение 2 мес) применение соединений железа в эксперименте, как в виде сульфата железа (группа 2), так и железа в составе полимальтозного комплекса (группа 3), приводило к возникновению признаков хронической перегрузки железом в форме гемосидероза. Нарушения функции печени и почек были более выражены при использовании сульфата железа и несколько менее выражены при использовании полимальтозного комплекса. Последующее двухмесячное введение Лаеннека уменьшало повреждение печени и отложение железа в печени и почках как в случае интоксикации сульфатом железа (группа 4), так и в случае железа в составе полимальтозного комплекса (группа 5).

Защитный эффект препарата Лаеннек по отношению к клеткам печени, почек и головного мозга при хронической перегрузке железом связан, по всей видимости, с наличием в составе препарата биологически

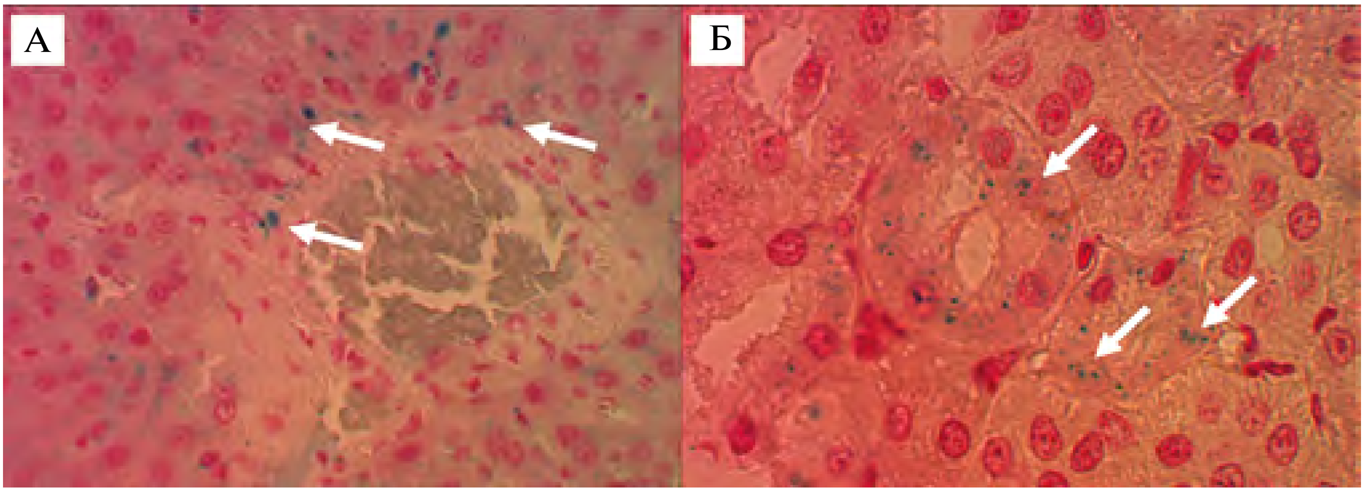


Рис. 4. Гистологический анализ тканей животных, получавших одновременно сульфат железа и Лаеннек. (А) Берлинская лазурь содержится в макрофагах и гепатоцитах перипортальной зоны печёночной дольки. Реакция Перльса. Увеличение × 480. (Б) Железом перегружены лишь отдельные проксимальные извитые канальцы. Реакция Перльса. Увеличение × 1200

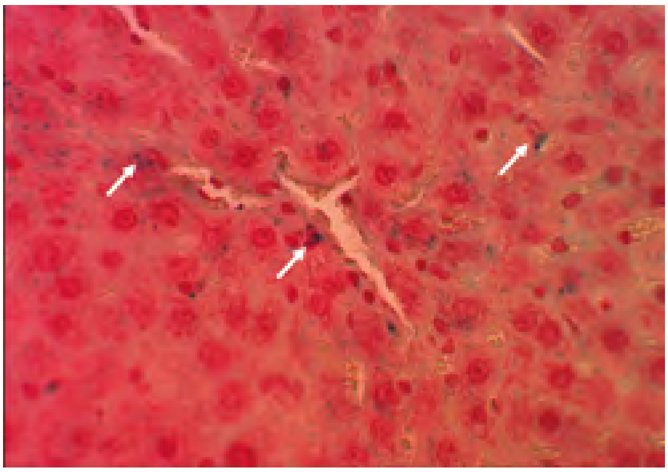


Рис. 5. Исследование тканей печени. В цитоплазме единичных макрофагов и гепатоцитов содержатся гранулы берлинской лазури. Реакция Перльса. Увеличение × 480

активных пептидных фрагментов инсулиноподобного фактора роста-1 (ИФР-1). Также, в составе Лаеннека содержится дегидроэпиандростерон, повышающий секрецию ИФР-1 [8]. ИФР-1 является частичным аналогом гормона инсулина и проявляет анаболический эффект.

ИФР-1 оказывает воздействие непосредственно на молекулярные механизмы гомеостаза железа [5]. Так, ИФР-1 регулирует экспрессию рецепторов трансферрина, осуществляющего перенос ионов железа между поверхностью клетки и эндосомами внутри клетки. Воздействие ИФР-1 на клетки в культуре вызывает быструю транспортировку рецепторов трансферрина из внутриклеточного пространства на поверхность клетки. ИФР-1 увеличивает экспрессию рецепторов трансферрина на поверхности клетки, вследствие чего происходит увеличение скорости экзоцитоза и торможение эндоцитоза ионов железа [6]. Кроме того, ИФР-1 стимулирует процессы регенерации в печени [7]. Поэтому, препарат Лаеннек и может оказывать гепатопротекторное действие при перегрузке организма низкоусвояемыми препаратами на основе железа.

Заключение

Длительное (в течение 2 месяцев) применение препаратов железа внутрь (сульфата железа, полимальтозного комплекса железа) в дозах, близких к максимальным, вызывает хроническую перегрузку железом, что подтверждается результатами биохимических и гистологических исследований. По сравнению с сульфатом железа, полимальтозный комплекс железа проявляет намного более слабую гепатотоксичность. Курсовое применение Лаеннека в течение 60 сут после хронической перегрузки организма железом снижает уровень накопления гемосидерина в печени, почках и головном мозге; способствует стабилизации физиологического обмена железа. Таким образом, после проведения курсов железо-содержащих препаратов (особенно на основе сульфата железа) весьма желательно проведение реабилитационного курса препарата Лаеннек, способствующего снижению гемосидероза и восстановлению функциональной активности клеток печени, почек и головного мозга.

