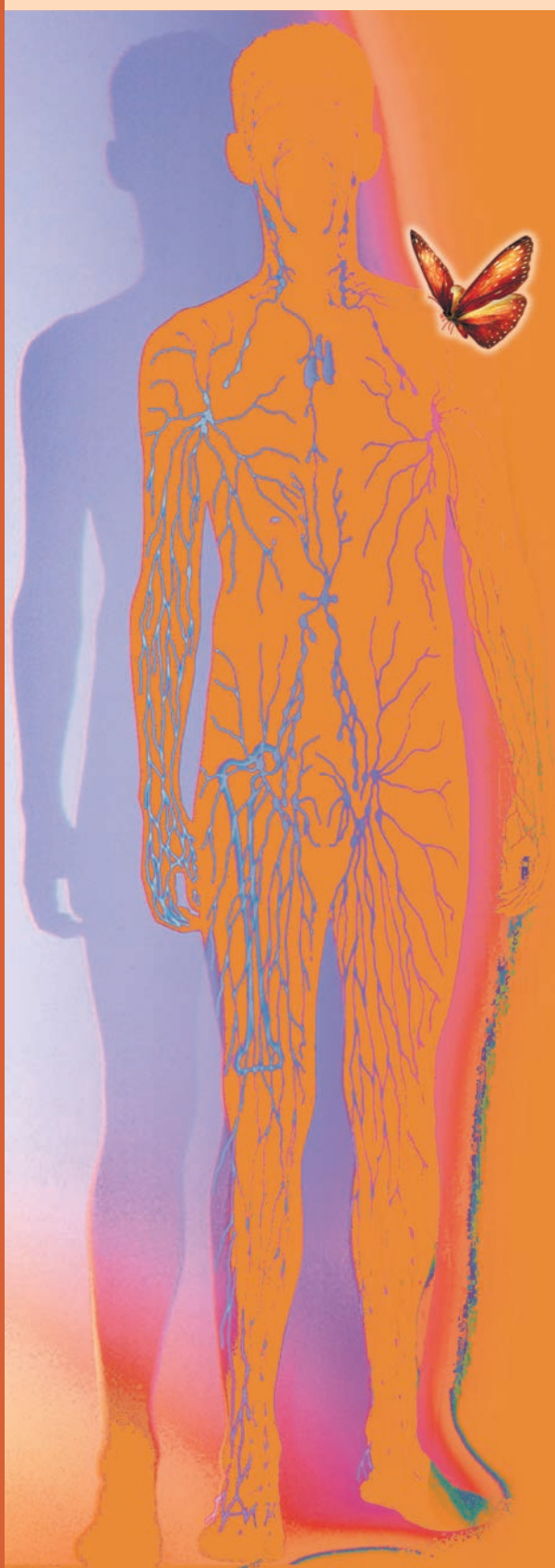


ФАРМАКО КИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№4.2017



Издательство
ОКИ

Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

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

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

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

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д.б.н., Москва

Редакционная коллегия

**Белопищевская
Вера Геннадиевна**
к.б.н., Москва

**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

Казей Василий Игоревич
к.б.н., Москва

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

**Кулмагамбетов
Ильяс Райханович**
д.м.н., профессор, академик
НАН, Казахстан, Алматы

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

Насонов Александр Сергеевич
к.б.н., Москва

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

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

Соколов Андрей Владимирович
д.б.н., Москва

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

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

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

Тюренков Иван Николаевич
член-корр. РАН, д.м.н.,
профессор, Волгоград

Чистяков Виктор Владимирович
д.ф.н., профессор, Москва

Выпускающая группа

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

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

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

Подписано в печать 24.12.2017 г. Тираж 400 экз.
ООО «МЕДИАКОЛОП», www.mediacolor.ru

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

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

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия
Качественная клиническая практика
Клиническая фармация
Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

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

Центр Фармакоэкономических Исследований
Market Access Solutions
Издательство ОКИ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Нейропротекторное и противосудорожное действие
Церебролизина в эксперименте
Богачёва Т.Е., Калачёва А.Г., Гришина Т.Р., Громова О.А.,
Суракова Т.В. 3

Изучение эффектов магния оротата на модели первично-
генерализованных судорог у крыс
Калачёва А.Г., Богачёва Т.Е., Громова О.А., Гришина Т.Р.,
Демидов В.И. 7

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Тропоксин в эффективной дозе у крыс
не оказывает влияния на активность
изоформ CYP2C9 и CYP1A2 цитохрома P450
Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Грибакина О.Г.,
Бочков П.О., Шевченко Р.В. 12

Динамика распределения лития в различных тканях
после перорального приёма цитрата лития у крыс
Пронин А.В., Громова О.А., Торшин И.Ю., Гришина Т.Р. 16

ПРОТЕОМНЫЙ АНАЛИЗ

Протеомный анализ эффектов тиоктовой кислоты
в составе меглюмина тиоктата
Торшин И.Ю., Громова О.А., Койфман О.И.,
Майорова Л.А. 24

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

Димерный дипептидный миметик 1-й петли
фактора роста нервов ГК-6, активирующий
PI3K/AKT и MEK/MAPK/ERK, вызывает дифференцировку
клеток PC12 по нейрональному типу
Антипова Т.А., Николаев С.В., Ревизин А.В.,
Савченко Е.А., Павлова Г.В., Гудашева Т.А. 31

Содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в
мозге крыс при литий-пилокарпиновых судорогах
и на фоне предварительного введения леветиретама
и нового производного рацетама ГИЖ-290
Ковалёв И.Г., Боков Р.О., Кудрин В.С.,
Воронина Т.А., Ковалёв Г.И. 36

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОЛОГИЯ

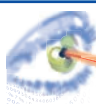
Значение количественной ЭЭГ в интерпретации
бензодиазепинового теста у больных в вегетативном
состоянии
Неробкова Л.Н., Филатова Ю.Б., Пылев А.Л., Кац О.Ю. 40

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Регуляция формирования соединительной ткани
при спайкообразовании блокаторами медленных
кальциевых каналов
Скальский С.С., Соколова Т.Ф., Зырянов С.К. 46

ЮБИЛЕЙ

Белоусову Юрию Борисовичу 51



Издательство

ОКИ

Chief editor

Zherdev Vladimir

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

Deputy chief editor

Firsov Alexander

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

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Belolipetskaia Vera

Ph.D., Moscow

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

Kazey Vasily

Ph.D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Kulmagambetov Ilyas

Ph.D., Professor, Academician
National Academy of Sciences,
Almaty, Kazakhstan

Mirzoyan Ruben

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

Nasonov Alexander

Ph.D., Moscow

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Sokolov Andrey

Ph.D., Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Starodubtcev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

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

Tyurenkov Ivan

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

Chistyakov Viktor

Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

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

Afanasyeva Elena

CEO in LLC «Publishing 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 24.12.2017 r. **Circulation** 400 copies.

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

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

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

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Clinical-Pharmacy.ru
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Clinical Pharmacy
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

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

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OKI

PRECLINICAL PHARMACODYNAMIC STUDIES

Neuroprotective and anticonvulsant effects
of Cerebrolysin in the experiment
*Bogacheva T.E., Kalacheva A.G., Grishina T.R.,
Gromova O.A., Surakova T.V.* 3

The study of the effects of magnesium orotate
on the model of primary generalized convulsions in rats
*Kalacheva A.G., Bogacheva T.E., Gromova O.A.,
Grishina T.R., Demidov V.I.* 7

PRECLINICAL PHARMACOKINETIC STUDIES

Tropoxine in the effective dose does not affect on activity
of CYP2C9 and CYP1A2 isoforms of cytochrome P450 in rats
*Zherdev V.P., Kolyvanov G.B., Litvin A.A.,
Grybakina O.G., Bochkov P.O., Shevchenko R.V.* 12

Dynamics of distribution of lithium in different tissues
after oral administration of lithium citrate in rats
*Pronin A.V., Gromova O.A., Torshin I.I.U.,
Grishina T.R.* 16

PROTEOMIC ANALYSIS

Proteomic analysis of the effects of thioctic
acid within meglumine thioctate
*Torshin I.I.U., Gromova O.A., Koifman O.I.,
Maiorova L.A.* 24

MECHANISM OF ACTION RESEARCH

Dimeric dipeptide mimetic the 1st loop of nerve
growth factor of GK-6, which activates PI3K/AKT
and MEK/MAPK/ERK, causes a neuronal type
differentiation of PC12 cells
*Antipova T.A., Nikolaev S.V., Revishchin A.V.,
Savchenko E.A., Pavlova G.V., Gudasheva T.A.* 31

The brain excitatory and inhibitory amino acids content
in rats with lithium-pilocarpine-evoked seizures
and after the preliminary administration of levetiracetam
and novel racetam derivative GLZH-290
*Kovalev I.G., Bokov R.O., Kudrin V.S.,
Voronina T.A., Kovalev G.I.* 36

CLINICAL PHARMACOLOGY

The importance of quantitative EGG for patients
in a vegetative state in benzodiazepine test interpretation
*Nerobkova L.N., Filatova Yu.B.,
Pylev A.L., Kats O.Yu.* 40

LITERATURE REVIEW

Regulation of connective tissue development
by calcium channel blocking agents in adhesion process
Skalskii S.V., Sokolova T.F., Zyryanov S.K. 46

ANNIVERSARIES

Belousov Yuri Borisovich 51

Нейропротекторное и противосудорожное действие Церебролизина в эксперименте

Богачёва Т.Е., Калачёва А.Г., Гришина Т.Р., Громова О.А., Суракова Т.В.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Ивановская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иваново

Резюме. Цель исследования. Оценить противосудорожное и нейропротекторное действия препарата Церебролизин у крыс. Материал и методы. Исследование проведено на 30 белых крысах-самцах, которые получали курсовое введение препарата Церебролизин. Модель первично-генерализованных судорог воспроизводилась однократным введением тиосемикарбазида. Результаты и заключение. Предварительное введение Церебролизина уменьшает тяжесть и длительность судорог, вызванных тиосемикарбазидом, увеличивает выживаемость животных. Исследуемый препарат оказывает нейропротективный эффект на клетки коры головного мозга в условиях ишемии.

Ключевые слова: Церебролизин, судороги, нейропротекция

Neuroprotective and anticonvulsant effects of Cerebrolysin in the experiment

Bogacheva T.E., Kalacheva A.G., Grishina T.R., Gromova O.A., Surakova T.V.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy»
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Resume. Purpose of the study. Assess anticonvulsant and neuroprotective effects of Cerebrolysin in rats. Material and methods. The study was carried out on 30 white male rats, who received a course of Cerebrolysin. The model of primary-generalized convulsions was reproduced by a single administration of thiosemicarbazide. Results and conclusion. Preliminary introduction of Cerebrolysin reduces the severity and duration of seizures caused by thiosemicarbazide, increases the survival rate of animals. The test drug has a neuroprotective effect on the cells of the cerebral cortex under conditions of ischemia.

