

ISSN 2587-7836 (print)
ISSN 2686-8830 (online)

ФАРМАКО КИНЕТИКА и ДИНАМИКА



№ 4.2021



20

Лет работы

230+

Исследований

220+

Публикаций

38

Партнёров

Комплексная оценка для включения в ограничительные перечни



Оценка эффективности и безопасности

- систематический обзор и метаанализ
- сетевой метаанализ



Фармакоэкономический анализ

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



Разработка моделей в MS Excel

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



Подготовка досье на включение в

- перечень ЖНВЛП
- перечень ВЗН
- минимальный ассортимент

Также Центр занимается:

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

По вопросам сотрудничества обращаться к:



Белоусов Дмитрий Юрьевич

Генеральный директор
+ 7 (926) 568-17-35
clininvest@mail.ru



Чеберда Алексей Евгеньевич

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



Афанасьева Елена Владимировна

Финансовый директор
+ 7 (916) 986-04-65
eva88@list.ru



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

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

Зам. главного редактора

Смирнов Валерий Валерьевич

д. фарм. н., Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д. б. н., Москва

Редакционная коллегия

Бондарева

Ирина Борисовна

д. б. н., Москва

Воронина

Татьяна Александровна

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

Громова Ольга Алексеевна

д. м. н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич

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

Ковалёв Георгий Иванович

д. м. н., профессор, Москва

Колик Лариса Геннадьевна

д. б. н., профессор РАН, Москва

Колыванов Геннадий

Борисович, д.б.н., Москва

Мирзоян Рубен Симонович

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

Рудакова Алла Всеволодовна

д. фарм. н., профессор,
Санкт-Петербург

Раменская

Галина Владиславовна

д. фарм. н., профессор, Москва

Сариев Абрек

Куангалиевич

д. м. н., профессор, Москва

Спасов Александр Алексеевич

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

Стародубцев

Алексей Константинович

д. м. н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Алексеевич

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

Тюренков Иван Николаевич

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

Шевченко Роман

Владимирович

к. м. н., Москва

Выпускающая группа

Белоусов

Дмитрий Юрьевич

Ответственный за выпуск
журнала

+7 (910) 449-22-73

e-mail: clinvest@mail.ru

Афанасьева

Елена Владимировна

Генеральный директор
ООО «Издательство ОКИ»

подписка

+7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна

Дизайн и верстка

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 30.12.2021 г. Тираж 400 экз.

Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

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

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

Оформить подписку можно через «Агентство «Книга-Сервис»
или каталог «Пресса России» — подписной индекс E45072

Сайт журнала: www.PharmacoKinetics.ru Журнал зарегистрирован в Федеральной служ-
бе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций
(Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349.
Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет
ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru

www.ClinVest.ru

www.Hospital-Apteka.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия

Качественная клиническая практика

Дайджест «Больничная аптека»

Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.izdat-OkI

Центр Фармакоэкономических Исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

АКТУАЛЬНЫЕ ОБЗОРЫ

Кардиопротекторные средства с биароматической
структурой. Часть 1. Блокаторы кальциевых каналов

Мокрыев Г. В. 3

Новый глипролин ГЗК-111 с нейropsychотропной
активностью

Колясникова К. Н., Аляева А. Г., Кузнецова Е. А. 18

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Изучение влияния блокады VEGF рецепторов
на антиишемическую активность соединения
ГК-2 на модели ишемии задней конечности крыс
Пекельдина Е. С., Мирошкина И. А., Сорокина А. В.,
Сазонова Н. М., Вититнова М. Б.,
Крыжановский С. А. 24

Изучение влияния фабомотизола дигидрохлорида на
морфологическую картину левого желудочка сердца
у крыс с подострым инфарктом миокарда
Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Цорин И. Б.,
Столярук В. Н., Вититнова М. Б.,
Крыжановский С. А., Дурнев А. Д. 29

К возможности выявления синдрома «коронарного
обкрадывания» на мелких лабораторных животных
Цорин И. Б., Симоненко С. А., Вититнова М. Б.,
Крыжановский С. А. 36

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

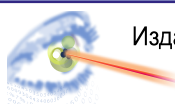
Влияние пираретама и фенотропила на метаболизм
дофамина и серотонина в мозге субпопуляций
мышей CD-1, различающихся по устойчивости
внимания

Сухорукова Н. А., Кудрин В. С., Наркевич В. Б.,
Ковалёв Г. И. 40

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценка влияния нейротоксина МФТП и
противопаркинсонического препарата гомантана
на целостность ДНК в структурах головного мозга
мышей C57BL/6

Анисина Е. А., Жанатаев А. К., Непоклонов А. В.,
Котельникова С. О., Вальдман Е. А. 47



Chief editor

Zherdev Vladimir

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Smirnov Valery

Ph.D., Moscow

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

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

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

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

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Colic Larisa

Ph.D., Professor, Moscow

Kolyanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

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

Rudakova Alla

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

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

Tyurenkov Ivan

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

Shevchenko Roman

Ph.D., Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

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

Afanasyeva Elena

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

Zhuk Elena

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

Signed in print 30.12.2021 r. **Circulation** 400 copies.

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

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

You can subscribe via the «Agency «Book-Service» or the catalog
«Press of Russia» — **Index E45072**

Website: www.PharmacoKinetics.ru The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PINo.FS77-80349. Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

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

Journals

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

WEB-portals

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

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OKI

CURRENT REVIEWS

Cardioprotective agents with biaromatic structure.

Part 1. Calcium channel blockers

Mokrov GV..... 3

Novel glyproline GZK-111 with neuropsychotropic activity

Koliasnikova KN, Alyaeva AG, Kuznetsova EA 18

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Study of the effect of the VEGF receptor blockade
on the antiischemic activity of the compound GK-2
in a rat hind limb ischemia model

Pekeldina ES, Miroshkina IA, Sorokina AV,
Sazonova NM, Vititnova MB,
Kryzhanovskii SA 24

Investigation of the fabomotizol dihydrochloride effect
on the morphological picture of the heart left ventricle
in rats with the subacute myocardial infarction

Miroshkina IA, Sorokina AV, Tsorin IB,
Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kryzhanovsky SA,
Durnev AD..... 29

To the possibility of detecting the "coronary theft"
syndrome in small laboratory animals

Tsorin IB, Simonenko SA, Vititnova MB,
Kryzhanovskii SA..... 36

STUDIES OF THE MECHANISM OF ACTION OF DRUGS

The influence of Piracetam and Phenotropil
on brain dopamine and serotonin metabolism
in CD-1 mice sub-populations, diverging
in attention sustainability

Sukhorukova NA, Kudrin VS, Narkevich VB,
Kovalev GI 40

TOXICOLOGY STUDY

Evaluation of the effect of the neurotoxin MPTP
and the antiparkinsonian drug hemantane
on the DNA integrity in the brain structures
of C57BL/6 mice

Anisina EA, Zhanataev AK, Nepoklonov AV,
Kotelnikova SO, Valdman EA 47

Кардиопротекторные средства с биароматической структурой.

Часть 1. Блокаторы кальциевых каналов

Мокров Г. В.

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

Аннотация. Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) широко распространены, являясь ведущей причиной заболеваемости и смертности во всём мире. Лекарства для лечения ССЗ разрабатываются практически с начала 20 века. К настоящему времени создано большое количество кардиопротекторных средств различных классов. Тем не менее потребность в разработке новых эффективных и безопасных лекарств для лечения сердечно-сосудистых заболеваний сохраняется. Данные литературы свидетельствуют о том, что огромное количество кардиопротекторных средств различных поколений и механизмов соответствует единой обобщённой фармакофорной модели, содержащей два ароматических ядра, связанных линейным линкером. В связи с этим мы выдвинули концепцию создания нового поколения кардиопротекторных препаратов с мультитаргетным механизмом действия в рамках указанной фармакофорной модели. Настоящая работа начинает серию обзоров литературы, посвящённых обобщению известных в настоящее время соединений с кардиопротекторными свойствами в ряду соединений, соответствующих фармакофорной модели биароматических соединений, связанных линейным линкером. В представленной первой части описываются блокаторы кальциевых каналов с кардиопротекторным действием. антиаритмики; кардиопротекторы; блокаторы Ca^{2+} -каналов; биароматические соединения

Ключевые слова: антиаритмики; кардиопротекторы; блокаторы Ca^{2+} -каналов; биароматические соединения

Для цитирования:

Мокров Г. В. Кардиопротекторные средства с биароматической структурой. Часть 1. Блокаторы кальциевых каналов. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):3–17. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-3-17>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 1. Calcium channel blockers

Mokrov GV

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. Cardiovascular diseases (CVD) are widespread and the leading cause of morbidity and mortality worldwide. Drugs for the treatment of CVD have been developed since the beginning of the 20th century. To date, a large number of cardioprotective agents of various classes have been created. Nevertheless, the need for the development and development of new effective and safe drugs for the treatment of cardiovascular diseases remains. Literature data indicate that a huge number of cardioprotective agents of various generations and mechanisms correspond to a single generalized pharmacophore model containing two aromatic nuclei linked by a linear linker. In this regard, we put forward the concept of creating a new generation of cardioprotective drugs with a multi-targeting mechanism of action within the indicated pharmacophore model. This work begins a series of literature reviews devoted to the generalization of currently known compounds with cardioprotective properties in a series of compounds corresponding to the pharmacophore model of linked biaromatic compounds. The first part presented here describes calcium channel blockers with cardioprotective effects.

Keywords: antiarrhythmics; cardioprotectors; Ca^{2+} -channels blockers; biaromatic compounds

For citations:

Mokrov GV. Cardioprotective agents with biaromatic structure. Part 1. Calcium channel blockers. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):3–17. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-3-17>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021

Список сокращений

СНО	—	Клетки яичника Китайского хомячка
HCN	—	Циклически-нуклеотид-управляемый канал, активируемый гиперполяризацией
НЕК	—	Клетки эмбриональной почки человека
hERG	—	Канал, кодируемый геном «human ether-a-go-go-related gene»
IC ₅₀	—	Полумаксимальная ингибирующая концентрация
IC _{aL}	—	Кальциевый ток L-типа
IC _{aT}	—	Кальциевый ток T-типа
I _{Kr}	—	Быстрый калиевый ток задержанного выпрямления
K _v x.y	—	Потенциал-зависимый калиевый канал, изоформа x.y
Nav1.x	—	Потенциал-зависимый натриевый канал, изоформа 1.x

Введение / Introduction

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются основной причиной смерти во всём мире. В 2019 году от ССЗ умерло примерно 17,9 млн человек, что составляет 32 % во всеобщей структуре летальности. Из этих смертей 85 % были вызваны инфарктами и инсультами. Из 17 млн преждевременных смертей (в возрасте до 70 лет) от неинфекционных заболеваний в 2019 году 38 % были вызваны ССЗ [1, 2].

Практически с начала 20 века осуществляется поиск средств для лечения ССЗ. Результатом этих исследований стал огромный ряд препаратов различных классов. Многие из них успешно применяются уже в течение десятилетий и остаются незаменимыми и на сегодняшний день. Тем не менее потребность в конструировании и создании новых средств для лечения ССЗ по-прежнему остаётся. Большое количество

современных кардиозащитных препаратов ограничено в клиническом применении из-за их многочисленных побочных эффектов, таких как потенциальные проаритмические эффекты. Имеется целый ряд препаратов, использовавшихся в клинической практике, которые были отозваны вследствие высоких рисков применения [3].

В современной науке с целью создания новых эффективных и безопасных кардиопротекторных средств происходит постоянный поиск новых мишеней и их лигандов, расширение понимания вовлечённости старых мишеней, поиск соединений, способных более селективно воздействовать на известные мишени, создаются новые концепции конструирования лекарственных средств этого типа.

Одна из современных концепций разработки эффективных и безопасных кардиопротекторных средств заключается в том, что такие препараты должны иметь мультитаргетный механизм действия, обычно с большей аффинностью к одной из мишеней [4–9]. Эта концепция находится в прямом соответствии с «мультитаргетным подходом к кардиопротекции», развиваемым в современном сообществе кардиологов [4, 10, 11].

Действительно, многие стратегии кардиопротекции, основывавшиеся на использовании одноцелевого подхода, потерпели неудачу в клинических условиях, в то время как мультитаргетный подход, направленный на более чем одну молекулярную мишень или внутриклеточные сигнальные пути, заявил себя как более эффективная стратегия лечения ССЗ, особенно в случае наличия сопутствующих заболеваний. «Мультитаргетный эффект» может быть достигнут либо с помощью одной активной молекулы с комплексным механизмом действия [11], либо комбинацией соединений с разными механизмами действия [10].

Использование мультитаргетного подхода особенно актуально при разработке кардиопротекторных средств в группе блокаторов ионных каналов, что в первую очередь связано с тем, что потенциал действия (ПД) кардиомиоцитов является результатом сложного взаимодействия между большим количеством входящих и исходящих ионных токов. В частности, в то время как широко известно, что селективные ингибиторы hERG-каналов имеют высокий риск проаритмического действия, взаимодействие лекарств с входящим ионным током может изменить эффект ингибирования hERG исходящего тока и, следовательно, может ограничить вызванные им негативные эффекты. Действительно, такие мощные ингибиторы hERG каналов, как верапамил, пропафенон, амиодарон или ранолазин, лишены проаритмического действия из-за противодействия ингибированию калиевого тока посредством блокады натриевых и кальциевых каналов или других потенциальных антиаритмических механизмов [12–14].

Среди других подходов к созданию современных кардиопротекторных средств, несомненно, существует

более классическая стратегия разработки лекарств по созданию высокоселективных структур, нацеленных на одну из давно известных или новых мишеней или даже на мутированную форму биомишени. Без сомнения, такой подход также представляется весьма актуальным, поскольку в некоторых случаях позволяет создавать эффективные кардиопротекторы с малыми дозировками и, как следствие, с благоприятным профилем безопасности. Селективный блокатор HCN-каналов ивабрадин [15] или селективный блокатор β_1 -адренорецепторов небиволол [16] можно привести как успешные примеры реализации такого подхода. Стратегия поиска селективных к одной биомишени средств чрезвычайно важна для уточнения структурных требований для соответствующих селективных лигандов. В качестве последующей итерации эта информация может быть успешно использована в мультитаргетном подходе к разработке кардиопротекторных агентов, позволяя более эффективно создавать молекулы с заданным спектром механизмов, один из которых может быть основным.

Анализ современных и ранее используемых клинически эффективных средств для лечения ССЗ, веществ с антиаритмической, противоишемической и другими видами кардиопротекторной активности в доклинических исследованиях, а также молекул, продемонстрировавших свой потенциал *in vitro* по отношению к различным мишеням, вовлечённым в механизмы кардиопротекторного действия, позволяет выделить отдельную обширную группы соединений, соответствующих обобщённой фармакофорной модели, представленной на рис. 1. Эта модель имеет следующую структуру: молекула активного соединения содержит два ароматических цикла (отмечены красным), соединённые линкером (обозначены синим).



Рис. 1. Обобщённая фармакофорная модель биароматических соединений, связанных линейным линкером, обладающих кардиопротекторными свойствами. Буква «X» в линкере указывает на наличие в нём хотя бы одного гетероатома

Fig. 1. Generalized pharmacophore model of linked biaromatic cardioprotective agents. Letter “X” in the linker indicates the presence of at least one heteroatom in it

Длина и структура линкера широко варьируются, при этом в подавляющем большинстве случаев линкер содержит один или несколько гетероатомов. Как правило, количество связей в линкере составляет

около 7–10, но в некоторых случаях оно может варьироваться от 5 до 15. Кроме того, в этом линкере часто присутствуют циклический фрагмент или боковые заместители. Строение ароматических фармакофоров также довольно разнообразно, один из них может быть гетероароматическим. Наиболее распространёнными заместителями в ароматических кольцах являются метоксигруппы (обозначены тёмно-красным цветом), которые широко представлены почти во всех группах кардиопротекторных средств.

Указанное выше структурное сходство широкого спектра соединений с кардиопротекторными свойствами и, как следствие, наличие у них единой обобщённой фармакофорной модели, свидетельствует о структурном сходстве мишеней этих препаратов и их сайтов связывания. Кроме того, этот факт подтверждает современное представление о том, что эффективные и безопасные кардиозащитные препараты должны иметь мультитаргетный механизм действия [4–9].

Для большей наглядности в настоящем обзоре все соединения, соответствующие указанной фармакофорной модели, окрашены аналогичным образом: ароматические группы выделены красным цветом, а связывающий их линкер — синим.

Исторически первым соединением, содержащим две ароматические группы, связанные линкером, с кардиопротекторной активностью можно назвать алкалоид папаверин, выделенный из мака и изучённый Георгом Мерком ещё в 1848 году (рис. 2). В отличие от других алкалоидов мака папаверин не обладал обезболивающим или наркотическим действием. Супрессивные свойства папаверина в отношении сердечной аритмии были впервые описаны в 1929 г. В.В. Закусовым. Он открыл, что инфузия папаверина предотвращает спонтанную фибрилляцию желудочков (ФЖ) в изолированных сердцах кошек [17]. Последующие исследования подтвердили антиаритмические свойства этого препарата, однако он так и не вошёл в клиническую практику в качестве антиаритмического средства из-за непродолжительности своего действия [18].

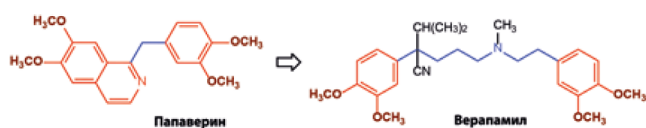


Рис. 2. Структуры папаверина и верапамила
Fig. 2. Structures of papaverine and verapamil

В 1957 году химик из немецкой фармацевтической фирмы Knoll Ferdinand Dengel получил очень активный синтетический аналог папаверина D365, который позже стал известен как верапамил (см. рис. 2). В 1963 году Albrecht Fleckenstein открыл механизм действия верапамила, заключающийся в антагонизме кальция. В 1972 году *Schamroth L, Krikler DM, Garrett C* первыми

связали антиаритмическое действие верапамила, с концепцией блокады кальциевых каналов [19]. Верапамил стал первым членом группы биароматических соединений с линкером (БСЛ), который нашёл широкое применение в качестве кардиопротекторного препарата. Возможно, из-за открытия верапамила и его биологических свойств класс БСЛ получил такое широкое распространение впоследствии, поскольку часто дизайн новых соединений осуществлялся с использованием именно его структуры.

Настоящая работа начинает серию обзоров литературы, посвящённых рассмотрению соединений с кардиопротекторной активностью, имеющих БСЛ-структуру. В первой части этой серии, представленной в настоящем обзоре, описываются блокаторы кальциевых каналов как исторически первые кардиопротекторные средства.

Многие ССЗ связаны с «перегрузкой кальцием» в результате аномально повышенного притока кальция через плазматическую мембрану сердечных и гладкомышечных клеток сосудов. Одними из основных путей, по которому внеклеточный кальций поступает в эти клетки, являются потенциалзависимые кальциевые каналы (ПЗКК). ПЗКК разделены на 6 основных категорий, из которых наиболее важными в сердечно-сосудистой системе являются L-(медленные кальциевые каналы) и T-типы (быстрые кальциевые каналы) [20].

Каналы L- и T-типов обнаружены в миокарде, гладкой мускулатуре сосудов. L-каналы инактивируются медленно, через них в клетку проникает большая часть внеклеточного кальция, T-каналы быстро инактивируются, и ток кальция через них незначителен.

Ток ионов Ca^{2+} через L-каналы формирует плато потенциала действия. В синатриальном узле (САУ) ионы кальция принимают участие в обеспечении функции водителя ритма, в атриовентрикулярном (АВ) соединении регулируют проведение возбуждения. В гладкомышечной ткани каналы L-типа необходимы для электрохимического сопряжения процессов возбуждения и сокращения. Блокирование медленных каналов препятствует поступлению ионов кальция в клетку и угнетает или полностью блокирует сокращение без существенного влияния на ПД.

Каналы T-типа локализованы в пейсмекерных областях сердца (САУ, АВ узел и волокна Пуркинье), где они, как считается, вносят вклад в пейсмекерную активность САУ и АВ-проводимость. Инактивация Ca^{2+} -каналов T-типа приводит к брадикардии и задержке АВ-проводимости, что подчёркивает важность этого канала в обеспечении нормального сердечного ритма [21–23].

Блокаторы кальциевых каналов L-типа Верапамил и его подгруппа

Как уже было указано выше, первым представителем семейства блокаторов кальциевых каналов

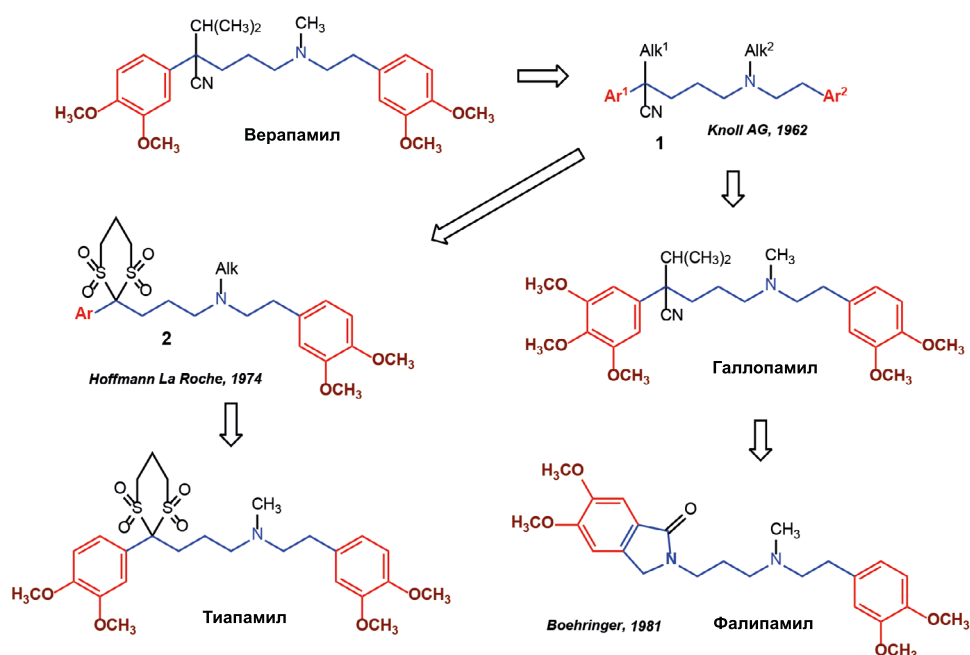


Рис. 3. Разработка производных верапамила
Fig. 3. Development of verapamil derivatives

был верапамил, открытый в Knoll AG (Германия) при синтезе производных папаверина в конце 1950-х — начале 1960-х годов. Это соединение содержит две 3,4-диметоксифенильные группы, связанные N-содержащим линкером длиной 8 связей. Циано-, изопропильная и N-метильная группы присутствуют в линкере в качестве заместителей. С тех пор и по сей день верапамил успешно применяется в кардиологической практике. Верапамил является блокатором кальциевых каналов L-типа, показанным для лечения ишемической болезни сердца, включая вариантную стенокардию (стенокардию Принцметала), нестабильную стенокардию, хроническую стабильную стенокардию, наджелудочковые тахидиаритмии и гипертонию [24]. Среди показаний к применению верапамила, не утверждённых Управлением по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), имеются также следующие: острый коронарный синдром, гипертрофическая кардиомиопатия и идиопатическая желудочковая тахикардия (ЖТ) [25].

Радиолигандный анализ связывания верапамила с различными сайтами связывания кальциевых каналов L-типа (мембраны коры головного мозга крысы) с использованием [^3H]-нитрендипина (дигидропиридиновый сайт), [^3H]-верапамила (фенилалкиламинный сайт) и [^3H]-дилтиазема (бензотиазепиновый сайт) в качестве соответствующих радиолигандов продемонстрировал избирательность верапамила в отношении фенилалкиламинового сайта в сравнении с бензотиазепиновым и особенно с дигидропиридиновыми сайтами ($\text{pK}_i = 8,00$ против $\text{pK}_i = 6,39$ и $\text{pK}_i < 5,00$ (36 %), соответственно) [26].

Несмотря на то, что основным механизмом действия верапамила является его способность блокировать Ca^{2+} каналы L-типа, необходимо отметить, что *in vitro* эксперименты показали сродство этого препарата к другим каналам: $\text{IC}_{50}(\text{Nav}1.5) = 41,5 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50}(\text{hERG}) = 0,37 \mu\text{M}$; $\text{IC}_{50}(\text{Kv}1.7) = 280 \mu\text{M}$. Интересно отметить, что, несмотря на тот факт, что верапамил обладает довольно высокой ингибирующей активностью по отношению к hERG ($\text{IC}_{50} = 143 \text{ nM}$), он не обладает проаритмическим действием [27].

В процессе создания верапамила компанией Knoll AG был получен ряд его аналогов 1, представленных в патенте 1966 г., имеющих такой же азотсодержащий линкер с длиной в 8 связей и различающихся строением ароматических групп и алкильных заместителей в линкере. Все соединения содержали цианогруппу в первом положении линкера (см. рис. 3). Одним из активных аналогов верапамила в этой серии был галлопамил, минимальное отличие которого от верапамила заключалось в наличии дополнительной метоксигруппы в одном из ароматических колец [28]. Как и верапамил, галлопамил имеет высокое сродство к кальциевым каналам L-типа ($\text{IC}_{50} = 17 \text{ nM}$, клетки НЕК-293) [29].

В различных моделях на животных галлопамил заметно снижает ЖТ и полностью предотвращает ФЖ. Он также значительно снижает систолическое и диастолическое АД, измеренное через 5 минут после инъекции, без заметного влияния на частоту сердечных сокращений (ЧСС) [30]. В сравнении с верапамилем, галлопамил с такой же интенсивностью оказывал влияние на миокард, пейсмейкерную

систему и сосуды. Однако количественно галлопамил был примерно в 5–10 раз эффективнее верапамила [31].

У пациентов с нормальными коронарными артериями интракоронарное введение галлопамила вызывало дозозависимую коронарную вазодилатацию. При пероральном или внутривенном введении галлопамил не оказывает значительного влияния на нормальную или умеренно нарушенную функцию левого желудочка у пациентов с ишемической болезнью сердца, а также улучшает расслабление и наполнение левого желудочка у пациентов с острым инфарктом миокарда или гипертрофической кардиомиопатией, что свидетельствует об улучшении диастолической функции левого желудочка. Исследования на пациентах с ишемической болезнью сердца показывают, что пероральное лечение галлопамиллом улучшает регионарную перфузию миокарда и утилизацию жирных кислот [32].

Интересно отметить, что в исследовании *Zucchi R et al.* обнаружен факт ингибирования галлопамиллом связывания рианодина с его низкоаффинным сайтом на рецепторе рианодина [33].

В первой половине 1970-х годов группа исследователей из Hoffman La Roche (Швейцария) запатентовала группу аналогов верапамила **2**, содержащих полностью S окисленный 1,3-дитиановый фрагмент вместо циано- и изопропильных групп прототипа [34]. В серии новых соединений в качестве лидерного соединения был выбран тиапамил, который полностью повторял структуру верапамила за исключением указанной модификации в линкере. Подобно верапамилу, тиапамил дозозависимо ингибировал вызванные кальцием сокращения в изолированных, деполяризованных калием препаратах почечной артерии, коронарной артерии собаки и главной лёгочной артерии кролика [35]. Этот препарат вызывал дозозависимое ингибирование связывания [^3H] дезметоксиверапамила с мембранами тканей сердца свиней ($\text{IC}_{50} = 250 \text{ нМ}$) [36].

Тиапамил имеет сходный с верапамиллом спектр действия, но в отличие от него не обладает отрицательной инотропной активностью. Исследования на животных показали, что тиапамил снижает периферическое сопротивление, увеличивает коронарную перфузию и обладает антиаритмическими свойствами [37].

В клинических исследованиях у пациентов с острым инфарктом миокарда тиапамил при внутривенном введении вызывал гемодинамические изменения, приводящие к поддержанию сердечного выброса и увеличению диастолической функции сердца. Антиаритмические свойства тиапамила, по-видимому, выходят за рамки подавления наджелудочковой тахикардии. Также клинические испытания показали, что внутривенное введение тиапамила эффективно предотвращает преждевременные сокращения желудочков и ЖТ [36]. Несмотря на успешные клинические испытания препарата, на рынок он так и не поступил.

Другим активным производным верапамила является фалипамил, открытый в компании Boehringer (Германия) в начале 1980-х годов в рамках программы по созданию специфических лекарств от брадикардии. Разница между структурами фалипамила и верапамила заключается в замене линкерного фрагмента с циано- и изопропильными заместителями на бутиралактамный цикл, сочленённый с соответствующим ароматическим ядром [38]. У анестезированных животных фалипамил вызывал дозозависимую брадикардию. Сравнение его сердечно-сосудистого действия с действием верапамила у анестезированных кошек показало, что фалипамил в большей степени снижает ЧСС, чем АД левого желудочка, тогда как верапамил более активен в снижении АД и сократимости миокарда, чем в снижении ЧСС [39].

Брадикардический эффект фалипамила является результатом снижения скорости диастолической деполяризации и удлинения длительности потенциала действия. Эти эффекты фалипамила объясняются блокадой медленного кальциевого тока, смешанного натриевого/калиевого пейсмейкерного входящего тока и выходящего тока выпрямителя с задержкой [40].

Клинические исследования показали, что фалипамил может использоваться для нормализации синусового ритма у пациентов с синусовой тахикардией различного происхождения, особенно в области интенсивной терапии, при острой ишемической болезни сердца, при анестезии и хирургических вмешательствах. Тем не менее, дальнейшая разработка фалипамила была прекращена [41].

Гибриды W-7 и верапамила

В 1986 г. American Home Products Corporation получила патенты на группу биароматических соединений **3**, созданных как комбинация блокатора кальциевых каналов верапамила и антагониста кальмодулина W-7 (рис. 4). От верапамила молекулы новой группы получили общую биароматическую структуру, 3,4-диметоксифенэтильный фармакофор и заместители в линкере. От соединения W-7 был использован арилсульфонамидный фармакофор. Соединения предложенной группы обладали антиаритмической активностью на моделях у крыс [42, 43].

Одним из наиболее активных соединений оказалось Wy-47324, которое содержит 3,4-дихлорфенильную группу и линкер с длиной в 10 связей. Это соединение напрямую ингибирует артериальные актинмиозиновые взаимодействия посредством ингибирования фосфорилирования лёгкой цепи миозина в актомиозине. Активность соединения Wy-47324 ($\text{IC}_{50} = 18 \text{ мМ}$) была выражена более, чем у W-7 ($\text{IC}_{50} = 35 \text{ мМ}$). Wy-47324 был более эффективен, чем верапамил, в ингибировании опосредованных рецептором сокращений в интактных коронарных или гладких мышцах аорты свиней. Wy-47324 ($\text{IC}_{50} = 16 \text{ мМ}$) также был более мощным, чем верапамил, ингибитором второй фазы агрегации тромбоцитов человека, индуцированной адреналином [44].