Литература

1. *Торшин И.Ю., Громова О.А., Гилельс А.В., Волков А.Ю., Лиманова О.А., Керимкулова Н.В., Носиков В.В.* Пептидный состав препарата плаценты человека Лаеннек и молекулярные механизмы его воздействия на организм человека. Эстетическая медицина. 2013;12(1): 33–45.

2. *Pal P., Mallick S., Mandal S.K., Das M., Dutta A.K., Datta P.K., Bera R., Bhadra R.* A human placental extract: in vivo and in vitro assessments of its melanocyte growth and pigment-inducing activities. Int J Dermatol. 2002; 41(11): 760–767. doi: 10.1046/j.1365-4362.2002.01524.x

3. *Lee Y.K., Chung H.H., Kang S.B.* Efficacy and safety of human placenta extract in alleviating climacteric symptoms: prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Obstet Gynaecol Res. 2009; 35(6): 1096–1101. doi:10.1111/j.1447-0756.2009.01066.x

4. *Минушкин О.Н., Масловский Л.В., Елизаветина Г.А., Калинин А.В., Дубовая Т.К., Диброва Е.А.* Препарат «Лаеннек» в гастроэнтерологической практике. Кремлевская медицина. Кремлевский вестник. 2011; 3: 88–92.

5. *Громова О.А., Торшин И.Ю., Минушкин О.Н., Диброва Е.А., Каримова И.М. Кустова. Е.В.* Об эффективности и молекулярных механизмах действия препарата «Лаеннек» в лечении патологических состояний печени, связанных с отложением железа в печени. Медицинский журнал «Дело Жизни». 2015; 1(1): 44–51.

6. *Davis R.J., Faucher M., Racaniello L.K., Carruthers A., Czech M.P.* Insulin-like growth factor I and epidermal growth factor regulate the expression of transferrin receptors at the cell surface by distinct mechanisms. J Biol Chem. 1987; 262(27): 13126–13134.

7. *Vera M., Sobrevals L., Zaratiegui M., Martinez L., Palencia B., Rodriguez C.M., Prieto J., Fortes P.* Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. Gene Ther. 2007; 14(3): 203–210. doi:10.1038/sj.gt.3302858

8. *Villareal D.T., Holloszy J.O., Kohrt W.M.* Effects of DHEA replacement on bone mineral density and body composition in elderly women and men. Clin Endocrinol (Oxf). 2000; 53 (5): 561–568. doi:10.1046/j.1365-2265.2000.01131.x

Аскорбат анион — эффективный противострессовый лиганд нового поколения для лития

Остренко К.С.[1], Галочкин В.А.[1], Громова О.А.[2], Расташанский В.В.[3], Торшин И.Ю.[3]

[1] – ФГБНУ «ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных», Калужская обл., г. Боровск
[2] – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново
[3] – ФГБАОУ ВО Московский физико-технический институт, г. Долгопрудный

Резюме. Состояние хронического стресса, вызвано различными экзогенными факторами, всегда сопровождается состоянием возбуждения в центральной нервной системе, нейродегенеративной неупорядоченностью функций организма, нарушениями метаболических и физиологических процессов, иммунными отклонениями. Для повышения стрессоустойчивости необходимо поддержание в организме сбалансированности функций нервной, иммунной, эндокринной, антиоксидантной и монооксигеназной систем. Проведённый анализ данных литературы и результаты собственных исследований авторов дают основание заключить, что повышение стрессоустойчивости может быть достигнуто за счёт снижения уровня свободнорадикального окисления, оптимизации липидно-холестеролового и гормонального статуса при использовании антистрессовых препаратов нового поколения, к которым можно отнести органические соли лития. В отличие от многочисленных синтетических транквилизаторов и седативных веществ, воздействующих на нейрорецепторы, органические соли лития влияют на психическую активность, не затрагивая нейрорецепторный аппарат мозга, и включаются в регуляцию нейросинаптической активности за счёт ингибирования ферментов, ответственных за главный метаболический путь деградации гамма-аминомасляной кислоты – ингибирование ГАМК-декарбоксилазы и ГАМК-аминотрансферазы. Есть основания считать такой способ повышения стрессоустойчивости не только более эффективным, но и более физиологичным. Соединения органической соли лития с аскорбиновой кислотой комплексно воздействуют на нейрогуморальный статус и нормализуют его, при этом эффект от их применения является следствием снижения уровня свободнорадикального окисления, включая липопероксидацию. Ионы лития способствуют поддержанию нормальной возбудимости ЦНС и тонуса кровеносных сосудов за счёт снижения избыточной концентрации норадреналина в ЦНС и нормализации уровня ионов натрия в нервных и мышечных клетках. Комплексный характер нейролептического действия препаратов лития объясняется существованием нескольких путей воздействия ионов лития на физиологические процессы. При достаточной обеспеченности литием чувствительность мозга к дофамину повышается. Ионы лития оказывают влияние на гомеостаз нейротрансмиттеров, повышают синтез нейротрофических факторов и чувствительность клеток нервной системы к их воздействию. Дальнейшее изучение физиологического действия органических солей лития позволит расширить представления о механизме антистрессового действия препаратов этого типа и наметить реальные пути повышения стрессоустойчивости человека и животных, в лечении и профилактике депрессивных и субдепрессивных состояний.

Ключевые слова: литий, аскорбиновая кислот, стрессоустойчивость, нейролептическое действие

Effective antistress ligands lithium new generation

Ostrenko K.S.[1], Galochkin V.A.[1], Gromova O.A.[2], Rastashanskii V.V.[3], Torshin I.Yu.[3]

[1] – FGBNU «Institute of Physiology, Biochemistry and Nutrition of Animals», Kaluga region, Borovsk
[2] – FGBOU IN «Ivanovo State Medical Academy» Russian Ministry of Health, Ivanovo
[3] – FGBOU VPO Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Dolgoprudny