Keywords: Cerebrolysin, convulsions, neuroprotection

Автор, ответственный за переписку:

Богачева Татьяна Евгеньевна – к.м.н., доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России; 153012, г. Иваново, пр. Шереметевский, д. 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: tatiana.boga4iova@yandex.ru

Церебролизин – препарат с доказанным нейротрофическим действием, используемый в клинической практике для восстановления неврологических функций пациентов с деменцией, перенёсших инсульт или черепно-мозговую травму (ЧМТ) [1, 4, 5]. Применение Церебролизина достоверно уменьшает неврологический дефицит [2, 5], улучшает когнитивные способности [6], снижает объём зоны инфаркта при инсульте [7]. Церебролизин обладает органоспецифическим мультимодальным действием на головной мозг, т. е. обеспечивает метаболическую регуляцию, нейропротекцию, функциональную нейромодуляцию и нейротрофическую активность [3, 6]. Церебролизин защищает нейроны от повреждающего действия лактацидоза, предотвращает образование свободных радикалов [8, 9], повышает выживаемость и предотвращает гибель нейронов в условиях гипоксии и ишемии, снижает повреждающее нейротоксическое действие возбуждающих аминокислот (глутамата). Однако в литературе существуют разные мнения исследователей и клиницистов на возможность применения Церебролизина у больных при судорогах и эпилепсии. Поэтому актуальным является изучение противосудорожного эффекта препарата Церебролизин.

Цель исследования – изучить влияние препарата Церебролизин на выраженность и тяжесть течения первично-генерализованных судорог, вызванных тиосемикарбазидом, у крыс и оценить эффективность его противосудорожного и нейропротективного действия.

Материалы и методы

Исследование проведено на 30 белых крысах-самцах массой 200 г. Животные были разделены на 5 групп: первая группа ($n = 6$) – контроль-интактный; вторая группа ($n = 6$) – контроль с воспроизведением первично-генерализованных судорог; третья ($n = 6$), четвёртая ($n = 6$) и пятая ($n = 6$) группы животных получали препарат Церебролизин в дозе 2,5 мл/кг массы внутривентрикулярно в течение 18 дней. Для определения противосудорожных свойств веществ воспроизводят экспериментальные модели первично-генерализованной эпилепсии, включающие судороги, вызванные электрическим и химическим воздействием [4]. Нами в экспериментальных группах (второй и третьей) была воспроизведена модель судорог однократным введением внутривентрикулярно тиосемикарбазида (ТСК) в дозе 28 мг/кг; в четвёртой и пятой экспериментальных группах вводили внутривентрикулярно тиосемикарбазид

в дозах соответственно 10 и 20 мг/кг. При этом во всех группах регистрировалось латентное время до первого судорожного приступа, количество, характер судорог (вздрагивание, манежный бег, клонические судороги, тонико-клонические судороги с боковым положением, тоническая экстензия, тоническая экстензия, заканчивающаяся гибелью), и летальность в течение 90 мин. После одномоментной декапитации проводили патогистологическое исследование секционного материала (головной мозг) в группах, которым вводили тиосемикарбазид в максимальной дозе 28 мг/кг без Церебролизина и с предварительным курсовым введением исследуемого препарата.

Окрашивание микропрепаратов: гематоксилином и эозином. Статистическая обработка данных проводилась с помощью программы Statistica 6,0.

Результаты исследования

Результаты проведённого исследования показали, что у животных контрольной группы при введении тиосемикарбазида в указанной дозе в 100 % случаев наблюдались клонико-тонические судороги, проявляющиеся в виде вздрагивания, манежного бега, клонических судорог, тонико-клонических судорог с боковым положением, тонической экстензии. Летальность в этой группе животных составила 100%. В группах крыс, которым вводили Церебролизин в течение 18 дней, возникновение судорог не отмечалось. Курсовое введение препарата Церебролизин в указанной дозе на модели тиосемикарбазидовых судорог (доза ТСК максимальная 28 мг/кг) достоверно снизило тяжесть судорожных приступов (по признаку «вздрагивание») ($p = 0,003$) и уменьшило длительность судорожных приступов ($p = 0,005$) (рис. 1).

Летальность животных этой группы составила 83 %, тогда как в контрольной все животные погибли. Со-

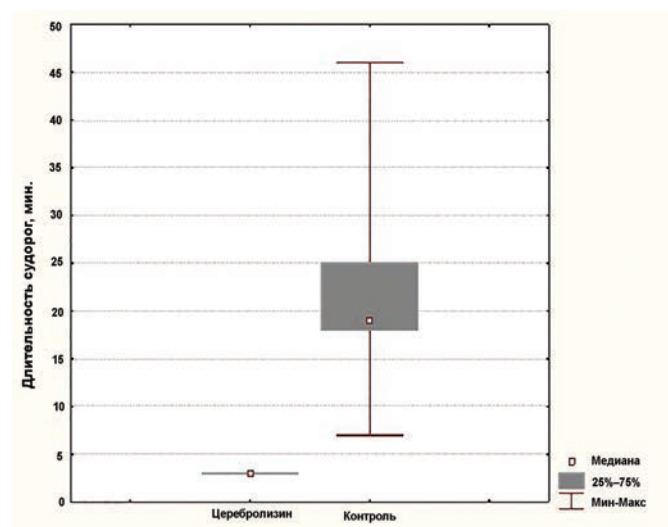


Рис. 1. Сравнительная продолжительность судорожных приступов

четание Церебролизина и ТСК в минимальной дозе 10 мг/кг вызвало менее выраженные судороги по длительности ($p = 0,002$), количеству приступов ($p = 0,04$) (рис. 2) и тяжести по признакам «клонические судороги» и «тоническая экстензия» ($p = 0,004$). Летальность крыс – 33 %. С увеличением дозы конвульсанта (ТСК 20 и 28 мг/кг) усилился его судорожный эффект, и в исследуемых группах уменьшилась выживаемость животных.

Но даже при высоких дозах конвульсанта Церебролизин оказывал защитное противосудорожное

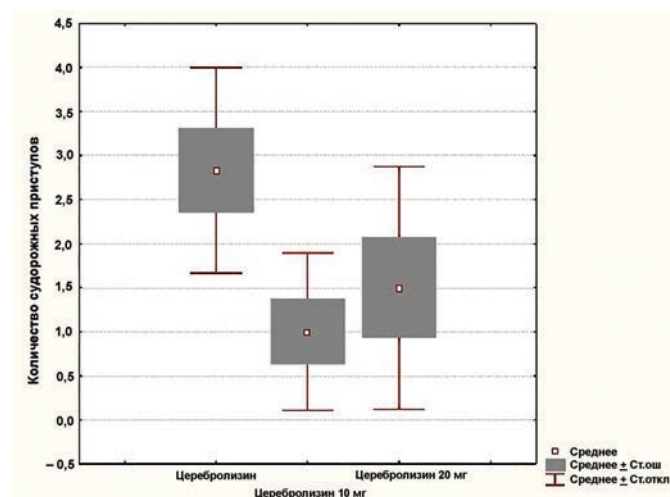


Рис. 2. Количество судорожных приступов в группах на различных дозах тиосемикарбазида

воздействие. Возникновение судорог при введении тиосемикарбазида связано с уменьшением содержания в мозге тормозного нейромедиатора ГАМК, вследствие снижения активности фермента декарбоксилазы глутаминовой кислоты, содержание возбуждающего нейромедиатора глутамата увеличивается. Установленные в настоящем исследовании противосудорожные эффекты Церебролизина обусловлены, по всей видимости, пептидным и аминокислотным составом препарата, который снижает повреждающее нейротоксическое действие возбуждающих аминокислот (глутамата). Гистологическое исследование секционного материала головного мозга показало, что использованная модель первично-генерализованных судорог имела морфологическое подтверждение во всех случаях наблюдения (рис. 3). Выявлены признаки выраженных нарушений кровообращения на уровне микроциркуляторного русла, равномерно проявляющиеся в сером и в белом веществе полушарий переднего мозга. В капиллярах явления гемостаза характеризовались агрегацией эритроцитов с выраженным периваскулярным отёком нервной ткани, в коре полушарий выявлены мелкоочаговые периваскулярные кровоизлияния, отмечены ишемические повреждения нейроцитов. Импрегнация серебром зон головного мозга, содержащих проводящие пути, по-

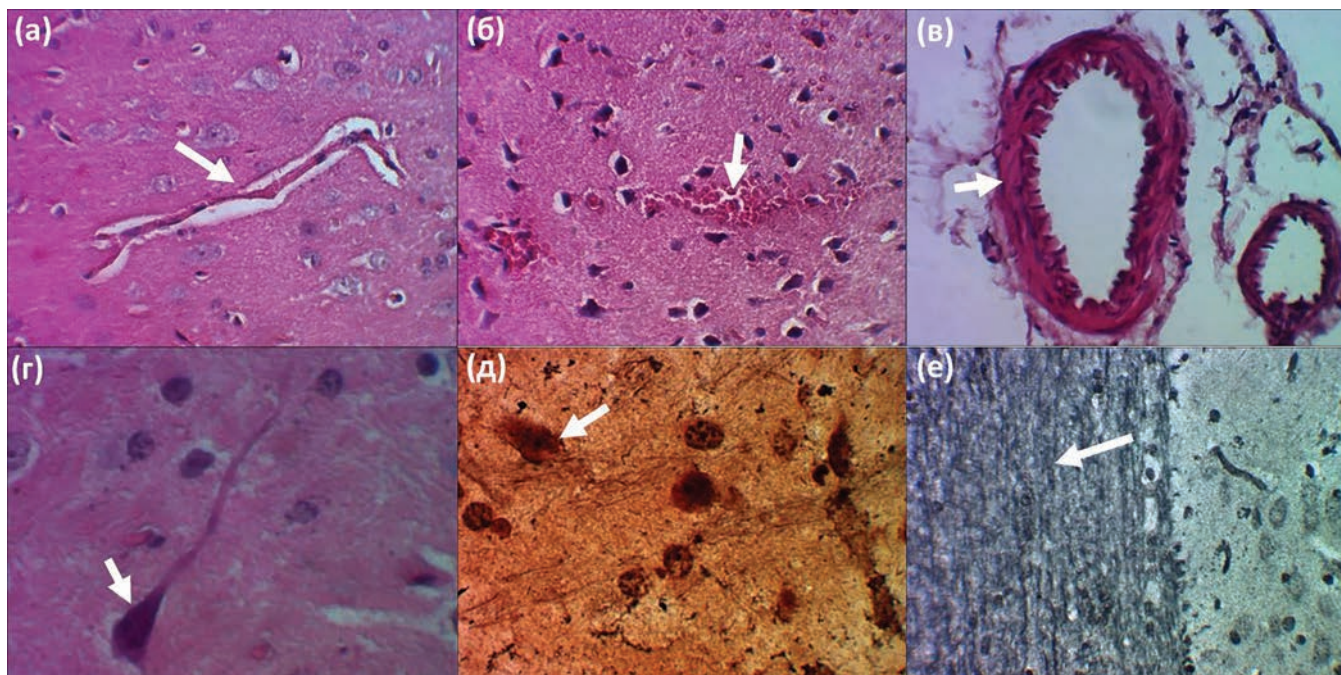


Рис. 3. Нейрогистологическое исследование тканей мозга в исследуемой модели судорог (2-я группа):

a — Агрегация эритроцитов, перикапиллярный отёк серого вещества коры переднего мозга. Выраженный периваскулярный и перичеселлюлярный отёк нервной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$; *б* — Мелкоочаговые диапедзные кровоизлияния в пирамидном слое коры больших полушарий. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$; *в* — Спастическое состояние пияльной артерии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$; *г* — Пирамидная нервная клетка коры с гомогенизированной цитоплазмой и набухшим аксоном. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$; *д* — Плазмолитис поврежденного нейрона. Импрегнация серебром. Увеличение $\times 1200$; *е* — Комиссуральные волокна коры головного мозга имеют размытые контуры. Импрегнация серебром. Увеличение $\times 1200$

казала неравномерную окраску и нечёткость контуров нервных волокон. Все эти особенности гистологии указывают на выраженные повреждения морфологии и ишемизацию коры головного мозга (рис. 4).