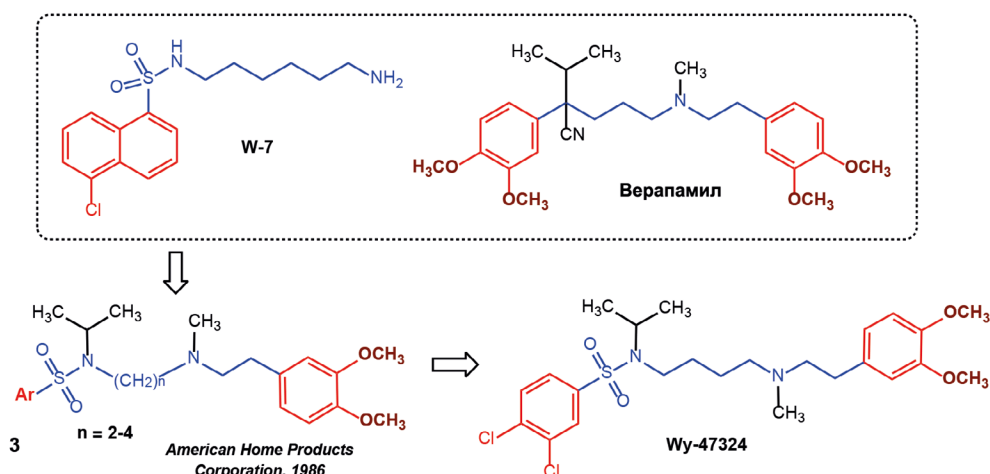


Рис. 4. Конструирование Wy-47324 и его группы
Fig. 4. Design of Wy-47324 and its group

Фантофарон и его аналоги

Группа исследователей из Санофи (Франция) в 1990 году получила патент на группу 4, созданную на основе производных сульфенилбензофурана 5, обладающих коронарной сосудорасширяющей активностью. Соединения группы 4 имеют ароматические и гетероароматические циклы, связанные достаточно длинным линкером, содержащим дополнительное фенильное кольцо и сульфогруппу (рис. 5). Свойства ингибирования транспорта кальция на мембранном уровне у новых соединений были продемонстрированы путём измерения их антагонистического действия в отношении сократительной реакции на индуцированную калием деполяризацию на изолированной аорте крысы. Наилучшие результаты показали соединения, содержащие одну или две метоксигруппы в фенильном

кольце. Тип гетероциклического кольца не оказывает значительного влияния на эффективность молекул, но важным оказалось присутствие изопропильной группы в ортоположении относительно сульфогруппы. Оптимальные значения n и m составляли 2–3 [45].

Среди соединений группы 4 в качестве лидеров были выбраны фантофарон с индолизиновым гетероциклом и сходное соединение SR 33805 с индольным гетероциклом. Фантофарон ингибировал Ca^{2+} -индуцированные сокращения в препаратах K^{+} -деполяризованной аорты с $\text{IC}_{50} = 5,6 \text{ нМ}$, а SR 33805 — с $\text{IC}_{50} = 37,5 \text{ нМ}$ [46]. Фантофарон более эффективно подавлял сократительные реакции в полосках аорты и воротной вены крыс, чем верапамил и дилтиазем. Отрицательное инотропное действие фантофарона в левом предсердии кролика было менее выражено,

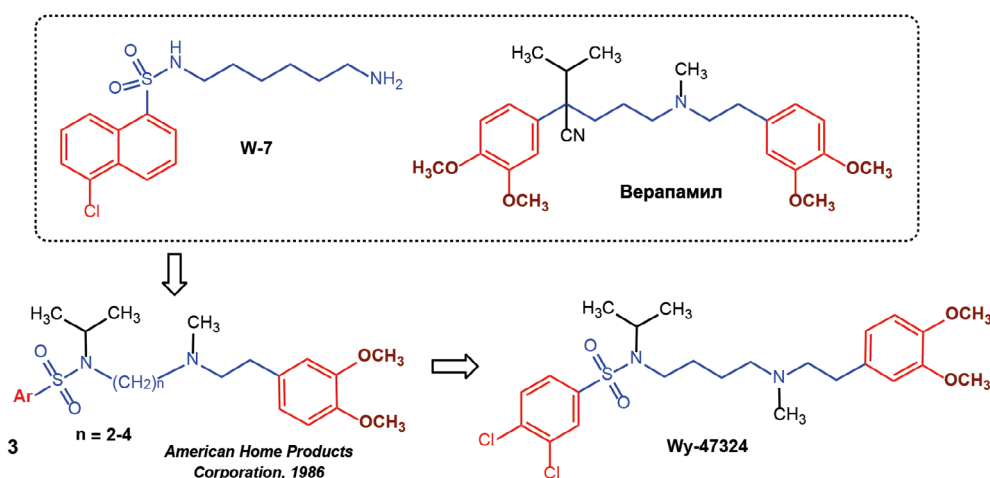


Рис. 5. Конструирование фантофарона и его аналогов
Fig. 5. Creation of fantofarone and analogues

чем у верапамила, но более выражено, чем у дилтиазема. Фантофарон был особенно избирательным в отношении гладких мышц сосудов и лишён сильного отрицательного инотропного действия. Отрицательные хронотропные эффекты на спонтанную частоту сокращений правого предсердия кролика у фантофарона были более выражены, чем у верапамила или дилтиазема [47].

Фантофарон значительно улучшал функциональное восстановление после ишемического инсульта в сердце крысы. У анестезированных собак фантофарон вызывал снижение потребления кислорода миокардом в условиях нормальной, но не повышенной ЧСС [48].

SR 33805 уменьшает перегрузку кальцием, вызванную витамином D₃, и её негативные последствия на сердце крыс (поражения, появляющиеся в ткани, прилегающей к артериям). Кроме того, этот препарат восстанавливает изменения клеток миокарда, вызванных инфарктом, и улучшает конечное систолическое напряжение и фракционное укорочение сердца при инфаркте миокарда *in vivo* [21].

В клинических испытаниях фантофарон был эффективен и безопасен при лечении пациентов с хронической стабильной стенокардией, поскольку препарат продлевал время тренировки без какого-либо влияния на систолическое АД как в покое, так и во время нагрузки [49]. Несмотря на успешную разработку, препарат не применялся в клинической практике.

Гибриды верапамил и дилтиазема

В 1988 г. Yamamoto K с соавт. из Santen Pharmaceutical Co. Ltd. (Япония) описали производные бензотиазолина **6** со свойствами антагонистов кальция (рис. 6). Эти соединения сочетают тиаанилиновый фармакофор дилтиазема, связанный с метоксифенильным кольцом, и биароматическую структуру верапамила. Среди соединений этого ряда лучшими кальций-блокирующими свойствами (блокирование Ca²⁺-индуцированного сокращения K⁺-деполяризованной ткани слепой кишки морской свинки) обладают соединения, содержащие метоксигруппы во втором ароматическом кольце. Лидерное соединение SA2572 с 3,4,5-триметоксифенильным кольцом и линкером с длиной в 9 связей имело IC₅₀ = 1,3×10⁻⁷ М. Соединение SA2572 показало длительный гипотензивный эффект у крыс со спонтанной гипертензией и предотвращало острую лёгочную тромботическую смерть у мышей [50].

Основываясь на этих данных, те же авторы описали группу 3-оксо-2Н-1,4-бензотиазиновых аналогов SA2572 **7**. В этом случае в качестве арильного фармакофора были использованы различные алкоксифенильные группы. В состав линкера был добавлен дополнительный атом кислорода. Все соединения новой серии показали высокую кальций-блокирующую активность (IC₅₀ < 1 μМ; блокирование Ca²⁺-индуцированного сокращения K⁺-деполяризованной ткани слепой кишки

морской свинки). Для дальнейшей разработки было отобрано соединение семотиадил, которое имело самую лучшую кардиоселективность (IC₅₀ = 0,089 μМ). Его энантиомер левосемотиадил был в 7 раз менее активным (IC₅₀ = 0,6 μМ). В качестве ароматического фармакофора в молекуле семотиадила/левосемотиадила была использована бензодиоксолильная группа; длина линкера, соединяющего ароматические группы, составляет 9 связей, как и в соединении SA2572 [51].

Семотиадил и левосемотиадил оказывали антиаритмическое действие у анестезированных крыс, значимо снижая количество общих желудочковых преждевременных сокращений, возникающих во время ишемии, а также частоту реперфузионной фибрилляции желудочков [52]. Большое количество экспериментов *in vivo* указывает на превосходные антиаритмические свойства левосемотиадила при желудочковых аритмиях [21].

Семотиадил проходил клинические исследования в Европе в качестве средства для лечения стенокардии и гипертензии, а также в Японии для лечения аритмий. Левосемотиадил проходил II фазу клинических испытаний для лечения аритмий. Однако эти исследования были прекращены.

В 1995 г. Campiani G с соавт. из Института фармакологии Сиены (Италия) предприняли целенаправленную попытку объединить в одной молекуле различные подклассы известных в то время ингибиторов кальциевых каналов L-типа. В частности, они создали соединение Campiani-10d — гибрид верапамила и известного ингибитора кальциевых каналов дилтиазема, используя пирроло[2,1-с][1,4]бензотиазиновое ядро с аналогичными ароматическими фармакофорами и сходным линкером. Значение IC₅₀ для этого соединения (связывание [³H]-нитрендипина с гомогенатом коры головного мозга крысы) составляло 53 нМ. В функциональных исследованиях (предсердия морской свинки) Campiani-10d был эквивалентен по отрицательному инотропному эффекту дилтиазему [53].

Yamamori T с соавт. из Shionogi & Co., Ltd. (Япония) в том же 1995 году предложили группу производных дилтиазема, содержащих дополнительный ароматический фармакофор, подобный верапамилу, связанный с основной цепью дилтиазема пиперазинсодержащим линкером. Выбранное лидерное соединение S-2150 содержит ортометоксифенильную группу [54].

В изолированной грудной аорте крысы, предварительно обработанной KCl (18 mM), значение IC₅₀ для S-2150 составляло 190 нМ, что было аналогично таковому для дилтиазема. В аорте, предварительно обработанной фенилэфрином (0,3 μМ), значения IC₅₀ для S-2150 и дилтиазема составляли 29 нМ > 10 μМ, соответственно. Помимо блокирования кальциевых каналов, S-2150 обладал блокирующим действием на α₁-адренорецепторы. Также S-2150 показал выраженную антигипертензивную активность у крыс [55].

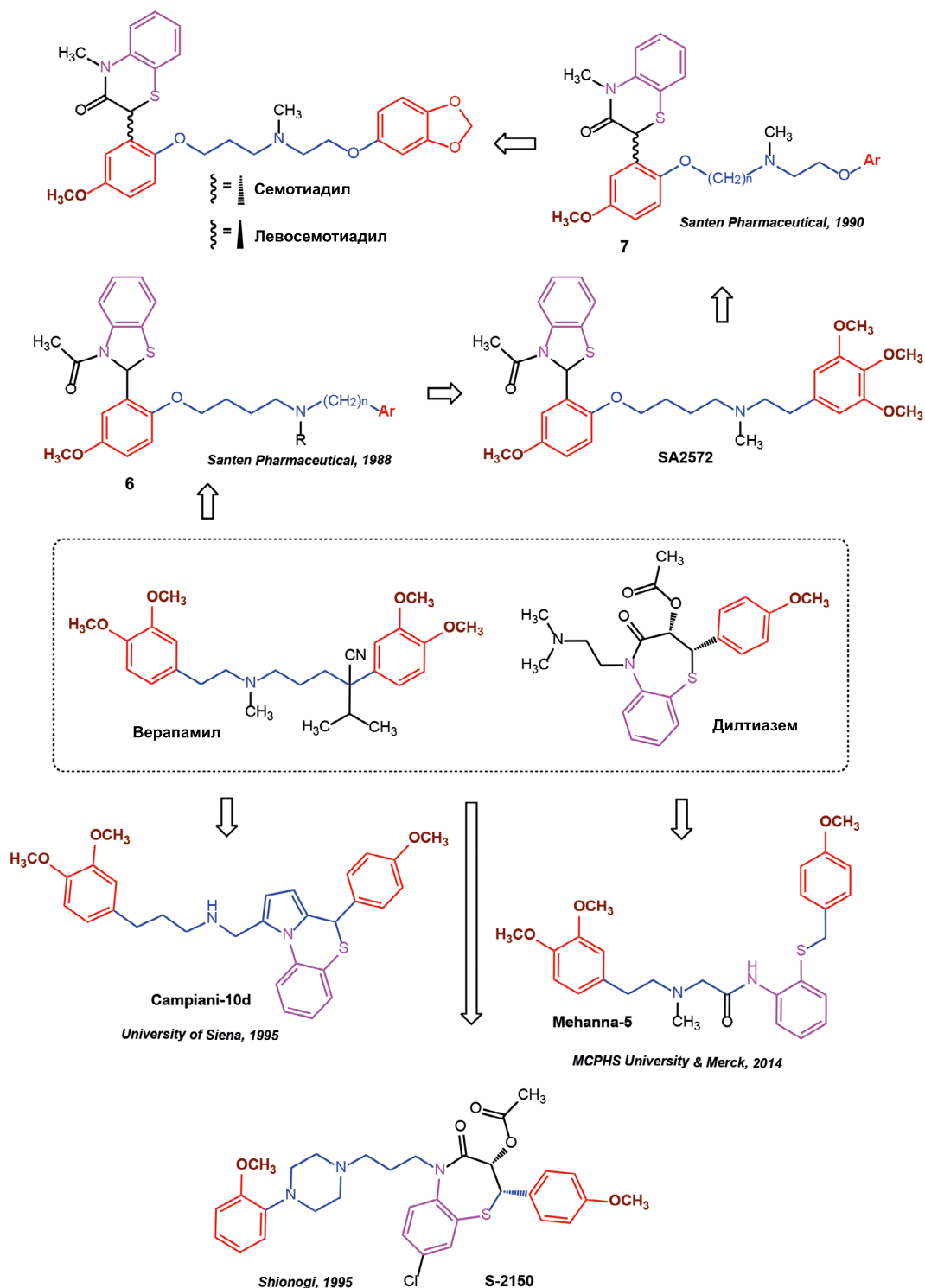


Рис. 6. Дизайн гибридов верапамила и дилтиазема
Fig. 6. Design of diltiazem-verapamil hybrids

У анестезированных крыс S-2150 уменьшал размер инфаркта миокарда в той же степени, что и дилтиазем и верапамил. Частота ЖТ и фибрилляций, вызванных 4-минутной окклюзией с последующей реперфузией коронарной артерии, действием S 2150 была снижена почти до нуля. Кроме того, этот препарат также снижал механическую функцию сердца. По сравнению с дилтиаземом S-2150 был менее кардиодепрессивным, но обладал большим сосудорасширяющим действием [56].

У собак с вскрытой грудной клеткой, находящихся под наркозом, препарат S-2150 снижал деятельность миокарда в большей степени по сравнению с дилтиаземом, в то же время вызывал сопоставимый гипотензивный эффект. S-2150 более оперативно улучшал локальное оглушение миокарда, вызванное ишемией и реперфузией, и, в отличие от дилтиазема, этот эффект не сопровождался энергосберегающим действием в ишемизированном/реперфузированном миокарде [57].

Другой вариант комбинации молекул верапамила и дилтиазема был предложен *Mehanna AS et al.* из Университета MCPHS и компании Merck (США, 2014 г). Эти исследователи оставили ортотиоанилиновый фрагмент дилтиазема, связанный гетероатомами через линкеры с ароматическими фармакофорами своих прототипов. Одно из созданных таким образом соединений — *Mehanna-5* — имело значение IC_{50} (изолированные полоски аорты крысы в богатой калием среде Кребса) $3,72 \mu M$, что оказалось ниже, чем у прототипов верапамила ($0,45 \mu M$) и дилтиазема ($0,26 \mu M$) [58].

АН-1058

В 1999 г. *Hashimoto K с соавт.* из Ajinomoto Co Inc. (Япония) запатентовали группу блокаторов Ca^{2+} каналов L-типа, созданную на основе противоаллергического препарата ципрогептадин, который, как сообщалось, обладал свойством блокировать Ca^{2+} каналы (рис. 7). Наиболее перспективное соединение АН-1058 содержит структуру ципрогептадина, связанную этеновым мостиком со вторым ароматическим фармакофором — метокситрофенильным кольцом [59].

В кардиомиоцитах морских свинок АН-1058 эффективно подавлял токи Ca^{2+} -канала L-типа, не влияя

на другие ионные каналы или токи ионного обмена. В мембранах коры головного мозга крыс АН-1058 связывается преимущественно с Ca^{2+} -каналами L-типа в сайтах связывания фенилалкиламина ($IC_{50} = 27,4 \text{ нМ}$) и бензотиаземина ($IC_{50} = 60,9 \text{ нМ}$). В препаратах изолированных сердец собак АН-1058 оказывал отрицательный инотропный, дромotropный, хронотропный и слабый коронарный вазодилаторный эффект. У собак, которым вводили галотан, это соединение подавляло сократимость желудочков и снижало АД и сердечный выброс. У собак, находящихся в сознании, внутривенное введение АН-1058 снижало систолическое АД и максимальную скорость подъёма давления в левом желудочке, а также дозозависимо увеличивало ЧСС. Препарат не влиял на диастолическое АД, что существенно отличается от сердечно-сосудистых свойств хорошо известных блокаторов Ca^{2+} -каналов верапамила и дилтиазема [60].

Заключение по блокаторам Ca^{2+} -каналов L-типа

Блокаторы Ca^{2+} -каналов L-типа широко представлены среди БСЛ, что, вероятно, обусловлено в некоторой степени строением молекулы верапамила, который является родоначальником этой группы. Обобщённая фармакофорная модель блокаторов тока Ca^{2+} -каналов L-типа содержит следующие элементы (рис. 8). Две ароматические группы в большинстве соединений содержат по две метоксигруппы, хотя встречаются и соединения с другим числом метоксигрупп, с атомами галогена или сопряжёнными кольцами. Линкер, который связывает арильные фармакофоры, имеет длину 8–12 связей и содержит центральный атом азота, обычно замещённый метильной группой, два алифатических мостика и липофильную область, которая может являться объёмной алкильной группой или кольцом. В линкере также присутствует группа с гетероатомом, содержащим пару электронов (CN , SO_2 , CO) вблизи липофильной области. Иногда линкер содержит дополнительное ароматическое кольцо или гетероатом, а липофильная область может быть частью заместителя в одном из ароматических ядер.

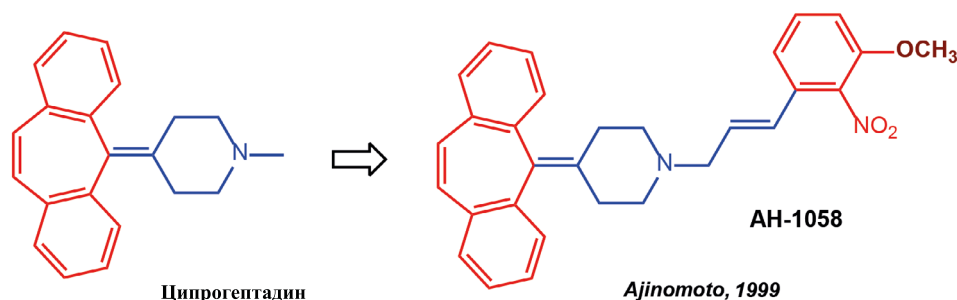


Рис. 7. Дизайн соединения АН-1058
Fig. 7. Design of AN-1058

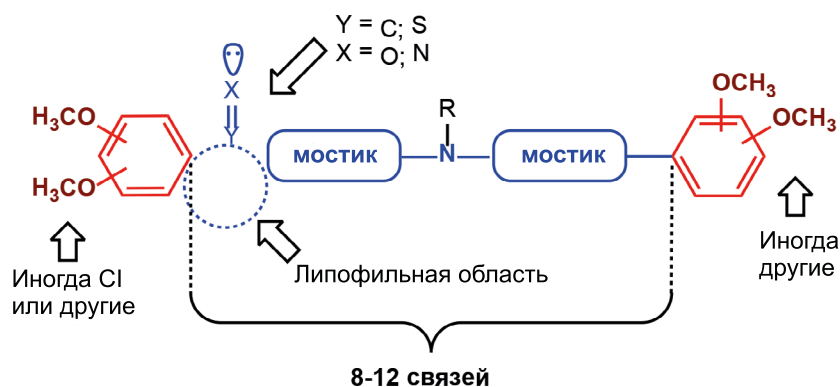


Рис. 8. Модель блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа
Fig. 8. L-type Ca^{2+} current blockers model

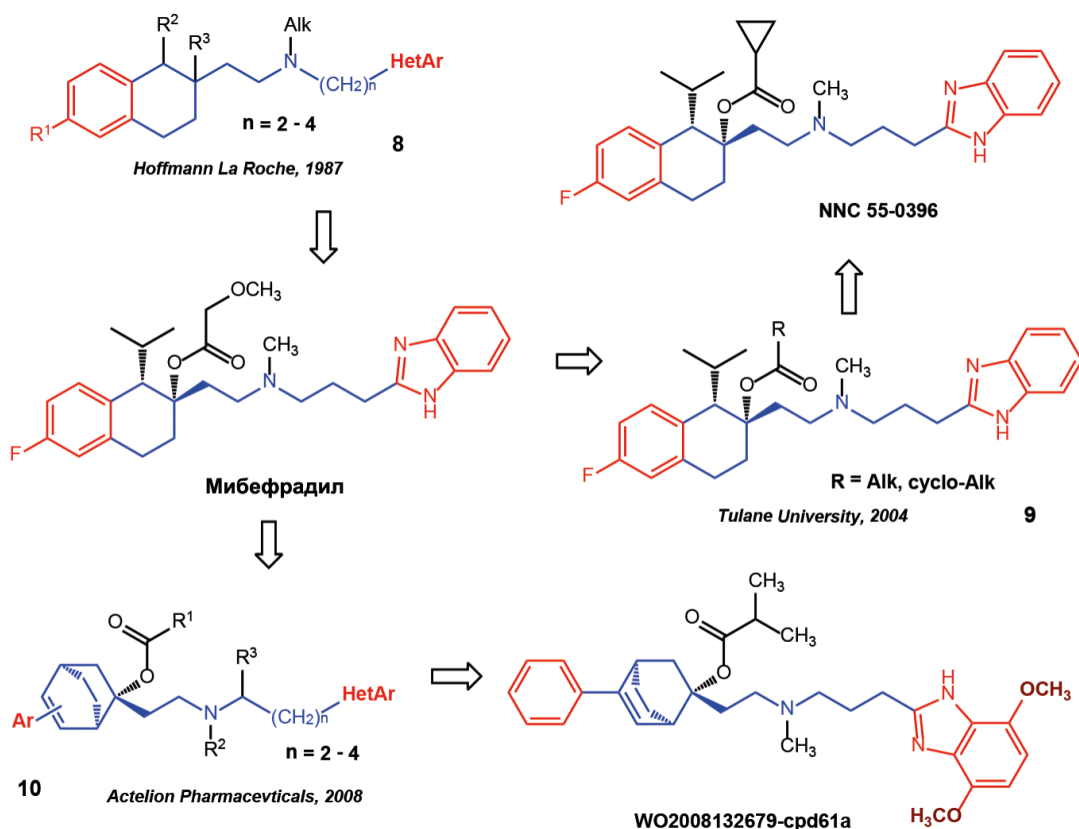


Рис. 9. Мибефрадил и его аналоги
Fig. 9. Development of mibefradil and analogues

Смешанные блокаторы Ca^{2+} -каналов L-типа и T-типа Мибефрадил и аналоги

В 1987 году компания Hoffmann-La Roche Inc. запатентовала группу БСЛ **8**, созданную на основе известных в то время антагонистов кальция. В соединениях новой группы один ароматический фармакофор был присоединён к насыщенному циклогексановому кольцу, а в качестве второго ароматического фармакофора использовали гетероциклические ядра. Структура линкера напоминает таковую для верапамила: замещённый атом азота также расположен в его центральной части, кроме того, линкер содержит аналогичные заместители (рис. 9).

По результатам первичного скрининга (связывание [^3H]-дезметоксиверапамила *in vivo*) в качестве лидерного соединения был выбран мибефрадил ($\text{IC}_{50} = 1,3 \cdot 10^{-7} \text{M}$), содержащий в качестве ароматических групп фторбензол и бензимидазол. В линкере длиной в 9 связей имеется аналогичная верапамилу изопропильная группа и метоксиацетатный фрагмент, напоминающий нитрильную группу [61]. Было установлено, что мибефрадил в три раза эффективнее блокирует I_{CaT} в сравнении I_{CaL} в миоцитах желудочков морских свинок [62] и в 30 раз сильнее в клетках желудочков крыс [63]. В ряде исследований на животных мибефрадил продемонстрировал антиаритмическое и антиангинальное действие при ишемии и реперфузии [21].

Эффективность, безопасность и переносимость мибефрадила при лечении стенокардии была подтверждена в двойных слепых рандомизированных плацебо-контролируемых исследованиях с параллельным дизайном, а также в сравнительных исследованиях с дилтиаземом и амлодипином, обычно назначаемыми при стенокардии [64].

Мибефрадил был одобрен FDA в 1997 году в качестве препарата для лечения гипертензии и стенокардии. Однако уже в 1998 году он был снят с продажи из-за лекарственного взаимодействия, которое привело к различным побочным эффектам. Было показано, что мибефрадил ингибирует цитохром P-4503A4 и 2D6 – ферменты, используемые для метаболизма ряда терапевтических агентов.

В 2004 году Huang L *соавт.* из Tulane University (Луизиана, США) получили группу производных мибефрадила **9**, отличающихся наличием ацетильных заместителей вместо метоксиацетильной группы в циклогексановом кольце. Эта модификация была сделана для предотвращения внутриклеточного гидролиза, присущего мибефрадилу. Наиболее стабильным аналогом оказался NNC 55-0396 с циклопропанкарбоксилатной группой. Значение IC_{50} для NNC 55-0396 по отношению к рекомбинантным каналам $\alpha_1\text{G}$ T-типа ($\text{Cav}3.1$) в клетках эмбриональной почки человека (НЕК-293) составляла $7 \mu\text{M}$, тогда как $100 \mu\text{M}$ NNC 55-0396 не оказывали заметного воздействия на каналы, активируемые

высоким напряжением в клетках INS-1 [65, 66]. Позже было показано, что NNC 55 0396 дозозависимо уменьшал амплитуду K^+ -тока с $\text{IC}_{50} 0,080 \mu\text{M}$ [67]. Matsuda S *с соавт.* продемонстрировали, что NNC 55-0396 способен уменьшать окклюзию средней мозговой артерии и повреждение головного мозга, вызванное реперфузией [68].

Группа производных мибефрадила **10** была запатентована Actelion Pharmaceuticals Ltd. (Швейцария) в 2008 году. В отличие от прототипа ароматическое кольцо в новых соединениях было отделено от циклоалканового фрагмента одной связью, а циклогексановый фрагмент был заменен на бицикло [2.2.2] окт-2-ен. В качестве второго ароматического фармакофора использовались различные гетероциклы. Кроме того, варьировались заместители в линкере и в ацильной группе. Было обнаружено, что соединения новой серии обладают блокирующей активностью в отношении кальциевых каналов как T-, так и L-типа. Одним из наиболее активных соединений являлось WO2008132679-cpd61a с IC_{50} (Ca^{2+} -каналы T-типа) = 571 nM (клетки НЕК-293). Значение IC_{50} для кальциевых каналов L-типа для этого соединения не превышало $10 \mu\text{M}$. WO2008132679-cpd61a содержит диметоксибензимидазольную и фенильную ароматические группы, а ацильная группа представлена изобутилатом; длина линкера составляет 11 связей [69].

Производные прениламина

Поиск новых синтетических анальгетиков в компании Albert-Roussel Pharma GmbH в 1960-х годах привёл к получению производных дифенилпропиламина. Lindner и Kochsiek *с соавт.* сообщили о новом терапевтическом действии одного из представителей этой группы. Было показано, что соединение прениламин является коронарным дилататором пролонгированного действия. Это соединение представляет собой БСЛ с двумя фенильными группами, связанными азотсодержащим линкером из 7 связей с дополнительным фенильным кольцом в его структуре (рис. 10) [70].

Прениламин оказался блокатором медленных Ca^{2+} -каналов. Он блокирует Ca^{2+} -каналы L-типа с $\text{IC}_{50} = 1,25 \mu\text{M}$ (кардиомиоциты морской свинки, пэтч-кламп метод) [71]. Этот препарат использовался для лечения пациентов со стенокардией и был одним из первых в новом классе препаратов, представленных на европейском и неамериканском рынках в начале 1960 года компанией Hoechst AG (Германия). К сожалению, это также первый препарат, который был снят с продажи в 1988 году из-за его способности вызывать серьёзные проаритмии, связанные с удлинением интервала QT [72].

Как прямое производное прениламина Harsanyi *с соавт.* из Chinoin Pharmaceutival and Chemical Works (Венгрия) в 1963 г. синтезировали фендилин, который отличается от прототипа укорочением длины линкера на одну метиленовую группу [70]. IC_{50} фендилина составляла

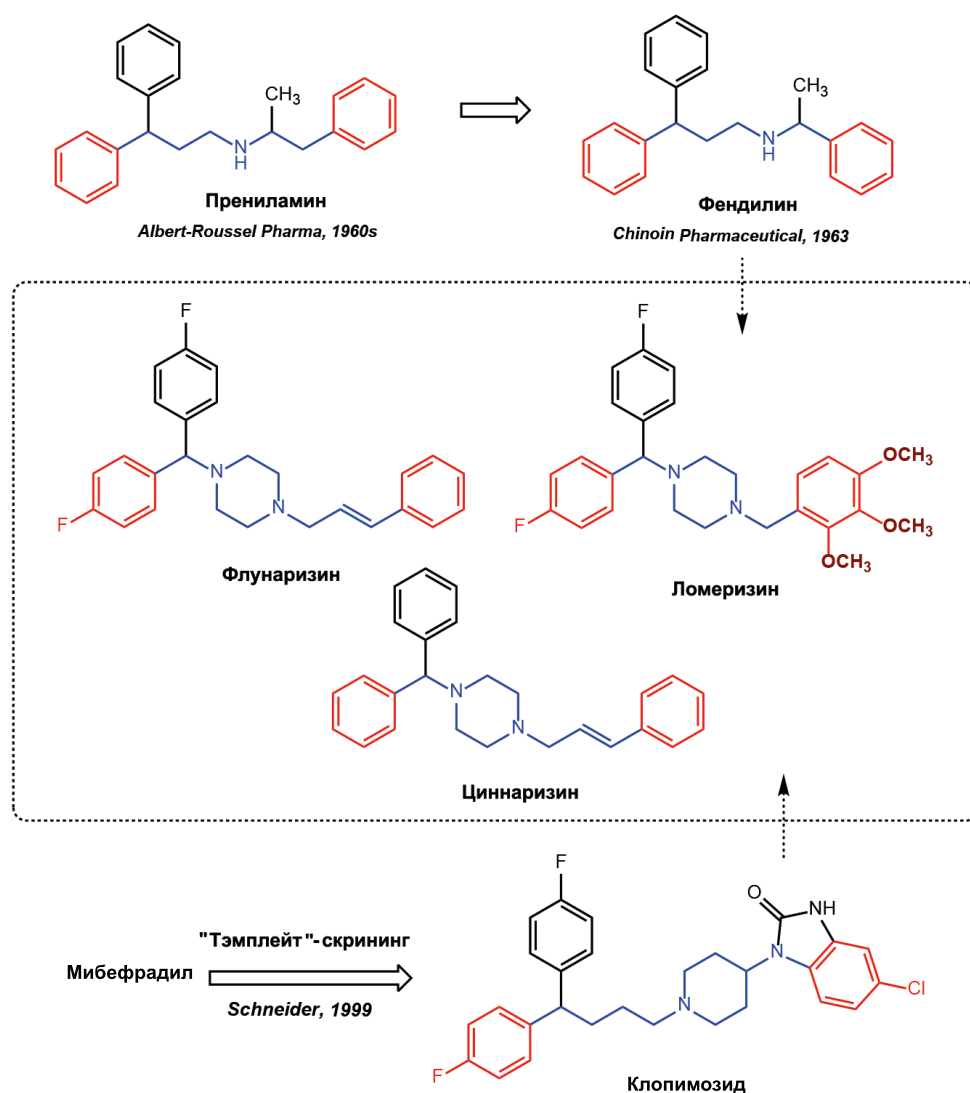


Рис. 10. Разработка производных прениламина
Fig. 10. Development of prenylamine derivatives

17 μM по отношению к Ca^{2+} -каналам L-типа желудочковых миоцитах морских свинок (пэтчкламп метод) [73].