Resume. The state of chronic stress caused by various exogenous factors, is always accompanied by a state of excitation in the Central nervous system, neurodegenerative disorder of body functions, impairment of metabolic and physiological processes, immune abnormalities. To increase stress tolerance it is necessary to maintain the body's balance functions of the nervous, immune, endocrine and antioxidant systems of the monooxygenase. The analysis of literature data and results of own researches of the authors give grounds to conclude that higher stress can be achieved by reducing the level of free radical oxidation, optimization of lipid-cholesterol and hormonal status when using anti-stress drugs of new generation, which include organic lithium salts. Unlike many synthetic tranquilizers and sedatives, acting on the neuroreceptors, organic lithium salts affect mental activity, without affecting neuroreceptors unit of the brain, and are involved in the regulation of neurosynaptic activity through inhibition of enzymes responsible for the main metabolic degradation pathway of gamma-aminobutyric acid – inhibition of GABA-decarboxylase and GABA-aminotransferase. There is reason to believe this method of increasing stress resistance are not only more effective but also more physiological. Compound organic lithium sal with ascorbic acid, combined effect on neurohumoral status and normalize it, with the effect of their use is the result of decrease level of free radical oxidation, including lipid peroxidation. Lithium ions, contribute to the maintenance of normal excitability of Central nervous system and blood vessel tone by reducing the excessive concentration of norepinephrine in the Central nervous system and normalization of the level of sodium ions in nerve and muscle cells. The complex nature of neyrolepticheskih of action of lithium is due to the existence of multiple pathways of exposure to lithium ions on physiological processes. With sufficient supply of lithium sensitivity of the brain to dopamine increases. Lithium ions have an effect on the homeostasis of neurotransmitters, and increase the synthesis of neurotrophic factors and the sensitivity of cells of the nervous system to their effects. Further study of the physiological action of organic salts of lithium will allow to expand representations about the mechanism of antistress action of drugs of this type and to outline ways of enhancing the stress resistance of humans and animals in the treatment and prevention of depressive and subdepressive States.

Keywords: lithium, ascorbic acid, homeostasis, stressoustojchivosti, neurohumoral status, normotonic, stressreducer

Автор, ответственный за переписку:

Остренко Константин Сергеевич — к.б.н., докторант лаборатории Иммунобиотехнологии ФГБНУ «ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных»; 249010, Калужская обл., г. Боровск, п. Институт; тел.: +7 (910) 916-66-58; e-mail: ostrenkoks@gmail.com

Введение

В настоящее время отмечается прогрессивный рост числа психических расстройств, лечение которых часто требует длительной психофармакотерапии. Суммарная популяционная распространённость заболеваний, требующих приёма антипсихотических препаратов, составляет 1–5%. В последнее время большое внимание уделяется аспектам соматического здоровья пациентов, страдающих психическими заболеваниями. В этой группе больных распространённость сахарного диабета, дислипидемии, ожирения, сердечно-сосудистых заболеваний значительно выше, чем в общей популяции, вследствие чего ожидаемая продолжительность жизни пациентов с психическими расстройствами оказывается примерно на 25–30 лет короче, чем у людей, не страдающих психическими расстройствами [1].

Согласно клиническим рекомендациям ADA, все пациенты, длительно получающие терапию нейролептиками, нуждаются в специальном скрининге с периодическим измерением массы тела, гликемии, липидного спектра. При развитии нарушений углеводного, липидного обмена, выраженной прибавке массы тела или декомпенсации уже имеющихся нарушений, показана коррекция психотропной терапии с учётом психического статуса пациента; однако такая коррекция бывает возможной не всегда из-за разной чувствительности одного и того же пациента к разным нейролептикам и разной эффективности нейролептиков при множестве вариантов течения психозов. Плановая смена нейролептика на препарат с менее выраженным влиянием на метаболизм представляется целесообразной только после достижения ремиссии психического расстройства. В период изменения психотропной терапии пациент нуждается в тщательном наблюдении психиатра [2].

Результаты исследований, проведённых в последние десятилетия, показали, что определённого успеха в предотвращении неблагоприятных сдвигов в уровне стрессоустойчивости, неспецифической резистентности и адаптивной способности животных можно добиться при применении биологически активных веществ, способных предотвращать и компенсировать психоэмоциональные расстройства.

В настоящее время в стране и мире существует и разрабатывается большое количество различных нейротропных препаратов, предназначенных для смягчения и нейтрализации последствий стрессовых воздействий на организм человека и животных. Такие соединения в той или иной степени обеспечивают нормализацию ответных реакций на неадекватные раздражители, инициирующие метаболические отклонения, выходящие за пределы естественных биологических колебаний в системах гомеостаза. Однако эти вещества, как правило, представляют собой продукты химического синтеза, т. е. они в большей или меньшей степени являются чужеродными для организма, обладают негативными побочными эффектами и практически все они не могут применяться при производстве экологически чистой продукции. На этом фоне литийсодержащие препараты стоят отдельной группой, поскольку при относительно низкой эффективной дозировке они проявляют высокий стресс-протекторный и нормотимический эффект [3].

Биохимические индикаторы уровня свободнорадикального окисления

Согласно современным представлениям, свободные радикалы (соединения, несущие неспаренный электрон) постоянно образуются во многих метаболических реакциях»; они участвуют в регуляции внутриклеточных и межклеточных взаимоотношений, т. е. играют важную роль в контроле обмена веществ у здорового человека и животного. При этом нарушение окислительно-восстановительного баланса и активация перекисного окисления липидов могут рассматриваться как единый унифицированный патогенетический механизм. В целом, активность свободнорадикального и перекисного окисления липидов физиологически гомеостатирована тканевым балансом антиоксидантов и прооксидантов; при его смещении в сторону прооксидантов возникает состояние, которое называют окислительным стрессом [4].

Тиоловые соединения. Важным регуляторным параметром и одновременно — наиболее информативным диагностическим показателем «буферной ёмкости» антиоксидантной системы в норме и при патологии (а, следовательно, — стрессоустойчивости и неспецифической резистентности) служит показатель содержания в анализируемом биологическом субстрате количества сульфгидрильных и дисульфидных групп (тиоловый коэффициент SH/SS, тиол-дисульфидное соотношение, ТДС). Низко- и высокомолекулярные тиоловые соединения, благодаря их способности быстро, но обратимо окисляться, оказываются наиболее чувствительными к неблагоприятным воздействиям самой различной природы при большинстве инфекционных и неинфекционных патологий. В тиол-дисульфидной системе важная роль принадлежит глутатиону — трипептиду с чрезвычайно разнообразными биохимическими функциями. Восстановленная форма глутатиона служит главным клеточным «сульфгидрильным буфером», поддерживающим в восстановленном состоянии SH-группы во многих белковых структурах и в цистеине.

В организме окислительно-восстановительный баланс определяется донорно-акцепторными взаимоотношениями, а регуляция окислительно-восстановительного метаболизма определяется динамическим равновесием между донорами и акцепторами электронов. Изменение этого баланса в допустимых пределах используется для регуляции множественных частных функций, а выход за эти пределы приводит к патологии и гибели клетки [5]. При большинстве патологий инфекционной и неинфекционной природы, в состоянии окислительного стресса любой этиологии отмечается снижение содержания SH-групп и повышение концентрации SS-групп [6]. Тяжесть заболевания, периоды его обострения, воздействие неблагоприятных факторов внешней среды у здоровых людей и животных коррелируют со степенью снижения тиол-дисульфидного отношения.