Использование препарата Церебролизин минимизировало уровень ишемического повреждения нейроцитов. Значительная часть нейроцитов коры и подкорковых ядер не имела структурных повреждений. Ишемические повреждения нейронов характеризовались очаговым

хроматолитом единичных пирамидных клеток и набуханием нейрональных аксонов, что является классическим нейроморфологическим критерием обратимых изменений. Макроглиальная реакция нервной ткани была минимальной и выражалась слабым отёком периаперикулярных астроцитов. Импрегнация серебром проводящих двигательных путей головного мозга в большинстве наблюдений демонстрирует сохранность миелиновых оболочек нервных волокон, которые имели чёткие контуры.

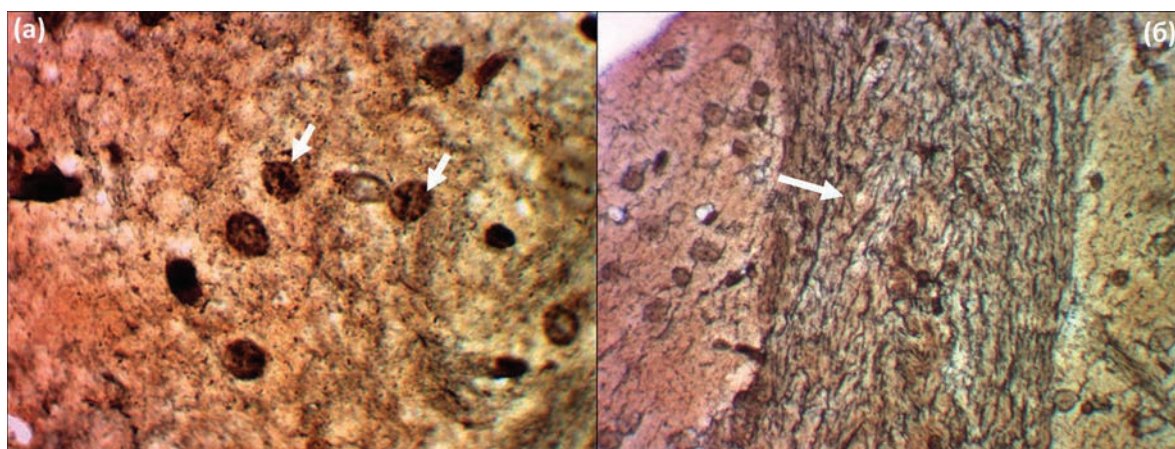


Рис. 4. Нейрогистологические оценки эффективности применения Церебролизина на модели судорог (3-я группа):

a — В большинстве нейроцитов сохранено ядро и грануляции Ниссля. Импрегнация серебром. Увеличение $\times 1200$; *б* — Чёткие контрастированные контуры комиссуральных волокон коры головного мозга. Импрегнация серебром. Увеличение $\times 1200$

Морфометрический анализ указывает, что в группе с Церебролизином количество повреждённых нервных клеток коры составило 20,5 %, тогда как в группе контроля количество повреждённых клеток составило 49,8 % при достоверных морфологических признаках гибели нейроцитов.

Таким образом, была воспроизведена модель тио-семикарбазидовых судорог в 100% случаев. Курсовое введение Церебролизина не вызывает развитие судорог.

Предварительное введение Церебролизина уменьшает тяжесть и длительность судорог, вызванных тио-семикарбазидом, увеличивает выживаемость животных. С уменьшением дозы конвульсанта усиливается противосудорожный эффект Церебролизина. Исследуемый препарат оказывает нейропротективный эффект на клетки коры головного мозга в условиях ишемии, ассоциированной с тио-семикарбазидной моделью судорог, обеспечивая сохранность нейроцитов.

Литература

1. Громова О.А., Пронин А.В., Торшин И.Ю. и др. Нейротрофический и антиоксидантный потенциал нейропептидов и микроэлементов. Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. 2015; 7 (4): 92–100.
2. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В. Пептидный состав церебролизина как основа молекулярных механизмов действия и клинической эффективности препарата. Современная терапия в психиатрии и неврологии. 2014; 2: 27–36.
3. Ижбульдина Г.И. Изменения системного гомеостаза и свободно-радикального окисления липидов в острой стадии ишемического инсульта. Журнал неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2012; 112: 3: 31–37.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944с.
5. Торшин И.Ю., Громова О.А. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. М.: МЦНМО 2012; 684.
6. Шамалов Н.А., Стаховская Л.В., Буренчев Д.В., Кичук И.В., Творогова Т.В., Боцына А.Ю., Смышков А.С., Кербиков О.В., Меслер Х., Новак П., Скворцов В.И. Влияние церебролизина в дозе 50 мл на морфометрическую картину очага поражения головного мозга при ишемическом инсульте. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова, 2010; 110: 12: 34–37.
7. Chen C., Wei S., Tsaia S., Chen X., Cho D. Cerebrolysin enhances cognitive recovery of mild traumatic brain injury patients: double-blind, placebo-controlled, randomized study. Br J Neurosurg. 2013; 27: 6: 803–807.
8. Georgy G., Nassar N., Mansour H., Abdallah D. Cerebrolysin Ameliorates Cognitive Deficits in Type III Diabetic Rats. PLoS One. 2013; 8: 6: 64847.
9. Vazquez-Roque R., Ubhi K., Masliah E., Flores G. Chronic cerebrolysin administration attenuates neuronal abnormalities in the basolateral amygdala induced by neonatal ventral hippocampus lesion in the rat. Synapse 2014; 68: 1: 31–8.

Изучение эффектов магния оротата на модели первично-генерализованных судорог у крыс

Калачёва А.Г., Богачёва Т.Е., Громова О.А., Гришина Т.Р., Демидов В.И.

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Ивановская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иваново

Резюме. Исследовано действие магния оротата на модели первично-генерализованных судорог в эксперименте. Курсовое введение магния оротата (препарат Магнерот) в дозе 0,06 г/кг массы тела уменьшает тяжесть и длительность судорог, вызванных тиосемикарбазидом, увеличивает выживаемость животных, оказывает нейропротективный эффект, влияя на различные морфологические структуры. Препарат Магнерот – донатор магния, восполняющий в организме дефицит, вызванный конвульсантом.

Ключевые слова: магния оротат, судороги, нейропротекция

The study of the effects of magnesium orotate on the model of primary generalized convulsions in rats

Kalacheva A.G., Bogacheva T.E., Gromova O.A., Grishina T.R., Demidov V.I.

Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy»
of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

Resume. The effect of magnesium orotate on the model of primary generalized convulsions in the experiment was studied. The course of administration of magnesium orotate (preparation Magneter) at a dose of 0,06 g / kg of weight reduces the severity and duration of seizures caused by thiosemicarbazide, increases the survival of animals, has a neuroprotective effect, affecting various morphological structures. The drug Magneter – the donor of magnesium, replenishing in the body the deficit caused by the convulsant.

Keywords: magnesium orotate, convulsions, neuroprotection

Автор, ответственный за переписку:

Калачёва Алла Геннадьевна – к.м.н, доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России; 153012, г. Иваново, пр. Шереметевский, д. 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: alla_kalacheva@mail.ru

Магний является эссенциальным элементом, который участвует в биохимических и физиологических реакциях, протекающих во всём организме и, в первую очередь, в контроле активности нервной системы, нервно-мышечной передаче, в энергетическом и электролитном обмене. Магний входит в состав важнейших нейроактивных ферментов, в частности, глутаминсинтетазы, участвующей в регуляции процессов возбуждения–торможения в коре [1–3]. При дефиците ионов магния электрическая возбудимость клеток повышается. В клиническо-экспериментальных исследованиях отмечено снижение внутриклеточной концентрации магния в нейронах при психических и неврологических нарушениях, в том числе, эпилепсии. Оротовая кислота имеет выраженный трофический эффект для синтеза белков. Поэтому актуальным является изучение возможного потенцирования эффекта противосудорожных средств препаратами магния и оротовой кислоты [4–6].

Целью настоящего исследования являлось изучение влияния магния оротата на выраженность и тяжесть течения первично-генерализованных судорог и оценка его нейропротективного действия.