Фендилин применяли как антиангинальное средство для лечения ишемической болезни сердца. Он является типичным антагонистом кальция, а также имеет антагонистическое действие по отношению к кальмодулину. Это выявляется по его ингибированию трансмембранного кальциевого тока, расслаблению гладких мышц, отрицательному инотропизму, кардиопротекции и ингибированию кальмодулинактивируемой киназы лёгкой цепи миозина и фосфодиэстеразы. Антиангинальная и противоишемическая эффективность фендилина была доказана в нескольких плацебо-контролируемых двойных слепых исследованиях. Фендилин одобрен FDA, хотя в настоящее время в клинике не применяется [74, 75].

Прениламин и фендилин послужили базовыми

молекулами для создания на их структурах смешанных блокаторов Ca^{2+} -каналов L-/T-типа.

Schneider G с соавт. (1999, Hoffmann-La Roche) использовали модель, основанную на структуре мибефрадила, для виртуального скрининга соединений из базы данных Roche. С помощью этого метода в качестве мощного блокатора кальциевых каналов T-типа был идентифицирован клопимозид [76]. Кардиопротекторная эффективность клопимозида не исследовалась, однако этот тип активности был подтверждён у ряда его структурных аналогов, таких как флунаризин, ломеризин и циннаризин. Перечисленные препараты из группы дифенилалкиламинов разработаны как аналоги прениламина и фендилина.

Циннаризин — это антигистаминное средство и блокатор кальциевых каналов, разработанный Janssen Pharmaceutica в 1950–1960-х годах. Он подавляет арит-

мию, вызванную ишемией у крыс [77]. Флунаризин был открыт как производное циннаризина в Janssen Pharmaceutica в 1968 году как антагонист кальция. Его использовали для лечения мигрени. Было показано, что флунаризин блокирует кальциевые каналы L- и T-типа со значениями 3,3–11 μM [78].

На животных моделях синдрома удлиненного интервала QT, индуцированного лекарственными средствами, флунаризин подавлял и предотвращал появление зависимого от ранней постдеполяризации TdP (torsade de pointes) и был более эффективным по сравнению с низолдипином, более селективным блокатором I_{CaL} . Антиаритмическая активность флунаризина связана с уменьшением вариабельности продолжительности реполяризации между сердечными сокращениями. У интактных животных, включая собак с хронической АВ-блокадой, флунаризин был эффективен против ЖТ вызванной убаином или катехоламинами задержкой после деполяризации [79]. Интересно отметить, что флунаризин продемонстрировал сильное ингибирующее действие на калиевые каналы, в том числе I_{Kr} ($\text{IC}_{50} = 5,7 \text{ нМ}$; клетки СНО) [80].

Ломеризин является дифенилпиперазиновым блокатором кальциевых каналов L- и T-типа. Он был разработан как потенциальное средство для селективного улучшения глазного или цереброваскулярного кровообращения с минимальными побочными эффектами в

сердечно-сосудистой системе и используется в качестве лекарства от мигрени. Ломеризин избирательно расслабляет гладкомышечные клетки, подавляя опосредованный L-каналами приток Ca^{2+} , тем самым снижая тонус и увеличивая кровоток в сосудах головного мозга [81].

Вывод по смешанным блокаторам Ca^{2+} -каналов L-типа и T-типа

Блокаторы Ca^{2+} -каналов T-типа в меньшей степени представлены в группе кардиопротекторных средств, чем блокаторы Ca^{2+} -каналов L-типа. В ряду БСЛ содержится всего несколько групп соединений, относящихся к блокаторам Ca^{2+} -каналов T-типа, однако все эти вещества чаще всего имеют довольно высокое сродство к Ca^{2+} -каналу L-типа, вероятно, из-за сходства этих биологических мишеней. Этот факт может объяснить соответствие большинства этих БСЛ обобщенной фармакофорной модели для блокаторов Ca^{2+} -каналов L-типа (см. рис. 8). В ряду смешанных блокаторов Ca^{2+} -каналов L- и T-типа в ароматических заместителях реже присутствуют метоксигруппы и чаще используется атом фтора. Согласно результатам «тэмплейт»-скрининга, который выявил клопимозид-подобные блокаторы Ca^{2+} -каналов T-типа, можно предположить, что липофильная область с XY-группой из модели на рис. 8 может имитироваться с помощью дополнительного арильного заместителя.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мокров Григорий Владимирович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN-код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Mokrov Grigory Vladimirovich

Corresponding author

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2617-0334>

SPIN code: 8755-7666

PhD Chemical Sci., Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. World Health Organization: Cardiovascular diseases (CVDs). Published 2021. Accessed October 12, 2021. <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>.
2. Shaito A, Thuan DTB, Phu HT, et al. Herbal Medicine for Cardiovascular Diseases: Efficacy, Mechanisms, and Safety. *Front Pharmacol.* 2020;11:422. DOI: 10.3389/fphar.2020.00422.
3. Nánási PP, Pueyo E, Virág L. Editorial: Perspectives of Antiarrhythmic Drug Therapy: Disappointing Past, Current Efforts, and Faint Hopes. *Front Pharmacol.* 2020;11:1116. DOI:10.3389/fphar.2020.01116.
4. Davidson SM, Ferdinandy P, Andreiadou I, et al. Multitarget Strategies to Reduce Myo-cardial Ischemia/Reperfusion Injury: JACC Review Topic of the Week. *J Am Coll Cardiol.* 2019;73(1):89–99. DOI: 10.1016/J.JACC.2018.09.086.
5. Budillon A, Bruzzese F, Gennaro EDi, Caraglia M. Multiple-Target Drugs: Inhibitors of Heat Shock Protein 90 and of Histone Deacetylase. *Curr Drug Targets.* 2005;6(3):337–351. DOI: 10.2174/1389450053765905.

6. Nattel S, Carlsson L. Innovative approaches to anti-arrhythmic drug therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(12):1034–1049. DOI: 10.1038/nrd2112.
7. Barman M. Proarrhythmic Effects Of Antiarrhythmic Drugs: Case Study Of Flecainide Induced Ventricular Arrhythmias During Treatment Of Atrial Fibrillation. *J Atr Fibrillation.* 2015;8(4):1091. DOI:10.4022/JAFIB.1091.
8. Polak S, Pugsley MK, Stockbridge N, Garnett C, Wiśniowska B. Early Drug Discovery Prediction of Proarrhythmia Potential and Its Covariates. *AAPS J.* 2015;17(4):1025. DOI: 10.1208/S12248-015-9773-1.
9. Song Lv, Zhang Ze-Fu, Hu Liang-Kun, et al. Curcumin, a MultiIon Channel Blocker That Preferentially Blocks Late Na^+ Current and Prevents I/R-Induced Arrhythmias. *Front Physiol.* 2020;11:978. DOI: 10.3389/fphys.2020.00978.
10. Hausenloy DJ, Garcia-Dorado D, Bøtker HE, et al. Novel targets and future strategies for acute cardioprotection: Position Paper of the European Society of Cardiology Working Group on Cellular Biology of the Heart. *Cardiovasc Res.* 2017;113(6):564–585. DOI: 10.1093/cvr/cvx049.
11. Der Sarkissian S, Aceros H, Williams PM, Scalabrini C, Borie M, Noiseux N. Heat shock protein 90 inhibition and multi-target approach to

maximize cardioprotection in ischaemic injury. *Br J Pharmacol*. 2020; 177(15):3378–3388. DOI: 10.1111/BPH.15075.

12. Mirams GR, Cui Y, Sher A, et al. Simulation of multiple ion channel block provides improved early prediction of compounds' clinical torsadogenic risk. *Cardiovasc Res*. 2011;91(1):53–61. DOI:10.1093/cvr/cvr044.

13. Martin RL, McDermott JS, Salmen HJ, Palmatier J, Cox BF, Gintant GA. The utility of hERG and repolarization assays in evaluating delayed cardiac repolarization: influence of multi-channel block. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43(3):369–379. DOI: 10.1097/00005344-200403000-00007.

14. Kodama I, Kamiya K, Toyama J. Cellular electropharmacology of amiodarone. *Cardiovasc Res*. 1997;35(1):13–29. DOI: 10.1016/S0008-6363(97)00114-4.

15. Thollon C, Bedut S, Villeneuve N, et al. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br J Pharmacol*. 2007;150(1):37–46. DOI: 10.1038/SJ.BJP.0706940.

16. Olawi N, Krüger M, Grimm D, Infanger M, Wehland M. Nebivolol in the treatment of arterial hypertension. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2019;125(3):189–201. DOI: 10.1111/BCPT.13248.

17. Sakussov jun WW. Über die Wirkung des Papaverins und des Narkotins auf das Herz. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol*. 1929;144(5):331–340. DOI: 10.1007/BF01865360.

18. Whipple GH. Papaverine as an Antiarrhythmic Agent. *Angiology*. 1977;28(11):737–749. DOI: 10.1177/000331977702801102.

19. Schamroth L, Krikler DM, Garrett C. Immediate effects of intravenous verapamil in cardiac arrhythmias. *Br Med J*. 1972;1(5801):660–662. DOI: 10.1136/bmj.1.5801.660.

20. Bean BP. Classes of calcium channels in vertebrate cells. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:367–384. DOI: 10.1146/ANNUREV.PH.51.030189.002055.

21. Szentandrássy N, Nagy D, Hegyi B, Magyar J, Banyasz T, Nanasi PP. Class IV anti-arrhythmic agents: new compounds using an old strategy. *Curr Pharm Des*. 2015;21(8):977–1010. DOI: 10.2174/1381612820666141029105910.

22. Godfraind T. Discovery and Development of Calcium Channel Blockers. *Front Pharmacol*. 2017;8:286. DOI: 10.3389/FPHAR.2017.00286.

23. Njegie A, Wilson C, Cartwright EJ. Targeting Ca²⁺ Handling Proteins for the Treatment of Heart Failure and Arrhythmias. *Front Physiol*. 2020;11:1068. DOI: 10.3389/FPHYS.2020.01068.

24. Eisenberg MJ, Brox A, Bestawros AN. Calcium channel blockers: an update. *Am J Med*. 2004;116(1):35–43. DOI: 10.1016/J.AMJMED.2003.08.027.

25. Fahie S, Cassagnol M. Verapamil. In: *In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021*. Accessed October 27, 2021. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538495/>

26. Fermini B, Ramirez DS, Sun S, et al. L-type calcium channel antagonism – Translation from *in vitro* to *in vivo*. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2017;84:86–92. DOI: 10.1016/J.VASCN.2016.11.002.

27. Wiśniowska B, Mendyk A, Fijorek K, Glinka A, Polak S. Predictive model for L-type channel inhibition: multichannel block in QT prolongation risk assessment. *J Appl Toxicol*. 2012;32(10):858–866. DOI: 10.1002/JAT.2784.

28. Dengel F. US Patent 3261859. Published online 1966.

29. Balasubramanian B, Imredy JP, Kim D, Penniman J, Lagrutta A, Salata JJ. Optimization of Cav1.2 screening with an automated planar patch clamp platform. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2009;59(2):62–72. DOI: 10.1016/J.VASCN.2009.02.002.

30. Kirchengast M, Hergenröder S. Reperfusion arrhythmias in closed-chest rats: the effect of myocardial noradrenaline depletion and Ca²⁺-antagonism. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1991;18(4):217–221. DOI: 10.1111/J.1440-1681.1991.TB01434.x

31. Fleckenstein-Grün G. Gallopamil: cardiovascular scope of action of a highly specific calcium antagonist. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1992;20 Suppl 7:S1–S10. DOI: 10.1097/00005344-199200207-00002.

32. Brogden RN, Benfield P. Gallopamil. *Drugs*. 2012;47(1):93–115. DOI: 10.2165/00003495-199447010-00007.

33. Zucchi R, Ronca-Testoni S, Yu G, Galbani P, Ronca G, Mariani M. Interaction between gallopamil and cardiac ryanodine receptors. *Br J Pharmacol*. 1995;114(1):85–92. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1995.tb14909.x.

34. Ramuz H. DE Patent 2460593 A1. Published online 1975. Accessed October 27, 2021. <https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/004429892/publication/DE2460593A1?q=DE2460593A1>

35. Eigenmann R, Blaber L, Nakamura K, Thorens S, Haeusler G. Tiapamil, a new calcium antagonist. I. Demonstration of calcium antagonistic activity and related studies. *Arzneimittelforschung*. 1981;31(9):1393–1401. Accessed October 27, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7197945/>

36. Hoick M, Osterrieder W. Tiapamil. *Cardiovasc Drug Rev*. 1987;5(1):77–94. DOI: 10.1111/j.1527-3466.1987.tb00503.x.

37. Khurmi NS, Robinson CW, O'Hara MJ, Raftery EB. Tiapamil, a new calcium channel blocking agent for the treatment of effort induced chronic stable angina pectoris. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986;30(4):387–392. DOI: 10.1007/BF00607949.

38. Reiffen M, Eberlein W, Mueller P, et al. Specific bradycardic agents. 1. Chemistry, pharmacology, and structure-activity relationships of substituted benzazepinones, a new class of compounds exerting antiischemic properties. *J Med Chem*. 1990;33(5):1496–1504. DOI: 10.1021/JM00167A033.

39. Dämmgen J, Kadatz R, Diederer W. Cardiovascular actions of 5,6-dimethoxy-2-(3-[(alpha-(3,4-dimethoxy) phenylethyl)-methylamino] propyl) phthalimidine (AQ-A 39), a specific bradycardic agent. *Arzneimittelforschung*. 1981;31(4):666–670. Accessed October 27, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7195712/>

40. Boucher M, Chassaing C, Chapuy E. Cardiac electrophysiological effects of falipamil in the conscious dog: comparison with alinidine. *Eur J Pharmacol*. 1996;306(1-3):93–98. DOI: 10.1016/0014-2999(96)00178-1.

41. Kobinger W, Lillie C. Falipamil (AQ-A 39) and UL-FS 49. *Cardiovasc Drug Rev*. 1988;6(1):35–53. DOI: 10.1111/j.1527-3466.1988.tb00371.x.

42. Buzby GC. UK Patent 2159815. Published online 1985. Accessed October 27, 2021. <https://patentimages.storage.googleapis.com/86/00/ae/8838fcdca5d89/GB2159815A.pdf>

43. Buzby GC. US Patent 4587360. Published online 1986. Accessed October 27, 2021. <https://patentimages.storage.googleapis.com/77/f9/99/8b097c1ad12b48/US4587360.pdf>

44. Silver PJ, Fenichel R, Wendt RL. Structural variants of verapamil and W-7 with combined Ca²⁺ entry blockade/myosin phosphorylation inhibitory mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1988;11(3):299–307. DOI: 10.1097/00005344-198803000-00006.

45. Gubin J, Chatelain P, Descamps M, et al. US Patent 4957925. Published online 1990.

46. Gubin J, Vogelaer H de, Inion H, et al. Novel heterocyclic analogs of the new potent class of calcium entry blockers: 1-[[4-(aminoalkoxy)phenyl] sulfonyl]indolizines. *J Med Chem*. 1993;36(10):1425–1433. DOI: 10.1021/jm00062a015. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1700816/>

47. Polster P, Christophe B, Van Damme M, Houlliche A, Chatelain P. SR 33557, a novel calcium entry blocker. I. In vitro isolated tissue studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990;255(2):593–599. Accessed October 27, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1700816/>

48. Hodeige D, Chatelain P, Manning A. Fantofarone (SR 33557): Effects on Myocardial Oxygen Consumption and Coronary Blood Flow. *Pharmacology*. 1994;48(1):49–55. DOI: 10.1159/000139161.

49. Glasser SP, Singh SN, Humen DP. Safety and Efficacy of Monotherapy with Fantofarone, a Novel Calcium Channel Antagonist, in Patients with Chronic Stable Angina Pectoris. *J Clin Pharmacol*. 1997;37(1):53–57. DOI: 10.1177/009127009703700109.

50. Yamamoto K, Fujita M, Tabashi K, et al. Novel calcium antagonists. Synthesis and structure-activity relationship studies of benzothiazoline derivatives. *J Med Chem*. 1988;31(5):919–930. DOI: 10.1021/jm00400a006.

51. Fujita M, Ito S, Ota A, et al. Synthesis and calcium ion antagonistic activity of 2-[2-[(aminoalkyl)oxy]-5-methoxyphenyl]-3,4-dihydro-4-methyl-3-oxo-2H-1,4-benzothiazines. *J Med Chem*. 1990;33(7):1898–1905. DOI: 10.1021/jm00169a011.

52. Fukuchi M, Uematsu T, Nagashima S, Nakashima M. Antiarrhythmic effects of a benzothiazine derivative (SD-3211) and its stereoisomer (SA3212) in anaesthetized rats and isolated perfused rat hearts compared with bepridil. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1990;341(6):557–564. DOI: 10.1007/BF00171737.

53. Campiani G, Garofalo A, Fiorini I, et al. Pyrrolo[2,1-c][1,4] benzothiazines: Synthesis, Structure-Activity Relationships, Molecular Modeling Studies, and Cardiovascular Activity. *J Med Chem*. 1995;38(22):4393–4410. DOI: 10.1021/jm00022a005.

54. Yamamori T, Harada H, Sakai K, Iwaki K, Matsunaga K. US Patent 5462936. Published online 1995. Accessed October 28, 2021. <https://patentimages.storage.googleapis.com/3d/7f/f6/315ea70560c8d5/US5462936.pdf>

55. Kawakami M, Matsumura S, Shimamura T, et al. Pharmacological studies on a new antihypertensive agent, S-2150, a benzothiazepine derivative: 2. Hypotensive effects in normotensive and hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;28(5):695–702. DOI: 10.1097/00005344-199611000-00013.

56. Masui M, Funakawa S, Uno O, et al. Pharmacological studies on a new antihypertensive agent, S-2150, a benzothiazepine derivative: 1. Antineurotic and antiarrhythmic effects in reperfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1996;28(4):526–532. DOI: 10.1097/00005344-199610000-00008.

57. Kimoto S, Haruna M, Matsuura E, et al. Pharmacological studies on a new antihypertensive agent, S-2150, a benzothiazepine derivative: 3. Hypotensive and antimyocardial-stunning effects in dogs. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;29(2):180–187. DOI: 10.1097/00005344-199702000-00005.

58. Mehanna AS, Maher TJ, Grongsaard PP. Design, Synthesis and Calcium Channel Blocking Activity of Diltiazem-Verapamil Hybrid Molecules. *Med chem*. 2014;4(10):704–703. DOI: 10.4172/2161-0444.1000216.

59. Takahara A, Uneyama T, Yoshimoto R, Sugiyama A, Hashimoto K. JP Patent 11228412. Published online 1999.

60. Takahara A, Sugiyama A, Yoshimoto R, Hashimoto K. AH-1058: a novel cardioselective Ca^{2+} channel blocker. *Cardiovasc Drug Rev.* 2001;19(4):279–296. DOI: 10.1111/j.1527-3466.2001.tb00071.x.
61. Branca Q, Jaunin R, Mirki HP, Ramuz H. US Patent 4808605. Published online 1989.
62. Emanuel K, Mackiewicz U, Pytkowski B, Lewartowski B. Effects of mibefradil, a blocker of T-type Ca^{2+} channels, in single myocytes and intact muscle of guinea-pig heart. *J Physiol Pharmacol.* 1998;49(4):577–590. Accessed October 28, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10069698/>
63. Leuranguer V, Mangoni ME, Nargeot J, Richard S. Inhibition of T-type and L-type calcium channels by mibefradil: Physiologic and pharmacologic bases of cardiovascular effects. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2001;37(6):649–661. DOI: 10.1097/00005344-200106000-00002.
64. Massie BM. Mibefradil, a T-Type Channel-Selective Calcium Antagonist Clinical Trials in Chronic Stable Angina Pectoris. *Am J Hypertens.* 1998;11(4 Pt 3):95S–102S. DOI: 10.1016/S0895-7061(98)00006-5.
65. Li M, Hansen JB, Huang L, Keyser BM, Taylor JT. Towards selective antagonists of T-type calcium channels: design, characterization and potential applications of NNC 55-0396. *Cardiovasc Drug Rev.* 2005;23(2):173–196. DOI: 10.1111/j.1527-3466.2005.tb00164.x.
66. Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, et al. NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-Benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-fluoro-1,2,3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: A New Selective Inhibitor of T-Type Calcium Channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;309(1):193–199. DOI: 10.1124/jpet.103.060814.
67. Son YK, Hong DH, Li H, et al. The Ca^{2+} channel inhibitor NNC 55-0396 inhibits voltage-dependent K^{+} channels in rabbit coronary arterial smooth muscle cells. *J Pharmacol Sci.* 2014;125(3):312–319. DOI: 10.1254/jphs.14054fp.
68. Matsuda S, Nishikawa H, Fukatsu A, et al. NNC 55-0396, a T-type calcium channel blocker, protects against the brain injury induced by middle cerebral artery occlusion and reperfusion in mice. *J Pharmacol Sci.* 2019;140(2):193–196. DOI: 10.1016/J.JPHS.2019.02.002.
69. Hilpert K, Hubler F, Renneberg D. WO Patent 2008132679A1. Published online 2008.
70. Harsányi K, Korbonits D, Kiss P. Diphenylpropylamine Derivatives. I. N-Substituted 3,3-Diphenylpropylamines. *J Med Chem.* 1964;7(5):623–625. DOI: 10.1021/jm00335a011.
71. Wiśniowska B, Mendyk A, Fijorek K, Glinka A, Polak S. Predictive model for L-type channel inhibition: multichannel block in QT prolongation risk assessment. *J Appl Toxicol.* 2012;32(10):858–866. DOI: 10.1002/jat.2784.
72. Shah RR, Stonier PD. Withdrawal of prenylamine: perspectives on pharmacological, clinical and regulatory outcomes following the first QT-related casualty. *Ther Adv Drug Saf.* 2018;9(8):475–493. DOI: 10.1177/2042098618780854.
73. Tripathi O, Schreiber W, Tritthart HA. Fendiline inhibits L-type calcium channels in guinea-pig ventricular myocytes: a whole-cell patch-clamp study. *Br J Pharmacol.* 1993;108(4):865–859. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1993.tb13479.x.
74. Cho K jin, van der Hoeven D, Hancock JF. Inhibitors of K-Ras Plasma Membrane Localization. *Enzymes.* 2013;33 Pt A:249–265. DOI: 10.1016/B978-0-12-416749-0.00011-7.
75. Bayer B, Mannhold R. Fendiline: a review of its basic pharmacological and clinical properties. *Pharmatherapeutica.* 1987;5(2):103–136. Accessed October 28, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3310016/>
76. Schneider G, Neidhart W, Giller T, Schmid G. "Scaffold-Hopping" by Topological Pharmacophore Search: A Contribution to Virtual Screening. *Angew Chem Int Ed Engl.* 1999;38(19):2894–2896. Accessed October 28, 2021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10540384/>
77. Fagbemi O, Kane KA, McDonald FM, Parratt JR, Rothaul AL. The effects of verapamil, prenylamine, flunarizine and cinnarizine on coronary artery occlusion-induced arrhythmias in anaesthetized rats. *Br J Pharmacol.* 1984;83(1):299–304. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1984.tb10146.x.
78. Tytgat J, Vereecke J, Carmeliet E. Mechanism of L- and T-type Ca^{2+} channel blockade by flunarizine in ventricular myocytes of the guinea pig. *Eur J Pharmacol.* 1996;296(2):189–197. DOI: 10.1016/0014-2999(95)00691-5.
79. Antoons G, Oros A, Bito V, Sipido KR, Vos MA. Cellular basis for triggered ventricular arrhythmias that occur in the setting of compensated hypertrophy and heart failure: considerations for diagnosis and treatment. *J Electrocardiol.* 2007;40(6 Suppl):S8–14. DOI: 10.1016/j.jelectrocard.2007.05.022.
80. Trepakova ES, Dech SJ, Salata JJ. Flunarizine is a highly potent inhibitor of cardiac hERG potassium current. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;47(2):211–220. DOI: 10.1097/01.fjc.0000200810.18575.80.
81. Hara H, Toriu N, Shimazawa M. Clinical Potential of Lomerizine, a Ca^{2+} Channel Blocker as an Anti-Glaucoma Drug: Effects on Ocular Circulation and Retinal Neuronal Damage. *Cardiovasc Drug Rev.* 2004;22(3):199–214. DOI: 10.1111/j.1527-3466.2004.tb00141.x.

Новый глипролин ГЗК-111 с нейropsychотропной активностью

Колясникова К. Н., Аляева А. Г., Кузнецова Е. А.

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

Аннотация. Статья представляет собой обзор собственных работ, в которой описаны конструирование, синтез и фармакологические свойства линейного замещённого глипролина ГЗК-111, потенциального препарата для комплексного лечения психиатрических патологий, включающих тревожные, депрессивные расстройства и нарушения когнитивных функций. Описывается связь структуры и активности в ряду аналогов этого глипролина. Представлены экспериментальные доказательства способности ГЗК-111 метаболизироваться с образованием цикло-пролилглицина, идентичного эндогенному циклическому дипептиду. Приведены данные о токсикологических и фармакокинетических исследованиях ГЗК-111.

Ключевые слова: этиловый эфир N-фенилацетилглицил-L-пролина; ГЗК-111; цикло-пролилглицин

Для цитирования:

Колясникова К. Н., Аляева А. Г., Кузнецова Е. А. Новый глипролин ГЗК-111 с нейropsychотропной активностью. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):18–23. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-18-23>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

Novel glyproline GZK-111 with neuropsychotropic activity

Koliasnikova KN, Alyaeva AG, Kuznetsova EA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The article represents a review of our own researches, which describes the design, synthesis and pharmacological properties of linear substituted glyproline GZK-111, a potential drug for the complex treatment of psychiatric pathologies, including anxiety, depressive disorders, and cognitive impairment. The relationship between structure and activity in a series of this glyproline analogs is described. The experimental evidence of the GZK-111 ability to metabolized with the formation of cycloprolylglycine, which is identical to the endogenous cyclic dipeptide, is presented. The data on toxicological and pharmacokinetic studies of GZK-111 are presented.

Keywords: N-phenylacetylglucyl-L-proline ethyl ester; GZK-111; cyclo-prolyl-glycine

For citations:

Koliasnikova KN, Alyaeva AG, Kuznetsova EA. Novel glyproline GZK-111 with neuropsychotropic activity. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):18–23. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-18-23>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021

Введение / Introduction

Цикло-L-пролилглицин (ЦПГ) был сконструирован как предполагаемый пептидный прообраз классического ноотропного препарата пирацетама [1] и впоследствии обнаружен в мозге интактных крыс как эндогенное соединение в микромолярной концентрации [2]. Это открытие было подтверждено зарубежными исследователями [3, 4]. ЦПГ подобен пирацетаму не только по структуре, но и по основным фармакологическим эффектам. При системном введении ЦПГ обладает ноотропной [5], анксиолитической [6–8], антигипоксической [9], нейротропной [3, 4, 9, 10], анальгетической [11] и антидепрессивной [12, 13] активностями в дозах, в 100–1000 раз меньших, чем пирацетам. Недавно было высказано предположение, что ЦПГ может являться позитивным модулятором глутаматных AMPA-рецепторов, то есть ампакином [14]. Подобно другим ампакинам, он увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора (brain-derived neurotrophic factor, BDNF) в экспериментах *in vitro* [15] и *in vivo* [16], а его анксиолитический и антигипоксический эффекты зависят от активации как AMPA-, так и нейротрофиновых тирозинкиназных TrkB-рецепторов [17, 18]. Спектр

фармакологических эффектов ЦПГ соответствует не только спектру пирацетама, но и спектру BDNF. Таким образом, ЦПГ может стать основой для создания целой группы лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами. В связи с этим нами был сконструирован линейный замещённый глипролин ГЗК-111, этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина, химическая структура которого предполагает возможность превращения в цикло-L-пролилглицин в биологических средах.

Дизайн / Design

ЦПГ является гидрофильным соединением. Чтобы увеличить его прохождение через биологические мембраны, включая гемато-энцефалический барьер, была поставлена задача создания амфифильного пролекарства с улучшенными фармакокинетическими свойствами, которое бы превращалось в ЦПГ в мозге. Для этой цели можно было использовать два варианта замещённых дипептидов, основанных на последовательности Pro-Gly или Gly-Pro. Поскольку известно [19, 20], что наличие имидной связи при пролине, имеющей место в дипептидной последовательности Gly-Pro, увеличивает долю цисоидной пептидной

связи, которая, в свою очередь, способствует циклизации дипептида [21, 22], была выбрана вторая последовательность. Нами был сконструирован линейный замещённый глипролин – этиловый эфир N-фенилацетилглицил-L-пролина (лабораторный шифр ГЗК-111, рис. 1), предположительно способный метаболизироваться до ЦПГ, который может образовываться при энзиматическом отщеплении фенилацетильного радикала с последующей внутримолекулярной циклизацией. Отщепление фенилацетильного радикала может быть облегчено его химическим подобием фенилаланину [23, 24].

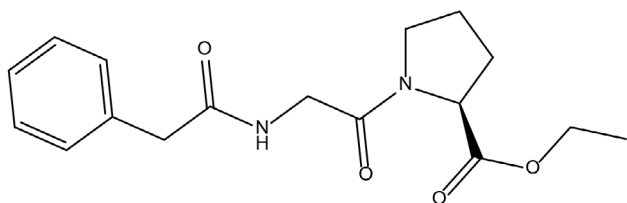


Рис. 1. Структура ГЗК-111
Fig. 1. Structure of GZK-111

Для подтверждения того, что активность замещённого глипролина ГЗК-111 связана с образованием циклического дипептида, нами было проведено расширение группы N-ацил-глипролинов путём варьирования природы N-ацильного радикала и C-концевого замещения. Была синтезирована серия соединений общей формулы (R-CO-Gly-Pro-X, где R-CO–ацил, X–функциональная группа, такая как NH₂, OMe, OEt, NHCH₃) [25, 26].

Изучение связи структуры и активности в ряду аналогов ГЗК-111 с замещением по C-концу (амид,

метиламид, кислота) показало, что нейрорепрогенное действие проявляет только амид, что, вероятно, связано с предполагаемой способностью этого соединения, как и ГЗК-111 (эфир), метаболизироваться с образованием ЦПГ [25]. Возможное объяснение состоит в том, что после ферментативного деацилирования N-фенилацетильной группы происходит спонтанная циклизация дипептида с образованием дикетопиперазина, которой, как известно, подвергаются только низкоалкильные эфиры и незамещённые амиды.

Изучение влияния природы N-ацильного заместителя на биологическую активность показало, что эффекты сохраняются только для соединения с остатком фенилпропионовой кислоты, также структурно близкой к фенилаланину, но не для аналогов с алифатическими ацильными фрагментами [26].

Синтез ГЗК-111 / Synthesis of GZK-111

Были опробованы три схемы синтеза ГЗК-111, каждая из которых включала в себя следующие стадии: 1) этерификация L-пролина; 2) получение N-фенилацетилглицина; 3) образование пептидной связи [27]. Во всех схемах синтеза использовали способ этерификации пролина по Бреннеру и получения N-фенилацетилглицина ацилированием глицина хлорангидридом фенилуксусной кислоты в условиях Шоттен–Баумана. Было рассмотрено три способа образования пептидной связи между N-фенилацетилглицином и эфиром пролина (метод смешанных ангидридов в условиях Андерсона, метод активированных бензотриазольных эфиров и метод активированных сукцинимидных эфиров) и показано, что оптимальным является метод смешанных ангидридов. Схема синтеза этилового эфира N-фенилацетилглицил-L-пролина представлена на рис. 2.