Повышение содержания SH-групп и снижение SS-групп связывают с активным извлечением резерва низкомолекулярных тиолов из печени в ответ на истощение редокс-системы крови и с мобилизацией резервов организма на восстановление окисленных тиолов. Тиоловые соединения (как низко-, так и высокомолекулярные), благодаря своей способности быстро, но обратимо окисляться, оказываются наиболее чувствительными к неблагоприятным воздействиям различной природы и интенсивности [7].

Узловым компонентом тиол-дисульфидной системы является глутатион — трипептид гамма-глутамил-цистеинил-глицин со свободной сульфгидрильной группой [8]. В продуктах гидролиза белков он не обнаруживается и синтезируется в клетках для выполнения специфических функций. Многие ферменты в активном центре содержат сульфгидрильные группы, окисление которых влечёт за собой потерю каталитической активности [9].

Интересная специфика глутатиона заключается в том, что никакое его скармливание, никакие внутримышечные или внутривенные инъекции абсолютно не помогают. Он очень плохо транспортируется через клеточные мембраны, а работает только тот восстановленный глутатион, который образовался непосредственно во внутриклеточном пространстве. Следовательно, инициируя и поддерживая реакции, ведущие к сохранению восстановленных тиоловых эквивалентов, мы повышаем адаптивную способность организма и его устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов [10].

Особое место, которое занимают тиолы среди тканевых антиоксидантов, обусловлено следующими их свойствами: 1) исключительно высокая реакционная способность сульфгидрильных групп, благодаря которой тиолы окисляются с феноменально высокой скоростью; 2) обратимость реакции окисления сульфгидрильных групп в дисульфидные, что предполагает возможность наиболее энергетически выгодного поддержания гомеостаза тиоловых антиоксидантов в клетке без активации их биосинтеза; 3) способность тиолов проявлять как антирадикальное, так и антиперекисное действие; 4) гидрофильность тиолов обусловливает их высокое содержание в водной фазе клетки и возможность защиты от окислительного повреждения биологически важных гидрофильных молекул, в том числе гемоглобина. Вместе с тем, присутствие в тиолах неполярных группировок обеспечивает им возможность проявления антиоксидантной активности и в липидной фазе клетки [11].

Малоновый диальдегид. Самым простым и общепризнанным критерием соотношения антиоксидантных и прооксидантных факторов и функциональной активности систем, ответственных за неспецифическую резистентность, является содержание в крови малонового диальдегида. Рост его концентрации характеризует неспособность защитных систем организма справляться с процессами липопероксидации и окисления кислорода по одноэлектронному пути.

Физиолого-биохимические механизмы действия ионов лития

Фармакологическая эффективность препаратов лития определяется их способностью вызывать стабильное повышение концентрации ионов лития в плазме крови и в эритроцитах. Отношение концентрации ионов лития в эритроцитах к концентрации в плазме крови ($Li_{Эр}/Li_{ПК}$) является предиктором ответа на терапию препаратами лития. Значение $Li_{Эр}/Li_{ПК}>0{,}4$ соответствует успешному отклику на терапию литием, а более низкие значения $Li_{Эр}/Li_{ПК}$ – низкой эффективности терапии карбонатом лития [12].

Повышение концентрации ионов лития в крови не только способствует стабилизации настроения пациентов с психоневрологическими расстройствами, но и проявляет нейропротекторное действие [13]. За счёт предотвращения эксайтотоксичности [14] повышение концентраций ионов лития способствует сокращению пенумбры после ишемии головного мозга [15] и предотвращает прогрессирование нейродегенеративной патологии (болезни Гентингтона, Паркинсона, Альцгеймера). Нейропротекторные эффекты лития также важны и для терапии психоневрологических заболеваний, протекающих на фоне органических повреждений.

Применение карбоната лития осложнено существенными побочными эффектами, что связано с его токсичностью при высоких дозах (граммы). В частности, при длительном использовании карбоната лития развиваются гиперпаратиреоз, гипотиреоз и нарушения функции почек у человека и явные признаки отравления у животных [16–19]. Эффективная дозировка карбоната лития составляют 37–40 мг/кг м.т. [20]. Эффективные дозировки аскорбата лития – от 0,5 до 5 мг/кг м.т. [21]. Токсичность ($ЛД_{50}$) карбоната лития – 0,53 г/кг, аскорбата лития – 6,33 г/кг [22]. Эти и другие неблагоприятные последствия приёма карбоната лития стимулируют поиски других форм лития, которые позволили бы избежать неблагоприятных побочных эффектов [23].

Состояние натриево-литиевого противотранспорта, как и действие аскорбиновой кислоты, в определённой степени ассоциировано со сдвигами уровня триглицеридов, холестерина в крови и индекса массы тела. Применение аскорбата лития (препарат Нормотим) в физиологических дозах (1 мг/сут в расчёте на элементный литий, 2–3 мес.) позволило достичь существенного снижения массы у пациентов с избыточной массой тела [24]. Выявлена взаимосвязь между содержанием в крови адипонектина и лептина, интенсивностью Na/Li ПТ в эритроцитах и параметрами метаболизма глюкозы [25], при этом интенсивность Na/Li ПТ была обратно пропорциональна уровню адипонектина [26].

Участие ионов лития в метаболизме глюкозы и других простых сахаров зависит, в частности, от концентрации ионов лития и магния. Например, литий тормозит избыточный глюконеогенез в печени, влияет на активность гликолитических ферментов фосфофруктокиназы и фосфоглюкомутазы в головном мозге, печени и в мышцах [27].

Скорость натриево-литиевого противотранспорта в эритроцитах зависит от степени выраженности инсулинорезистентности и отражает состояние пациентов с инсулинозависимым сахарным диабетом (у пациентов с диабетом Na/Li ПТ > 0,40 ммоль/ч/л). Более того, интенсивность натрий-литиевого противотранспорта является предиктором диабетической нефропатии, повышенных уровней триглицеридов и повышенного артериального давления [28].

Одним из важнейших эффектов воздействия ионов лития на метаболизм простых сахаров является влияние лития на секрецию и функции инсулина. В эксперименте на культуре островковых клеток поджелудочной железы показано, что ионы лития, совместно с инозитолфосфатами, участвуют в регуляции секреции инсулина бэта-клетками. Ионы лития повышают чувствительность к инсулину различных типов клеток (в том числе нейронов). При анализе данных, полученных на пациентах с биполярным расстройством, установлено, что ионы лития стимулируют экспрессию гена ИФР-1 — инсулиноподобного фактора роста [29].