Материалы и методы

Исследование проведено на 30 белых крысах-самцах массой 200 г. Животные были разделены на 3 группы:

первая группа ($n = 10$) – контроль-интактный; вторая группа ($n = 10$) – контроль с воспроизведением первично-генерализованных судорог; третья ($n = 10$) группа животных получали препарат Магнерот, содержащий магния оротат, в дозе 0,06 г/кг массы внутривенно в течение 18 дней. Для определения противосудорож-

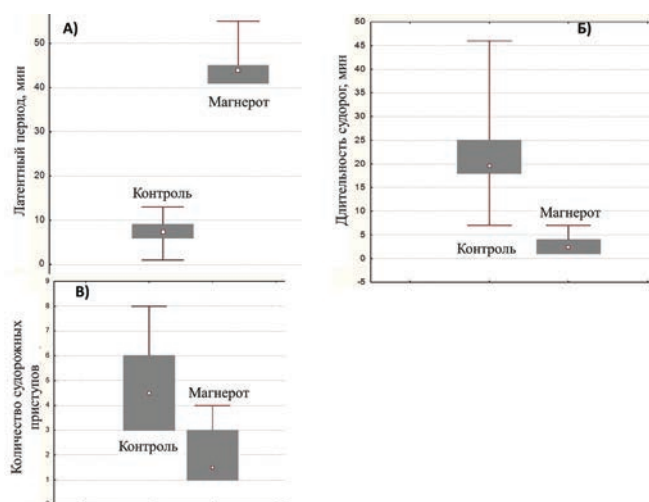


Рис. 1. Латентный период до судорожных приступов (А), продолжительность (Б) и количество судорожных приступов (В) в группе контроля и при приёме магния оротата

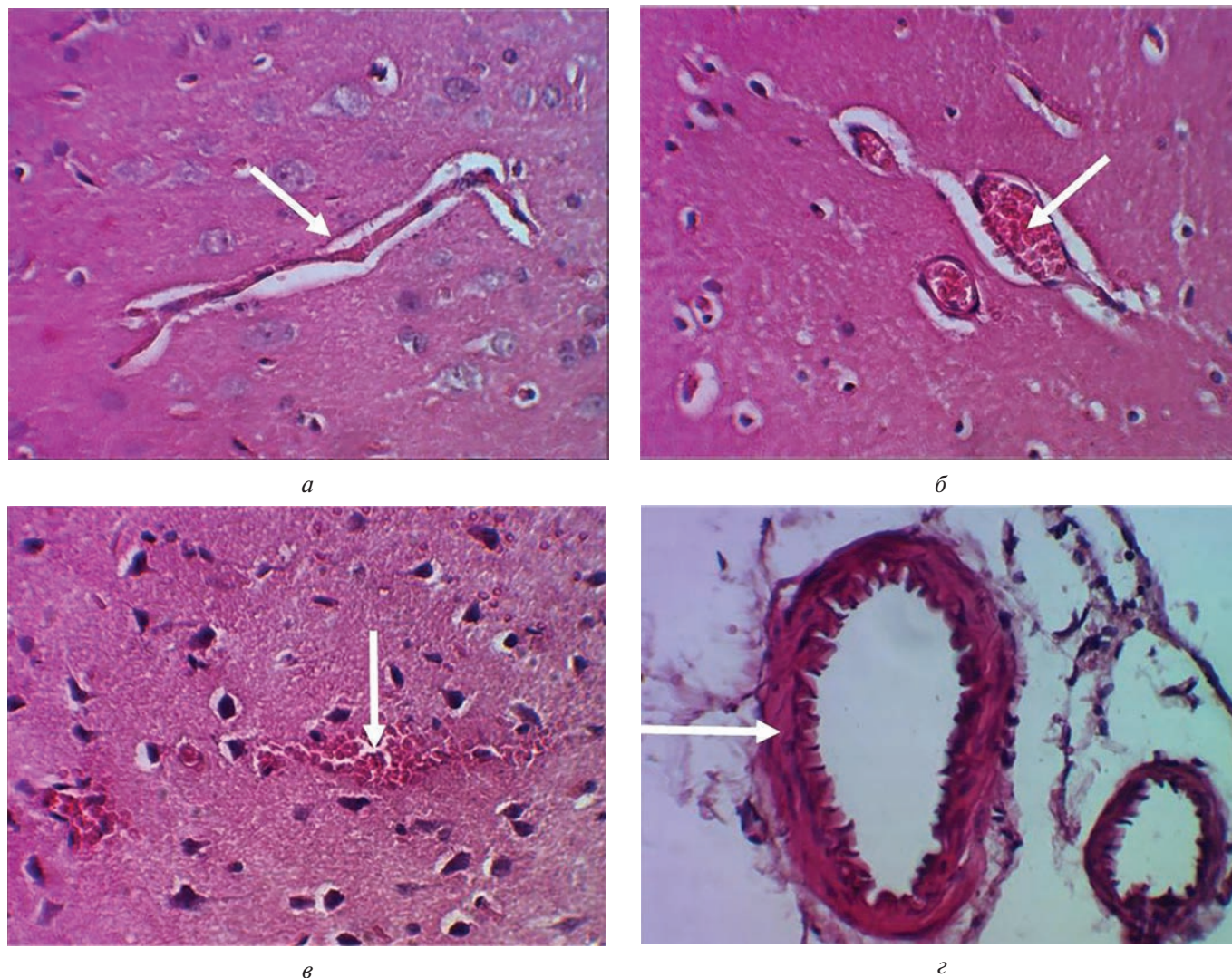


Рис. 2. Исследование гистологии сосудов контрольной группы с моделью судорог (группа 2):

а — Агрегация эритроцитов, перикапиллярный отёк серого вещества коры переднего мозга. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$; *б* — Полнокровие и дилатация венул. Выраженный периваскулярный и перичеселлюлярный отёк нервной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$; *в* — Мелкоочаговые диапедзные кровоизлияния в пирамидном слое коры больших полушарий. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$; *г* — Спастическое состояние пиальной артерии. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$

ных свойств веществ воспроизводят экспериментальные модели первично-генерализованной эпилепсии, включающие судороги, вызванные электрическим и химическим воздействием [2]. В экспериментальных группах была воспроизведена модель судорог введением внутрибрюшинно тиосемикарбазида в дозе 28 мг/кг. При этом во всех группах регистрировалось латентное время до первого судорожного приступа, количество, характер судорог (вздрагивание, манежный бег, клонические судороги, тонико-клонические судороги с боковым положением, тоническая экстензия, тоническая экстензия, заканчивающаяся гибелью), и летальность в течение 90 мин. Кровь получали после одномоментной декапитации. Определение содержания магния в плазме крови и эритроцитах экспериментальных животных на 18-й день исследования проводилось с помощью стандартных наборов «Ольвекс». Проводилось патогистологическое исследование секционного материала

(головного мозга). Статистическая обработка данных производилась с помощью программа «Statistica 6.0».

Результаты и обсуждение

Результаты проведённого исследования показали, что курсовое введение магния оротата в указанной дозе на модели тиосемикарбазидовых судорог достоверно увеличило латентный период до начала судорог ($p = 0,006$), снизило тяжесть судорожных приступов (по признакам «манежный бег» и «тоническая экстензия») ($p = 0,005$), уменьшило длительность судорог ($p = 0,005$) и количество судорожных приступов ($p = 0,018$) (рис. 1). Летальность животных в третьей группе была существенно ниже и составила 83 %, тогда как в контрольной (вторая группа) — все животные погибли (100 %).

Курсовое введение магния оротата достоверно увеличило содержание магния в плазме крови по срав-

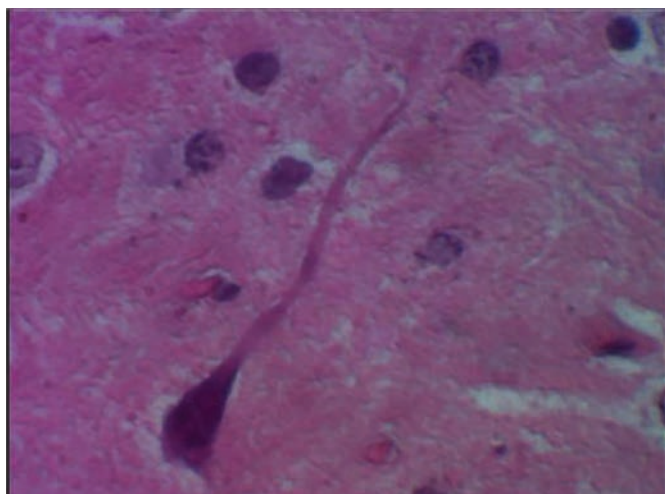
нению с интактными животными и группой с воспроизведением модели тиосемикарбазидовых судорог. Однократное введение конвульсанта тиосемикарбазида в максимальной дозе привело к значимому снижению уровня магния в эритроцитах. Курсовое введение магния оротата сохранило уровень магния в эритроцитах на таком же уровне. Увеличение дозы препарата магния и длительности его введения способно восполнять истощённое депо, что требует дальнейшего исследования.

Было проведено сравнительное гистологическое исследование образцов контрольной группы с моделью судорог (2-я группа) и группы с моделью судорог и приёмом магния оротата (3-я группа). В контрольной группе во всех наблюдениях выявлено выраженное нарушение кровообращения на уровне микроциркуляторного русла, равномерно проявляющееся в сером и белом веществе полушарий переднего мозга. В капиллярах явления гемостаза характеризовались агрегацией эритроцитов с выраженным периваскулярным отёком нервной ткани (рис. 2, а). Полнокровие венул сопровождалось дилатацией их просвета (рис. 2, б). В коре

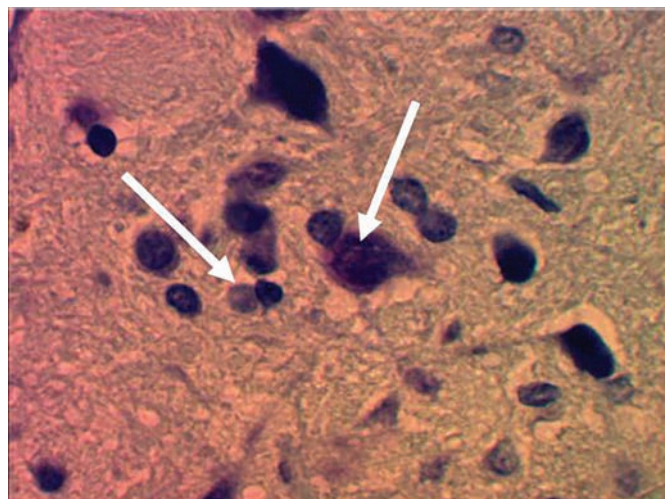
полушарий у 2 крыс (№ 2, 5) выявлены мелкоочаговые периваскулярные кровоизлияния (рис. 2, в). В интрацеребральных артериях и артериях мягкой мозговой оболочки отмечены признаки стойкого спазма с перпендикулярной ориентацией эндотелиальных клеток и формированием интимальных подушечек (рис. 2, г).

В контрольной группе также отмечены выраженные повреждения нейроцитов. Ишемические повреждения нейроцитов коры и подкорковых ядер выражались в исчезновении грануляций Нисля, гомогенизации цитоплазмы с исчезновением контуров ядра, набуханием аксона (рис. 3, а). Наблюдалась гибель нейроцитов пирамидного слоя коры, сопровождавшаяся уменьшением объёма клеток, гиперхромией цитоплазмы, размытием границ ядра, нейрофагической реакцией (рис. 3, б). Импрегнация серебром зон головного мозга, содержащих проводящие пути, показала неравномерную окраску и нечёткость контуров нервных волокон, а также очаговую пролиферацию микроглиальных элементов (рис. 3, в).