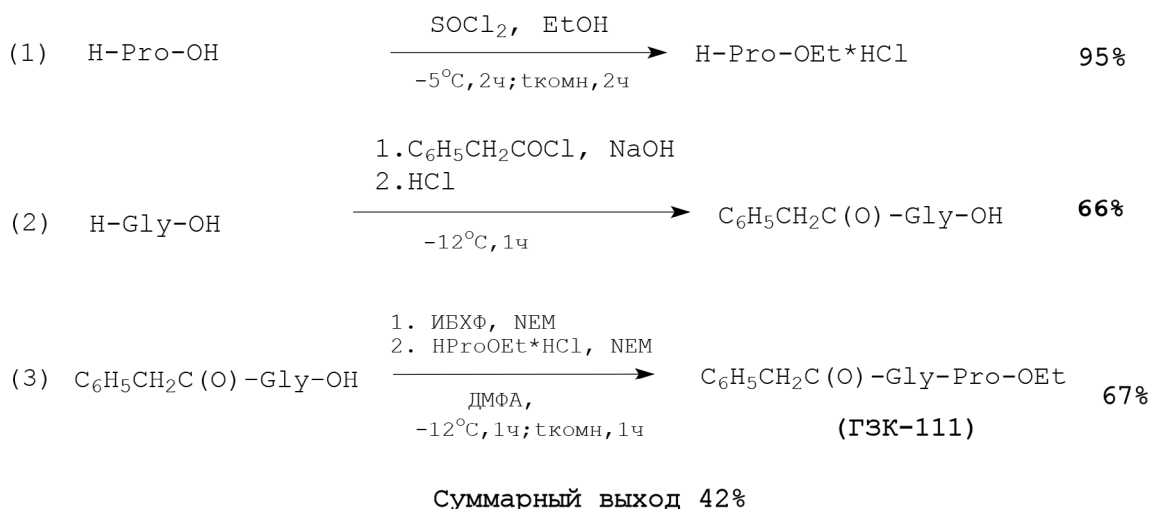


Рис. 2. Схема синтеза этилового эфира N-фенилацетилглицил-пролина (ГЗК-111)
Fig. 2. Scheme of the synthesis of N-phenylacetyl-glycyl-proline ethyl ester (GZK-111)

Биотрансформация ГЗК-111 / Biotransformation of GZK-111

Биотрансформация *in vitro* ГЗК-111 в ЦПГ / *In vitro* biotransformation of GZK-111 in CPG. Для того чтобы показать принципиальную возможность образования ЦПГ из ГЗК-111 была изучена биотрансформация последнего в присутствии ферментов плазмы крови. Исходная плазма, по данным ОФ ВЭЖХ, содержала эндогенный ЦПГ в концентрации 1 мкМ. При инкубации ГЗК-111 с плазмой при 37 °С в течение 10 ч наблюдалось увеличение пика ЦПГ и появление пика, соответствующего по времени удерживания соединению с открытой карбоксильной группой, N-фенилацетилглицил-L-пролину. Таким образом, в присутствии ферментов плазмы крови из ГЗК-111 действительно образуется ЦПГ [23]. Схема превращения представлена на рис. 3.

Образование ЦПГ из ГЗК-111 было подтверждено и *in vivo* [28].

Фармакологические свойства ГЗК-111 / Pharmacological properties of GZK-111

Исходя из ранее установленных фармакологических эффектов ЦПГ, был изучен соответствующий спектр нейropsychотропной активности ГЗК-111 (антиамнестическая, анксиолитическая, антигипоксическая, нейропротекторная, антидепрессивная и анальгетическая). Для ряда биологических эффектов была изучена стереоспецифичность, характерная для ЦПГ.

Ноотропное антиамнестическое действие / Nootropic antiamnesic effect ГЗК-111 оценивали по его способности предотвращать нарушение воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) у крыс, вызываемое электроконвульсивным шоком (ЭКШ). Исследования показали, что ГЗК-111 обла-

дает антиамнестическую активностью в дозах 0,1; 0,5 и 1,0 мг/кг внутривентриально (в/б), что соответствует по дозам и выраженности эффекта самого ЦПГ [23]. Эффекты ГЗК-111 аналогично ЦПГ стереоспецифичны, однако, если D-энантиомер ЦПГ проявляет проамнестическое действие, то D-энантиомер ГЗК-111 (лабораторный шифр ГЗК-121) неактивен. Это можно объяснить тем, что D-ЦПГ блокирует рецептор, а ГЗК-121 не метаболизируется до ЦПГ.

Анксиолитическую активность / Anxiolytic activity

ГЗК-111 изучали на крысах в дозах 0,75; 1,5 и 3,0 мг/кг в/б с использованием теста приподнятого крестообразного лабиринта. Достоверный анксиолитический эффект наблюдался в дозе 1,5 мг/кг. ГЗК-111 увеличивал время пребывания крыс в открытых рукавах в 12 раз по сравнению с контролем, что сравнимо с эффектом ЦПГ в дозе 0,1 мг/кг. Энантиомер ГЗК-121 в дозе 1,5 мг/кг был неактивен [23]. При пероральном введении ГЗК-111 проявляет анксиолитическую активность в этом тесте в дозах 40 мг/кг [29].

Также анксиолитическое действие ГЗК-111 было изучено в тесте «Открытое поле» на мышах линии BALB/c в диапазоне доз 0,1–10 мг/кг в/б. Достоверное увеличение общей двигательной активности наблюдали в дозе 1,0 мг/кг в/б [24].

Антигипоксическая активность / Antihypoxic activity

ГЗК-111 была изучена на мышах в тесте нормобарической гипоксии с гиперкапнией («баночная» гипоксия) в дозах 0,1; 0,5 и 1,0 мг/кг в/б. Было выявлено, что это соединение, как и ЦПГ, проявляет антигипоксический эффект в дозе 0,5 мг/кг в/б, достоверно увеличивая продолжительность жизни животных, и это действие так же стереоспецифично, как и в случае антиамнестического и анксиолитического эффектов [23]. При пероральном введении ГЗК-111 проявляет антигипоксическую активность в этом тесте в дозах 10 и 30 мг/кг [29].

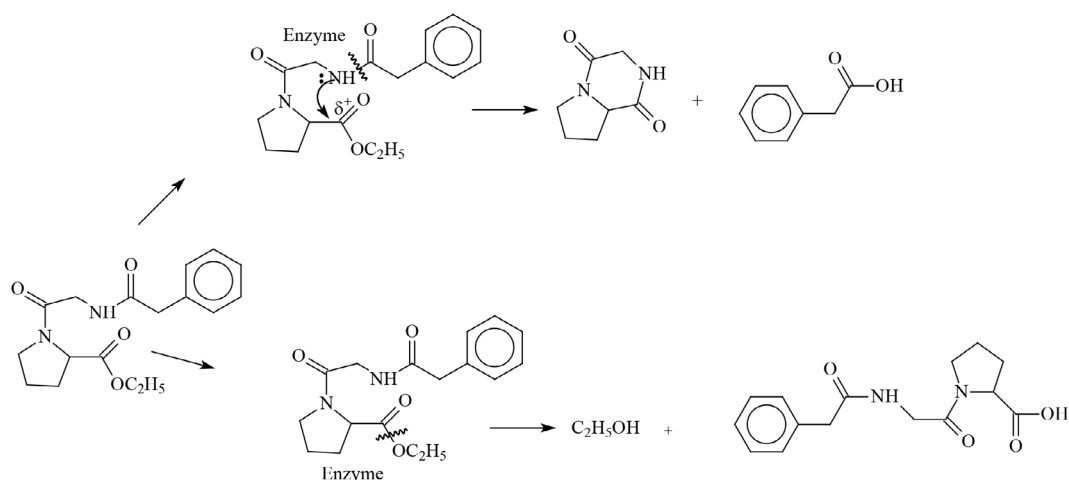


Рис. 3. Гипотетическая схема образования ЦПГ в результате метаболизма ГЗК-111

Fig. 3. Hypothetical scheme of CPG formation as a result of GZK-111 metabolism

Антидепрессивное действие / Antidepressant effect

ГЗК-111 было изучено в тесте вынужденного плавания по Порсолту [30]. Исследование проводили на мышах в интервале доз 0,01–20,0 мг/кг при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 7 или 14 дней. Установлено, что при 7-дневном введении ГЗК-111 в дозе 10 мг/кг статистически значимо уменьшал время иммобилизации на 11 %, по выраженности эффекта, не уступая амитриптилину в дозе 10 мг/кг. При 14-дневном введении ГЗК-111 обладал достоверным антидепрессивным эффектом в дозе 10 мг/кг и проявлял тенденцию к снижению времени иммобилизации в дозе 1,0 мг/кг ($p = 0,08$) при парентеральном введении.

Также антидепрессивная активность ГЗК-111 была показана в 2-х бутылочном тесте предпочтения 1 % раствора сахарозы у мышей на экспериментальной модели агедонии, индуцированной введением липополисахарида [31]. Однократное внутрибрюшинное введение ГЗК-111 в дозе 1,0 мг/кг способствовало выраженному антиагедоническому эффекту.

Для самого ЦПГ антидепрессивная активность также была нами недавно выявлена в тесте вынужденного плавания по Порсолту на мышах [12] и на экспериментальной модели выученной беспомощности на крысах [13] при ежедневном внутрибрюшинном введении в течение 14 дней.

Нейропротекторное действие ГЗК-111 было показано *in vitro* в концентрациях 10^{-7} и 10^{-6} М на модели 6-OHDA токсичности с использованием клеток линии SH-SY5Y (клеточная модель болезни Паркинсона) [25]. Ранее на этой модели было показано нейропротекторное действие самого ЦПГ [9].

Нейропротекторная активность ГЗК-111 *in vivo* была изучена на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. Соединение вводили внутрибрюшинно в дозе 0,5 мг/кг/сутки в течение 7 дней, первое введение через 6 ч после операции. ГЗК-111 проявлял выраженные нейропротекторные эффекты, уменьшая объём зоны инфаркта в 1,6 раз и улучшая примерно на 30 % неврологический статус животных [30].

Для ЦПГ нейропротекторная активность была показана на модели неполной глобальной ишемии головного мозга у крыс, создаваемой необратимой двусторонней окклюзией общих сонных артерий в дозе 1,0 мг/кг при субхроническом внутрибрюшинном введении [10].

Анальгетические свойства / Analgesic properties ГЗК-111 были изучены на мышах-самцах линии C57Bl/6 при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 0,5; 1,0; 2,0 и 4,0 мг/кг в тесте «горячая пластина». ГЗК-111 показывал достоверный анальгетический эффект в дозах 1, 2 и 4 мг/кг. При этом в дозах 1 и 2 мг/кг эффект развивался уже через 60 мин после введения, а в дозе

4 мг/кг — через 90 мин и сохранялся через 120 мин [30]. Полученные данные свидетельствуют о том, что ГЗК-111, подобно ЦПГ [32], проявляет анальгетическую активность, которая является дозозависимой.

Токсичность / Toxicity

В экспериментах по исследованию острой токсичности показано, что для ГЗК-111 LD_{50} у мышей составляет более 3000 мг/кг при внутрибрюшинном введении [33].

Установлено, что ГЗК-111 в области использованных концентраций (1,6–5000 мкг/мл) и дозировок (12 и 120 мг/кг) не обладает мутагенной активностью. Совокупность данных, полученных в краткосрочных тестах на мутагенность и в тесте по оценке повреждений ДНК свидетельствует об отсутствии у соединения ГЗК-111 потенциальной канцерогенной активности [Жанатаев и др., неопубликованные данные].

Фармакокинетические исследования / Pharmacokinetic studies

Изучение фармакокинетики ГЗК-111 в плазме крови крыс проводилось при его однократном внутривенном и внутрижелудочном введении в дозе 20 мг/кг. Период полуэлиминации ($t_{1/2el}$) неизменённого дипептида составил 0,66 ч при внутривенном и 0,43 ч при внутрижелудочном введении. Методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии были определены продукты биотрансформации ГЗК-111, среди которых был обнаружен ЦПГ, совпадающий с эндогенным нейропептидом [28]. Помимо ЦПГ образуются также N-фенилацетилглицил-L-пролин, N-фенилацетилглицин и фенилуксусная кислота [34]. Независимо от способа введения ГЗК-111 период полуэлиминации для ЦПГ составил 1,4 ч [28].

Заключение / Conclusion

Таким образом, замещённый глипролин ГЗК-111 *in vivo* метаболизирует до ЦПГ и проявляет характерные для последнего ноотропную, анксиолитическую, антигипоксическую, антидепрессивную, нейропротекторную и анальгетическую активности, в том числе и при пероральном введении. Он подобен ЦПГ не только по спектру активностей, но и наличием и характером стереоспецифичности. Показано, что ГЗК-111 является нетоксичным соединением, не проявляет мутагенной и канцерогенной активностей. Сохранение фармакологических эффектов замещённого дипептида ГЗК-111 при пероральном использовании важно для дальнейшей разработки соединения в качестве психотропного препарата.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Колясникова Ксения Николаевна
Автор, ответственный за переписку
 e-mail: kszolotova@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>
 SPIN-код: 5682-2035
 к. б. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аляева Анна Григорьевна
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0371-4370>
 м. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Кузнецова Елена Александровна
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9228-0596>
 к. х. н., с. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Koliasnikova Ksenia N.
Corresponding author
 e-mail: kszolotova@mail.ru
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-6797-692X>
 SPIN code: 5682-2035
 PhD in Biology, Senior Researcher at the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Department of Drug Chemistry FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Alyueva Anna G.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0371-4370>
 Junior Researcher at the Laboratory of Peptide Bioregulators of the Department of Drug Chemistry FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Kuznetsova Elena A.
 ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9228-0596>
 PhD in Chemical, Senior Research at the Laboratory of fine organic synthesis Department of medicinal chemistry FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Максимова Ф.В. и др. Топологические аналоги пирacetамов на основе пролина и их ноотропная активность. *Химико-фармацевтический журнал*. 1989;23(3):276–281. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Maksimova FB, et al. Proline-based topologic pyracetam analogs and their nootropic activity. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 1989;23(3):276–281. (In Russ).].
2. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, Ostrovskaya RU, Skoldinov SP, Rozantsev GG, Voronina TA, Zherdev VP, Seredenin SB. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-propylglycine in rat brain. *FEBS Letters*. 1996;391(1-2):149–152. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00722-3.
3. Tran LH, inventor; Neurobiomed Corp, assignee. Neuroprotection and neurogenesis by administering cyclic prolyl glycine. United States patent US 7232798B2. 2007.
4. Guan J, Mathai S, Harris P, Wen J-Y, Zhang R, Brimble M, Gluckman P. Peripheral administration of a novel diketopiperazine, NNZ 2591, prevents brain injury and improves somatosensory-motor function following hypoxia-ischemia in adult rats. *Neuropharmacology*. 2007;53(6):749–762. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2007.08.010.
5. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С., и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирacetаму по селективности мнемоторного эффекта. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1999;128(4):411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. New Endogenous Dipeptide Cyclopropyl-Glycine Is Similar To Piracetam By Its Mnemotropic Selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 1999;128(4):411–413. (In Russ).].
6. Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cyclopropylglycine in elevated plus-maze test. *Bull Exp Biol Med*. 2001;131(5):464–466. DOI: 10.1023/a:1017928116025.
7. Seredenin SB, Gudasheva TA, Boiko SS, Kovalev GI, Voronin MV, Yarkova MA. Endogenous dipeptide cyclopropylglycine shows selective anxiolytic activity in animals with manifest fear reaction. *Bull Exp Biol Med*. 2002;133(4):360–362. DOI: 10.1023/a:1016293904149.
8. Васильева Е.В., Абдуллина А.А., Салимов Р.М., Гудашева Т.А., Ковалёв Г.И. Динамика психотропных эффектов циклопролилглицина у мышей BALB/c и C57Bl/6 в зависимости от продолжительности его введения. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(1):3–7. [Vasil'eva EV, Abdullina AA, Salimov RM, Gudasheva TA, Kovalev GI. Dynamics of cyclopropylglycine psychotropic effects in BALB/C and C57BL/6 mice depending on treatment duration. *Eksperimental'naya i klinicheskaya Farmakologiya*. 2021;84(1):3–7 (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-1-3-7.
9. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирacetамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(9):3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Similarity of Cyclopropylglycine to Piracetam in Antihypoxic and Neuroprotective Effects. *Eksperimental'naia i klinicheskaya farmakologiya*. 2012;75(9):3–6. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6.
10. Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Nikolaev SV, Antipova TA, Gudasheva TA. Neuropeptide cyclopropylglycine exhibits neuroprotective activity after systemic administration to rats with modeled incomplete global ischemia and in vitro modeled glutamate neurotoxicity. *Bull Exp Biol Med*. 2016;160(5):653–655. DOI: 10.1007/s10517-016-3241-5.
11. Ferro JN, de Aquino FL, de Brito RG, dos Santos PL, Quintans Jde S, de Souza LC, de Araújo AF, Diaz BL, Lucca-Júnior W, Quintans-Júnior LJ, Barreto E. Cyclo-Gly-Pro, a cyclic dipeptide, attenuates nociceptive behavior

and inflammatory response in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(12):1287–1295. DOI: 10.1111/1440-1681.12480.

12. Ковалёв Г.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Антидепрессантоподобные свойства циклопролил-глицина. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2018;81(11):3–6. [Kovalev GI, Abdullina AA, Vasil'eva EV, Gudasheva TA, Seredenin SB. Antidepressant-Like Properties of Cyclopropylglycine. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2018;81(11):3–6. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-11-3-6.

13. Garibova TL, Gudasheva TA, Seredenin SB. A New Component in the Mechanism of Regulation of Endogenous Depressive-Like States. *Dokl Biochem Biophys*. 2019;488(1):324–326. DOI: 10.1134/S1607672919050107.

14. Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Seredenin SB, et al. Neuropeptide cyclopropylglycine is an endogenous positive modulator of AMPA receptors. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;471(1):387–389. DOI: 10.1134/S160767291606003X.

15. Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Antipova TA, Seredenin SB. Neuropeptide cyclopropylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Dokl Biochem Biophys*. 2016;469(1):273–276. DOI: 10.1134/S1607672916040104.

16. Aguado-Llera D, Canelles S, Fernández-Mendivil C, Frago LM, Argente J, Arilla-Ferreiro E, López MG, Barrios V. Improvement in inflammation is associated with the protective effect of Gly-Pro-Glu and cyclopropylglycine against A β -induced depletion of the hippocampal somatostatinergic system. *Neuropharmacology*. 2019;151:112–126. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2019.04.008.

17. Gudasheva TA, Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Alyaeva AG, Vorontsova ON, Seredenin SB. The Anxiolytic Effect of the Neuropeptide Cyclopropylglycine Is Mediated by AMPA and TrkB Receptors. *Dokl Biochem Biophys*. 2020;493(1):190–192. DOI: 10.1134/S1607672920040067.

18. Кольяникова К.Н., Аляева А.Г., Воронцова О.Н., Гудашева Т.А. Изучение вовлеченности AMPA-рецепторов в антигипоксическое действие нейропептида цикло-пролилглицина. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2020;23(9):42–45. [Kolyasnikova KN, Alyaeva AG, Vorontsova ON, Gudasheva TA. Study of the involvement of AMPA receptors in the antihypoxic effect of the neuropeptide cyclopropylglycine. *Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry*. 2020;23(9):42–45. (In Russ).]. DOI: 10.29296/25877313-2020-09-06.

19. Ovchinnikov YuA, Ivanov VT. Conformational states and biological activity of cyclic peptides. *Tetrahedron*. 1975;31(18):2177–2209. DOI: 10.1016/0040-4020(75)80216-X.

20. Baldoni HA, Zamarbide GN, Enriz RD, Jauregui EA, Farkas Ö, Perczel A, Salpietro SJ, Csizmadia IG. Peptide models XXIX. cis–trans Isomerism of peptide bonds: ab initio study on small peptide model compound; the 3D–Ramachandran map of formylglycinamide. *J Molec Struct (Theochem)*. 2000;500(1-3):97–111. DOI: 10.1016/S0166-1280(00)00372-9.

21. Rydon HN, Smith PWG. Polypeptides. Part IV. The self-condensation of the esters of some peptides of glycine and proline. *J Chem Soc*. 1956;3642–3650. DOI: 10.1039/JR9560003642.

22. Manabe S, Machida H, Aihara Y, Yasunaga M, Ito Y, Matsumura Y. Development of a diketopiperazine-forming dipeptidyl Gly-Pro spacer for preparation of an antibody–drug conjugate. *Med Chem Comm*. 2013;4(5):792–796. DOI: 10.1039/C3MD00075C.

23. Гудашева Т.А., Кольяникова К.Н., Кузнецова Е.А., Литвинова С.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А., Островская Р.В., Середенин С.Б., Этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина метаболизируется до цикло-L-пролилглицина, проявляя сходный спектр нейropsychotropic активности. *Химико-фармацевтический журнал*. 2016;50(11):3–8. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, Litvinova SA, Zolotov NN, Voronina TA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. N-phenylacetyl-glycyl-L-proline ethyl ester converts into cyclo-L-prolyl-glycine showing a similar spectrum of neuropsychotropic activity. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2016;50(11):3–8. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2016-50-11-3-8.

24. Патент РФ на изобретение № 2646604/ 06.03.18. Бюл. №7. Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Кольяникова К.Н., Кузнецова Е.А., Воронина Т.А., Яркова М.А., Антипова Т.А., Литвинова С.А., Золотов Н.Н. Новые глипролины с ноотропной, антигипоксической, нейропротективной и анксиолитической активностью. [Patent RUS №2646604/ 06.03.18. Byul. № 7. Seredenin SB, Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, Voronina TA, Yarkova MA, Antipova TA, Litvinova SA, Zolotov NN. Novyye gliproliny s nootropnoy, antigipoksicheskoy,

neuroprotektivnoy i anksioliticheskoy aktivnost'yu (In Russ).]. Доступно по: <https://findpatent.ru/patent/264/2646604.html> Ссылка активна на 14.12.2021.

25. Кольяникова К.Н., Кузнецова Е.А., Николаев С.В., Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Анализ зависимости антигипоксической активности от структуры соединений в ряду замещенных глипролинов. *Химико-фармацевтический журнал*. 2018;52(6):13–17. [Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, Nikolaev SV, Antipova TA, Gudasheva TA, Seredenin SB. Investigation of the structure – antihypoxic activity relationship in a series of substituted glyprolines. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2018;52(6):13–17. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2018-52-6-13-17.

26. Николаев С.В., Логвинов И.О., Кольяникова К.Н., Кузнецова Е.А., Антипов П.И., Антипова Т.А. Нейропротекторные свойства *in vitro* новых глипролинов, замещенных по N-концу. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2020;(2):4–10. [Nikolaev SV, Logvinov IO, Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, Antipov PI, Antipova TA. The *in vitro* neuroprotective activity of analogues of N-terminus substituted glyprolines. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2020;(2):4–10. (In Russ).]. DOI: 10.37489/2587-7836-2020-2-4-10.

27. Kuznetsova EA, Kolyasnikova KN, Golubyatnikova AK, Rebeko AG, Gudasheva TA. Developing the optimal synthetic scheme for the potential nootropic drug GZK-111, N-phenylacetyl-glycyl-L-proline ethyl ester. *Pharmaceutical chemistry journal*. 2020; 54(6):642–646. DOI: 10.1007/s11094-020-02251-6.

28. Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Бочков П.О., и др. Доклиническая фармакокинетика дипептида ГЗК-111 с нейропротективной активностью. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;172(9):298–302. [Litvin AA, Kolyvanov GB, Bochkov PO, et al. Preclinical pharmacokinetics of dipeptide with neuroprotective activity GZK-111. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2021;172(9):298–302. (In Russ).].

29. Кольяникова К.Н., Поварнина П.Ю., Кузнецова Е.А., Аляева А.Г., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Замещенный глипролин ГЗК-111 сохраняет антигипоксическую и анксиолитическую активность при пероральном введении. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(10):10–13. [Kolyasnikova KN, Povarnina PY, Kuznetsova EA, Alyaeva AG, Gudasheva TA, Seredenin SB. Substituted glyproline GZK-111 retains antihypoxic and anxiolytic activity upon oral administration. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2021;55(10):10–13. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-10-10-13.

30. Kolyasnikova KN, Povarnina PYu, Tallerova AV, Firsova YuN, Nikolaev SV, Antipova TA, Nadorova AV, Kolik LG, Gudasheva TA, Seredenin SB. Glyproline Pro-Ampakine with Neuroprotective Activity // in: Neuroprotection – New Approaches and Prospects. – IntechOpen. 2020. DOI: 10.5772/intechopen.91192.

31. Tallerova AV, Mezhlumyan AG, Yarkova MA, Gudasheva TA, Seredenin SB. Effects of original compounds GSB-106, GML-3, and GZK-111 in an experimental lipopolysaccharide-induced anhedonia model. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(2):101–105. DOI: 10.1007/s11094-021-02397-x.

32. Konstantinopolsky MA, Gudasheva TA, Kolik LG. Experimental study of endogenous dipeptide Cyclo-L-prolyl-glycine in aspects of opioid addiction and analgesia in rodents. *European Neuropsychopharmacology*. 2019;29(3):S180–S181. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2018.11.305.

33. Качалов К.С. Исследование острой токсичности нового соединения ГЗК-111. / II научная конференция молодых ученых с международным участием «АКТУАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ В ФАРМАКОЛОГИИ». Материалы конференции. ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 28–29 октября 2021 г. [Kachalov KS. Issledovaniye ostroy toksichnosti novogo soyedineniya GZK-111. / II nauchnaya konferentsiya molodykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiyem «AKTUAL'NYE ISSLEDOVANIYA V FARMAKOLOGII». Materialy konferentsii. FGBNU «НИИ farmakologii imeni V.V. Zakusova», 28–29 oct 2021 (In Russ).].

34. Колыванов Г.Б., Бочков П.О., Литвин А.А., и др. Метаболизм нового дипептидного нейропротектора у крыс. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2021;172(11):618–621. [Kolyvanov GB, Bochkov PO, Litvin AA et al. Metabolism of a new dipeptide neuroprotector in rats. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2021;172(11):618–621. (In Russ).]. DOI: 10.47056/0365-9615-2021-172-11-618-621.

Изучение влияния блокады VEGF рецепторов на антиишемическую активность соединения ГК-2 на модели ишемии задней конечности крыс

Пекельдина Е. С., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Сазонова Н. М.,
Вититнова М. Б., Крыжановский С. А.

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

Аннотация. Ранее в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было показано, что агонист TrkA-рецепторов соединения ГК-2, являющееся низкомолекулярным миметиком NGF, обладает выраженной ангиогенной и антиишемической активностью. Однако оставалось не ясным, связана ли эта активность с активацией VEGF-A, поскольку, с одной стороны, имеются сообщения о том, что NGF-опосредованный ангиогенез может быть инициирован и путём активации NGF фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A, а с другой стороны, было показано, что селективный антагонист Flk1 рецепторов, специфичных для VEGF-A, соединение SU-5416 не влияет на ангиогенный эффект NGF. **Цель исследования.** Изучение влияния селективной блокады VEGF на антиишемическую активность агониста TrkA рецепторов соединения ГК-2. **Методы.** Оценку антиишемической активности соединения ГК-2 проводили в модельных экспериментах, воспроизводящих ишемию задней конечности у крыс. **Результаты.** Показано, что на фоне блокады связывания VEGF-A со специфичными для него (VEGFR1 /Flt-1/ и VEGFR2 /KDR/) рецепторами препаратом бевацизумаб (2,5 мг/кг, в/б, каждые 3 дня на протяжении 14 дней) соединения ГК-2 (1 мг/кг, в/б, ежедневно, в течение 14 дней) реализует свою антиишемическую активность. **Заключение.** Результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что селективная блокада VEGF не оказывает существенного влияния на противоишемическую активность дипептидного миметика NGF – соединения ГК-2, обладающего свойствами агониста TrkA рецепторов.

Ключевые слова: агонист TrkA-рецепторов – соединение ГК-2; антагонист TrkA-рецепторов – соединение ГК-1; бевацизумаб; ишемия задней конечности у крыс; антиишемическое действие

Для цитирования:

Пекельдина Е. С., Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Сазонова Н. М., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А. Изучение влияния блокады VEGF рецепторов на антиишемическую активность соединения ГК-2 на модели ишемии задней конечности крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):24–29. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-24-29>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

Study of the effect of the VEGF receptor blockade on the antiischemic activity of the compound GK-2 in a rat hind limb ischemia model

Pekeldina ES, Miroshkina IA, Sorokina AV, Sazonova NM, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. Earlier, in experiments *in vitro* and *in vivo*, it was shown that the TrkA receptor agonist compound GK-2, which was a low molecular weight NGF mimetic, had pronounced angiogenic and antiischemic activity. However, it remained unclear whether this activity was associated with the activation of VEGF-A, since, on the one hand, there are reports that NGF-mediated angiogenesis can be initiated by activating NGF of the vascular endothelial growth factor VEGF-A, and on the other hand, it is shown that a selective antagonist of Flk1 receptors specific for VEGF-A, compound SU-5416 does not affect the angiogenic effect of NGF. **Purpose of the investigation.** Study of the selective VEGF blockade effect on the antiischemic activity of the TrkA receptor agonist GK-2. **Methods.** Evaluation of the compound GK-2 antiischemic activity was assessed in model experiments simulating hind limb ischemia in rats. **Results.** It has been shown that against the background of blockade of VEGF-A binding with specific for it (VEGFR1 / Flt-1 / and VEGFR2 / KDR /) receptors, bevacizumab (2.5 mg / kg, i.p., every 3 days for 14 days) compound GK-2 (1 mg / kg, i.p., daily, for 14 days) realizes its antiischemic activity. **Conclusion.** The results of these experiments indicate that the selective blockade of VEGF does not significantly affect the anti-ischemic activity of the dipeptide NGF mimetic compound GK-2, which has the properties of a TrkA receptor agonist.

Keywords: TrkA receptor agonist – GK-2 compound; TrkA receptor antagonist – GK-1 compound; bevacizumab; hind limb ischemia in rats; antiischemic effect

For citations:

Pekeldina ES, Miroshkina IA, Sorokina AV, Sazonova NM, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Study of the effect of the VEGF receptor blockade on the antiischemic activity of the compound GK-2 in a rat hind limb ischemia model. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):24–29. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-24-29>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021.

Введение / Introduction

Одним из эндогенных регуляторов ангиогенеза является открытый в 1951 году итальянским нейробиологом *Levi-Montalcini R.* фактор роста нервов (NGF). Показано, что NGF может секретироваться и экскретироваться гладкомышечными клетками сосудов и кардиомиоцитами, а на их клеточных мембранах представлены специфичные для NGF TrkA рецепторы [1, 2].

Активация NGF TrkA рецепторов, расположенных на клеточной мембране эндотелиальных клеток сосудов, инициирует активацию Ras-МАРК- и/или PI3/Akt-опосредованных сигнальных путей, что в конечном итоге приводит к пролиферации, миграции и инвазии эндотелиальных клеток. Помимо активации вышеуказанных сигнальных путей, NGF-опосредованный ангиогенез может осуществляться посредством активирующего влияния NGF на фактор роста эндотелия сосудов – VEGF-A [3, 4]. Однако в

литературе имеются сообщения о том, что селективный антагонист Flk1 рецепторов, специфичных для VEGF-A, соединение SU-5416 не влияет на ангиогенный эффект NGF [5].