При эссенциальной гипертонии инсулинорезистентность и ожирение ассоциированы с более высоким уровнем Na/Li ПТ. Другими словами, внутриклеточный дефицит лития является фактором риска коморбидности гипертонической болезни, сахарного диабета и избыточной массы тела. Воздействие ионов лития на артериальное давление связано с регуляцией биологической активности ренина, ангиотензина, норадреналина, альдостерона и натрийуретического пептида предсердий. Ионы лития оказывают также влияние на ацетилхолин-опосредованную вазодилатацию посредством воздействия на синтез оксида азота и поддержания баланса вазодилататорных и вазоконстрикторных простагландинов. Приём препаратов лития способствуют защите сосудов и мезенхимы печени при хронической ишемии печени [30].

Ионы лития способствуют улучшению гемодинамики и процессов кроветворения (гемопоэза). В частности, литий повышал выработку фактора роста колоний лейкоцитов (G-CSF). Литий способствует компенсации агранулоцитоза, вызванного приёмом карбамазепина.

Ионы лития воздействуют на процессы воспаления (в том числе в нервной ткани) за счёт модуляции каскада метаболизма арахидоновой кислоты (АРК) и ускорения биотрансформации омега-3-докозагексаеновой кислоты (ДГК) в противовоспалительный докозаноид 17-гидрокси-ДГК – маркер биосинтеза резольвинов и протектинов. В частности, ионы лития способствуют ингибированию циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2), что снижает концентрацию пирогенного простагландина Е2 в головном мозге и в других тканях. [31].

Результаты настоящего систематического исследования показали, что концентрация ионов лития оказывает существенное влияние на гомеостаз ацетилхолина, энкефалинов, катехоламинов (в т. ч. дофамина), серотонина и других нейротрансмиттеров [32]. В частности, ионы лития влияют на активность ацетилхолинэстеразы и секрецию ацетилхолина в коре головного мозга. Показано влияние и однократного, и курсового приёма лития на концентрацию холина и ацетилхолина в мозге. Холин способствует активации транспорта ионов лития внутрь клеток. В процессе лечения карбонатом лития пациентов с биполярным расстройством отмечено накопление холина в эритроцитах (в частности, за счёт восстановления Li/Na ПТ в эритроцитах). Соли лития способствуют также стабилизации мускариновых рецепторов ацетилхолина, влияют на активность протеинкиназы С (в частности, в нейронах гиппокампа) [33].

Важным направлением изучения эффективности препаратов лития является исследование нейротрофического и нейропротекторного действия ионов лития. Экспериментальные и клинические исследования действия неорганических и органических солей лития выявили нейропротективный эффект ионов лития в условиях ишемии мозга и при избыточном апоптозе нейронов гиппокампа в экспериментальной модели менингита. Установлены также нейротрофические эффекты ионов лития, связанные с ростом и развитием нейронов. Обработка нейронов ионами лития повышает экспрессию мозгового нейротрофического фактора BDNF и нейротрофина-3 в головном мозге. Ионы лития активируют TrkB-рецептор нейротрофических факторов в качестве важного шага для нейропротекции против эксайтотоксичности (от англ. *to excite — возбуждать, активировать* — патологический процесс, ведущий к повреждению и гибели нервных клеток под воздействием избытка нейромедиаторов) [15].

Физиологические механизмы действия витамина С

Витамин С. В мировой практике давно известен антистрессовый эффект витамина С. Термин «витамин С» объединяет два родственных соединения, обладающих биологической активностью — L-аскорбиновая (или просто аскорбиновая — $C_6H_8O_6$, лактон-2,3-дегидро-1-гулоновая кислота) и L-дегидроаскорбиновая кислота [34]. Этот эссенциальный водорастворимый антиоксидант в организме человека не синтезируется, а поступает с пищевыми продуктами (преимущественно с овощами и фруктами), а именно в виде окисленной формы — L-дегидроаскорбиновой кислоты (ДАК) [35].

Аскорбиновая кислота играет в организме человека фундаментальную биохимическую и физиологическую роль, она обнаруживается во всех органах и тканях человека, присутствует в различных секретах — в поте, слюне, желчи [36].

Функция витамина С как переносчика водорода в процессе тканевого дыхания является универсальной, как, например, соответствующая функция витамина В2. В некоторых окислительно-восстановительных процессах она играет ведущую роль, например, в системе метгемоглобин — гемоглобин. Отмечено, что для поступления витамина С в клетки важен переход аскорбиновой кислоты в ДАК.

Способность аскорбиновой кислоты легко отдавать электроны соответствующим акцепторам и образовывать ион-радикалы лежит в основе её участия в окислительно-восстановительных реакциях [37].

Аскорбиновая кислота выступает в качестве гидроксилирующего агента при образовании кортикостероидов в гомогенатах надпочечников. Аскорбиновая кислота оказывает влияние на секрецию и действие АКТГ [38].

Особенности антиоксидантного действия вещества определяются в первую очередь их химической природой. В химическом отношении витамин С является простейшим среди витаминов, но наличие в нём ендиольной группы создаёт основу для сложных окислительно-восстановительных процессов с участием стабильных промежуточных радикалов. L-аскорбиновая кислота легко окисляется кислородом воздуха. Первый продукт этой реакции — дегидроаскорбиновая кислота ещё сохраняет антискорбутное действие*, но дальнейшее окисление приводит к необратимому распаду витамина. Механизм всех стадий этого процесса остаётся невыясненным в деталях. Очевидно, что витамин С «работает» не каталитически, а расходуется как другие соединения [39].

Аскорбиновая кислота наряду с токоферолом, биофлаваноидами и ретинолом, является биоантиоксидантом прямого действия. Система антиоксидантной защиты (САЗ) включает биоантиоксиданты (БАО), ингибирующие аутоокисление на стадии инициации. Антирадикальное ингибирование осуществляется цепью: глутатион – аскорбат – токоферол (полифенолы), транспортирующей электроны в составе атомов водорода от пиридиннуклеотидов (НАДН и НАДФН) к свободным радикалам. Это обеспечивает стационарный, крайне низкий уровень свободнорадикальных состояний липидов и биополимеров в клетке. Аскорбиновая кислота является важным компонентом САЗ крови. Радикалы токоферола, биофлавоноидов регенерируются под влиянием аскорбиновой кислоты, находящейся в гидрофильном слое мембран.