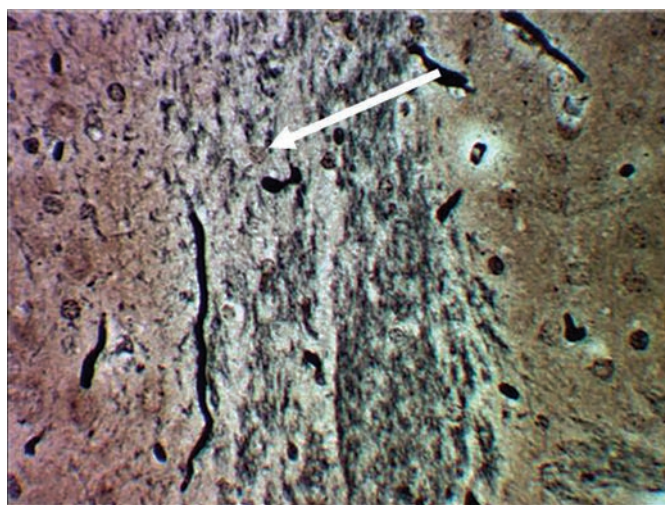
Гистологический анализ образцов 3-й группы показал, что расстройства кровообращения при приёме



а



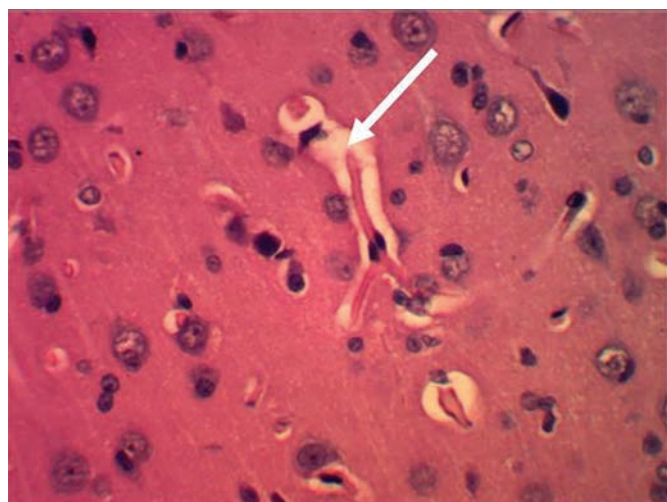
б



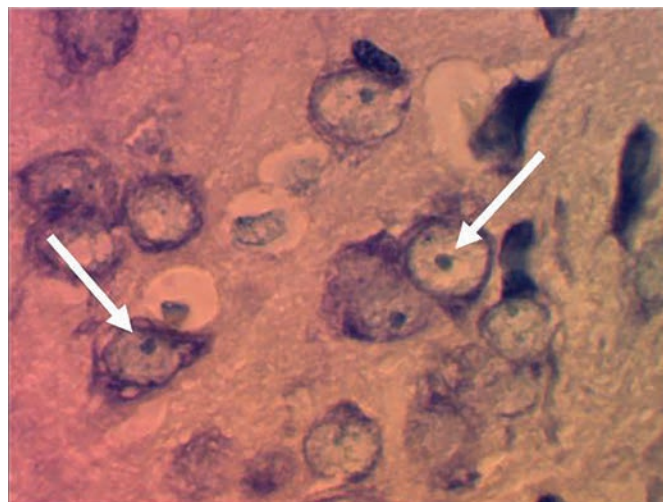
в

Рис. 3. Нейрогистология контрольной группы с моделью судорог (группа 2):

а — Пирамидная нервная клетка коры с гомогенизированной цитоплазмой и набухшим аксоном. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 1200$; б — Некроз нейроцита с явлениями нейрофагии. Преобладание тёмных форм повреждённых нейронов. Окраска толуидиновым синим по Нислю. Увеличение $\times 1200$; в — Комиссуральные волокна коры головного мозга имеют размытые контуры с участками демиелинизации. Импрегнация серебром. Увеличение $\times 480$



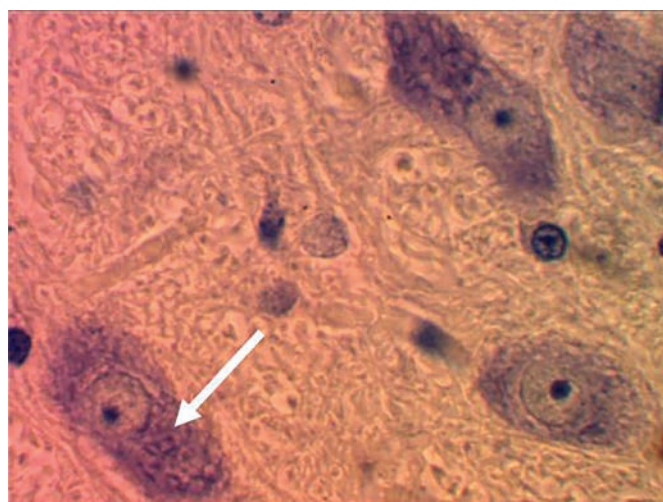
а



б

Рис. 4. Гистология нервной ткани в модели судорог с терапией оротатом магния:

а — Гемостаз, отёк нервной ткани. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение $\times 480$; б — В цитоплазме нейроцитов равномерно распределены мелкие глыбки Ниссля. Окраска толуидиновым синим по Ниссля. Увеличение $\times 1200$; в — Проплиферация олигодендроцитов. Окраска толуидиновым синим по Ниссля. Увеличение $\times 1200$



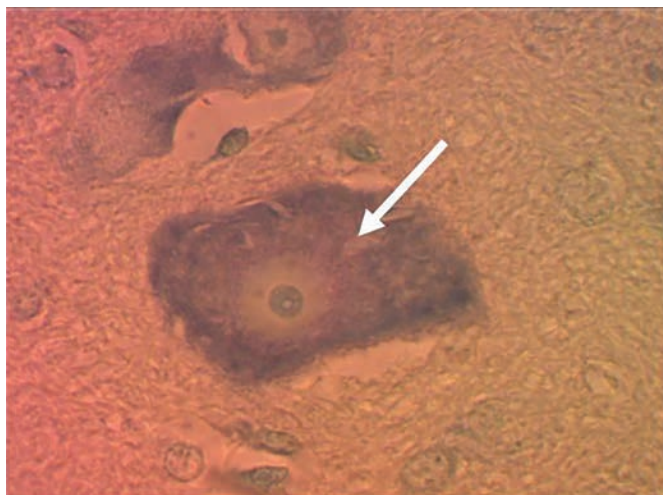
в

магния оротата характеризовались гемостазом в капиллярах, умеренно выраженным перикапиллярным и перичеллюлярным отёком нервной ткани коры и белого вещества переднего мозга (рис. 4, а), а также только в 2 наблюдениях из 16 выявлены мелкоочаговые кровоизлияния в стволе головного мозга. Спастическое состояние интрацеребральных и пияльных артерий зарегистрированы лишь в одном наблюдении. Значительная часть нейроцитов коры и подкорковых ядер на светооптическом уровне не имела структурных повреждений (рис. 4, б). В большинстве наблюдений отмечена выраженная реакция макроглиальных элементов, которая характеризовалась гипертрофией дренажных олигодендроцитов, очаговой пролиферацией астроцитов (рис. 4, в). Выраженная реакция макроглиальных элементов (пролиферация астроцитов, гипертрофия олигодендроцитов) при использовании препарата Магнерот возможно связана с анаболическим эффектом оротовой кислоты.

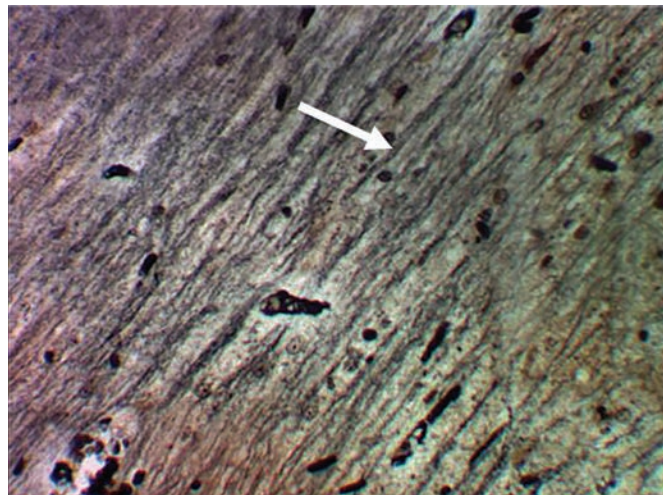
При приёме магния оротата отмечают менее выраженные повреждения нейроцитов и проводящих

нервных путей, чем в контрольной группе. В цитоплазме отдельных нейроцитов выявлен очаговый и тотальный лизис глыбок Ниссля при сохранении ядра (рис. 5, а), что позволяет рассматривать такие клетки, как «светлые» формы повреждения нейроцитов. Импрегнация серебром проводящих путей головного мозга в большинстве наблюдений показала сохранность миелиновых оболочек нервных волокон, которые имели чёткие контуры (рис. 5, б). Лишь в 2 наблюдениях из 16 выявлены мелкие фокусы демиелинизации комиссуральных и ассоциативных волокон. Таким образом, имеются отличительные особенности в характере повреждения нейроцитов, выражающихся преобладанием «светлых» форм у крыс, получавших Магнерот. Такие изменения нейроцитов принято считать обратимыми, в отличие от преимущественного формирования «тёмных» нейроцитов в коре головного мозга крыс контрольной группы.

Морфометрический анализ показал, что в 3-й группе количество повреждённых нервных клеток коры составило 34,2 %, в сравнении с 2-й группой, где количество повреждённых клеток было на уровне



а



б

Рис. 5. Состояние нейроцитов при приёме магния оротата:

а — Хроматолиз нейроцита. Окраска толуидиновым синим по Нисслю. Увеличение $\times 1200$; б — Чёткие контрастированные контуры комиссуральных волокон коры головного мозга. Импрегнация серебром. Увеличение $\times 480$

49,8 % при достоверных морфологических признаках необратимой гибели нейроцитов. Можно предположить, что использование препарата Магнерот в качестве превентивной терапии в третьей группе оказало хороший нейропротективный эффект на клетки коры головного мозга в условиях «стресса» (ишемии), вызванной судорогами, что подтверждено сохранностью органелл цитоплазмы нейроцитов.

Таким образом, курсовое введение магния оротата (препарат Магнерот) уменьшает тяжесть и длительность

судорог, вызванных тиосемикарбазидом, увеличивает выживаемость животных. Препарат Магнерот — донатор магния, восполняющий в организме дефицит, вызванный конвульсантом. Препарат магния оказывает нейропротективный эффект на клетки коры головного мозга в условиях ишемии, вызванной судорогами, влияя на различные морфологические структуры.