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, начиная с 2003 года, проводятся фундаментальные исследования по созданию и фармакологическому изучению биологически активных замещённых низкомолекулярных миметиков NGF. В результате этих исследований были синтезированы дипептид $\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{Glu-Lys}-\text{NH}_2$ (амид N-сукцинил-L-глутамил-L-лизина), получивший шифр ГК-1, и гомодимерный миметик $(\text{HOOC}-(\text{CH}_2)_2-\text{CO}-\text{Glu-Lys}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2$ гексаметилендиламид бис{N-моносукцинил-глутамил-лизина} — соединение ГК-2, являющиеся, соответственно, антагонистом и агонистом TrkA рецепторов [6].

Ранее в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре клеток сосудистого эндотелия человека HUVEC, нами было показано, что антагонист TrkA-рецепторов соединение ГК-1 блокирует ангиогенные эффекты агониста TrkA-рецепторов соединения ГК-2, что позднее было подтверждено результатами гистологических исследований в экспериментах *in vivo*, свидетельствующих о том, что на модели ишемии задней конечности крысы соединение ГК-1 подавляет антиишемическую активность агониста TrkA-рецепторов соединения ГК-2.

В продолжении этих исследований оценили влияние блокады VEGF на антиишемическое действие агониста TrkA рецепторов соединения ГК-2. Постановка такой задачи обусловлена тем, что с одной стороны, известно, что NGF-опосредованный ангиогенез может быть инициирован и путём активации NGF фактора роста эндотелия сосудов — VEGF-A [4], а с другой стороны, было показано, что селективный антагонист Flk1 рецепторов, специфичных для VEGF-A, соединение SU-5416 не влияет на ангиогенный эффект NGF [6].

Целью настоящего исследования было изучение влияния селективной блокады VEGF на антиишемическую активность агониста TrkA рецепторов соединения ГК-2.

Материалы и методы / Materials and methods

Опыты проводили на белых беспородных крысах самцах массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)»

от 29 августа 2014 г. № 51. Животных основных и контрольных групп содержали в стандартных клетках по 5–7 особей в каждой, в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» с предоставлением брикетированного корма и воды *ad libitum* при регулируемом 12/12 (свет/темнота) световом режиме. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Животные были рандомизированы на 6 групп: 1-я ($n = 5$) — интактные; 2-я ($n = 6$) — ишемия; 3-я ($n = 6$) — ишемия + ГК-2; 4-я ($n = 6$) — ишемия + ГК-1 + ГК-2; 5-я ($n = 6$) — ишемия + бевацизумаб и 6-я ($n = 8$) — ишемия + бевацизумаб + ГК-2. Соединения ГК-1 (1 мг/кг) и ГК-2 (1 мг/кг) вводили в/б, ежедневно, в течение 14 дней). Первая инъекция — через 1 час после перевязки. В 4-й группе соединение ГК-1 вводили за 1 час до инъекции ГК-2. Животным 5-й и 6-й групп препарат бевацизумаб вводили в/б по известной схеме [7, 8] — 2,5 мг/кг, каждые 3 дня на протяжении 14 дней (всего 4 инъекции). В 5-й группе первая инъекция бевацизумаба — через 1 час после перевязки. В 6-й группе бевацизумаб вводили по вышеуказанной схеме, соединение ГК-2 — ежедневно. Животные 1-й и 2-й групп получали эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида.

Ишемию задних конечностей у анестезированных (хлоралгидрат, 350 мг/кг, в/б) крыс вызывали путём одномоментной резекции участка бедренной артерии.

Морфогистологические исследования

Ткани фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина для дальнейшего морфометрического и гистологического изучения. После окончания фиксации и стандартной проводки образцы заливали в парафиновые блоки. Готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на стекло с полилизинным покрытием (Menzel), затем окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с последующей докраской 1 % водным раствором эозина. Гистологические препараты микроскопировали в проходящем свете (микроскоп Nikon eclipse 55i, увеличение $\times 100$, $\times 40$).

Субстанция соединений ГК-1 и ГК-2 синтезирована в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

В качестве антагониста VEGF использовали препарат бевацизумаб концентрат для приготовления раствора, который представляет собой рекомбинантные гиперхимерные моноклональные IgG1 антитела, селективно связывающиеся и ингибирующие биологическую активность VEGF.

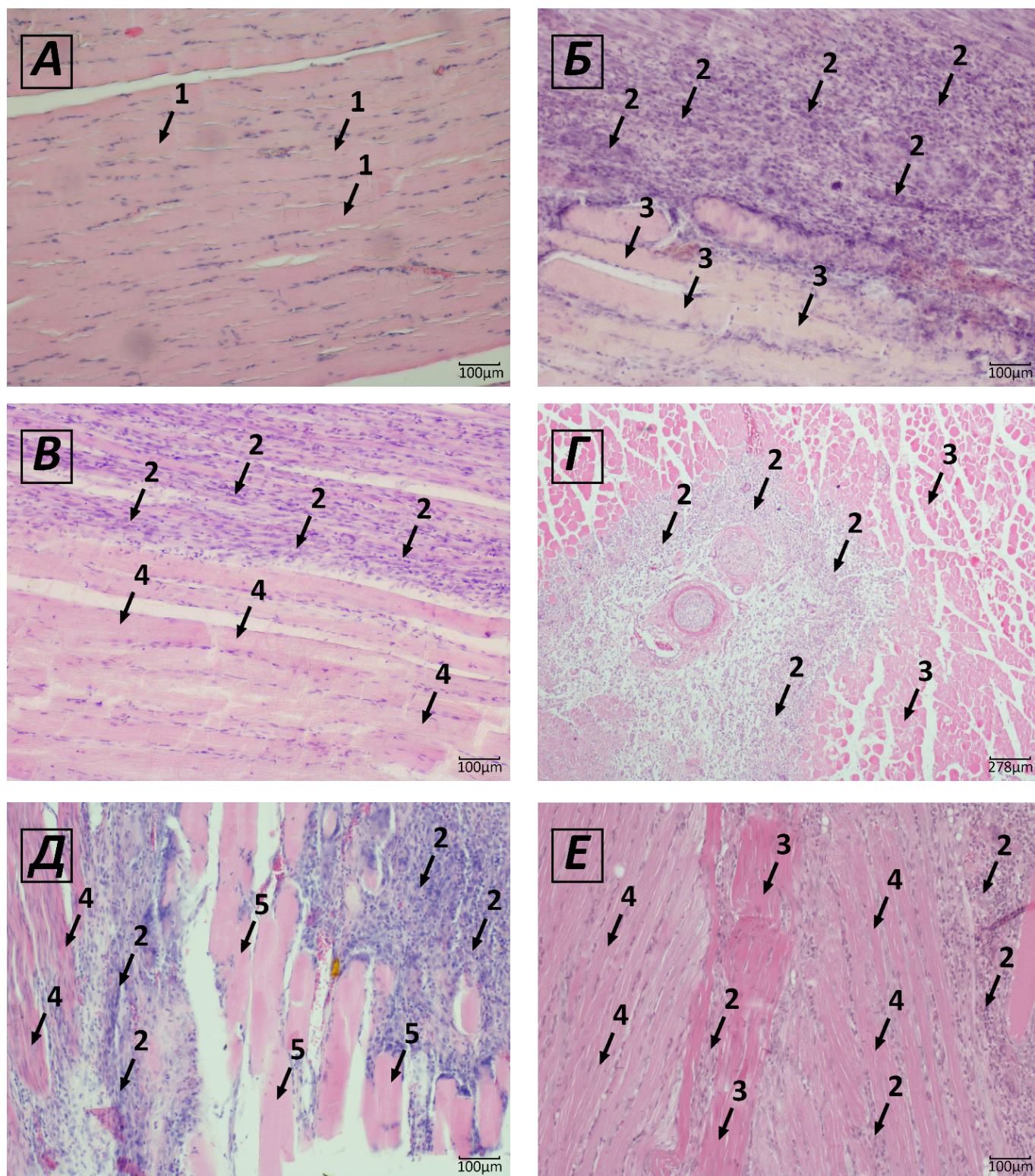


Рис. 1. Гистологические препараты икроножной мышцы крысы:

А – intactные (ув. $\times 100$); Б – контроль ишемии (ув. $\times 100$); В – ишемия + ГК-2 (ув. $\times 100$); Г – ишемия+ГК-1+ ГК-2 (ув. $\times 40$); Д – ишемия +Бевацизумаб (ув. $\times 100$); Е – Бевацизумаб+ГК-2 (ув. $\times 100$)

Fig. 1. Histological preparations of the rat gastrocnemius muscle:

А – intact ($\times 100$); Б – ischemia control ($\times 100$); В – ischemia + GK-2 ($\times 100$); Г – ischemia + GK-1 + GK-2 ($\times 40$); Д – ischemia + Bevacizumab ($\times 100$); Е – Bevacizumab + GK-2 ($\times 100$)

Примечания. 1 – intactные мышечные волокна; 2 – лимфомакрофагальный инфильтрат; 3 – некробиотически изменённые мышечные волокна; 4 – сохранённые мышечные волокна; 5 – восковидный некроз мышечных волокон.

Notes: 1 – intact muscle fibers; 2 – lymphomacrophage infiltrate; 3 – necrobiotically altered muscle fibers; 4 – preserved muscle fibers; 5 – waxy necrosis of muscle fibers.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

При изучении микроскопической картины поперечнополосатых мышц, полученных из задней конечности крыс 1-й группы (интактные), показано, что гистоархитектоника мышечной ткани не изменена. На поперечных срезах заметен эпимизий и перимизий. На продольных срезах видны параллельно идущие мышечные волокна. Саркоплазма равномерно окрашена в бледно-розовый цвет. Во всех мышечных волокнах чётко определяется поперечная исчерченность. По периферии мышечных волокон определяются продолговатые, базофильно окрашенные ядра. В эндомизии между мышечными волокнами обнаруживаются ядра фибробластов (рис. 1А).

Микроскопическая картина поперечнополосатых мышц экспериментальных крыс 2-й группы (контроль ишемии) свидетельствует о том, что гистоархитектоника поперечнополосатой мышечной ткани существенно изменена. Мышечная ткань у всех экспериментальных животных отёчна. На поперечных срезах обнаруживается заметно утолщенный перимизий. Участки ткани в ишемизированной области представляют собой обрывки мышечных волокон, где саркоплазма ярко окрашена, гомогенна. Поперечная исчерченность в таких волокнах не определяется. Ядра в большинстве случаев лизированы, поэтому визуально не определяются. В отдельных ишемизированных мышечных волокнах можно видеть мелкие тёмные пикнотичные ядра. Наряду с участками, где мышечные волокна имеют характерную толщину, встречаются участки с заметно атрофированными мышечными волокнами (рис. 1Б). Участки некробиотически изменённой мышечной ткани соседствуют с лимфомакрофагальным инфильтратом с примесью фибробластов и гигантских эпителиоидных клеток.

Микроскопическая картина икроножной мышцы крыс, которые на фоне ишемии получали соединение ГК-2, свидетельствует о том, что интенсивность альтеративных процессов в мышце этих крыс менее выражена. Ядра поперечнополосатых мышц мелкие, гиперхромные, иногда они не обнаруживаются. Саркоплазма в отдельных участках оксифильна, иногда гомогенна, поперечная исчерченность выражена слабо. Вокруг некробиотически изменённых поперечнополосатых мышц обнаружены участки лимфомакрофагального инфильтрата с примесью полиморфноядерных лейкоцитов. Размер таких участков заметно меньше

такового, наблюдаемого у контрольных крыс. Сосуды полнокровны, обнаружен околососудистый отёк. Эндомизий чётко виден. Капиллярная сеть хорошо выражена. Капилляры идут прямо, вдоль мышечных волокон (рис. 1В).

Полученные данные свидетельствуют о том, что у животных, которым после удаления бедренной артерии в течение 14 дней в/б вводили соединение ГК-2, в отличие от контрольных, хорошо выражена капиллярная сеть, а интенсивность некротических и воспалительных изменений существенно ниже, т. е. на данной модели патологии соединение ГК-2 проявляет противоишемическую активность.

В группе животных, которым соединение ГК-2 вводили на фоне инъекций антагониста TrkA рецепторов соединения ГК-1, микроскопическая картина икроножной мышцы крыс этой группы существенно не отличается от таковой у контрольных животных (рис. 1Г), что подтверждает ранее полученные нами данные о том, что антагонист TrkA соединение ГК-1 блокирует антиишемическое действие агониста TrkA-рецепторов соединения ГК-2.

У животных, получавших препарат бевацизумаб, гистологическая картина мышечной ткани близка к зарегистрированной у контрольных животных, хотя визуально интенсивность альтеративных процессов в мышце этих крыс несколько выше (рис. 1Д), а участков некробиотически изменённой мышечной ткани больше.

Иная картина наблюдается у животных, которые на фоне ишемии получали комбинацию бевацизумаб + соединение ГК-2. Интенсивность альтеративных процессов в мышечной ткани этих животных значительно ниже, чем у крыс, получавших бевацизумаб (рис. 1Е). В целом гистологическая картина близка к зарегистрированной у животных, получавших на фоне ишемии соединение ГК-2 (рис. 1В), однако визуально интенсивность воспалительных процессов у животных, получавших комбинацию бевацизумаб + соединение ГК-2 выше.

Выводы / Conclusions

Таким образом, результаты настоящих экспериментов свидетельствуют о том, что селективная блокада VEGF не оказывает существенного влияния на противоишемическую активность дипептидного миметика NGF — соединения ГК-2, обладающего свойствами агониста TrkA рецепторов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Пекельдина Евгения Сергеевна

pekeldinaes@mail.ru

SPIN-код: 3225-9216

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Pekeldina Eugenia S.

pekeldinaes@mail.ru

SPIN code: 3225-9216

Researcher Scientist of Laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Мирошкина Ирина Александровна

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова», Москва, Россия**Miroshkina Irina A.**

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN code: 4697-7938

Research scientist of the laboratory of drug toxicol-
ogy FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
Moscow, Russia**Сорокина Александра Валериановна**

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>к. б. н., в. н. с. лаборатории лекарственной
токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва, Россия**Sorokina Alexandra V.**

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>PhD in Biology, Leading researcher of the labora-
tory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of
Pharmacology», Moscow, Russia**Сазонова Нелля Михайловна**

e-mail: saz-nellya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>

SPIN-код: 8835-7887

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

e-mail: saz-nellya@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-7419>

SPIN code: 8835-7887

PhD Chemical Sci., Senior research scientist of
laboratory of peptide bioregulators of medicinal
chemistry department FSBI «Zakusov Institute of
Pharmacology», Moscow, Russia**Вититнова Марина Борисовна**

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

SPIN-код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакологического
скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова», Москва, Россия**Vititnova Marina B.**

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

SPIN code: 1901-8919

PhD Biological Sci., Senior researcher scientist
of laboratory of pharmacological screening FSBI
«Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia**Крыжановский Сергей Александрович****Автор, ответственный за переписку**

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического
скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва, Россия**Kryzhanovskiy Sergey A.****Corresponding author**

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharma-
cological screening FSBI «Zakusov Institute of
Pharmacology», Moscow, Russia**Список литературы / References**

1. Donovan MJ, Miranda RC, Kraemer R et al. Neurotrophin and neurotrophin receptors in vascular smooth muscle cells. Regulation of expression in response to injury. *Am J Pathol.* 1995;147(2):309–324. https://hsr.himmelfarb.gwu.edu/smhs_medicine_facpubs/4884
2. Martinelli PM, Camargos ER, Azevedo AA et al. Cardiac NGF and GDNF expression during Trypanosoma cruzi infection in rats. *Auton Neurosci.* 2006;130(1-2):32–40. DOI: 10.1016/j.autneu.2006.05.004.
3. Asanome A, Kawabe J, Matsuki M, Kabara M, Hira Y, Bochimoto H, Yamauchi A, Aonuma T, Takehara N, Watanabe T, Hasebe N. Nerve growth factor stimulates regeneration of perivascular nerve, and induces the maturation of microvessels around the injured artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;443(1):150–155. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.11.070.
4. Wang J, He C, Zhou T, Huang Z, Zhou L, Liu X. NGF increases VEGF expression and promotes cell proliferation via ERK1/2 and AKT signaling in Müller cells. *Mol Vis.* 2016;22: 254–263.

5. Lazarovici P, Gazit A, Stanizewska I et al. Nerve growth factor (NGF) promotes angiogenesis in the quail chorioallantoic membrane. *Endothelium.* 2006;13(1):51–59. DOI: 10.1080/10623320600669053.

6. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. *Докл. акад. наук.* 2010;434(4):549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor *Dokl Biochem Biophys.* 2010;434(1): 262–265. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S160767291005011X.
7. Ishida J, Onishi M, Kurozumi K, Ichikawa T, Fujii K, Shimazu Y, Oka T, Date I. Integrin inhibitor suppresses bevacizumab-induced glioma invasion. *Transl Oncol.* 2014;7(2):292–302.e1. DOI: 10.1016/j.tranon.2014.02.016.
8. Soysal D, Kızıldağ S, Saatlı B, Posacı C, Soysal S, Koyuncuoğlu M, Doğan Ö. A novel angiogenesis inhibitor bevacizumab induces apoptosis in the rat endometriosis model. *Balkan J Med Genet.* 2015;17(2):73–80. DOI: 10.2478/bjmg-2014-0077.

Изучение влияния фабомотизола дигидрохлорида на морфологическую картину левого желудочка сердца у крыс с подострым инфарктом миокарда

Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Цорин И. Б., Столярук В. Н., Вититнова М. Б.,
Крыжановский С. А., Дурнев А. Д.

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

Аннотация. Цель. Изучение влияния систематической терапии фабомотизола дигидрохлоридом на морфологическую картину левого желудочка (ЛЖ) сердца у крыс в подостром периоде инфаркта миокарда (ИМ). *Материалы и методы.* Моделирование ИМ проводили по методу A.Selye. Фабомотизола дигидрохлорид вводили крысам внутривентриально 1 раз в сутки с 15-го по 28-й день после ИМ в дозе 15 мг/кг. По окончании эксперимента проводили эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие. Образцы сердец после фиксации в формалине и стандартной проводки заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы сердец микроскопировали в проходящем свете. *Результаты.* Дилатация полости ЛЖ и истончение его стенок у животных, получавших фабомотизола дигидрохлорид, менее выражены, чем у контрольных крыс с ИМ. В перинфарктной зоне миокарда у крыс, получавших фабомотизола дигидрохлорид, волнообразная деформация и фрагментация кардиомиоцитов (КМ) менее интенсивна, а поперечная исчерченность миофибрилл, напротив, более выражена, чем в контроле. У животных, получавших фабомотизола дигидрохлорид, перинфарктная зона хорошо васкуляризирована. *Заключение.* Согласно результатам морфологических исследований, выполненных на модели подострой ишемии миокарда у крыс, продемонстрировано, что систематическая терапия фабомотизола дигидрохлоридом способствует не только значимому уменьшению зоны некроза, но и в определенной мере препятствует развитию раннего постинфарктного ремоделирования. У животных, получавших фабомотизола дигидрохлорид, в отличие от контрольных крыс, в сердечной мышце преобладают репаративные процессы. Эти наблюдения свидетельствуют о наличии у препарата кардиопротективной активности.

Ключевые слова: фабомотизола дигидрохлорид; инфаркт миокарда; морфология; кардиомиоциты

Для цитирования:

Мирошкина И. А., Сорокина А. В., Цорин И. Б., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А., Дурнев А. Д. Изучение влияния фабомотизола дигидрохлорида на морфологическую картину левого желудочка сердца у крыс с подострым инфарктом миокарда. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):29–35. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-29-35>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

Investigation of the fabomotizol dihydrochloride effect on the morphological picture of the heart left ventricle in rats with the subacute myocardial infarction

Miroshkina IA, Sorokina AV, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kryzhanovsky SA, Durnev AD

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. *The purpose of the study.* Investigation of the effect of the fabomotizol dihydrochloride systematic therapy on the morphological picture of the heart left ventricle (LV) in rats in the subacute period of myocardial infarction. *Materials and methods.* Myocardial infarction (MI) modeling was carried out using the A.Selye method. Fabomotizol dihydrochloride was administered to rats intraperitoneally 1 time per day from the 15th to the 28th day after MI at a dose of 15 mg/kg. At the end of the experiment, euthanasia and a pathoanatomic autopsy were performed. Samples of hearts after fixation in formalin and standard wiring were poured into paraffin blocks. Histological sections of the hearts were microscopied in transmitted light. *Results.* Dilatation of the LV cavity and thinning of its walls in animals treated with fabomotizol dihydrochloride are less pronounced than in control rats with MI. In the periinfarction zone of the myocardium in rats treated with fabomotizol dihydrochloride, wave-like deformation and fragmentation of cardiomyocytes is less intense, and the transverse striation of myofibrils, on the contrary, is more pronounced than in the control. In animals treated with fabomotizol dihydrochloride, the periinfarction zone is well vascularized. *Conclusion.* According to the results of morphological studies performed on a model of subacute MI in rats, it was demonstrated that systematic therapy with fabomotizole dihydrochloride contributes not only to a significant reduction in the necrosis zone, but also to a certain extent prevents the development of early postinfarction remodeling. In rats treated with fabomotizol dihydrochloride, in contrast to control animals, reparative processes prevail in the cardiac muscle. These observations indicate the presence of cardioprotective activity in the drug.

Keywords: fabomotizol dihydrochloride; myocardial infarction; morphology; cardiomyocytes

For citations:

Miroshkina IA, Sorokina AV, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kryzhanovsky SA, Durnev AD. Investigation of the fabomotizol dihydrochloride effect on the morphological picture of the heart left ventricle in rats with the subacute myocardial infarction. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):29–35. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-29-35>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021

Введение / Introduction

Оригинальный анксиолитик фабомотизола дигидрохлорид (афобазол) обладает сложным механизмом анксиолитического действия, включающим в себя агонистическое влияние на σ_1 -рецепторы [1, 2]. Показано, что помимо, собственно анксиолити-

ческой, афобазол проявляет и антиаритмическую [3, 4], и антиишемическую [5] активность которая во многом связана с его сродством к σ_1 -рецепторам. В исследованиях, проводимых на модели острой ишемии миокарда, было продемонстрировано, что терапия фабомотизола дигидрохлоридом в определенной мере препятствует развитию раннего постинфарктного ремо-

делирования ЛЖ [5, 6]. Следующим этапом работы является изучение кардиопротективного действия фабомотизола дигидрохлорида в условиях подострой ишемии миокарда, с целью оценки влияния препарата на морфофункциональное состояние кардиомиоцитов (КМ) и интенсивность репаративных процессов в сердечной мышце.

Цель исследования / The aim of study

Целью настоящего исследования явилось изучение влияния систематической терапии фабомотизола дигидрохлоридом на морфологическую картину левого желудочка сердца у крыс в подостром периоде ИМ.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 180–200 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Крыс содержали в стандартных клетках, с предоставлением брикетированного корма и воды *ad libitum* при регулируемом 12/12 (свет/темнота) световом режиме. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова, международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол. Крыс рандомизировали на 3 группы: 1-я — ложнооперированные животные ($n = 8$); 2-я — животные с ИМ — контроль ($n = 6$); 3-я — животные с ИМ, получавшие фабомотизола дигидрохлорид ($n = 6$). Моделирование ИМ проводили по методу A.Selye [7]. Во 2-ю и 3-ю группы включали только тех животных, у которых через 1 час после перевязки коронарной артерии в I и/или II стандартных отведениях ЭКГ регистрировали глубокий зубец Q. Фабомотизола дигидрохлорид вводили животным 3-й группы внутривенно 1 раз в сутки с 15-го по 28-й день после ИМ в дозе 15 мг/кг. Крысам

контрольной группы, а также ложнооперированным (ЛО) животным по аналогичной схеме вводили эквивалентный объём изотонического раствора натрия хлорида. По окончании эксперимента животных подвергали эвтаназии в соответствии с ГОСТом 33215-2014, сердца извлекали из грудных клеток для дальнейших морфологических исследований.

Морфологические исследования. После проведения эвтаназии сердца извлекали для последующего микроскопического исследования, фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина (готовый раствор производства ООО «Биовитрум»).

Сердца после окончания фиксации и стандартной проводки (автоматизированный тканевой процессор Leica TP1020, Германия) заливали в парафиновые блоки (система заливки тканей с графическим дисплеем Tissue-Tek®ТЕК™, США) [8]. Готовили гистологические срезы сердец (толщиной 5 мкм) с помощью микротомы ротационного Accu-Cut®SPM™, США.

Полученные срезы помещали на стекло с полилизиновым покрытием (Menzel) и окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами (Serva) с последующей докраской 1 % водным раствором эозина (Bio-Optica). Микропрепараты фотографировали цифровой зеркальной камерой Canon EOD 1000 с использованием макрообъектива. Фотографии сердец сохраняли в формате jpeg и анализировали с помощью программы Adobe Photoshop CS5. Морфометрические измерения производили на поперечном срединном срезе сердца. Срезы микроскопировали в проходящем свете (микроскоп Nikon eclipse 55i, увеличение $\times 100$, $\times 200$).

Статистический анализ. Нормальность распределения результатов морфометрии проверяли с помощью критерия Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Так как распределение вариантов не отличалось от нормального, а дисперсии были гомогенны, то статистическую значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену—Кейлсу. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Результаты патологоанатомического вскрытия

Результаты патологоанатомического вскрытия свидетельствуют о том, что морфологическая картина сердец ложнооперированных животных соответствовала анатомической норме: сердца были тёмно-красного цвета, конусообразной формы (рис. 1). Эпикард имел обычный вид. Полости сердца были запустевшими, не расширенными, предсердно-желудочковые отверстия проходными. Изменений консистенции сердечной мышцы не было выявлено. На разрезе толщина стенок левого желудочка (ЛЖ) и правого желудочка (ПЖ)

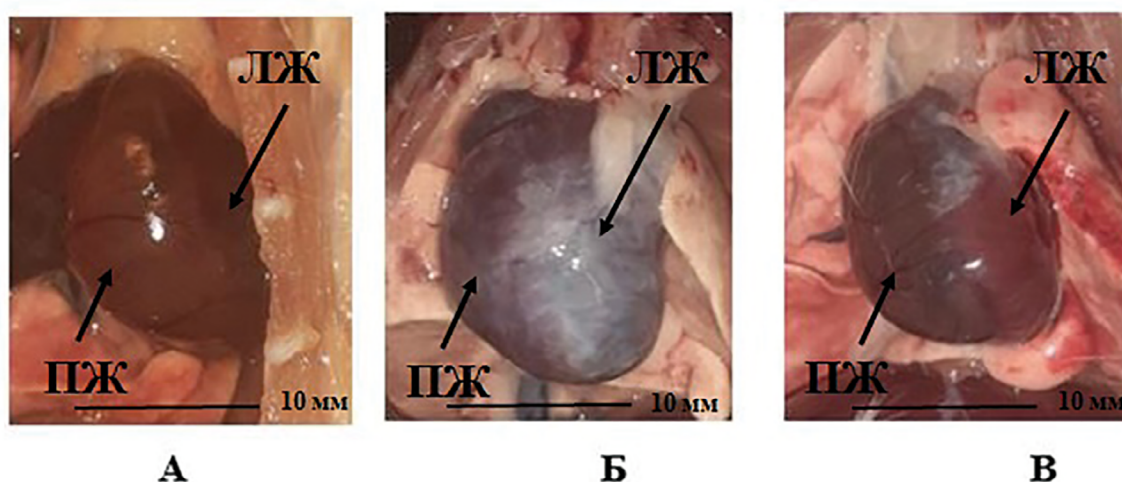


Рис. 1. Фотографии сердец: А — ложнооперированного животного; Б — контрольного животного с ИМ; В — животного, получавшего фабомотизола дигидрохлорид (15 мг/кг/сут в/б) с 15-го по 28-й день после воспроизведения ИМ
Fig. 1. Photos of hearts: A — the heart of a sham operated animal; Б — the heart of a control animal with MI; В — the heart of an animal treated with fabomotizol dihydrochloride (15 mg/ kg/ day in /b) from the 15th to the 28th day after MI reproduction

визуально была в пределах нормы. Эндокард и миокард не имели особенностей. Венечные сосуды были умеренно кровенаполнены.

У крыс контрольной группы (подострая ишемия миокарда) сердца имели тёмно-красный цвет, выявлялась выраженная область цианоза. Форма сердца была близка к шаровидной (см. рис. 1). Полости сердца были кровенаполнены и дилатированы, предсердно-желудочковые отверстия проходимы. Ниже места перевязки левой коронарной артерии на передней стенке ЛЖ визуализировалась зона некроза, имеющая неправильную форму и сероватый оттенок. Передняя стенка ЛЖ визуально была истонченной, консистенция сердечной мышцы дрябловатой. Венечные сосуды были кровенаполнены. В эндокарде ЛЖ выявлялись точечные кровоизлияния.

У животных основной группы (ИМ + фабомотизола дигидрохлорид) сердца были тёмно-красного цвета с незначительной областью цианоза, которая располагалась преимущественно вокруг зоны некроза. Форма сердца была ближе к конусообразной (см. рис. 1). Полости сердца были кровенаполненными, незначительно дилатированными, предсердно-желудочковые отверстия проходимыми. Ниже места перевязки левой коронарной артерии на передней стенке ЛЖ визуализировалась зона некроза, имеющая неправильную форму и сероватый оттенок, однако её размеры были визуально меньше, чем у контрольных животных (см. рис. 1). Истончение передней стенки ЛЖ было менее выражено, чем в контрольной группе. Сердечная мышца имела слегка дрябловатую консистенцию. В эндокарде ЛЖ выявлялись единичные точечные кровоизлияния. Венечные сосуды были умеренно кровенаполнены.

Таким образом, согласно результатам патологоанатомического вскрытия, у животных контрольной группы диагностировался передний или переднебоковой трансмуральный ИМ, сопровождающийся истончением стенки ЛЖ сердца. У животных, получавших систематическую терапию фабомотизола дигидрохлоридом, визуально площадь ИМ была меньше, передняя стенка ЛЖ была сердца менее истонченной, миокард менее дряблым.

Результаты морфометрического исследования

Согласно результатам морфометрического исследования, у контрольных животных площадь ИМ в среднем составляет $6,91 \pm 0,42 \text{ мм}^2$, тогда как у леченных животных этот показатель статистически значимо меньше — $4,72 \pm 0,69 \text{ мм}^2$ ($p = 0,0216$). То же касается и площади полости ЛЖ — у крыс, получавших афобазол, она меньше, чем в контрольной группе, соответственно, $14,68 \pm 0,68 \text{ мм}^2$ и $24,82 \pm 2,05 \text{ мм}^2$ (табл. 1).

Таким образом, систематическая терапия фабомотизола дигидрохлоридом способствует не только значимому уменьшению зоны некроза, но и в определённой мере препятствует развитию раннего постинфарктного ремоделирования

Результаты микроскопического исследования

Гистоархитектоника сердец крыс ложнооперированной группы не нарушена. Изредка между отдельными группами КМ обнаруживаются небольшие кровоизлияния. В стенке сердца крысы определяются оболочки: наружная (эпикард), средняя (миокард) и внутренняя (эндокард). Эндокард выстилает изнутри камеры и клапаны сердца. Миокард представлен поперечнополосатыми клетками сердечной мышцы (КМ), расположенными послойно. КМ имеют характерную форму и величину. В КМ выявляется отчётливо выраженная поперечная исчерченность.