До сих пор не определены все ферменты, в состав простетических групп которых входит витамин С. У видов, не синтезирующих витамин С (человек, морская свинка), аскорбиновая кислота оказывает экономизирующее действие в отношении витаминов B_1, B_2, A, E, фолиевой кислоты, пантотеновой кислоты, снижая потребность в этих витаминах. Действие аскорбиновой кислоты тесно связано с действием глутатиона и токоферола. В целом, витамин С вызывает физиологические эффекты, механизм которых ещё не раскрыт в полной мере, но их наличие убедительно продемонстрировано. Самый известный их них — стимуляция иммунной системы [40]. Аскорбиновая кислота необходима для синтеза интерферона и некоторых других цитокинов. Всасываясь в кровь, аскорбиновая кислота быстро попадает в лейкоциты, усиливая их способность к хемотаксису. Интенсивнее всего нейтрофилы поглощают витамин С во время «дыхательного взрыва», необходимого для биосинтеза бактерицидных свободнорадикальных субстанций. После активации фагоцитов содержание в них аскорбиновой кислоты падает. Обогащённые аскорбиновой кислотой нейтрофилы усиливают свою способность распознавать и уничтожать (чаще путём фагоцитоза) собственные патологически изменённые клетки, бактериальные, вирусные и другие чужеродные агенты. В норме концентрация витамина С в нейтрофилах в 150 раз выше, чем в плазме. Витамин С улучшает иммунные реакции за счёт поддержания уровня содержания витамина Е в крови и тканях (витамин Е в физиологических концентрациях также является стимулятором иммунной системы). Усиление пролиферации лимфоцитов наиболее выражено при одновременном назначении витаминов С и Е. Комбинация витаминов С, А и цинка стимулирует синтез антител [41].

Аскорбиновая кислота предотвращает пероксидацию холестерола в составе липопротеинов низкой плотности и тем самым препятствует прогрессированию атеросклероза. Витамин С улучшает способность организма усваивать кальций, способствует выведению токсичных металлов — меди, свинца и ртути. Он способствует активизации цитохрома P_{450} в печени, увеличивая метаболизм и детоксикацию ксенобиотиков. С участием аскорбиновой кислоты происходит метаболизм циклических нуклеотидов, простагландинов и гистамина [42].

Следует особо подчеркнуть, что исследования аскорбата лития в целом позволяют уточнить сформулированную концепцию циркадианной ритмики физиологических процессов у млекопитающих. Она состоит, по меньшей мере, из двух ритмоводителей, тесно взаимосвязанных между собой, что обеспечивает согласование деятельности норадренергической и серотонинергической систем мозга. «Утренние» и «вечерние» осцилляторы температуры и подвижности находятся под модулирующим контролем обеих моноаминергических систем мозга. Повышая свою активность, серотонинергическая система понижает чувствительность циркадных ритмов к свето-темновому циклу и облегчает включение обоих «вечерних» осцилляторов, а норадренергическая система в отношении осциллятора подвижности работает однонаправленно с серотонинергической, но в отношении температурного — реципрокно с нею. «Утренние» осцилляторы ритма подвижности и температуры модулируются обеими моноаминергическими системами однонаправленно, но реципрокно между собой. Согласованная деятельность моноаминергических образований мозга обеспечивает, по-видимому, адаптацию циркадианной системы грызунов к сезонному дрейфу длительности и интенсивности светлого промежутка суток. Срыв моноаминергического контроля может привести к развитию внутреннего или внешнего десинхронозов и нарушению деятельности осцилляторов как генераторов циркадианных колебаний. Такая вероятность увеличивается при скрытом генетическом или приобретенном дефекте моноаминергических систем, например, при длительном стрессе разного генеза, в том числе под влиянием психотравмирующих ситуаций и обстоятельств [43].

В целом, анализ данных литературы и результаты собственных исследований авторов дают основание заключить, что повышение стрессоустойчивости может быть достигнуто за счёт снижения уровня свободнорадикального окисления, оптимизации липидно-холестеролового и гормонального статуса при использовании антистрессового препарата нового поколения, к которым можно отнести аскорбат лития.

В настоящее время постоянно разрабатывается множество препаратов, проявляющих нейротропную активность, предназначенных и для людей, и для животных. Большинство этих веществ — это продукты химического синтеза, которые в большей или меньшей степени являются чужеродными для организма и, в принципе, далеко небезразличны для здоровья животных. Почти все они не могут быть применены при производстве экологически чистой продукции.

Рассмотренные выше препараты на основе органической соли лития можно отнести к адаптогенам нового поколения. В отличие от многочисленных новых транквилизаторов и седативных веществ, у которых механизм действия направлен на взаимодействие с различными нейрорецепторами (ацетилхолиновыми, адренергическими, бензодиазепиновыми, барбитуратными, гистаминовыми, дофаминовыми), у аскорбата лития механизм действия иной. Все синтетические транквилизаторы работают по принципу неконкурентного ингибирования конкретных нейрорецепторов. Органическая соль лития также работают по принципу обратимого конкурентного взаимодействия, но не с нейрорецепторами. Они влияют на психическую активность человека и животного, не затрагивая структуры мозга, их нейрорецепторный аппарат, и включаются в регуляцию нейросинаптической активности за счёт ингибирования ферментов, ответственных за главный метаболический путь деградации гамма-аминомасляной кислоты – ингибирование ГАМК-декарбоксилазы и ГАМК-аминотрансферазы. Есть основания считать такой способ повышения не только более эффективным, но, самое главное, — более физиологичным.

Заключение

Для повышения стрессоустойчивости, у человека и животных необходим целенаправленный контроль интенсивности и направленности метаболизма посредством поддержания сбалансированности функций нервной, иммунной, антиоксидантной и монооксигеназной систем организма. Окислительный метаболический стресс сопровождается усилением состояния возбуждения в центральной нервной системе и нейродегенеративной неупорядоченностью функций организма — нарушениями метаболических и физиологических процессов, иммунными отклонениями. Критический анализ данных литературы и результаты собственных исследований авторов дают основание заключить, что соединения органической соли лития с аскорбиновой кислотой, комплексно воздействуют на нейрогуморальный статус и нормализуют его, а эффект от применения аскорбата лития, судя по имеющимся данным, во многом является следствием снижения интенсивности свободнорадикальных процессов, включая липопероксидацию.

Так же аскорбат-аниону свойственно большее сродство к серотониновым, дофаминовым, бензодиазепиновым, адренергическим рецепторам по сравнению с контрольными молекулами. Более высокое сродство аскорбат-аниона к этим рецепторам, указывает, во-первых, на возможность модуляции активности этих рецепторов аскорбатом лития и, во-вторых, на более интенсивный транспорт аскорбата лития внутрь нейронов и других клеток ЦНС. Более высокое, сродство к рецепторам бензодиазепинов указывает на возможные анксиолитические эффекты аскорбата.