Литература

1. Громова О.А. Магний и пиридоксин: основы знаний. Москва, ПротоТип, 2006; 234.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых лекарственных веществ / Под ред. Р.У.Хабриева. 2005; 281—289.
3. Селянина Н.В. Мозговой нейротрофический фактор как прогностический критерий развития когнитивных нарушений у больных острой черепно-мозговой травмой. Медицинский альманах. 2013; 1: 127—129.
4. Селянина Н.В., Каракулова Ю.В. Активация репаративных процессов в остром периоде черепно-мозговой травмы под влиянием нейротрофической терапии. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2012; 112 (5): 46—49.
5. Торшин И.Ю., Громова О.А. Экспертный анализ данных в молекулярной фармакологии. М.: МЦНМО; 2012; 684.
6. Торшин И.Ю., Громова О.А., Калачева А.Г., Ощепкова Е.В., Мартынов А.И. Метаанализ клинических исследований воздействия оротата магния на сердечно-сосудистую систему. Терапевтический архив, 2015; 87: 6: 88—97.

Тропоксин в эффективной дозе у крыс не оказывает влияния на активность изоформ CYP2C9 и CYP1A2 цитохрома P450

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

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

Резюме. Представлены результаты изучения влияния тропоксина на активность изоформ цитохрома CYP2C9 и CYP1A2 по маркерным препаратам лозартану и кофеину в экспериментах на крысах. Показано, что тропоксин в эффективной дозе (30 мг/кг) после 4-дневного введения (3 раза в день) не вызывает изменения активности исследуемых изоформ. Изучение влияния продолжительности введения тропоксина на изменение активности изофермента CYP2C9 показало, что введение лекарственного средства в течение 3 или 4 дней не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на изоформу CYP2C9.

Ключевые слова: тропоксин, CYP2C9, CYP1A2, лозартан, кофеин, метаболическое отношение, межлекарственное взаимодействие

Tropoxine in the effective dose does not affect on activity of CYP2C9 and CYP1A2 isoforms of cytochrome P450 in rats

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

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Effects of tropoxine on activity of isoforms CYP2C9 and CYP1A2 of cytochrome P450 using marker drugs losartane and caffeine were studied. Tropoxine in the effective dose (30 mg/kg) after 4-days intraperitoneal administration (3 times per day) in rats did not produce changes of CYP2C9 and CYP1A2 isoforms activity. Study of duration of tropoxine administration on the CYP2C9 activity changing was shown that 3 and 4 days administration of the drug did not affect neither inhibiting nor inducing effect of CYP2C9 isoform.

Keywords: tropoxine, CYP2C9, CYP1A2, losartane, caffeine, metabolic ratio, drug-drug interaction

Автор, ответственный за переписку:

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

Введение

Одной из наиболее важных метаболизирующих ферментных систем в организме человека является система цитохрома P450 (CYP), которая отвечает за окислительный метаболизм многочисленных эндогенных веществ и ксенобиотиков [8]. У людей около 90 % лекарств и ксенобиотиков в первую очередь метаболизируются изоферментами семейств CYP1, CYP2, CYP3 и CYP4 [9]. Многие лекарственные препараты могут влиять на активность изоформ цитохрома P450, являясь либо его ингибиторами, либо индукторами, что может лежать в основе межлекарственного взаимодействия, и требует учёта при сочетанной фармакотерапии [5].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» разработано лекарственное средство (ЛС) из группы производных оксима тропинона, обладающее противомигреновой антисеротониновой активностью — тропоксин [1, 3, 4]. Влияние новых ЛС на изоформы цитохрома P450 необходимо оценивать уже на доклиническом этапе, поэтому целью настоящего исследования явилась оценка влияния тропоксина на изменение активности изофермента CYP2C9 и CYP1A2 в дозе 30 мг/кг (в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч). Дополнительно изучено влияние эффективной дозы

тропоксина на изменение активности изофермента CYP2C9 при разной длительности введения препарата (3- и 4-дневное введение).

Материалы и методы

Изучение влияния тропоксина на изменение активности изоформы CYP2C9 после его введения в эффективной дозе

В настоящем исследовании оценивали влияние тропоксина в эффективной дозе 30 мг/кг при введении препарата в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч. Выбор дозы основывался на результатах ранее проведённых исследований антимигренозной активности и экспериментальных данных фармакокинетики тропоксина у крыс [2].

Индуцирующий или ингибирующий эффект тропоксина оценивали по величинам метаболических отношений (МО) препарата-маркера. Под «МО» понимали отношение концентрации метаболита лозартана (Е-3174) и кофеина (теобромина и параксантина) к концентрации исходного соединения в суточной моче.

На данном этапе исследования определяли МО (Е-3174/лозартан) после введения лозартана без тропоксина (контроль; I) в сравнении с введением

лозартана на фоне 4-дневного введения тропоксина в дозе 30 мг/кг — II.

Крысам вводили сначала перорально лозартан (контроль), затем по истечении 4 сут этим же животным вводили в/б тропоксин в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч (субхроническое введение). Лозартан животным вводили через 30 мин после последнего введения тропоксина.

Препарат-маркер лозартан вводили в дозе 30 мг/кг. Крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Анализ проб мочи животных проводили с использованием ВЭЖХ с флуориметрическим детектированием. Методики экстракции и количественного определения исследуемых веществ описаны *Прониной О.Г. и соавт.* [7].

Изучение влияния длительности введения крысам тропоксина в дозе 30 мг/кг на изменение активности изоформы CYP2C9

Исследования проводили на 2 группах крыс. В каждую группу входило по 8 животных. Субхроническое 3-дневное введение тропоксина — группа I и субхроническое 4-дневное введение тропоксина — группа II. Крысам I группы сначала вводили перорально лозартан (контроль), затем по истечении 3 сут этим же животным вводили в/б тропоксин в течение 3 дней, трёхкратно через каждые 3 ч. Крысам II группы сначала вводили лозартан (контроль), затем по истечении 3 сут этим же животным вводили в/б тропоксин в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч. Лозартан в дозе 30 мг/кг животным обеих групп вводили через 30 мин после последнего введения тропоксина.

Изучение влияния тропоксина на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP1A2 по данным экскреции с мочой

На данном этапе исследования определяли МО (теобромин/кофеин и параксантин/кофеин) после введения кофеина без тропоксина (контроль; I) в сравнении с введением кофеина на фоне 4-дневного введения тропоксина в дозе 30 мг/кг — II.

Крысам вводили сначала перорально кофеин (контроль), затем по истечении 4 сут этим же животным вводили в/б тропоксин в течение 4 дней, трёхкратно через каждые 3 ч (субхроническое введение). Кофеин животным вводили через 30 мин после последнего введения тропоксина.

Препарат-маркер кофеин вводили животным в дозе 50 мг/кг. Крыс помещали в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде. У каждой крысы собирали суточную мочу. Анализ проб мочи животных проводили с использованием ВЭЖХ с УФ-детектированием. Методики экстракции и количественного определения исследуемых веществ подробно описаны *Новицкой и соавт.* [6].

Достоверность различий между величинами МО после введения препаратов-маркеров (лозартана и кофеина) без тропоксина (контроль) и на фоне субхронического введения тропоксина оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента.

Результаты и их обсуждения

На рис. 1 представлены отношения концентраций метаболита к препарату-маркеру в суточной моче крыс, т. е. МО после введения крысам лозартана без тропоксина (контроль; I) и введения лозартана на фоне субхронического введения тропоксина в дозе 30 мг/кг (II). Так, после введения лозартана без тропоксина МО составило $1,70 \pm 0,67$, а после введения лозартана на фоне субхронического введения тропоксина — $2,12 \pm 0,81$.

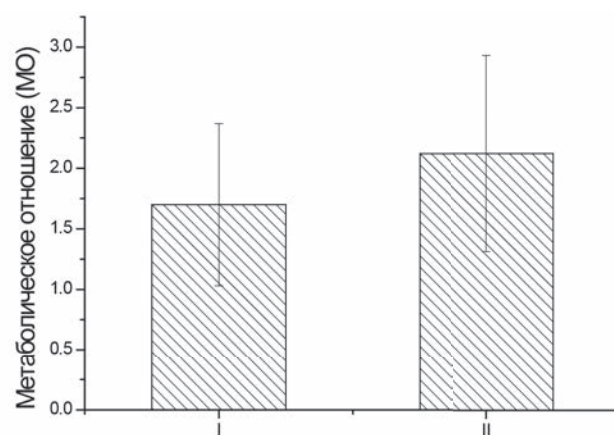


Рис. 1. Значения МО (Е-3174/лозартан) после многократного введения тропоксина крысам в дозе 30 мг/кг ($n = 8$; $\bar{x} \pm S_x$):

I — введение лозартана без тропоксина (контроль, I); II — введение лозартана на фоне 4-дневного введения тропоксина в дозе 30 мг/кг (II)

При сравнении величин МО (Е-3174/лозартан) после введения лозартана без тропоксина (контрольная группа) и после введения лозартана на фоне 4-дневного введения тропоксина статистически значимые различия не выявлены ($p < 0,05$).

На рис. 2 представлены значения МО, полученные в контрольных группах в сравнении с аналогичными параметрами, полученными после введения лозартана на фоне 3- и 4-дневного введения тропоксина.

При сравнении величин МО не выявлены статистически значимые различия в контрольных группах в сравнении с введением лозартана на фоне 3- и 4-дневного введения тропоксина ($p < 0,05$).

МО в контрольной группе составило $2,06 \pm 1,01$, а после субхронического 3-дневного введения тропоксина — $2,04 \pm 1,09$. Результаты 4-дневного эксперимента показали, что МО в контроле составило $1,70 \pm 0,67$, а после субхронического 4-дневного введения тропоксина — $2,12 \pm 0,81$.

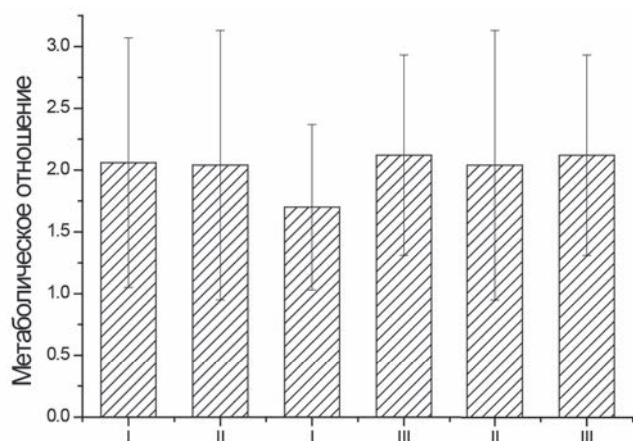


Рис. 2. Значения МО (Е-3174/лозартан) после субхронического введения тропоксина крысам в дозе 30 мг/кг ($n = 8$; $\bar{x} \pm S_x$):

I – введение лозартана в дозе 30 мг/кг без тропоксина (контрольные группы); II – введение лозартана в дозе 30 мг/кг на фоне 3-дневного введения тропоксина (группа II); III – введение лозартана в дозе 30 мг/кг на фоне 4-дневного введения тропоксина (группа III)

При сравнении МО, рассчитанных после 3- и 4-дневного введения тропоксина, статистически значимые различия не были выявлены ($p < 0,05$). МО после субхронического 3-дневного введения тропоксина составило $2,04 \pm 1,09$; после 4-дневного введения – $2,12 \pm 0,81$. Таким образом, продолжительность введения тропоксина (3 или 4 дня) в дозе 30 мг/кг не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на изофермент CYP2C9.