Таблица 1

Влияние фабомотизола гидрохлорида (15 мг/кг в/б 1 раз в день с 15-го по 28-ой день ИМ) на морфометрические показатели ЛЖ сердца крыс

Table 1

The fabomotizol hydrochloride effect (15 mg / kg i.p. 1 time per day from the 15th to the 28th day of MI) on the morphometric parameters of the rat heart LV

Группа	Толщина передней стенки ЛЖ, мм	Диаметр полости ЛЖ, мм	Площадь инфаркта миокарда, мм ²	Площадь ЛЖ, мм ²	Площадь полости ЛЖ, мм ²	Площадь миокарда ЛЖ, мм ²
ЛО, $n = 8$	$2,25 \pm 0,16$ $p = 0,005$	$4,42 \pm 0,25$ $p = 0,0002$		$54,69 \pm 2,24$ $p = 0,67$	$11,72 \pm 1,13$ $p = 0,0002$	$42,98 \pm 1,49$ $p = 0,0006$
ИМ контроль, $n = 6$	$0,98 \pm 0,0,24$	$6,9 \pm 30,34$	$6,91 \pm 0,42$	$58,24 \pm 4,38$	$24,82 \pm 2,05$	$26,51 \pm 3,91$
ИМ + фабомотизола дигидрохлорид, $n = 6$	$1,50 \pm 0,34$ $p = 0,15$	$5,38 \pm 0,13$ $p = 0,0007$ $p_1 = 0,0178$	$4,72 \pm 0,69$ $p = 0,0216$	$56,42 \pm 1,69$ $p = 0,66$	$14,68 \pm 0,68$ $p = 0,0002$	$37,03 \pm 2,57$ $p = 0,0122$

Примечания: 1. Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; 2. P – ошибка первого рода по отношению к контролю с ИМ; 3. P_1 – ошибка первого рода по отношению к ЛО.

Notes: 1. Arithmetic averages and their standard errors are shown; 2. P is an error of the first kind in relation to the control with myocardial infarction; 3. P_1 is an error of the first kind in relation to LO.

Ядра КМ хорошо различимы, имеют характерную величину. Изредка обнаруживаются гипертрофированные ядра КМ с расплывчатым хроматином. Между мышечными элементами миокарда выявляются рыхлая соединительная ткань и кровеносные сосуды. Сосуды миокарда полнокровны. Наружная оболочка сердца (эпикард) представлена соединительнотканной пластиной, плотно срастающейся с миокардом. Таким образом, микроскопическая картина миокарда ложнооперированных животных соответствует норме.

Для сердец животных контрольной группы (инфаркт миокарда) характерна выраженная дилатация полости ЛЖ. Передняя стенка ЛЖ сильно истончена. В стенке сердца определяются оболочки: наружная (эпикард), средняя (миокард) и внутренняя (эндокард). Эндокард выстилает изнутри камеры и клапаны сердца.

На поперечном срединном срезе миокарда ЛЖ сердца определяются очаг ишемического поражения, перинфарктная зона и условно интактная зона миокарда. В зоне некроза, в значительной мере замещённой соединительной тканью, визуализируется неспецифическая грануляционная ткань с большим количеством фибробластов (рис. 2).

В перинфарктной зоне миокарда сильно выражена волнообразная деформация и фрагментация клеток сердечной мышцы. В КМ выявляется слабо выраженная поперечная исчерченность. Ядра КМ хорошо различимы (рис. 3). Количество сосудов незначительно.

В условно интактной зоне миокарда большая часть КМ имеет характерную форму и величину. Однако ближе к перинфарктной зоне визуализируются КМ с волнообразной деформацией и фрагментацией, миофибриллы которых имеют слабую поперечную исчерченность. Между группами этих КМ выявляются очаги кровоизлияний. Эпикард представлен соединительнотканной пластиной, плотно срастающейся с миокардом.

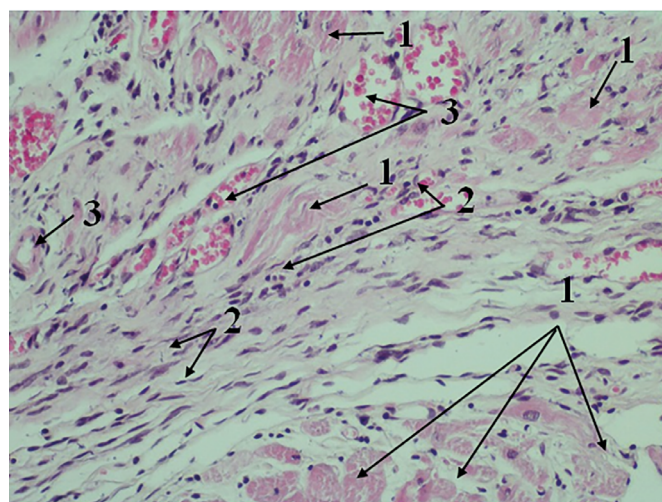


Рис. 2. Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы контрольной группы с ИМ. 28-й день после перевязки левой коронарной артерии:

1 – потеря поперечной исчерченности в КМ; 2 – фибробласты; 3 – сосуды; окраска галлоцианин-эозином. Увеличение $\times 200$

Fig. 2. Microphoto of the cardiac muscle necrosis zone of a control rat with MI. 28th day after ligation of the left coronary artery:

1 – loss of transverse striation in CM; 2 – fibroblasts; 3 – vessels; staining with gallocyanin-eosin ($\times 200$)

У животных основной группы, получавших фабомотизола дигидрохлорид с 1-го по 15-й день после воспроизведения ИМ, как и в контрольной группе, эндокард выстилает изнутри камеры и клапаны сердца, на поперечном срединном срезе миокарда ЛЖ сердца определяется очаг ишемического поражения, перинфарктная зона и условно интактная зона миокарда. Визуально истончение передней стенки ЛЖ и дилатация его полости менее выражены, чем у крыс контрольной группы.

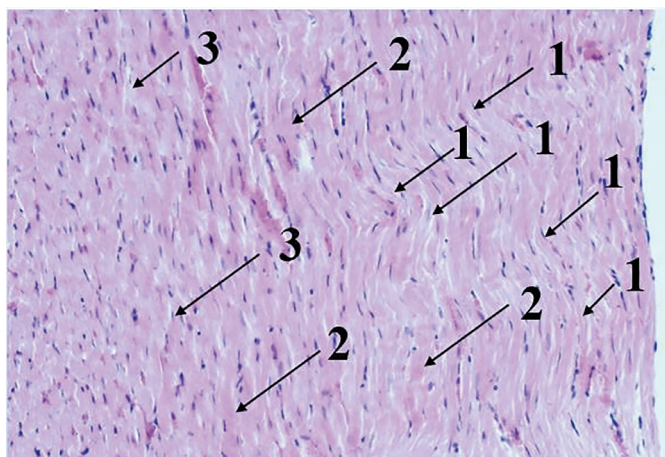


Рис. 3. Микрофотография периинфарктной зоны сердечной мышцы крысы контрольной группы с ИМ. 28-й день после перевязки левой коронарной артерии. Количество сосудов незначительно:

1 – волнообразная деформация КМ; 2 – потеря поперечной исчерченности в КМ; 3 – капилляры в периинфарктной зоне миокарда; окраска галлоцианин-эозином. Увеличение $\times 100$

Fig. 3. Microphoto of the heart muscle periinfarction zone of a control rat with MI. 28th day after ligation of the left coronary artery. The number of vessels is insignificant:

1 – wavelike deformation of CM; 2 – loss of transverse striation in CM; 3 – capillaries in the periinfarction zone of the myocardium; staining with gallocyanine-eosin ($\times 100$)

В зоне некроза, так же как и у контрольных животных, визуализируется неспецифическая грануляционная ткань, в значительной мере замещённая соединительной тканью. Однако, в отличие от контроля, в грануляционной ткани, преимущественно на границе с периинфарктной зоной, в поле зрения присутствует большое количество сосудов (рис. 4).

Периинфарктная зона миокарда также лучше васкуляризирована, чем у животных контрольной группы, а степень волнообразной деформации и фрагментации КМ меньше. Большинство миофибрилл в периинфарктной зоне, в отличие от контроля, имеют выраженную поперечную исчерченность. Ядра КМ хорошо различимы (рис. 5).

В условно интактной зоне преобладают КМ характерной формы и величины с выраженной поперечной исчерченностью миофибрилл и неизменёнными ядрами. Между отдельными группами КМ в этой зоне обнаруживаются небольшие кровоизлияния. Деформированные КМ практически отсутствуют. Эпикард представлен соединительнотканной пластиной, плотно срастающейся с миокардом.

Результаты проведённого микроскопического исследования свидетельствуют о том, что систематическая экспериментальная терапия фабототизола дигидрохлоридом, проводимая в период с 15-го по 28-й день после воспроизведения ИМ, оказывает кардиопротективное действие:

– дилатация полости ЛЖ и истончение его стенок у животных, получавших фабототизола дигидрохлорид, менее выражены, чем у контрольных крыс с ИМ.

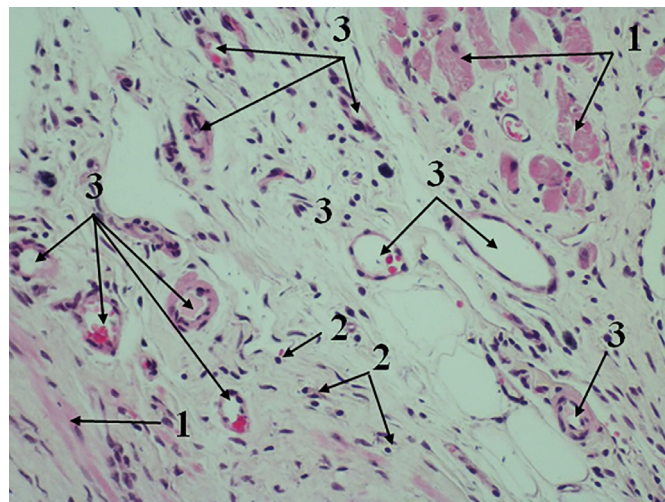


Рис. 4. Микрофотография зоны некроза сердечной мышцы крысы, получавшей фабототизола дигидрохлорид (15 мг/кг/сут в/б с 15-го по 28-й день ИМ):

1 – плазмокоагуляция, потеря поперечной исчерченности в КМ; 2 – фибробласты; 3 – сосуды; окраска галлоцианин-эозином. Увеличение $\times 200$

Fig. 4. Microphoto of the cardiac muscle necrosis zone of a rat treated with fabomotizol dihydrochloride (15 mg/kg / day i.p. from the 15th to the 28th day MI):

1 – plasmocoagulation, loss of transverse striation in CM; 2 – fibroblasts; 3 – vessels; staining with gallocyanine-eosin ($\times 200$).

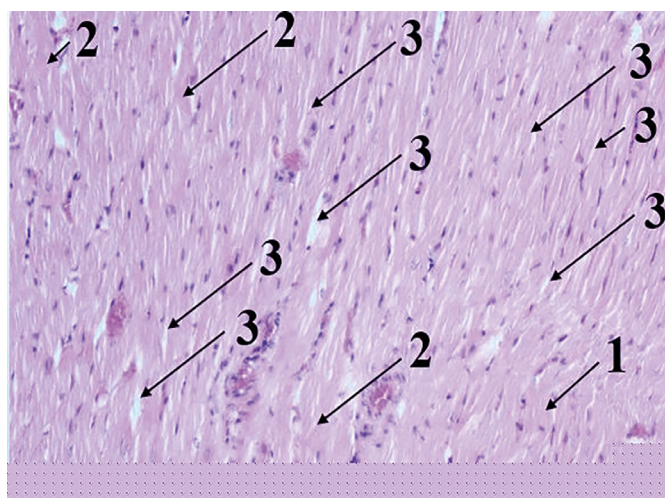


Рис. 5. Микрофотография периинфарктной зоны сердечной мышцы крысы, получавшей фабототизола дигидрохлорид (15 мг/кг/сут в/б с 15-го по 28-й день ИМ). Миокард хорошо васкуляризирован:

1 – волнообразная деформация КМ; 2 – потеря поперечной исчерченности; 3 – капилляры в периинфарктной зоне миокарда; окраска галлоцианин-эозином. Увеличение $\times 100$.

Fig. 5. Microphoto of the heart muscle periinfarction zone of a rat treated with fabomotizol dihydrochloride (15 mg/kg / day i.p. from the 15th to the 28th day of MI). The myocardium is well vascularized:

1 – undulating deformation of CM; 2 – loss of transverse striation; 3 – capillaries in the periinfarction zone of the myocardium; staining with gallocyanine-eosin ($\times 100$).

— волнообразная деформация и фрагментация КМ в перинфарктной зоне у крыс, получавших фабомотизола дигидрохлорид, менее выражены, чем в контрольной группе.

— у крыс, получавших фабомотизола дигидрохлорид, в отличие от животных контрольной группы, миофибриллы в перинфарктной зоне миокарда имеют выраженную поперечную исчерченность.

— если у животных контрольной группы количество сосудов в перинфарктной зоне незначительно, то у крыс, получавших фабомотизола дигидрохлорид, перинфарктная зона хорошо васкуляризирована.

Известно, что кардиопротективное действие фабомотизола в определённой мере связано с его агонистическим влиянием в отношении σ_1 -рецепторов, которые рассматривают как эволюционно сложившийся «ремонтный комплекс» клетки [2]. Можно предполагать, что улучшение морфофункциональ-

ного состояния КМ объясняется такими свойствами σ_1 -рецепторов, как способность оптимизировать гомеостаз ионов Ca^{2+} [9, 10] и энергообразующую функцию митохондрий [11] в КМ.

Выводы / Conclusions

Согласно результатам морфологических исследований, выполненных на модели подострой ишемии миокарда у крыс, продемонстрировано, что систематическая терапия фабомотизола дигидрохлоридом способствует не только значимому уменьшению зоны некроза, но и в определённой мере препятствует развитию раннего постинфарктного ремоделирования. У животных, получавших фабомотизола дигидрохлорид, в отличие от контрольных крыс, в сердечной мышце преобладают репаративные процессы.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошкина Ирина Александровна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN-код: 4697-7938

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

Miroshkina Irina A.

Corresponding author

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3208-198X>

SPIN code: 4697-7938

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

Сорокина Александра Валериановна

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

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

Sorokina Alexandra V.

e-mail: alex54.sorokina@icloud.com

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

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

Цорин Иосиф Борисович

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скрининга
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Tsorin Iosif B.

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>

SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. Biological, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Столярук Валерий Николаевич

e-mail: char11@qip.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>

SPIN-код: 3405-8229

к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Stolyaruk Valeryi N.

e-mail: char11@qip.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-4779-427X>

SPIN code: 3405-8229

PhD Med. Sci., Senior Researcher Scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Крыжановский Сергей Александрович

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN-код: 6596-4865

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

Дурнев Андрей Дмитриевич

e-mail: durnev@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN-код: 8426-0380

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kryzhanovskiy Sergey A.

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Durnev Andrey D.

e-mail: durnev@academpharm.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

SPIN code: 8426-0380

Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г., Бледнов Ю.А., Бадыштов Б.А., Виглинская И.В., Козловская М.М., Колотилинская Н.В., Яркова М.А., Савельев В.Л., Гарибова Т.Л., Вальдман Е.А. Фармакогенетическая концепция анксиоселективного эффекта. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 1998;4(11):3–9. [Seredenin SB, Voronina TA, Neznamov GG, Blednov YA, Badyshtov BA, Viglinskaya IV, Kozlovskaya MM, Kolotilinskaya NV, Yarkova MA, Savel'ev VL, Garibova TL, Val'dman EA. Farmakogeneticheskaya kontseptsiya anksioselektivnogo effekta. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 1998;4(11):3–9. (In Russ).]
2. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009;72(1):3–11. [Seredenin SB, Voronin MV. Neuroreceptor Mechanisms Involved in the Action of Afobazole. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2009;72(1):3–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2009-72-1-3-11.
3. Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А. Изучение эффектов афобазола на модели реперфузионных аритмий. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010;4:41–45. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. Investigation of Afobazol Effects on a Model of Reperfusion Arrhythmias. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2010;4:41–45. (In Russ).].
4. Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Оценка эффективности афобазола на модели ваготонической фибрилляции предсердий. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2010;4:49–52. [Stolyaruk VN, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Evaluation of Afobazol Efficiency on a Model of Vagotonic Atrial Fibrillation. *Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk*. 2010;4:49–52. (In Russ).].
5. Крыжановский С.А., Сорокина А.В., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Изучение антиишемического действия «Афобазола» в условиях экспериментального инфаркта миокарда. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2010;150(9):284–287. [Kryzhanovskii SA, Sorokina AV, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Miroshkina IA, Tsorin IB, Durnev AD. Study of Anti-ischemic Effect of Afobazole in Experimental Myocardial Infarction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2010;150(9):284–287. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-011-1131-4.
6. Мирошкина И.А., Ионова Е.О. Изучение влияния афобазола на ремоделирование левого желудочка сердца на модели острого инфаркта миокарда. Достижения современной фармакологической науки. Сборник материалов Всероссийской конференции молодых ученых с Международным участием, посвященной 150-летию со дня рождения академика Н.П. Кравкова. Рязань, 2015;208–213. [Miroshkina IA, Ionova EO. Izuchenie vliyaniya afobazola na remodelirovanie levogo zheludochka serdtsa na modeli ostrogo infarkta miokarda. Dostizheniya sovremennoi farmakologicheskoi nauki. Sbornik materialov Vserossiiskoi konferentsii molodykh uchenykh s Mezhdunarodnym uchastiem, posvyashchennoi 150-letiyu so dnya rozhdeniya akademika N.P. Kravkova. Ryazan'. 2015;208–213. (In Russ).].
7. Selye AI, Bajuz E, Crasso S, Nendell P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. 1960;11:398–407. DOI: 10.1177/000331976001100505.
8. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. Смоленск: САУ; 2000. [Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo. Smolensk: SAU; 2000. (In Russ).]
9. Tchedre KT, Huang RQ, Dibas A, Krishnamoorthy RR, Dillon G.H, Yorio T. Sigma-1 receptor regulation of voltage-gated calcium channels involves a direct interaction. *Investigative Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):4993–5002. DOI: 10.1167/iops.08-1867.
10. Tagashira H, Bhuiyan MS, Fukunaga K. Diverse regulation of IP3 and ryanodine receptors by pentazocine through σ 1-receptor in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(8):1201–1212. DOI: 10.1152/ajpheart.00300.2013.
11. Mammucari C, Patron M, Granatiero V, Rizzuto R. Molecules and roles of mitochondrial calcium signaling. *Biofactors*. 2011;37(3):219–227. DOI: 10.1002/biof.160.

К возможности выявления синдрома «коронарного обкрадывания» на мелких лабораторных животных

Цорин И. Б., Симоненко С. А., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А.

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

Аннотация. Цель исследования. Изучение возможности применения метода лазерной доплеровской флоуметрии для оценки микроциркуляции крови и анализа механизмов её регуляции в условно-интактном и ишемизированном миокарде у мелких лабораторных животных (крыс) для идентификации синдрома «коронарного обкрадывания». **Материалы и методы.** Опыты проводили на белых беспородных наркотизированных (уретан 1300 мг/кг в/б) крысах-самцах массой 200–250 г. Через 28 суток после воспроизведения экспериментального инфаркта миокарда в условиях открытой грудной клетки и искусственной вентиляции лёгких методом лазерной доплеровской флоуметрии оценивали уровень микроциркуляции в условно-интактной и ишемизированной зонах миокарда. Используя спектральный вейвлет анализ, проводили определение нормированных к общей перфузии амплитуд осцилляций микрокровотока, связанных с различными механизмами регуляции. **Результаты.** Установлено, что показатель микроциркуляции значительно ниже в ишемизированной зоне миокарда по сравнению с условно-интактной ($17,3 \pm 2,8$ и $30,3 \pm 1,3$ пер. ед., соответственно, $p = 0,006$, $n = 8$). Спектральный вейвлет анализ показал, что в зоне ишемического повреждения, по сравнению с условно-интактным миокардом, амплитуды осцилляций микрокровотока, нормированные на общий уровень микроциркуляции, увеличиваются для всех механизмов регуляции. **Заключение.** Метод лазерной доплеровской флоуметрии может быть применён для оценки интенсивности микроциркуляции в условно-интактном и ишемизированном миокарде. Использование этого метода даёт возможность в опытах на мелких экспериментальных животных выявить синдром «коронарного обкрадывания».

Ключевые слова: инфаркт миокарда; микроциркуляция; лазерная доплеровская флоуметрия; спектральный вейвлет анализ; синдром «коронарного обкрадывания» у крыс

Для цитирования:

Цорин И. Б., Симоненко С. А., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А. К возможности выявления синдрома «коронарного обкрадывания» на мелких лабораторных животных. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):36–39. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-36-39>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

To the possibility of detecting the "coronary theft" syndrome in small laboratory animals

Tsorin IB, Simonenko SA, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The purpose of the study. There are investigation of the possibility of using the laser Doppler flowmetry method to assess blood microcirculation and analyze the mechanisms of its regulation in conditionally intact and ischemic myocardium in small laboratory animals (rats) to identify the "coronary theft" syndrome. **Materials and methods.** The experiments were carried out on white mongrel anesthetized (urethane 1300 mg/kg /b) male rats weighing 200–250 g. 28 days after the reproduction of an experimental myocardial infarction in an open chest and artificial lung ventilation, the microcirculation level was assessed in conditionally intact and ischemic areas of the myocardium by laser Doppler flowmetry. Using spectral wavelet analysis, the amplitudes of microcirculation oscillations normalized to the total perfusion associated with various regulation mechanisms were determined. **Results.** It was found that the microcirculation level is significantly lower in the ischemic zone of the myocardium compared with the conditionally intact one (17.3 ± 2.8 and 30.3 ± 1.3 per. units, respectively, $p = 0.006$, $n = 8$). Spectral wavelet analysis showed that in the ischemic injury zone, in comparison with the conditionally intact myocardium, the amplitudes of microcirculation oscillations normalized to the general level of microcirculation increase for all regulatory mechanisms. **Conclusion.** The laser Doppler flowmetry method can be used to assess the intensity of microcirculation in conditionally intact and ischemic myocardium. Using this method makes it possible to identify the "coronary theft" syndrome in experiments on small experimental animals.

Keywords: Myocardial infarction; microcirculation; laser Doppler flowmetry; spectral wavelet analysis; "coronary theft" syndrome in rats

For citations:

Tsorin IB, Simonenko SA, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA. To the possibility of detecting the "coronary theft" syndrome in small laboratory animals. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):36–39. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-36-39>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021

Введение / Introduction

При изучении фармакологических средств, предлагаемых для лечения больных ишемической болезнью сердца, большое значение имеет изучение их влияния на кровоснабжение условно-интактного и ишемизированного миокарда, с целью определения наличия/отсутствия синдрома «коронарного обкрадывания» [1]. Ранее для этих целей использовали метод регистрации ретроградного кровотока в дистальном отрезке нисходящей ветви левой коронарной артерии с одновременной оценкой объёмной скорости кровотока в огибающей ветви левой коронарной артерии с помощью электромагнитного или ультразвукового

измерителя потока крови. Модификацией вышеупомянутого метода является оценка кровоснабжения различных зон миокарда по венозному оттоку, измеряемому с помощью ультразвукового измерителя потока крови. Однако эти эксперименты можно проводить только на крупных животных (собаки, свиньи и т. п.) [1–3]. Изучение кровотока в различных зонах миокарда также возможно с помощью метода меченных радиоактивными изотопами микросфер, излучающих гамма-лучи. Однако этот метод требует специально оборудованного блока для работы с радиоактивными изотопами. Кроме того, радиоактивные микросферы закупоривают мелкие сосуды, поэтому более четырёх изотопов, как правило, не применяют, следовательно

кровоток можно оценить только в 4 временных точках [4, 5]. Следует также отметить, что все вышеперечисленные методы не позволяют отдифференцировать нутритивный кровоток от потока по шунтам.

Всех этих недостатков лишён метод лазерной доплеровской флоуметрии, который позволяет оценить в локальной точке интенсивность микроциркуляции, измеренной в перфузионных единицах (перф. ед.). Проведённые этим методом исследования дают возможность с помощью спектрального вейвлет анализа определить абсолютные и нормированные к стандартному отклонению и общей перфузии амплитуды эндотелиальных (A_e), нейрогенных (A_n), миогенных (A_m), пульсовых (A_p) и дыхательных (A_d) осцилляций микрокровотока и показатель шунтирования (ПШ) [6–8].

Целью данного исследования явилось изучение возможности применения метода лазерной доплеровской флоуметрии для оценки микроциркуляции и анализа механизмов её регуляции в условно-интактном и ишемизированном миокарде мелких лабораторных животных (крыс) и выявления, таким образом, синдрома «коронарного обкрадывания».

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 200–250 г, полученных из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при контролируемом освещении (12 ч – свет/12 ч – темнота) и постоянной температуре (21–23 °C) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования. Условия содержания животных соответствовали ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» (Переиздание) и ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами» (Переиздание). Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, установленными международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол. Инфаркт миокарда воспроизводили по методу Selye [9]. Через 28 суток у наркотизированных животных (уретан 1300 мг/кг в/б) в условиях открытой грудной клетки и искусствен-

ного дыхания, проводимого с помощью аппарата искусственной вентиляции лёгких для грызунов (Ugo Basile, Италия), измеряли уровень микроциркуляции в условно-интактной и ишемизированной зонах миокарда. Эксперименты проводили на подогреваемом лабораторном столике ($t = 38\text{ °C}$) Surgi Suite, Kent Scientific Corporation, США. Температуру в лабораторной комнате поддерживали в пределах 24–25 °C.

Метод измерения микроциркуляции. Оценку микроциркуляции в миокарде проводили методом лазерной доплеровской флоуметрии с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАКК-ОП2» (производство НПП «Лазма», Россия) с использованием программы LDF 3.0.2.395. Световодные зонды фиксировали на поверхности левого желудочка сердца в условно-интактной и ишемизированной зонах. Длительность записи показателей микроциркуляции в каждой точке составляла 8 минут. При оценке микрокровотока рассчитывались показатель микроциркуляции (М) в перфузионных единицах (перф. ед.) и его коэффициент вариации (K_v). На втором этапе с помощью спектрального вейвлет анализа проводили определение абсолютных и нормированных к общей перфузии амплитуд эндотелиальных (A_e), нейрогенных (A_n), миогенных (A_m), пульсовых (A_p) и дыхательных (A_d) осцилляций микрокровотока и показателя шунтирования (ПШ). Такой подход даёт возможность судить о роли различных механизмов регуляции микрокровотока в изменениях кровоснабжения миокарда, вызываемых фармакологическими веществами [6–8].

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили следующим образом. Нормальность распределения данных проверяли по критерию Шапиро–Уилка. Так как результаты измерений микроциркуляции крови были распределены по нормальному закону, то для определения значимости различий использовали t -критерий Стьюдента для зависимых выборок. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Распределение результатов частотного анализа механизмов регуляции микроциркуляции значительно отличалось от нормального, в связи с этим для их статистической обработки применяли непараметрический знаково-ранговый критерий Вилкоксона. Полученные результаты представляли в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Анализ полученных результатов показал, что в зоне ишемического повреждения уровень микроциркуляции значительно ниже, чем в условно-интактном миокарде ($17,3 \pm 2,8$ и $30,3 \pm 1,3$ пер. ед., соответственно, $p = 0,006$, $n = 8$). Согласно данным,

Таблица

Амплитуды эндотелиальных, нейрогенных, миогенных, пульсовых и дыхательных осцилляций микрокровоотока, нормированные к общей перфузии ($n = 7$)

Table

Amplitudes of endothelial, neurogenic, myogenic, pulse and respiratory oscillations of microcirculation normalized to total perfusion ($n = 7$)

	A_e/M A_e/M	A_n/M A_n/M	A_m/M A_m/M	A_c/M A_c/M	A_r/M A_r/M	ППШ ISh
Условно-интактная зона / Conditionally intact zone	0,74 0,38–0,79	0,54 0,41–0,60	0,54 0,52–1,20	4,61 3,06–10,36	1,29 0,70–1,45	—
Зона повреждения / Damage zone	2,51 0,98–4,74	2,60 0,78–4,62	3,45 1,35–8,53	22,18 20,97–40,01	6,61 1,61–10,99	0,64 0,50–0,74
P различий между условно-интактным и повреждённым миокардом / P differences between conditionally intact and damaged myocardium	0,018	0,028	0,028	0,028	0,028	0,173

Примечание: показаны медианы, нижний и верхний квартили.

Note: the medians and the lower, upper quartiles are shown.

полученным при проведении спектрального вейвлет анализа, в зоне ишемического повреждения, по сравнению с условно-интактным миокардом, амплитуды осцилляций микрокровоотока различного происхождения, нормированные на общий уровень микроциркуляции, увеличиваются для всех оцененных механизмов регуляции в 3–5 раз, возрастает также и межквартильный размах этих показателей. Увеличение нормированных амплитуд эндотелиальных осцилляций (A_e/M) указывает на усиление метаболической активности эндотелия и рост уровня секреции оксида азота, что приводит к расширению сосудов. Увеличение амплитуд нейрогенных осцилляций (A_n/M) свидетельствует об активацию регуляторных симпатических влияний на артериолярный тонус. Рост нормированных амплитуд миогенных осцилляций (A_m/M) связан с усилением активности прекапиллярных сфинктеров и прекапиллярных метаартериол. Рост амплитуд дыхательных (A_d/M) и пульсовых (A_c/M) ритмов указывает на усиление модуляций венозного микрокровоотока и рост перфузионного давления в микрососудах, соответственно [6–8]. Таким образом, можно полагать, что в условиях ишемического по-

ражения «усиливается» напряжённость механизмов регуляции микроциркуляции и наблюдается их «разбалансировка». В то же время показатель шунтирования не меняется (таблица). Эти данные указывают на то, что доля нутритивного микрокровоотока в зоне поражения практически не меняется [6–8].

Таким образом, метод лазерной доплеровской флоуметрии с помощью компьютеризированного лазерного анализатора «ЛАКК-ОП2» с использованием программы LDF 3.0.2.395 может быть применён для оценки интенсивности микроциркуляции в условно-интактном и ишемизированном миокарде, а также для анализа изменений активности различных механизмов регуляции. Так как с помощью лазерной доплеровской флоуметрии можно одновременно выявить уменьшение кровоснабжения зоны ишемии и оценить изменения кровотока в условно-интактном миокарде в условиях действия фармакологических веществ, то использование этого метода даёт возможность в опытах на мелких экспериментальных животных выявить синдром «коронарного обкрадывания» у изучаемых веществ.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цорин Иосиф Борисович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории

фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Tsorin Iosif B.

Corresponding author

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-3988-7724>

SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. Biological, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Симоненко София Алексеевна

e-mail: irvik98@gmail.com

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

Simonenko Sophia A.

e-mail: irvik98@gmail.com

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

Вититнова Марина Борисовна

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

SPIN-код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории

фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Vititnova Marina B.

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7407-7516>

SPIN code: 1901-8919

PhD Biological Sci., Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Крыжановский Сергей Александрович

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN-код: 6596-4865

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

Kryzhanovskiy Sergey A.