Аскорбат-анион может характеризоваться выраженным противовоспалительным действием, обусловленным модуляцией метаболизма простагландинов и проявлять умеренный антикоагуляционный, антигиперлипидемический и антигипергликемический эффекты, что также способствует нормализации гемодинамики.

В отличие от многочисленных синтетических транквилизаторов и седативных веществ, воздействующих на нейрорецепторы, органические соли лития влияют на психическую активность животного, не затрагивая нейрорецепторный аппарат мозга, и включаются в регуляцию нейросинаптической активности за счёт ингибирования ферментов, ответственных за метаболический путь деградации гамма-аминомасляной кислоты. Есть основания считать такой способ повышения стрессоустойчивости не только более эффективным, но и более физиологичным.

Основные эффекты лития заключаются в том, что у человека и животных литий, поступающий с пищей и водой, поддерживает нормальную возбудимость ЦНС и тонус сосудов путём предотвращения подъёма концентрации норадреналина в ЦНС, а также путём регуляции потоков натрия в нервных и мышечных клетках. При достаточной обеспеченности литием чувствительность мозга к дофамину повышается, что снижает риск возникновения и распространения негативных последствий стресс-факторов.

Проведённый систематический анализ указал на существование ряда параллельных механизмов воздействия лития на организм. Ионы лития, воздействуя на баланс потоков одновалентных и двухвалентных катионов, что, в частности, оказывает влияние на регуляцию артериального давления. Выявленное участие ионов лития в метаболизме простых сахаров, липидов и простагландинов позволяет предположить антиатеросклеротический и антидиабетический эффекты препаратов лития у человека. Ионы лития оказывают влияние на метаболизм и действие нейротрансмиттеров — энкефалинов, допамина, норадреналина, серотонина, ацетилхолина и др. Ионы лития повышают синтез нейротрофических факторов (прежде всего, BDNF) и, кроме того, повышают чувствительность клеток нервной системы к воздействию нейротрофинов.

Литература

1. *Gury C.* Schizophrenia, diabetes mellitus and antipsychotics. Encephale. 2004 Jul-Aug; 30(4): 382–91.
2. *Юнилайнен О.А., Старостина Е.Г.* Влияние антипсихотических препаратов на обмен веществ. Ожирение и метаболизм. 2012; 3: 11–13.
3. *Остренко К.С., Сардарян И.С., Громова О.А., Колоскова Е.М., Пронин А.В., Торшин И.Ю.* Определение острой токсичности и негативного воздействия высоких доз аскорбата лития при длительном применении на крысах линии Вистар. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 4: 43–54.
4. *Майстров В.И., Галочкина В.П., Шевелев Н.С.* Антиоксидантно-антирадикальная и тиол-дисульфидная система племенных бычков под влиянием комплекса биологически активных веществ. Сельскохозяйственная биология. 2006; 2: 64–68.
5. *Морозов С.В., Долгих В.Т., Полуэктов В.Л.* Активация процессов липопероксидации — патогенетический фактор полиорганной дисфункции при остром панкреатите. Бюллетень Сибирского отделения РАМН. 2005; 4: 30–35.
6. *Колесниченко Л.С., Бардымова Т.П., Верлан Н.В., Сергеева Е.С., Сергеева М.П.* Глутатионовая антиоксидантная система у больных сахарным диабетом. Сибирский медицинский журнал. 2009; 1: 31–33.
7. *Likidlilid A., Patchanans N., Poldee S., Peerapatdit T.* Glutathione and glutathione peroxidase in type 1 diabetic patients. J. Med. Assoc. Thai. 2007; 90: 9: 1759–1767.
8. *Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G.* Endocrinology of the stress response. Ann. Rev. Physiol. 2005; 67: 259–284.
9. *Эльгайтаров В.А., Ольховская Л.В.* Уровень общих сульфгидрильных групп и неспецифическая резистентность коз с различными типами трансферрина в зависимости от сезона года. В сб.: Научные труды СНИИЖК. 2005; 1: 136–138.
10. *Черникевич И.П.* Функциональная значимость сульфгидрильных групп тиаминкиназы головного мозга свиньи. Журнал Гродненский Государственный медицинский университет. 2013; 4: 25–28.
11. *Blalock J.E.* The syntax of immune-neuroendocrine communication. Immunol. Today. 1994; 15: 504–511.
12. *Flemenbaum A., Weddige R., Miller J.Jr.* Lithium erythrocyte/plasma ratio as a predictor of response. Am J Psychiatry. 1978; 135 (3): 336–338.
13. *Wilot L.C., Bernardi A., Frozza R.L., Marques A.L., Cimarosti H., Salbego C., Rocha E., Battastini A.M.* Lithium and valproate protect hippocampal slices against ATP-induced cell death. Neurochem Res. 2007; 32 (9): 1539–1546.
14. *Shao L., Young L.T., Wang J.F.* Chronic treatment with mood stabilizers lithium and valproate prevents excitotoxicity by inhibiting oxidative stress in rat cerebral cortical cells. Biol Psychiatry. 2005; 58 (11): 879–884.
15. *Tsai L.K., Wang Z., Munasinghe J., Leng Y., Leeds P., Chuang D.M.* Mesenchymal stem cells primed with valproate and lithium robustly migrate to infarcted regions and facilitate recovery in a stroke model. Stroke. 2011; 42 (10): 2932–2939.
16. *Baumgartner A., Pinna G., Hiedra L., Gaio U., Hessenius C., Campos-Barros A., Eravci M., Prengel H., Thoma R., Meinhold H.* Effects of lithium and carbamazepine on thyroid hormone metabolism in rat brain. Neuropsychopharmacol. 1997; 16: 1: 25–41.
17. *Kandil E., Dackiw A.P., Alabbas H., Abdullah O., Tufaro A.P., Tufano R.P.* A profile of patients with hyperparathyroidism undergoing lithium therapy for affective psychiatric disorders. Head Neck. 2011; 33 (7): 925–927.
18. *Marti J.L, Yang C.S., Carling T., Roman S.A., Sosa J.A., Donovan P., Guoth M.S., Heller K.S., Udelsman R.* Surgical approach and outcomes in patients with lithium-associated hyperparathyroidism. Ann Surg Oncol. 2012; 19 (11): 3465–3474.
19. *Meehan A.D., Humble M.B., Yazarloo P., Jarhult J., Wallin G.* The prevalence of lithium-associated hyperparathyroidism in a large Swedish population attending psychiatric outpatient units J Clin Psychopharmacol. 2015; 35 (3): 279–285.
20. *Преображенский С.Н., Евтинов И.А.* Параметры токсичности препаратов лития для птиц. Ветеринарная медицина. 2004; 4: 7–8.
21. *Остренко К.С. Галочкин В.А., Галочкина В.П.* Разработка теоретических основ и создание антистрессовых препаратов нового поколения. Сельскохозяйственная биология. 2009; 2: 43–54.
22. *Остренко К.С., Громова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С., Пронин А.В., Стельмащук Е.В., Хаспеков Л.Г.* Аскорбат лития улучшает адаптацию к стрессу на моделях *in vitro* и *in vivo*. Фармакодинамика и фармакокинетика. 2016; 3: 13–20.
23. *Tsuji S., Morinobu S., Tanaka K., Kawano K., Yamawaki S.* Lithium, but not valproate, induces the serine/threonine phosphatase activity of protein phosphatase 2A in the rat brain, without affecting its expression. J Neural Transm (Vienna). 2003; 110 (4): 413–425.
24. *Salvagno G.L., Lippi G., Montagnana M., Brocco G., Guidi G.C.* Non-homogeneous separation of triglycerides, gamma-glutamyltransferase, C-reactive protein and lactate dehydrogenase after centrifugation of lithium-heparin tubes. Clin Chem Lab Med. 2008; 46 (8): 1180–1182.
25. *Diaz-Sastre C., Perez-Rodriguez M.M., Cebollada A., Ruiz J.S., Baca-Garcia E., de Leon J.* Cholesterol and lithium levels were correlated but serum HDL and total cholesterol levels were not associated with current mood state in bipolar patients. J. Clin. Psychiatry. 2005; 66: 3: 399–400.
26. *Elias E., Wallenius V., Herlitz H., Bergstrom G.M., Olson F.J., Behre C.J.* Erythrocyte sodium-lithium countertransport activity is inversely correlated to adiponectin, retinol binding protein 4 and body height. Scand J Clin Lab Invest. 2010; 70 (7): 487–491.
27. *Nordenberg J., Kaplansky M., Beery E., Klein S., Beitner R.* Effects of lithium on the activities of phosphofructokinase and phosphoglucomutase and on glucose-1,6-diphosphate levels in rat muscles, brain and liver. Biochem Pharmacol. 1982; 31 (6): 1025–1031.
28. *van Dijk D.J., Erman A., Panski R., Lilos P., Kalter-Leibovici O., Karp M., Boner G.* Sodium-lithium countertransport: a predictor of diabetic nephropathy in Jewish insulin-dependent diabetes mellitus patients of different ethnic origin. Isr J Med Sci. 1996; 32 (2); 105–111.
29. *Squassina A., Costa M., Congiu D., Manchia M., Angius A., Deiana V., Ardau R., Chillotti C., Severino G., Calza S., Del Zompo M.* Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) expression is up-regulated in lymphoblastoid cell lines of lithium responsive bipolar disorder patients. Pharmacol Res. 2013; 73: 1–7.