Также было установлено, что тропоксин в эффективной дозе не оказывал индуцирующего/ингибирующего эффекта на изофермент CYP1A2 ($p < 0,05$).

На рис. 3 представлены величины МО метаболита кофеина – теобромина к неизменённому веществу после введения кофеина без тропоксина и на фоне 4-дневного в/б введения тропоксина в дозе 30 мг/кг.

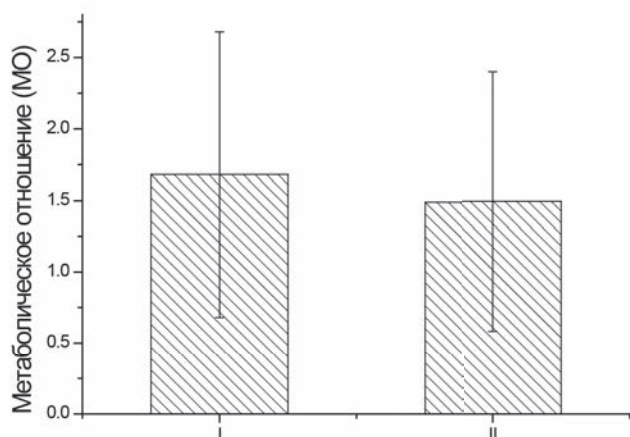


Рис. 3. МО (теобромин/кофеин) после введения тропоксина в дозе 30 мг/кг; I – контроль; II – тропоксин 30 мг/кг ($n = 8$; $\bar{x} \pm S_x$)

Среднее значение МО после 4-дневного введения крысам тропоксина в эффективной дозе практически не отличалось от аналогичного параметра в контрольной группе животных. Так, МО в группе I составило $1,68 \pm 1,00$ и в группе II – $1,49 \pm 0,91$.

На рис. 4 представлены величины МО метаболита кофеина – параксантина к неизменённому веществу после введения кофеина без тропоксина (I) и на фоне 4-дневного в/б введения тропоксина в дозе 30 мг/кг (II).

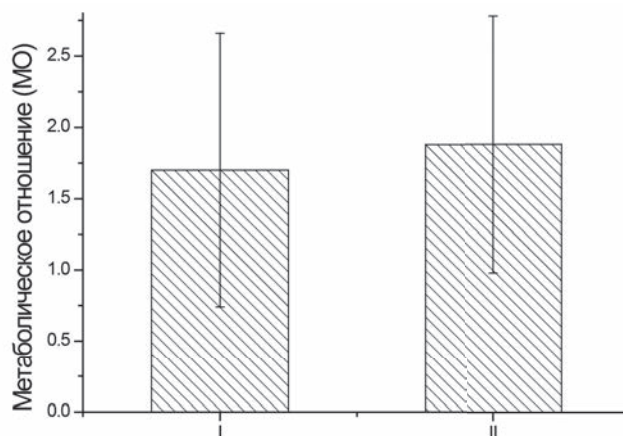


Рис. 4. МО (параксантин/кофеин) после введения тропоксина в дозе 30 мг/кг; I – контроль; II – тропоксин 30 мг/кг ($n = 8$; $\bar{x} \pm S_x$)

Статистический анализ не выявил достоверно значимых различий между величинами МО параксантина в суточной моче животных после введения кофеина без тропоксина (I) и на фоне субхронического введения тропоксина (II). Так, для крыс из группы I этот параметр равнялся $1,70 \pm 0,96$ и для животных группы II – $1,88 \pm 0,90$, соответственно. То есть, введение кофеина на фоне 4-дневного в/б введения тропоксина в дозе 30 мг/кг не вызвало изменения активности изофермента CYP1A2.

Заключение

На крысах изучено влияние тропоксина на изменение активности изофермента цитохрома P450 CYP2C9 (маркерный субстрат – лозартан) и CYP1A2 (маркерный субстрат – кофеин). Изучение влияния дозы 30 мг/кг на изменение активности изоферментов CYP2C9 и CYP1A2 показало, что тропоксин в эффективной дозе после 4-дневного введения (3 раза в день) не вызывает изменения активности данных изоформ. Изучение влияния продолжительности введения тропоксина в дозе 30 мг/кг на изменение активности изофермента CYP2C9 показало, что введение тропоксина в течение 3 или 4 дней не оказывает ни ингибирующего, ни индуцирующего эффекта на изофермент CYP2C9.

Литература

1. Ганьшина Т.С., Горбунов А.А., Гнездилова А.В. и др. Тропоксин — новое средство для лечения мигрени. Хим.-фарм. журн. 2016; 50: 1: 19–23.
2. Жердев В.П., Колыванов Г.Б., Литвин А.А. и др. Оценка взаимосвязи между фармакокинетикой и фармакодинамикой тропоксина у крыс Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 3: 21–25.
3. Косточка Л.М., Мирзоян Р.С., Ганьшина Т.С., Середенин С.Б. Синтез и антисеротониновая активность новых производных тропана. Хим.-фарм. журн. 2010; 44: 9: 6–9.
4. Мирзоян Р.С., Середенин С.Б., Ганьшина Т.С. и др. Эксперим. и клин. фармакол. 1998; 61: 2: 28–31.
5. Новицкая Я.Г. Оценка фармакокинетического взаимодействия афобазола с препаратом-субстратом изофермента цитохрома P450 CYP1A2. Автореф. канд. биол. наук, М.: 2014; 24.
6. Новицкая Я.Г., Литвин А.А., Жердев В.П. Количественный анализ кофеина и его метаболитов в плазме крови крыс с применением ВЭЖХ, как метод определения метаболических отношений. Вест. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2013; 54: 1: 56–60.
7. Пронина О.Г., Колыванов Г.Б., Виглинская А.О., Жердев В.П. Количественное определение лозартана и его метаболита в моче крыс. Вест. Моск. Ун-та. Сер. 2. Химия. 2012; 53: 2: 194–197.
8. Frye R.F. Probing the world of cytochrome P450 enzymes. Mol Interv. 2004; 4: 3: 157–162.
9. Wijnen P.A., Buijsch R.A., Drent M. et al. Review article: the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms. Aliment Pharmacol Ther. 2007; 26: Suppl. 2: 211–219.

Динамика распределения лития в различных тканях после перорального приёма цитрата лития у крыс

Пронин А.В.¹, Громова О.А.¹, Торшин И.Ю.², Гришина Т.Р.¹

¹ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иваново

² – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Москва

Резюме. Для цитрата лития в дозе 1 000 мг/кг получены фармакокинетические кривые для цельной крови и гомогенатов тканей 11 различных биосубстратов (головной мозг, лобная доля головного мозга, сердце, аорта, лёгкие, печень, почки, селезёнка, надпочечники, бедренная кость, моча). В рамках бескамерного анализа динамики концентраций в цельной крови получены следующие значения фармакокинетических параметров цитрата лития: $C_{\max} = 54,1$ мкг/л, $T_{\max} = 1,50$ ч, $C_{\text{last}} = 33,7$ мкг/л, $AUC_t = 1776$ мкг/л × ч, $MRT_t = 22,7$ ч, $L_z = 0,004$ л/ч, $T_{1/2} = 146$ ч, $CL = 0,014$ л/ч, $V_d = 3,0$ л. Концентрации лития в цельной крови и в лобной доли головного мозга оставались стабильными в течение, по крайней мере, 40–50 ч после прохождения пика концентрации. Многокамерный фармакокинетический анализ показал, что стабилизация уровней лития в крови и в головном мозге поддерживается за счёт специального «депо» лития, в состав которого входят головной мозг, аорта, почки и бедренная кость.

Ключевые слова: цитрат лития, бескамерная модель, многокамерное моделирование, фармакокинетика, биосубстраты

Dynamics of distribution of lithium in different tissues after oral administration of lithium citrate in rats

Pronin A.V.¹, Gromova O.A.¹, Torshin I.IU.², Grishina T.R.¹

¹ – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ivanovo State Medical Academy" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

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

Resume. Concentration time curves for whole blood and tissue homogenates of 11 different bio-substrates (brain, frontal lobe, heart, aorta, lungs, liver, kidneys, spleen, adrenal capsules, femur, urine) were obtained for lithium citrate at a dose of 1 000 mg/kg. In the course of a non-compartmental analysis of the concentrations dynamics in the whole blood the following values of the pharmacokinetic parameters of lithium citrate were obtained: $C_{\max} = 54,1$ mcg/L, $T_{\max} = 1,50$ h, $C_{\text{last}} = 33,7$ mcg/L, $AUC_t = 1776$ mcg/L × h, $MRT_t = 22,7$ h, $L_z = 0,004$ l/h, $T_{1/2} = 146$ h, $CL = 0,014$ l/h, $V_d = 3,0$ l. Lithium concentrations in the whole blood and in the brain frontal lobe were stable for at least 40...50 hours after overcoming the peak concentration. Multi-compartmental pharmacokinetic analysis showed that the stabilization of the lithium levels in the blood and in the brain is maintained due to the special lithium "depot" that includes brain, aorta, kidneys and femur.

Keywords: lithium citrate, non-compartmental model, multi-compartmental modeling, pharmacokinetics, bio-substrates

Автор, ответственный за переписку:

Пронин Артем Викторович – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России; 153000, г. Иваново, Шереметевский пр., д. 8; тел.: +7 (915) 818-98-59; e-mail: doctormchs1978@mail.ru

Введение

Ион лития характеризуется широким спектром важных фармакологических эффектов, включая нейтропротекторное, нейротрофическое, антидиабетическое, нормотимическое действие. Наиболее известной фармакологической формой лития является карбонат лития, использующийся в психиатрии для терапии биполярных расстройств [1], маний [2] и др. Однако клиническое использование карбоната лития существенно ограничивается необходимостью: (1) регулярных измерений концентраций лития в крови [3]; (2) поддержания узкого терапевтического коридора концентраций лития в плазме (0,6–1,2 ммоль/л, концентрации >2,5 ммоль/л ассоциированы с тяжёлым отравлением [4]); (3) использования высоких доз (1–3 г/сут, в остром периоде – до 9 г/сут) [5]. Поэтому, для повышения безопасности литиевой терапии ис-

следуются эффекты других солей лития и, в частности, цитрата лития.