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-4739>

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Чичканов Г.Г., Цорин И.Б. Методические рекомендации по изучению противоишемического (антиангинального) действия лекарственных средств. // В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. I. — М.: Гриф и К; — 2013. — С. 417–433. [Chichkanov GG, Tsorin IB. Methodological recommendations for the study of anti-ischemic (antianginal) effects of drugs. In the book: Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part I. Moscow: Grif and K; 2013. (In Russ).].
2. Толмачева Е.А. Новый антиаритмический препарат боннекор: некоторые аспекты фармакодинамики и фармакокинетики. — Дисс. Канд. Мед. Наук. — М.; 1988. [Tolmacheva EA. New antiarrhythmic drug bonnecor: some aspects of pharmacodynamics and pharmacokinetics. [dissertation] Moscow; 1988. (In Russ).].
3. Stavrakis S, Terrovitis J, Tsolakis E, Drakos S, Dalianis A, Bonios M, Koudoumas D, Malliaras K, Nanas J. Relationship between retrograde coronary blood flow and the extent of no-reflow and infarct size in a porcine ischemia-reperfusion model. *J Cardiovasc Transl Res*. 2011;4(1):99–105. DOI: 10.1007/s12265-010-9240-4.
4. Miura T, Downey JM. Critical collateral bloodflow level for salvage of ischemic myocardium. *Can J Cardiol*. 1989;5(4):201–205.
5. Arellano R, Jiang MT, O'Brien W, Hossain I, Boylen P, Demajo W, Cheng DC. Acute graded hypercapnia increases collateral coronary blood

flow in a swine model of chronic coronary artery obstruction. *Crit Care Med*. 1999;27(12):2729–2734. DOI: 10.1097/00003246-199912000-00021.

6. Крупаткин А.И., Сидоров В.В. Функциональная диагностика состояния микроциркуляторно-тканевых систем, Колебания, информация, нелинейность. — М.; Книжный дом «Либроком»: 2014; 498 с. [Krupatkin AI, Sidorov VV. Functional diagnostics of the state of microcirculatory-tissue systems, Vibrations, information, nonlinearity. Moscow; Book house "Librocom": 2014. (In Russ).].

7. Сидоров В.В., Рыбаков Ю.Л., Гукасов В.М. Диагностический подход для оценки состояния микроциркуляторно-тканевой системы с использованием лазерных технологий и температурной функциональной пробы. *Иноватика и экспертиза*. 2018;1(22):135–142. [Sidorov VV, Rybakov YL, Gukasov VM. Diagnostic approach for estimation of the state of microcirculator-tissue system using laser technologies and temperature functional sample. *Innovation and expertise*. 2018;1(22):135–142. (In Russ).].

8. Раваева М.Ю., Чуян Е.Н., Бирюкова Е.А., Аблаева Р.Н., Файчук С.Н. Показатели микроциркуляции крыс, находящихся в условиях комбинированного действия хронического и острого стресса. *Орбиталь*. 2018;2(3):23–29. [Ravaeva MYu, Chuyan EN, Birukova EA, Ablaeva RN, Faichuk SN. Parameters of rats microcirculation under chronic and acute stress combined action. *Orbital*. 2018;2(3):23–29. (In Russ).].

9. Selye AI, Bajuz E, Crasso S, Nendell P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. 1960;11:398–407. DOI: 10.1177/000331976001100505.

Влияние пирацетама и фенотропила на метаболизм дофамина и серотонина в мозге субпопуляций мышей CD-1, различающихся по устойчивости внимания

Сухорукова Н. А., Кудрин В. С., Наркевич В. Б., Ковалёв Г. И.

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

Аннотация. Изучено влияние субхронического введения ноотропного средства фенотропила (100 мг/кг/сутки) на поведение аутбредных мышей CD-1 в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт». Предварительно популяция мышей была разделена на субпопуляции по величине индекса внимания особей к незнакомым объектам в отсеках лабиринта – высоковнимательных (ED-high) и низковнимательных (ED-low). Установлено, что фенотропил повышал индекс внимания у ED-low, однако ухудшал его в субпопуляции ED-high, а также изменял показатели тревожности и двигательной активности, что отличало его от более селективного эффекта пирацетама (200 мг/кг/сутки). Большая избирательность пирацетама отражалась и в отношении метаболизма дофамина в ткани префронтальной коры мозга: препарат нормализовал метаболический оборот как внутриклеточного (ДОФУК/ДА), так и внеклеточного (ГВК/ДА) дофамина, тогда как фенотропил корректировал лишь первый. Таким образом, положительное влияние пирацетама на индекс внимания у мышей ED-low соответствует нормализации обоих показателей метаболизма дофамина в префронтальной коре, а фенотропил проявлял неизбирательность как в отношении поведенческих, так и нейрохимических параметров. Оба препарата практически не затрагивали метаболизм серотонина как в коре, так и в стриатумах мышей обеих субпопуляций.

Ключевые слова: пирацетам; фенотропил; дефицит внимания; дофамин; серотонин; метаболиты; префронтальная кора; стриатум; мыши CD-1; ВЭЖХ/ЭД

Для цитирования:

Сухорукова Н.А., Кудрин В.С., Наркевич В.Б., Ковалёв Г.И. Влияние пирацетама и фенотропила на метаболизм дофамина и серотонина в мозге субпопуляций мышей CD-1, различающихся по устойчивости внимания. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):40–46. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-40-46>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

The influence of Piracetam and Phenotropil on brain dopamine and serotonin metabolism in CD-1 mice sub-populations, diverging in attention sustainability

Sukhorukova NA, Kudrin VS, Narkevich VB, Kovalev GI

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The effect of subchronic administration of the nootropics Phenotropil (100 mg/kg/day) on the behavior of CD-1 outbred mice in the "closed enriched cross maze" test (CECM) was studied. Predominantly, the mouse population was divided into subpopulations according to their values of individual attention index for novel objects in the maze compartments – highly attentive (ED-high) and low attentive (ED-low). It was found that Phenotropil increased the attention index in ED-low, but disimproved it in the ED-high subpopulation, and also changed parameters of anxiety and locomotor activity; this distinguished it from the more selective effect of Piracetam (200 mg/kg/day). The higher selectivity of Piracetam was also shown in relation to dopamine metabolism processes in the prefrontal cortex: the drug normalized the metabolic turnover of intracellular (DOPAC/DA) as well as extracellular (HVA/DA) dopamine, while Phenotropil influenced on the former only. Thus, positive effect of Piracetam on the attention level in ED-low mice corresponds to the normalization of both indicators of dopamine metabolism in the prefrontal cortex, while Phenotropil showed non-selectivity onto both behavioral and neurochemical parameters. Piracetam and Phenotropil failed to affect the cortical and striatal serotonin metabolism in both subpopulations.

Keywords: piracetam; phenotropil; attention deficit; dopamine; serotonin; metabolites; prefrontal cortex; striatum; CD-1 mice; HPLC/ED

For citations:

Sukhorukova NA, Kudrin VS, Narkevich VB, Kovalev GI. The influence of Piracetam and Phenotropil on brain dopamine and serotonin metabolism in CD-1 mice subpopulations, diverging in attention sustainability. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):40–46. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-40-46>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021

Введение / Introduction

Внимание является необходимым компонентом для процессов обучения у животных и человека, выработки практических навыков и выполнения заданий различной сложности. Поддержание внимания как когнитивной функции осуществляется на основе согласованной работы различных отделов ЦНС, среди которых ведущая роль принадлежит префронтальным областям лобной коры головного мозга [1]. Лобные доли коры головного мозга отвечают не только за обработку информации, поступающей из окружающей среды, но и за планирование, инициирование и контроль деятельности, обозначаемые в нейрофизиологии

как управляющие функции (executive functions). Нейрохимические механизмы, относящиеся к вниманию, преимущественно связаны с норадренергической и дофаминергической нейромедиаторными системами [2]. Согласно существующей на сегодняшний день дофаминовой гипотезе, нарушения синтеза, метаболизма и транспорта данных катехоламинов опосредуют клиническую картину различных форм дефицита внимания как самостоятельной патологии, так и в качестве коморбидного компонента при иных заболеваниях ЦНС [3]. Полученный практический опыт применения в терапии синдрома дефицита внимания (СДВ) групп фармакологических препаратов, по механизму своего действия оказывающих значимое влияние на

катехоламиновые нейромедиаторные системы (психостимуляторы, антидепрессанты и др.), указывает на их отрицательные эффекты при длительном приёме [4]. В связи с этим существует необходимость дальнейшего изучения нейрохимических механизмов патологии внимания при её экспериментальном моделировании и поиска лекарственных средств, обладающих менее выраженным побочным действием, избирательностью и специфичностью.

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния субхронического введения ноотропных средств пирacetama (200 мг/кг/сутки) и фенотропила (100 мг/кг/сутки) на показатели метаболизма катехол- и индоламинергических систем в префронтальной коре и стриатуме мозга мышей CD-1, связанных с поддержанием функции внимания.

Материалы и методы исследования/ Materials and methods

Эксперимент проводили на самцах аутбредных мышей CD-1, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ, массой 23–30 г ($n = 87$), которых содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в стандартных условиях при свободном доступе к воде и корму. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики». Эксперименты проводили с 10 до 16 ч. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Экспериментальная установка была поставлена ООО «НПК Открытая Наука» (Россия).

Поведенческие методы исследования (Тест «Закрытый обогащенный крестообразный лабиринт», *Enrichment Discrimination test*)

Грызунов подвергали поведенческому тестированию в закрытом обогащённом крестообразном лабиринте (ЗОКЛ) с помощью программы Enrisset. Тест заканчивался, когда животное совершало 12 визитов в отсеки [5]. Критерием разделения животных на субпопуляции служили значения индекса распознавания новых объектов, определяющегося по формуле:

$$ED\text{-ratio} = 100 \times Tenriched / Tempty,$$

где: Tenriched является временем, проведённым животным в рукавах установки с объектами, а Tempty — временем в пустых рукавах, соответственно.

При отсутствии предпочтения рукавов с новыми объектами индекс распознавания составлял около 100 и менее. В популяции мышей CD-1 присутствовало 2 типа особей, которые проявляли (индекс внимания > 120, 60–70 % мышей) или не проявляли (индекс

внимания < 100, 30–40 % мышей) внимание к объектам, имеющимся в лабиринте.

Во время 1-го теста производили отбор особей с поведенческими фенотипами ED-high (ED-ratio > 120) и ED-low (ED-ratio < 100). После отбора грызунов обеих субпопуляций разделяли на контрольную и опытную подгруппы. Изучаемые вещества, растворённые в физрастворе в выбранных дозах, вводили внутривентриально один раз в сутки в течение недели, контрольной группе вводили физраствор в эквивалентных объёмах. Выбор доз и продолжительности введения основывался на данных, полученных ранее в лаборатории радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» [6–8].

Во время 2-го теста, выполнявшегося в той же обстановке через 1 час после заключительной инъекции, оценивали влияние изучаемого вещества на внимание к обстановке у мышей с известным типом исследовательской реакции на объекты, имеющиеся в лабиринте. Далее грызунов декапитировали, мозг извлекали на лёду и выделяли его структуры по схеме [9].

Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД)

Содержание моноаминов и их метаболитов определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД) на хроматографе LC-304T (BAS, США) [10]. Выделенные структуры головного мозга мышей размельчали в гомогенизаторе «стекло–тефлон» (0,2 мм) при скорости вращения пестика 3000 об/мин. Гомогенизацию осуществляли в 0,1 н HClO₄ с добавлением в качестве внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) в количестве 0,5 нмоль/мл. Пробы центрифугировали при 9000 g и температуре 4 °C в течение 10 минут. Надосадочную жидкость в количестве 40 мкл фильтрата методом прямой инъекции наносили на аналитическую колонку Phenomenex C18. Моноамины и их метаболиты разделяли на хроматографе, снабжённом инжектором «Rheodyne 7125» и электрохимическим детектором (LC-304T). В качестве подвижной фазы использовали 0,1 М цитратно-фосфатный буфер, содержащий 0,3 М ионопарного агента октансульфоната натрия, 0,1 М ЭДТА и 8 % ацетонитрила (pH = 3,6). Определение ДА, ДОФУК (3,4-диоксифенилукусная кислота), 3-МТ (3-метокситирамин), ГВК (гомованилиновая кислота), НА, 5-НТ и 5-ГИУК (5-гидроксииндолукусная кислота) осуществляли на стеклоуглеродном электроде при потенциале +0,85 В против Ag/AgCl электрода сравнения. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,7 мл/мин. Регистрация образцов осуществлялась с помощью использования специального программного комплекса Мультихром 1,5 (Амперсенд). Для калибровки хроматографа в качестве стандарта для определения количества веществ в структурах мозга мышей использовали смеси рабочих растворов в концентрации 0,5 нмоль/мл. Величины

концентрации моноаминов в опытных образцах рассчитывали, исходя из отношений площадей пиков в стандартном и экспериментальных образцах.

Статистическая обработка экспериментальных данных осуществлялась с помощью программы Statistica 10.0 согласно «Методическим рекомендациям по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ». Полученные результаты представлены в виде средних значений с учётом стандартной ошибки среднего ($\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$). Различия между субпопуляциями мышей по изучаемым показателям в контрольных и опытных группах оценивали по критерию Манна–Уитни.

Результаты / Results

Результаты тестирования ноотропного средства из группы рацетамов — фенотропила (N-карбамоилметил-4-фенил-2-пирролидон) в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» представлены в табл. 1. Сопоставление их с аналогичными данными об эффектах пирацетама, представленными в нашей недавней публикации [11], свидетельствует о различиях в поведенческих эффектах двух этих ноотропов. Во-первых, 6-кратное введение фенотропила не вызывает изменений в показателях эффективности исследовательского поведения (ЭИП) — длине первого полного обхода боковых отсеков F_PtrN и количестве полных обходов $PatrIN$ в обеих субпопуляциях. Аналогичные данные по влиянию пирацетама указывают, что пирацетам уменьшал количество полных обходов в субпопуляции т. н. «низковнимательных

особей» (ED-low) с 1,5 до 0,9, что свидетельствует о некотором ухудшении эффективности. Во-вторых, пирацетам не изменял показатели тревожности F_ChTm и F_GlTm , тогда как фенотропил существенно уменьшал латентное время первого захода F_ChTm в обеих субпопуляциях. В-третьих, пирацетам не влиял на двигательную активность мышей, тогда как фенотропил ускорял её, но не избирательно в отношении низко- и высоковнимательных особей. Однако оба рацетама восстанавливали индекс внимания Obj_tR , исходно более низкий в субпопуляции ED-low, хотя фенотропил демонстрировал меньшую избирательность, воздействуя также и на субпопуляцию ED-high.

Эти особенности поведения в тесте сопровождались следующими показателями метаболического оборота катехоламинов и серотонина в префронтальной коре мозга (табл. 2): исходно субпопуляция ED-low характеризовалась большими величинами отношений ДОФУК/ДА и ГВК/ДА, тогда как по показателю оборота серотонина (5-ГИУК/5-НТ) разницы не было. После 6-кратного введения пирацетама наблюдалась нормализация оборота как ДОФУК/ДА, так и ГВК/ДА, тогда как фенотропил действовал неизбирательно, изменяя все три отношения в обеих субпопуляциях — оптимизировал значение ДОФУК/ДА, но увеличивал величины ГВК/ДА и 5-ГИУК/5-НТ.

Следовательно, избирательному восстановлению индекса внимания пирацетамом соответствует селективная нормализация оборотов вне- и внутриклеточного дофамина в префронтальной коре, тогда как действию фенотропила отвечают лишь изменения оборота ДОФУК, но не ГВК.

Таблица 1

Влияние субхронического введения фенотропила (100 мг/кг/день, в/б) на показатели поведения субпопуляций мышей аутбредной линии CD-1 в тесте «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» ($m \pm \text{S.E.M.}$)

Table 1

The effect of subchronic administration of phenotropil (100 mg/kg/day, i.p.) on the behavior of subpopulations of outbred CD-1 mice in «closed enriched cross maze test» ($m \pm \text{S.E.M.}$)

Экспериментальная группа/ Показатель [^]	Контроль ED-high (n = 25)	Фенотропил ED-high (n = 25)	Контроль ED-low (n = 18)	Фенотропил ED-low (n = 19)
F_PtrN	6,8 $\pm$ 0,5	6,1 $\pm$ 0,6	6,3 $\pm$ 0,4	7,8 $\pm$ 0,7
$PatrIN$	1,3 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1	1,5 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 0,2
F_ChTm	9,1 $\pm$ 0,4	6,1$\pm$0,3^{&}	8,9 $\pm$ 0,5	5,8$\pm$0,2[#]
F_GlTm	4,9 $\pm$ 1	5,9 $\pm$ 0,6	3,9 $\pm$ 0,4	9$\pm$1,2[#]
T_ChTm	56,4 $\pm$ 4,6	34,3$\pm$2,3[#]	62,1 $\pm$ 4,7	37,9$\pm$2,8^{&}
T_GlTm	54,7 $\pm$ 3,7	33,6$\pm$2,3^{&}	53,9 $\pm$ 4,8	49,5 $\pm$ 6,2
Obj_tR	373,1 $\pm$ 18,6	108,9 $\pm$ 12,2 [#]	51,5$\pm$3,8[*]	295,3$\pm$24,9[#]

Примечания: * — статистически значимое отличие между субпопуляциями, Манна–Уитни U-test, $p < 0,005$; # — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Манна–Уитни U-test, $p < 0,005$; & — статистически значимое отличие между контрольной и опытной группами, Манна–Уитни U-test, $p < 0,05$; ^ — пояснения в разделе Результаты и обсуждения.

Notes: * — statistically significant difference between subpopulations, Mann–Whitney U-test, $p < 0.005$; # — statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U-test, $p < 0.005$; & — statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U-test, $p < 0.005$; ^ — explanations are given in the Results and discussion.

Таблица 2

Влияние субхронического введения пирацетама и фенотропила на показатели оборота моноаминов в префронтальной коре мозга субпопуляций мышей CD-1 (нмоль/г ткани, $m \pm S.E.M$)

Table 2

The effect of subchronic administration of piracetam and phenotropil on monoamine turnover parameters in the prefrontal cortex of subpopulations of outbred CD-1 mice (nmol/g of tissue, $m \pm S.E.M$)

Оборот моноаминов	Контроль ED-high	Препарат ED-high	Контроль ED-low	Препарат ED-low
Пирацетам 200 мг/кг, внутривенно				
ДОФУК/ДА	0,13±0,04	0,17±0,05	0,35±0,07*	0,10±0,01[#]
ГВК/ДА	0,79±0,2	1,00±0,20	2,69±0,60*	0,79±0,20[#]
5-ГИУК/5-НТ	0,17±0,01	0,38±0,20	0,20±0,02	0,30±0,02[#]
Фенотропил 100 мг/кг, внутривенно				
ДОФУК/ДА	0,14±0,03	0,04±0,003[#]	0,27±0,05*	0,10±0,01[#]
ГВК/ДА	0,16±0,03	0,27±0,02[#]	0,41±0,10*	0,96±0,10[#]
5-ГИУК/5-НТ	0,22±0,02	0,30±0,02[#]	0,20±0,01	0,32±0,02[#]

Примечания: * – статистически значимое отличие между субпопуляциями, Манна–Уитни U-test, $p < 0,05$; [#] – статистически значимое отличие между опытной и контрольной группами, Манна–Уитни U-test, $p < 0,05$.
Notes: * – statistically significant difference between subpopulations, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; [#] – statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$.

Таблица 3

Влияние субхронического введения пирацетама и фенотропила на показатели оборота моноаминов в стриатумах мозга субпопуляций мышей CD-1 (нмоль/г ткани, $m \pm S.E.M$)

Table 3

The effect of subchronic administration of piracetam and phenotropil on monoamine turnover parameters in the striatum of subpopulations of outbred CD-1 mice (nmol/g of tissue, $m \pm S.E.M$)

Оборот моноаминов	Контроль ED-high	Препарат ED-high	Контроль ED-low	Препарат ED-low
Пирацетам 200 мг/кг, внутривенно				
ДОФУК/ДА	0,019±0,001	0,017±0,001	0,023±0,001	0,06±0,01
ГВК/ДА	0,096±0,001	0,094±0,001	0,091±0,0	0,20±0,03[#]
5-ГИУК/5-НТ	0,70±0,10	0,90±0,30	0,69±0,08	0,66±0,06
Фенотропил 100 мг/кг, внутривенно				
ДОФУК/ДА	0,026±0,001	0,01±0,001[#]	0,025±0,001	0,036±0,010
ГВК/ДА	0,084±0,008	0,090±0,004	0,086±0,004	0,105±0,008
5-ГИУК/5-НТ	0,33±0,07	0,38±0,07	0,25±0,02	0,34±0,04

Примечание: * – статистически значимое отличие между субпопуляциями, Манна–Уитни U-test, $p < 0,05$; [#] – статистически значимое отличие между опытной и контрольной группами, Манна–Уитни U-test, $p < 0,05$.
Notes: * – statistically significant difference between subpopulations, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$; [#] – statistically significant difference between control and experimental groups, Mann–Whitney U-test, $p < 0,05$.

Обсуждение / Discussion

Считается общепринятым, что патология внимания представляет собой заболевание, обусловленное генетическими, физиологическими и нейрохимическими изменениями в центральной нервной системе [12]. Его патофизиология, всё ещё недостаточно изученная, включает изменения дофаминергической активности, преимущественно в мезокортиколимбической системе [13], сопровождающиеся ослаблением фронто-базальных функций мозга [14].

В настоящее время психостимуляторы, избирательные ингибиторы транспортеров катехоламинов (например, метилфенидат), являются наиболее эффективными средствами при синдроме дефицита внимания, однако риск развития зависимости сильно ограничивает их широкое применение [15]. Другими потенциальными средствами считаются селективные ингибиторы захвата норадреналина и серотонина, обладающие антидепрессантоподобным эффектом (например, атомоксетин) [16]. Однако длительное использование данных групп препаратов, выражен-

но изменяющих процессы метаболизма, секреции и транспорта нейромедиаторов в синаптических окончаниях, сопряжено с множественными отрицательными эффектами. В этом плане ноотропные средства обладают большей шириной терапевтического диапазона, меньшей выраженностью побочных эффектов и накопительным действием на протяжении продолжительной фармакотерапии, необходимой для пациентов с СДВ-Г [4].

Нами с использованием неинвазивного теста «закрытый обогащённый крестообразный лабиринт» [17] на аутистических мышях CD-1 была продемонстрирована эффективность в коррекции дефицита внимания таких ноотропов, как фенибут [18], пантогам [19], семакс [20], пираретам [11]. В продолжение этой серии в настоящей работе было проведено изучение эффектов фенильного производного пираретама — фенотропила на поведение в тесте ЗОКЛ и метаболизм дофамина и серотонина в префронтальной коре и стриатуме (табл. 3) мышей — структурах мозга, предполагаемых мишенях расстройств внимания [21, 22].

Показано, что фенотропил в значительной степени восстанавливает индекс внимания в субпопуляции мышей со сниженным вниманием к новым объектам. Однако эффект этот не является избирательным, так как ухудшает этот показатель в группе с исходно высоким уровнем внимания. Кроме того, фенотропил так же неизбирательно по отношению к обеим субпопуляциям воздействует на уровни тревожности и двигательную активность. В целом, по сравнению с фенотропилом пираретам как средство коррекции внимания выглядит предпочтительнее [11].

Аналогичное преимущество сохраняется за пираретамом по отношению к показателям метаболизма дофамина в префронтальной коре: препарат нормализует индекс внимания именно у субпопуляции ED-low, которой присущи исходно высокие величины отношений ДОФУК/ДА и ГВК/ДА, отражающих интенсивность, соответственно, внутри- и внеклеточного метаболизма дофамина. Фенотропил же при этом корректировал лишь внутриклеточный метаболизм, но не специфично по отношению к субпопуляциям.

Недавно мы показали, что мозг мышей субпопуляции ED-low характеризуется повышенной плотностью

дофаминовых D_2 -рецепторов в префронтальной коре, количество которых не изменяется под влиянием пираретама, повышающим индекс внимания [11]. Предполагая, что патофизиология дефицита внимания заключается в снижении дофаминергической активности в ПФК [21], можно допустить, что увеличение D_2 -рецепторов и ускорение внутриклеточного (ДОФУК/ДА) и внеклеточного (ГВК/ДА) метаболизма у дефицитарных особей носит компенсаторный характер на снижение синаптической активности дофамина, а их уменьшение отражает положительный фармакотерапевтический эффект пираретама и, в некоторой степени, фенотропила.

Можно также предположить, что мягкий стимулирующий эффект этих ноотропов обеспечивается холинергическим механизмом, поскольку (а) в префронтальной коре мозга присутствует холинергическая иннервация [23], осуществляющая дофамин-активирующий эффект с помощью $\alpha 4\beta 2$ н-холинорецепторов [24]; (б) сам никотин относится к психостимуляторам, эффекты которых оказывают терапевтический эффект при дефиците внимания, хотя и обладают аддитивным потенциалом [25]; (в) механизмы регуляции ДА-ергической синаптической активности (-)-никотином в диапазоне концентраций 0,1 мкМ — 10 мкМ различаются в префронтальной коре и стриатуме [26]; (г) пираретам и фенотропил показали себя лигандами $\alpha 4\beta 2$ н-холинорецепторов с $IC_{50} = 8$ мкМ и $IC_{50} = 6$ мкМ, соответственно [27].

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания № 0521-2019-0009 «Анализ рецепторных механизмов и поиск средств фармакологической протекции ЦНС при нарушениях мозгового кровообращения и когнитивных расстройствах».

Financing. The work was carried out within the framework of State task No. 0521-2019-0009 "Analysis of receptor mechanisms and search for pharmacological protection of the central nervous system in disturbances of cerebral circulation and cognitive disorders".

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare that there is no conflict of interest.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Сухорукова Наталия Альбертовна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: natalipharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6412-4833>

SPIN-код: 2656-4174

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

Sukhorukova Nataliya A.

Corresponding author

e-mail: natalipharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6412-4833>

SPIN code: 2656-4174

Junior researcher, Laboratory of radioisotope research metho FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Кудрин Владимир Сергеевич

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-5125>
SPIN-код: 3986-3262

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

Наркевич Виктор Борисович

к. м. н., с. н. с., лаборатория нейрохимической
фармакологии, ФГБНУ «Научно-
исследовательский институт фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Ковалёв Георгий Иванович

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8597-7018>
SPIN-код: 8461-8814

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

Kudrin Vladimir S.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-0321-5125>
SPIN code: 3986-3262

PhD Med. Sci., Head of the Laboratory of Neuro-
chemical Pharmacology, FSBI «Zakusov Institute
of Pharmacology», Moscow, Russia

Narkevich Victor B.

PhD Med. Sci., Senior Research Scientist, Labora-
tory of Neurochemical Pharmacology, FSBI «Zaku-
sov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Kovalev Georgy I.

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-8597-7018>
SPIN code: 8461-8814

Dr. Sci. (Med.), professor, Head of the Laboratory
of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov
Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Pennington BF, Ozonoff S. Executive functions and developmental psychopathology. *J Child Psychol Psychiatry*. 1996;37(1):51–87. DOI: 10.1111/j.1469-7610.1996.tb01380.x.
2. Rogeness GA, Javors MA, Pliszka SR. Neurochemistry and child and adolescent psychiatry. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*. 1992;31(5):765–781. DOI: 10.1097/00004583-199209000-00001.
3. Ньокитъен Ч. Детская поведенческая неврология. — М.; Теревинф: 2020. — 288 с. — Т. 1-2. [Nyokiktien Ch. Detskaya povedencheskaya nevrologiya. Moscow; Terevinf: 2020. (In Russ).].
4. Заваденко Н.Н. Гиперактивность и дефицит внимания в детском возрасте // Учебное пособие для вузов — М.; Издательство Юрайт: 2019. — 274 с. [Zavadenko NN. Giperaktivnost' i deficit vnimaniya v detskom vozraste. Uchebnoe posobie dlya vuzov. Moscow; Terevinf: Izdatel'stvo YUrait; 2019. (In Russ).].
5. Salimov RM, Kovalev GI. Effect of atomoxetine on behavior of outbred mice in the enrichment discrimination test. *Journal of behavioral and brain science*. 2013;3(02):210–216. DOI: 10.4236/jbbs.2013.32022.
6. Ковалёв Г.И., Фирстова Ю.Ю., Салимов Р.М. Влияние пирacetамa и ацефена на NMDA и никотиновые рецепторы мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения в крестообразном лабиринте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2008;71(1):12–17. [Kovalev GI, Firstova YuYu, Salimov RM. Effects of piracetam and meclofenoxate on the brain NMDA and nicotinic receptors in mice with different exploratory efficacy in the cross maze test. *Eksperimental'nai i Klinicheskaia Farmakologiya*. 2008;71(1):12–17. (In Russ).]. DOI:10.30906/0869-2092-2008-71-1-12-17.
7. Ковалёв Г.И., Ахупкина В.И., Абаймов Д.А., Фирстова Ю.Ю. Фенотропил как рецепторный модулятор синаптической нейротрансдачи. *Атмосфера. Нервные болезни*. 2007;(4):22–26. [Kovalev GI, Akhupkina VI, Abaimov DA, Firstova YuYu. Fenotropil kak receptorniy modulyator sinapticheskoy nejroperedachi. *Atmosfera. Nervnye bolezni*. 2007;(4):22–26. (In Russ).].
8. Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. Влияние ноотропных средств на поведение мышей BALB/c и C57BL/6 в крестообразном лабиринте. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2012;75(7):3–7. [Vasil'eva EV, Salimov RM, Kovalev GI. Effects of nootropic

drugs on behavior of BALB/C and C57BL/6 mice in the exploratory cross-maze test. *Eksperimental'nai i Klinicheskaia Farmakologiya*. 2012;75(7):3–7. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2012-75-7-3-7.

9. Glowinski J, Iversen LL. Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. *J Neurochem*. 1966;13(8):655–669. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1966.tb09873.x

10. Кудрин В.С., Мирошниченко И.И., Раевский К.С. Различия в механизмах ауторецепторной регуляции биосинтеза и высвобождения дофамина в подкорковых структурах мозга крыс. *Нейрохимия*. 1988;7(1):3–10. [Kudrin VS, Miroshnichenko II, Raevsky KS. Razlichiya v mekhanizmah autoreceptornoj regulyatsii biosinteza i vysvobozhdeniya dofamina v podkorkovyh strukturah mozga kryss. *Nejrohimiya*. 1988;7(1):3–10. (In Russ).].

11. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Салимов Р.М. Влияние пирacetамa на рецепторные системы мозга мышей CD-1 с разным фенотипом устойчивости внимания. *Химико-фармацевтический журнал*. 2021;55(8):10–14. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA, Vasil'eva EV, Salimov RM. Influence of piracetam on the brain receptors in CD-1 mice with different attention stability phenotypes. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2021;55(8):10–14 (In Russ).]. DOI: 10.30906/0023-1134-2021-55-8-10-14.

12. Faraone SV, Perlis RH, Doyle A et al. Molecular genetics of attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57(11):1313–1323. DOI: 10.1016/j.biopsych.2004.11.024.

13. Biederman J, Faraone, SV. Current concepts on the neurobiology of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *J Atten Disord*. 2002;6 Suppl 1:S7–16. DOI: 10.1177/070674370200601S03.

14. Hart H, Radua J, Nakao T, Mataix-Cols D, Rubia K. Meta-analysis of functional magnetic resonance imaging studies of inhibition and attention in attention-deficit/hyperactivity disorder: exploring task-specific, stimulant medication, and age effects. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(2):185–198. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2013.277.

15. Greenhill LL. Clinical effects of stimulant medication in ADHD. In: Solanto, MV, Arnsten, A.F.T., Castellanos, F.X. (Eds.), *Stimulant Drugs and ADHD: Basic and Clinical Neuroscience*. Oxford University Press, New York, 2001. pp. 31–71.