30. *Bisogni V., Rossitto G., Reghin F., Padrini R., Rossi G.P.* Antihypertensive therapy in patients on chronic lithium treatment for bipolar disorders. J. Hypertens. 2016; 34; 1: 20–28.

31. *Giambelluca M.S., Bertheau-Mailhot G., Laflamme C., Rollet-Labelle E., Servant M.J., Pouliot M.* TNF-alpha expression in neutrophils and its regulation by glycogen synthase kinase-3: a potentiating role for lithium. FASEB J. 2014; 28 (8): 3679–3690.

32. *Гоголева И.В.* Влияние органических солей лития, магния, селена на элементный гомеостаз головного мозга на фоне экспериментальной хронической окклюзии общих сонных артерий: автореф. дисс...канд. мед. наук. М.: 2009; 23.

33. *Hillert M.H., Imran I., Zimmermann M., Lau H., Weinfurter S., Klein J.* Dynamics of hippocampal acetylcholine release during lithium-pilocarpine-induced status epilepticus in rats. J Neurochem. 2014; 131 (1): 42–52.

34. *Vetvicka V., Vetvickova J.* Anti-Stress Action of an Orally-Given Combination of Resveratrol, β-Glucan, and Vitamin C. Molecules. 2014; 19: 13724–13734.

35. *Дэвис М., Остин Дж., Патридж Д.* Витамин С. Химия и биохимия. М.: Мир, 1999; 176.

36. Бабенкова И.В., Теселкин Ю.О., Асейчев А.В. Влияние антиоксидантного препарата на основе биофлавоноидов и витамина С на антиоксидантную активность плазмы крови. Вопросы питания. 1999; 68: 3: 9–11.

37. *Казимирко В.К., Мальцев В.И. и др.* Свободнорадикальное окисление и антиоксидантная терапия. Киев: Морион, 2004; 160.

38. *Спиричев В.Б.* Витамины, витаминоподобные и минеральные вещества. М.: МЦФЭР, 2004; 240.

39. *Новиков Н.А., Растопшина Л.В., Жуков В.М.* Аскорбиновая кислота и её использование в кормлении яичной птицы. Вестник АГАУ. 2012; 12: 83–85.

40. *Гуреева Н.В.* Аскорбиновая кислота как стресс-реализующий фактор и биотест в экологических исследованиях. Вестник Тюменского государственного университета. 2011; 12: 56–61.

41. *Ших Е.В.* Витамины с антиоксидантными свойствами в профилактике и лечении острых респираторных инфекций у детей. ВСП (расшифровать). 2013; 4: 142–147.

42. *Тимирханова Г.А., Абдуллина Г.М., Кулагина И.Г.* Витамин с: классические представления и новые факты о механизмах биологического действия. Вятский медицинский вестник. 2007; 4: 158–161.

43. *Замощина Т.А., Шрейм Х.М., Иванова Е.В.* Влияние лития оксибутирата на ритмическую организацию суточной динамики содержания катионов Na+, K+, Ca+ и Li+ в крови, мозге и моче крыс в период летнего солнцестояния. Бюл. Сиб. мед.: науч.-практ. журн. 2005; 4 (4): 35–42.

Market Access Solutions

Инновационные идеи для развития бизнеса, основанные на клинико-экономической ценности для системы здравоохранения

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

Миссия:

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

Фокус:

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

Наши услуги:

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

Мы всегда рады сотрудничеству:

☎ +7 (495) 664-32-70

info@marketaccess.ru

www.Market-Access-Solutions.ru