16. Berridge CW, Devilbiss DM. Psychostimulants as cognitive enhancers: the prefrontal cortex, catecholamines, and attention-deficit/hyperactivity disorder. *Biol Psychiatry*. 2011;69(12):e101–111. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010.06.023.
17. Ковалев Г.И., Салимов Р.М., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В. Нейрорецепторный профиль и поведение субпопуляций мышей CD-1, различающихся устойчивостью внимания. *Нейрохимия*. 2020;37(1):15–23. [Kovalev GI, Salimov RM, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA, Vasil'eva EV. Neuroreceptor profile and behavior of CD-1 mice subpopulations with different attention stability. *Neurochemical Journal*. 2020;37(1):15–23. (In Russ).]. DOI: 10.1134/S1819712420010146.
18. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М. Анализ поведенческих и нейрорецепторных эффектов атомоксетина и фенибута у мышей CD-1 с различной устойчивостью внимания. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(4):3–11. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Salimov RM. Analysis of behavioral and neuroreceptor effects of atomoxetine and phenibut in CD-1 mice subpopulations diverging in sustained attention. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya*. 2021;84(4):3–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-4-3-11.
19. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М. Влияние пантогама и атомоксетина на устойчивость внимания и распределение дофаминовых D₂ и ГАМК_B-рецепторов у мышей с моделью дефицита внимания. *Биомедицинская химия*. 2021;67(5):402–410. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Vasil'eva EV, Kondrakhin EA, Salimov RM. Influence of pantogam and atomoxetine on attention stability and distribution of dopamine D₂ and GABA_B receptors in the attention deficit mouse model. *Biomeditsinskaya khimiya*. 2021;67(5):402–410. (In Russ).]. DOI: 10.18097/PBMC20216705402.
20. Ковалёв Г.И., Сухорукова Н.А., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Салимов Р.М. Субхроническое введение семакса повышает устойчивость внимания у мышей CD-1 через модуляцию D₂-дофаминовых рецепторов префронтальной коры мозга. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2021;84(6):3–10. [Kovalev GI, Sukhorukova NA, Kondrakhin EA, Vasil'eva EV, Salimov RM. Subchronic administration of semax increases attention stability in CD-1 mice via modulation D₂-dopamine receptors in the prefrontal cortex. *Ekspierimental'naia i Klinicheskaia Farmakologiya*. 2021;84(6):3–10. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2021-84-6-3-10.
21. Brennan RA, Arnsten AFT. Neuronal mechanisms underlying attention deficit hyperactive disorder: the influence of arousal on prefrontal cortical function. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1129:236–245. DOI: 10.1196/annals.1417.007.
22. Lee Y-A, Goto Y. Prefrontal cortical dopamine from an evolutionary perspective. *Neurosci Bull*. 2015;31(2):164–174. DOI: 10.1007/s12264-014-1499-z.
23. Vizi ES, Lendvai B. Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res Brain Res Rev*. 1999;30(3):219–235. DOI: 10.1016/S0165-0173(99)00016-8.
24. Ohmura Y, Tsutsui-Kimura I, Yoshioka M. Impulsive behavior and nicotinic acetylcholine receptors. *J Pharmacol Sci*. 2012;118(4):413–422. DOI: 10.1254/jphs.11r06cr.
25. Hall FS, Der-Avakian A, Gould TJ. et al. Negative affective states and cognitive impairments in nicotine dependence. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015;58:168–185. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2015.06.004.
26. Puttfarcken PS, Jacobs I, Faltynek CR. Characterization of nicotinic acetylcholine receptor-mediated [3H]-dopamine release from rat cortex and striatum. *Neuropharmacology*. 2000;39(13):2673–2680. DOI: 10.1016/S0028-3908(00)00131-3.
27. Ковалёв Г.И., Фирстова Ю.Ю. Ноотропные препараты: разные мишени – общий эффект. *Клиническая фармакология и терапия*. 2010;19(6):72–73. [Kovalev GI, Firstova YuYu. Nootropnye preparaty: raznye misheni – obshchij effekt. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya*. 2010;19(6):72–73. (In Russ).].

Оценка влияния нейротоксина МФТП и противопаркинсонического препарата гимантана на целостность ДНК в структурах головного мозга мышей C57BL/6

Анисина Е. А., Жанатаев А. К., Непоклонов А. В., Котельникова С. О., Вальдман Е. А.

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

Аннотация. Гимантан (гидрохлорид n-(2-адамантил)гексаметиленимина) – противопаркинсонический препарат, обладающий поликомпонентным механизмом действия, включающим модулирующее влияние на активность дофамин- и серотонинергической медиаторных систем, избирательный ингибирующий эффект на MAO-B, свойства низкоаффинного неконкурентного блокатора ионного канала глутаматных рецепторов NMDA подтипа, обладает умеренной антирадикальной и противовоспалительной активностью. Целью настоящего исследования явилась оценка влияния нейротоксина МФТП, применяемого для моделирования паркинсонического синдрома, и противопаркинсонического препарата гимантана на целостность ДНК в стриатуме и фронтальной коре головного мозга мышей C57BL/6 методом ДНК-комет – гель-электрофореза ДНК одиночных клеток. **Результаты.** В первом эксперименте гимантан вводили один раз в сутки в течение 5 дней до начала введения МФТП (20 мг/кг, в/б), затем вместе с МФТП один раз в сутки в течение 5 дней. Во втором – гимантан 10 мг/кг вводили предварительно 4 дня и за 40 мин до МФТП 30 мг/кг. Полученные результаты подтверждают отсутствие у гимантана в терапевтической дозе 10 мг/кг эффекта на ДНК. В использованных схемах экспериментов не удалось установить ожидаемого возрастания уровня ДНК повреждений под влиянием МФТП, и соответственно, оценить защитный эффект гимантана.

Ключевые слова: гимантан; МФТП; метод ДНК-комет; паркинсонизм; мыши C57BL/6

Для цитирования:

Анисина Е. А., Жанатаев А. К., Непоклонов А. В., Котельникова С. О., Вальдман Е. А. Оценка влияния нейротоксина МФТП и противопаркинсонического препарата гимантана на целостность ДНК в структурах головного мозга мышей C57BL/6. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(4):47–52. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-47-52>

Поступила: 01 декабря 2021 г. **Принята:** 15 декабря 2021 г. **Опубликована:** 30 декабря 2021 г.

Evaluation of the effect of the neurotoxin MPTP and the antiparkinsonian drug hemantane on the DNA integrity in the brain structures of C57BL/6 mice

Anisina EA, Zhanataev AK, Nepoklonov AV, Kotelnikova SO, Valdman EA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. Hemantane (N-adamant-2-yl-hexamethylenimine hydrochloride) is an antiparkinsonian drug with a multicomponent mechanism of action, including a modulating effect on the activity of dopamine and serotonergic mediator systems, a selective inhibitory effect on MAO-B, properties of a low-affinity non-competitive channel blocker of glutamate NMDA receptors, has moderate antiradical and anti-inflammatory activity. *The aim* of this study was to assess the effect of the neurotoxin MPTP, which is used for modeling of parkinsonian syndrome, and the hemantane on the DNA integrity in the striatum and frontal cortex of the brain of C57BL/6 mice by the DNA comet assay – gel electrophoresis of DNA single cells. **Results.** In the first experiment, hemantane was administered once a day for 5 days before the MPTP (20 mg/kg, i.p.), then together with MPTP once a day for 5 days. In the second experiment hemantane 10 mg/kg was injected preliminarily for 4 days and 40 minutes before MPTP 30 mg/kg. The obtained results confirm the absence of an effect on DNA of hemantane at a therapeutic dose of 10 mg / kg. In the experimental schemes used, we did not reveal the expected increase in the level of DNA damage under the influence of MPTP, and, accordingly, we were not able to assess the protective effect of hemantane.

Keywords: hemantane; MPTP; DNA-comet assay; parkinsonism; C57BL/6 mice

For citations:

Anisina EA, Zhanataev AK, Nepoklonov AV, Kotelnikova SO, Valdman EA. Evaluation of the effect of the neurotoxin MPTP and the antiparkinsonian drug hemantane on the DNA integrity in the brain structures of C57BL/6 mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2021;(4):47–52. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-4-47-52>

Received: December 01, 2021. **Accepted:** December 15, 2021. **Published:** December 30, 2021

Введение / Introduction

Болезнь Паркинсона (БП) – второе по частоте встречаемости после болезни Альцгеймера нейродегенеративное заболевание. В основе развития симптоматики БП лежит дегенерация дофаминергических нейронов чёрной субстанции. В клинической картине заболевания преобладают двигательные нарушения – тремор, олиго- и брадикинезия, ригидность, постуральные расстройства, которые проявляются тогда, когда уже погибло более 58–64 % нейронов компактной части чёрной субстанции, а содержание дофамина в стриатуме снизилось на 60–80 % [1]. Суще-

ствующие средства фармакотерапии преимущественно являются симптоматическими. Даже при наличии у ряда противопаркинсонических препаратов нейропротекторных свойств назначение их на развёрнутой стадии не позволяет предотвратить прогрессирование заболевания.

Усилия исследователей во всём мире направлены на изучение патогенеза БП, поиск генетических маркеров для оценки риска развития, диагностических возможностей для определения заболевания на до-симптомных стадиях, совершенствование экспериментальных моделей с целью повышения их предикторной значимости при поиске нейропротекторов, создание и

внедрение средств патогенетической терапии, позволяющих замедлить прогрессирование БП. Поскольку отдельные звенья патогенеза БП достаточно хорошо изучены, но первичное звено не определено, в качестве потенциальных нейропротекторов рассматриваются препараты, воздействующие на несколько звеньев патогенеза БП.

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова разработан препарат гимантан (гидрохлорид *n*-(2-адамантил)гексаметиленмина), обладающий выраженной противопаркинсонической активностью.

Установлен поликомпонентный механизм действия гимантана. Гимантан оказывает дозозависимое модулирующее влияние на активность дофамин- и серотонинергической медиаторных систем в стриатуме [2–4], избирательный ингибирующий эффект на моноаминоксидазы-В (МАО-В) [5, 6], является низкоаффинным неконкурентным блокатором ионного канала глутаматных рецепторов NMDA подтипа [7], обладает умеренной антирадикальной и иммунотропной активностью [8]. Антиоксидантные свойства гимантана в дозе 10 мг/кг подтверждены на модели паркинсонического синдрома, вызванного введением нейротоксина МФТП (1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин) у мышей C57BL/6. Предварительное до МФТП введение гимантана предотвращало повышение уровня продуктов перекисного окисления липидов в коре и стриатуме [9].

Известно, что окислительный стресс, сопровождающийся образованием активных форм кислорода (АФК), играет важную роль в развитии различного генеза повреждений нейронов и нейродегенеративных заболеваний, в частности болезни Паркинсона [10, 11]. Для изучения окислительного стресса в тканях мозга используются биомаркеры – биологические молекулы, химическая структура которых модифицируется под влиянием АФК. В качестве биомаркеров окисления молекул ДНК используют методы оценки повреждений оснований ДНК, в частности оценку ДНК повреждений методом ДНК-комет-гель-электрофореза ДНК одиночных клеток [12].

Целью настоящего исследования явилась оценка влияния нейротоксина МФТП и противопаркинсонического препарата гимантана на уровень поврежденности ДНК в структурах головного мозга мышей C57BL/6.

Материалы и методы / Materials and methods

Гимантан (гидрохлорид *n*-(2-адамантил)гексаметиленмина) синтезирован в опытно-технологическом отделе НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

Исследования проводились на мышах-самцах линии C57BL/6 массой 18–20 г, полученных из ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России, филиал «Столбовая».

Животные содержались в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным

доступом к стандартному гранулированному корму и воде. Соблюдались требования Приказа Минздрава РФ от 01.04.2016 №199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и Решения Совета ЕЭК №81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического Союза в сфере обращения лекарственных средств», а также правила лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 33044-2014 – Принципы надлежащей лабораторной практики). Все манипуляции с животными были одобрены Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Паркинсонический синдром моделировали у мышей C57BL/6 системным введением нейротоксина МФТП по разным схемам. Ранее удалось зарегистрировать наиболее выраженный защитный эффект гимантана от МФТП при повторном предварительном до нейротоксина введении [13], поэтому гимантан в дозе 10 мг/кг внутривентриально вводили до МФТП.

В первом эксперименте гимантан вводили один раз в сутки в течение 5 дней до начала введения МФТП (20 мг/кг, в/б), затем вместе с МФТП один раз в сутки в течение 5 дней.

Во втором эксперименте использовали однократное введение МФТП в дозе 30 мг/кг. Гимантан 10 мг/кг вводили предварительно 4 дня и за 40 мин до введения МФТП. Животных декапитировали через 24 ч после последней инъекции.

Оценку поврежденности ДНК проводили методом ДНК-комет в щелочной версии [12]. После эвтаназии животных максимально быстро извлекали головной мозг, помещали его на лёд и выделяли стриатум и кору обоих полушарий. Полученные структуры помещали в охлажденный фосфатно-солевой буфер, содержащий 20 mM EDTA-Na₂ и 10 % диметилсульфоксида (pH 7,5), измельчали и выдерживали для осаждения крупных фрагментов тканей. Суспензии клеток вносили в агарозный гель на предметные стекла и лизировали в буфере (10 mM Tris-HCl [pH 10], 2,5M NaCl, 100 mM EDTA-Na₂, 1 % Triton X-100, 10 % диметилсульфоксид) не менее 1 часа. После окончания лизиса микропрепараты переносили в охлажденный до 4 °C буфер для электрофореза – 300 mM NaOH, 1 mM EDTA-Na₂ [pH > 13]. Инкубировали в течение 20 минут для реализации щелочно-лабильных сайтов и щелочной денатурации ДНК и далее проводили электрофорез в течение 20 минут при напряженности поля 1В/см и силе тока ~300 мА. По окончании электрофореза микропрепараты отмывали в фосфатно-солевом буфере и фиксировали в 70 % растворе этанола.

Микропрепараты окрашивали SYBR Green I (1:10000 в ТЕ-буфере [pH 8,5] в 50 % глицерине). Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия), совмещенном с цифровой камерой высокого разрешения (VEC-335,

«ЭВС», Россия), при увеличении $\times 200$. Полученные с микропрепаратов изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2 [14]. В качестве показателя поврежденности ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте). С каждого микропрепарата анализировали не менее 100 ДНК-комет.

При статистической обработке данных метода ДНК-комет нормальность распределения выборок проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Значимость различий определяли с использованием параметрического критерия Даннета. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических медиан для отдельного животного и их стандартных отклонений ($M \pm SD$) [15]. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Эксперимент 1

В эксперимент были включены 4 группы мышей.

Группе 1 ($n = 8$) вводился физиологический раствор (физ. р-р) в течение 10 дней по схеме — 5 дней — одна инъекция и 5 дней — 2 инъекции;

Группе 2 ($n = 8$) вводили гимантан 10 мг/кг 5 дней, далее 5 дней 10 мг/кг гимантан + физ. р-р;

Группе 3 ($n = 8$) 5 дней вводили физ. р-р + МФТП, с 5-го по 10-й день — физ. р-р и 20 мг/кг в день МФТП;

Группе 4 ($n = 8$) вводили 5 дней гимантан по 10 мг/кг в день, далее 5 дней — гимантан 10 мг/кг и через 30 мин после гимантана — 20 мг/кг МФТП.

Структуры мозга извлекали через 24 часа после последней инъекции.

Таблица 1

Эксперимент 1. Уровень ДНК повреждений в коре и стриатуме мышей C57BL / 6

Experiment 1. DNA damage in frontal cortex and striatum of C57BL / 6 mice

Группа / Group		% ДНК в хвосте / % DNA in tail	
		Фронтальная кора / Frontal cortex	Стриатум / Striatum
1	Физраствор Saline	0,73 $\pm$ 0,47	0,78 $\pm$ 0,70
2	Гимантан 10 мг/кг Hemantane 10 mg/kg	0,63 $\pm$ 0,48	0,63 $\pm$ 0,30
3	МФТП 20 мг/кг МРТП 20 mg/kg	1,00 $\pm$ 0,60	0,70 $\pm$ 0,30
4	Гимантан 10 мг/кг + МФТП 20 мг/кг Hemantane 10mg/kg + МРТП 20 mg/kg	0,54 $\pm$ 0,29	0,70 $\pm$ 0,38

Примечание: результаты представлены в виде средней арифметической медиан и стандартного отклонения ($M \pm SD$).
Notes: the results are presented as mean of medians and standard deviation ($M \pm SD$).

При использованной схеме введения не выявлено увеличения поврежденности ДНК под воздействием нейротоксина МФТП, вводимого в дозе 20 мг/кг в течение 10 дней. Гимантан в дозе 10 мг/кг в течение 10 дней, также не оказывал эффекта на уровень поврежденности ДНК (табл. 1).

Эксперимент 2

Во втором эксперименте проводили однократное введение МФТП в дозе 30 мг/кг. Гимантан 10 мг/кг вводили предварительно 4 дня и за 40 мин до МФТП. Контрольной группе вводили физиологический раствор. Оценку поврежденности ДНК после введения *per se* гимантана не проводили, поскольку в предыдущем эксперименте на фоне субхронического введения препарат не проявил повреждающей ДНК активности. Поврежденность ДНК оценивали через 3 часа после введения МФТП. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2

Эксперимент 2. Уровень повреждений ДНК в коре и стриатуме мышей C57BL / 6

Table 2

Experiment 2. DNA damage in frontal cortex and striatum of C57BL / 6 mice

Группа / Group		% ДНК в хвосте / % DNA in tail	
		Фронтальная кора / Frontal cortex	Стриатум / Striatum
1	Физраствор Saline	2,06 $\pm$ 0,72	2,48 $\pm$ 1,37
2	МФТП 20 мг/кг МРТП 20 mg/kg	3,29 $\pm$ 1,68 $p_1 = 0,21$	3,02 $\pm$ 2,00 $p_1 = 0,64$
3	Гимантан 10 мг/кг + МФТП 20 мг/кг Hemantane 10mg/kg + МРТП 20 mg/kg	2,64 $\pm$ 1,75 $p_2 = 0,6$	1,76 $\pm$ 0,63 $p_2 = 0,16$

Примечания: результаты представлены в виде средней арифметической медиан и стандартного отклонения ($M \pm SD$); p_1 — по сравнению с группой 1; p_2 — по сравнению с группой 2.

Notes: the results are presented as mean of medians and standard deviation ($M \pm SD$); p_1 — as compared with group 1; p_2 — as compared with group 2.

Через 3 часа после однократного введения высокой дозы МФТП (30 мг/кг) отмечено некоторое увеличение уровня ДНК повреждений под влиянием нейротоксина, однако не достигающее даже уровня тенденции. Установлена тенденция к снижению уровня повреждений ДНК в стриатуме при предварительном до МФТП введении гимантана.

В рамках описываемого исследования уровень повреждений ДНК также оценивался через 3 часа и через 8 часов после однократного введения нейротоксина МФТП в дозе 30 мг/кг. Как и в предыдущих двух экспериментах, значимых различий с контрольной группой зафиксировано не было.

Таким образом, при схемах с однократным и многократным введением не удалось выявить ожидаемого

возрастания уровня повреждений ДНК в клетках фронтальной коры и стриатума мышей под действием нейротоксина МФТП, и соответственно, оценить потенциальный протекторный эффект гимантана.

Использованная в эксперименте 1 схема введения МФТП 20 мг/кг в течение 5 дней один раз в день соответствует субхронической модели с апоптотической гибелью клеток [16]. Имеются данные о индукции повреждений ДНК после введения МФТП в дозе 20 мг/кг 4 раза через 2 часа [17]. Эта схема считается моделью острого начала заболевания с развитием некротической гибели нейронов [18]. Вместе с тем, на микропрепаратах ДНК-комет не выявлялись так называемые атипичные ДНК-кометы, являющиеся косвенным свидетельством клеточной гибели [19].

Попытки оценивать повреждения ДНК, вызванные МФТП, представлены всего в нескольких работах. Полученные нами данные согласуются с результатами исследования, в котором авторам не удалось установить увеличения базального уровня ДНК повреждений после однократного введения МФТП в дозе 30 мг/кг, при этом установлено, что ДНК становилась менее устойчивой к повреждениям, но в то же время активизировались процессы репарации. В этом же исследовании при попытке оценить защитный эффект статинов, обладающих нейропротекторной активностью в других тестах, были получены результаты, указывающие на то, что сами эти препараты вызывают повреждения ДНК. Профилактическое применение правастатина, симвастатина и аторвастатина, обладающих нейропротекторной активностью, приводило к повышению базального уровня повреждений ДНК [20].

Повреждающее действие МФТП на клетки мозга связывают в первую очередь с индукцией окислительного стресса за счёт образования цитотоксических хинонов и гидроксильного радикала [21]. Последний,

являясь высокореактивной АФК, повреждает все макромолекулы клетки, включая ДНК. Возможно, при этом, что окислительный стресс, вызываемый МФТП при использованных нами схемах введения, не достаточно выражен для детекции с использованием в качестве биомаркера повреждений ядерной ДНК, но способен запустить каскад митохондриальной клеточной гибели. Установлено, что индуцируемый МФТП окислительный стресс вызывает каспаза-независимый путь апоптотической гибели путём активации апоптоз-индуцируемого фактора AIF митохондрий [21]. Примечательно, ряд исследователей указывает, что следует оценивать преимущественно не ядерную, а митохондриальную ДНК, повреждения которой вносят больший вклад в этиопатогенез БП [22]. Очевидна перспективность исследований по оценке первичных повреждений и мутаций в митохондриальной ДНК на модели МФТП-индуцированной БП с целью определения их в качестве чувствительного биомаркера нейротоксических поражений.

Полученные в настоящем исследовании результаты подтверждают выявленные ранее экспериментальные данные об отсутствии у гимантана в терапевтической дозе 10 мг/кг генотоксической активности.

Выводы / Conclusions

1. Нейротоксин МФТП при введении в течение 5 дней в дозе 20 мг/кг в сутки однократно, а также при однократном введении в дозе 30 мг/кг не индуцирует детектируемые методом ДНК-комет повреждения ДНК клеток стриатума и фронтальной коры мышей C57BL/6.

2. Гимантан при введении в течение 10 дней в дозе 10 мг/кг в сутки не вызывает повреждений ДНК в клетках стриатума и фронтальной коры мышей C57BL/6.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Анисина Елена Александровна

e-mail: anisinalena@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7542-5658>

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

Жанатаев Алий Курманович

e-mail: azhanataev@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7673-8672>

SPIN-код: 7070-0510

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

Anisina Elena A.

e-mail: anisinalena@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7542-5658>

junior researcher, laboratory of pharmacology of mutagenesis, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Zhanataev Aliy K.

e-mail: azhanataev@yandex.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-7673-8672>

SPIN code: 7070-0510

Leading researcher, laboratory of pharmacology of mutagenesis, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Непоклов Алексей Викторович

e-mail: lesstalkmorerock@list.ru

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

Котельникова Светлана Олеговна

e-mail: ailantha@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7083-5298>

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

Вальдман Елена Артуровна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: natalipharm@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6412-4833>

SPIN-код: 2656-4174

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

Nepoklonov Alexey V.

e-mail: lesstalkmorerock@list.ru

Junior researcher, laboratory of psychopharmacol-
ogy, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
Moscow, Russia

Kotelnikova Svetlana O.

e-mail: ailantha@mail.ru

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-7083-5298>

Senior researcher, laboratory of psychopharmacol-
ogy, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology»,
Moscow, Russia

Valdman Elena A.

Corresponding author

e-mail: evaldman@mail.ru

ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-9716-499X>

SPIN code: 6806-3799

Leading researcher, laboratory of psychopharma-
cology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacol-
ogy», Moscow, Russia

Список литературы / References

1. Tissingh P, Bergmans J, Booij A et al. Drug-naïve patients with Parkinson's disease in Hoehn and Yahr stages I and II show a bilateral decrease in striatal dopamine transporters as revealed by [123I]beta-CIT SPECT. *J Neurol.* 1998;245(1):14–20. DOI: 10.1007/s004150050168.
2. Абаймов Д.А., Зимин И.А., Ковалев Г.И. Влияние гимантана на основные подсистемы дофаминовых рецепторов стриатума крыс *ex vivo*. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2008;71(1):18–21. [Abaimov DA, Zimin IA, Kovalev GI. Subchronic effects of hemantane on the main subtypes of dopamine receptors in rat striatum *ex vivo*. *Experimental and clinical pharmacology.* 2008;71(1):18–21. (In Russ).].
3. Абаймов Д.А., Зимин И.А., Кудрин В.С., Ковалев Г.И. Влияние противопаркинсонического препарата гимантана на содержание и метаболизм нейромедиаторных моноаминов в структурах головного мозга мышей линии C57 BL/6. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2009;72(1):64–67. [Abaimov D, Zimin I, Kudrin V, Kovalev G. Effects of antiparkinsonian drug hemantane on the level and metabolism of biogenic monoamines in brain structures of C57BL/6 mice. *Experimental and clinical pharmacology.* 2009;72(1):64–67. (In Russ).].
4. Андриянова Э.А., Вальдман Е.А., Кудрин В.С. и др. Влияние нового потенциального противопаркинсонического средства гимантана на содержание моноаминов и их метаболитов в стриатуме крыс (микродиализное исследование). *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2001;64(6):13–17. [Andriyanova EA, Valdman EA, Kudrin VS et al. Effect of a novel potential antiparkinsonian drug hemantane on the content of monoamines and its metabolites in the striatum of rats (microdialysis assay). *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2001;64(6):13–17. (In Russ).].
5. Вальдман Е.А., Воронина Т.А., Аксенова Л.Н. и др. Влияние нового противопаркинсонического препарата гимантана на активность моноаминоксидаз. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2003;5:3–5. [Valdman EA, Voronina TA, Aksenova LN et al. Effect of a new antiparkinsonian drug hemantane on monoamine oxidase activity. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2003;5:3–5. (In Russ).].
6. Вальдман Е.А., Капица И.Г., Неробкова Л.Н. и др. Влияние длительного введения мышам изатина и гимантана на чувствитель-

ность моноаминоксидазы Б мозга к ингибированию депренилом *in vivo* и *in vitro*. *Биомедицинская химия.* 2004;50(5): 509–513. [Valdman EA, Kapitsa IG, Nerobkova LN et al. The effect of long-term administration of isatin and himantan to mice on sensitivity of brain monoamine oxidase B to inhibition by deprenyl *in vivo* and *in vitro*. *Biomeditsinskaya Khimia* 2004;50(5): 509–513 (In Russ).].

7. Елшанская М.В., Соболевский А.И., Вальдман Е.А., Ходоров Б.И. Взаимодействие потенциального противопаркинсонического средства производного адамантана с ионными каналами глутаматных рецепторов NMDA подтипа. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2001;64(1):18–21. [Elshanskaia MV, Sobolevskii AI, Val'dman EA, Khodorov BI. Effect of the potential antiparkinsonian agent adamantane derivative on ion channels of NMDA glutamate receptors. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2001;64(1):18–21. (In Russ).].

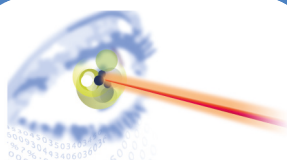
8. Нежинская Г.И., Вальдман Е.А., Назаров П.Г., Сапронов Н.С. Оценка пролонгированного иммуноотропного эффекта гимантана — потенциального противопаркинсонического средства. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2003;66(3):44–46. [Estimation of the prolonged immunotropic effect of the new potential antiparkinsonian drug himantane. *Experimental and Clinical Pharmacology.* 2003;66(3): 44–46. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2003-66-3-44-46.

9. Иванова Е.А., Капица И.Г., Золотов Н.Н., Вальдман Е.А., Непоклонов А.В., Колясникова К.Н., Воронина Т.А. Влияние гимантана на уровень продуктов перекисного окисления липидов в головном мозге при экспериментальном паркинсоническом синдроме. *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2016;(3):9–12. [Ivanova EA, Kapitsa IG, Zolotov NN, Valdman EA, Nepoklonov AV, Kolyasnikova KN, Voronina TA. Effects of Hemantane upon the level of lipid peroxidation in brain in experimental parkinsonian syndrome. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2016;(3):9–12. (In Russ).].

10. Halliwell B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem.* 1992;59(5):1609–1623. DOI: 10.1111/j.1471-4159.1992.tb10990.x.

11. Hald A, Lotharius J. Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental Neurology.* 2005;193(2):279–290. DOI: 10.1016/j.expneurol.2005.01.013.

12. Дурнев А.Д., Меркулов В.А., Жанатаев А.К. и др. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. Под ред. А.Н. Миронова. Москва: 2012;115-128. [Durnev AD, Merkulov VA, Zhanataev AK et al. Guidelines for the assessment of DNA damage by alkaline gel electrophoresis of single cells in pharmacological studies. Guidelines for preclinical studies of drugs. Part one. Ed. A.N. Mironov. Moscow: 2012. (In Russ).].
13. Непоклонов А.В. Изучение эффектов гимантана на ранних стадиях развития болезни Паркинсона и при индуцированных леводопой дискинезиях (экспериментальное исследование). Дис. канд. мед. наук. — Москва. 2013. [Nepoklonov AV. Study of the effects of hemantane on the early stages of Parkinson's disease and levodopa-induced dyskinesia (experimental study). [dissertation]. Moscow; 2013. (In Russ).].
14. Konca K, Lankoff A, Banasik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay. *Mutat Res.* 2003;534(1-2): 15–20. DOI: 10.1016/s1383-5718(02)00251-6.
15. Moller P., Loft S. Statistical analysis of comet assay results. *Front Genet.* 2014;5:292. DOI: 10.3389/fgene.2014.00292.
16. Schmidt N, Ferger B. Neurochemical findings in the MPTP model of Parkinson's disease. *J Neural Transm (Vienna)*. 2001;108(11):1263–1282. DOI: 10.1007/s007020100004.
17. Hoang T, Choi DK, Nagai M. et al. Neuronal NOS and cyclooxygenase-2 contribute to DNA damage in a mouse model of Parkinson disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(7):1049–1056. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.013.
18. Jackson-Lewis V, Jakowec M, Burke RE, Przedborski S. Time course and morphology of dopaminergic neuronal death caused by the neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Neurodegeneration.* 1995;4(3):257–269. DOI: 10.1016/1055-8330(95)90015-2.
19. Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Чайка З.В., Мирошкина И.А., Дурнев А.Д. Феномен атипичных ДНК-комет. *Цитология.* 2017;59(3):163-168. [Zhanataev AK, Anisina EA, Chaika ZV, Miroshkina IA, Durnev AD. The phenomenon of atypical DNA comets. *Citologia.* 2017;59(3):163–168. (In Russ).].
20. Coetsee N, Pretorius PJ, Terre Blanche G, Bergh JJ. Investigating the potential neuroprotective effects of statins on DNA damage in mouse striatum. *Food Chem Toxicol.* 2008;46(9):3186–3192. DOI: 10.1016/j.fct.2008.07.006.
21. Meredith GE, Rademacher DJ. MPTP mouse models of Parkinson's disease: an update. *J Parkinsons Dis.* 2011;1(1):19–33. DOI: 10.3233/JPD-2011-11023.
22. Pickrell AM, Pinto M, Hida A, Moraes CT. Striatal dysfunctions associated with mitochondrial DNA damage in dopaminergic neurons in a mouse model of Parkinson's disease. *J Neurosci.* 2011;31(48):17649–17658. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4871-11.2011.



Издательство
ОКИ

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



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

Сайт журнала: www.clinvest.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru



Журнал **«Реальная клиническая практика: данные и доказательства»** ставит своей целью предоставить средство для распространения и форум для обсуждения информации о том, как лекарственные препараты действуют в рутинной медицинской практике. Рубрики журнала включают как оригинальные исследования, так и обзоры использования реальных данных для оценки исходов лечения, принятия обоснованных медицинских решений в отношении лекарственных препаратов, медицинских изделий и других вмешательств.

Сайт журнала: www.myrwd.ru