Перспективность цитрата лития как нейтропротекторного и нейротрофического средства обусловлена тем, что нейтропротекторные и нейротрофические эффекты цитрата лития проявляются в достаточно низких дозах (сотни микрограмм – единицы миллиграмм в расчёте на элементный литий) [6]. Цитрат-анион в составе соли способствует преимущественной компартиментализации лития в нервной ткани (в частности, в лобной доле), где осуществляет мультитаргетное действие: ингибирует киназу-3 гликоген синтетазы (GSK-3), NMDA рецепторы, проявляет анти-апоптотическое действие, стимулирует увеличение секреции BDNF и др. [7]. На моделях хронической двусторонней окклюзии общих сонных артерий нами было установлено, что глюконат лития и цитрат лития являются эффективными средствами профилактики неврологического

дефицита при ишемических или нейродегенеративных повреждениях головного мозга [8]. В клинических исследованиях установлены нарушения литиевого гомеостаза у пациентов с ишемическим инсультом [9], в т. ч. на фоне артериальной гипертензии [10]; установлена коморбидность дисциркуляторной энцефалопатии с диабетической полинейропатией, лобной атаксией и сниженными уровнями лития в крови [11].

В настоящей работе представлены результаты комплексного экспериментального исследования фармакокинетики цитрата лития в дозе 1000 мкг/кг. Выбор данной дозировки обусловлен тем, что фармакологические эффекты органических форм лития достоверны уже при дозах в 30–100 мкг/кг (при приёме в течение 1–3 мес) [6, 8]. Для исследования фармакокинетики и распределения лития в тканях было решено использовать однократное введение 10-кратной дозы от 100 мкг/кг, т. е. 1 000 мкг/кг, т. к. LD₅₀ цитрата лития составляет 3200 мг/кг [6], то доза в 1 000 мкг/кг элементного лития достаточно далека от остро-токсичной.

Материалы и методы

В качестве модельного объекта были использованы самцы белых крыс линии Вистар массой 200–250 г ($n = 54$, 9 групп по 6 животных в каждой). Все процедуры и опыты на крысах проводились в соответствии с международными правилами обращения с животными; исследование проводилось в соответствии с решением этического комитета ИвГМА от 24 марта 2016 г. Животные содержались в комнатах с одинаковыми условиями, в клетках по 6 крыс в каждой, при температуре 19–21 °С. Животных ежедневно кормили комбикормом из расчёта 40–50 г на особь.

Приготовление растворов. Зондирование проводилось раствором цитрата лития, 1 мл которого содержал 250 мкг элементного лития. Для получения дозы 1000 мкг/кг животному массой 250 г необходимо получить 250 мкг элементного лития, т. е. 1 мл раствора. Необходимый объём раствора рассчитывался исходя из массы животного. Для приготовления раствора использовался порошок цитрата лития. Молекулярная масса безводного цитрата лития – 218 г/моль, так что литий и цитрат-анион представлены в молярном соотношении 3:1, а в массовом соотношении 18:218, т. е. 1:12,1. Таким образом, 250 мкг элементного лития содержится в $250 \times 12,1 = 3,025$ мг цитрата лития.

Проведение эксперимента. Проводилось зондирование раствором цитрата лития в дозе 1000 мкг/кг (в расчёте на элементный литий), затем проводился отбор групп в 9 временных точках – 0 мин, 45 мин, 1 ч, 1,5 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч. Методом масс-спектрометрии определялись уровни лития в 11 различных биосубстратах – цельная кровь, головной мозг, лобная доля головного мозга, сердце, аорта, лёгкие, печень, почки, селезёнка, надпочечники, бедренная кость, моча.

Определение уровней лития. При определении уровней лития были получены гомогенаты тканей, исследованных биосубстратов. Образцы гомогенатов отбирались в пластиковые пробирки и разбавлялись в 5 раз бидистиллированной и деионизированной водой. При проведении масс-спектрометрии, в качестве внутреннего стандарта в растворы вводили индий в концентрации 25 мкг/л. Калибровочные растворы были приготовлены из стандартных растворов фирмы VTRC с известным содержанием в диапазоне 5–1000 мг/л (10–7 %). Полученные растворы анализировались на масс-спектрометре с ионизацией в индуктивно-связанной плазме «Plasma Quad PQ2 Turbo» (VG Elemental, Англия). Рабочая мощность СВЧ генератора была 1,3 кВт. Расход плазмообразующего газа (аргон) 14 л/мин, расход транспортирующего газа 0,89 мл/мин. Проводилось от 3 до 10 экспозиций каждого образца, время интегрирования сигнала составило 60 с.

Фармакокинетический анализ. В ходе настоящего анализа был использованы методы бескамерного и многокамерного фармакокинетического анализа. Многокамерный анализ проводился посредством пакета SimBiology в составе программного комплекса MATLAB-2016 [12], а бескамерный анализ – с использованием электронных таблиц Excel, дополненных модулями программного пакета PKSolver [13].

Результаты и их обсуждение

В результате проведения фармакокинетического эксперимента были получены фармакокинетические кривые (ФК-кривые, т. е. зависимости концентраций от времени) для гомогенатов тканей различных органов (рис. 1).

ФК-кривые, полученные для различных биосубстратов, существенно отличаются по характеру и степени изменения концентраций лития во времени. Оценка «расстояния» между данными кривыми как среднеквадратичного отклонения кривых друг от друга позволила произвести кластеризацию ФК-кривых с использованием метода анализа метрических сгущений [14]. В результате кластеризации было установлено, что все ФК-кривые, за исключением ФК-кривых для мочи, печени, сердца и бедренной кости образуют единственный кластер (рис. 2).

Очевидно, что в течение 1–2 ч после зондирования цитратом лития происходит интенсивное накопление лития во всех исследованных тканях. Максимальные пиковые концентрации лития ($C_{\max}$) отмечены именно в гомогенатах тканей печени и сердца, а минимальные – в моче и в гомогенатах лёгких и аорты.

Важно отметить, что концентрации лития в цельной крови и в лобной доле головного мозга оставались весьма стабильными в течение, по крайней мере, 45 ч после прохождения пика концентрации. Данное наблюдение может указывать, во-первых, на *преимущественное накопление лития в цельной крови и в лобных*

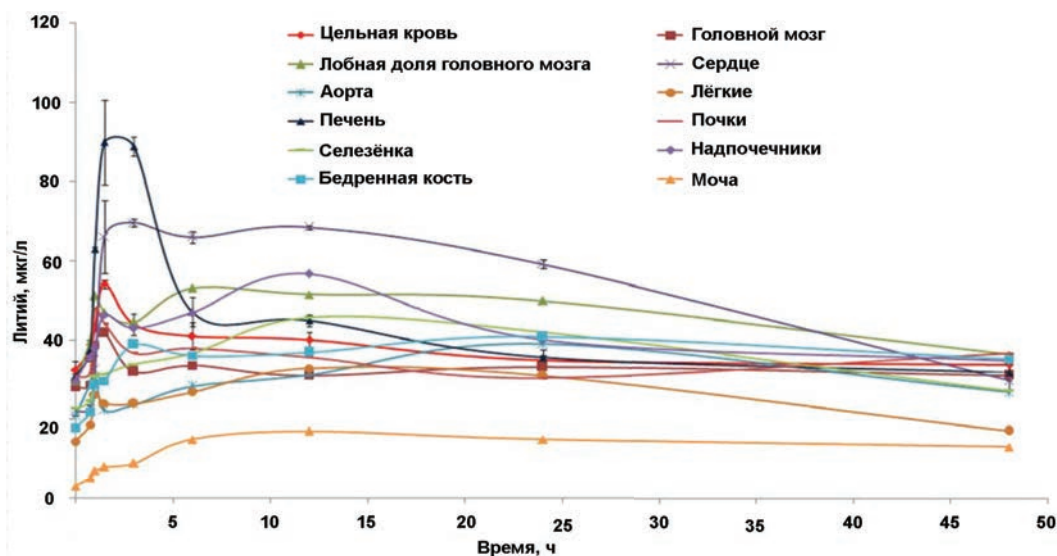


Рис. 1. Фармакокинетические кривые содержания лития в гомогенатах тканей после приёма цитрата лития в дозе 1000 мкг/кг (в расчёте на элементный литий)



Рис. 2. Результаты кластеризации ФК-кривых для различных биосубстратов

долях при использовании цитрата лития и, во-вторых, на поддержание концентраций лития в этих органах за счёт некоторого «депо» лития.

ФК-кривые цитрата лития для 6 из 11 исследованных биосубстратов имели только один пик (T_{max} в районе 1–1,5 ч) с последующим медленным снижением концентрации лития (печень, головной мозг, лобная доля, цельная кровь, сердце, почки) происходящим, вероятно, вследствие выведения лития. Для 6 из 11 биосубстратов (надпочечники, селезёнка, аорта, бедренная кость, лёгкие, почечек) ФК-кривые характеризовались присутствием второго, пологого пика концентраций лития, наблюдаемого через 10–20 ч после начала эксперимента (в случае бедренной кости – через 20–30 ч, см. рис. 1). Можно предположить,

что именно надпочечники, почки, селезёнка, аорта, бедренная кость, а также головной мозг и образуют своего рода «депо» лития, которое способствует поддержанию стабильных концентраций лития в цельной крови и в головном мозге. Существование такого «депо» лития подтверждается результатами проведённого нами многокамерного фармакокинетического анализа.

Результаты многокамерного фармакокинетического анализа цитрата лития

Для многокамерного ФК-анализа была использована усреднённая ФК-кривая для содержания лития в цельной крови, характеризовавшаяся выраженным пиком концентраций лития через 1–1,5 ч после зондирования и довольно пологим участком, указывающим на медленное выведение лития из крови (рис. 3).

Для получения наиболее адекватной многокамерной модели были исследованы одно-, двух-,

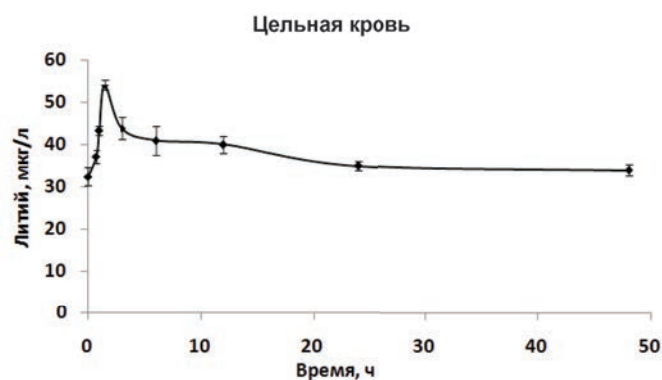


Рис. 3. Фармакокинетика уровней лития в цельной крови, усреднённая ФК-кривая

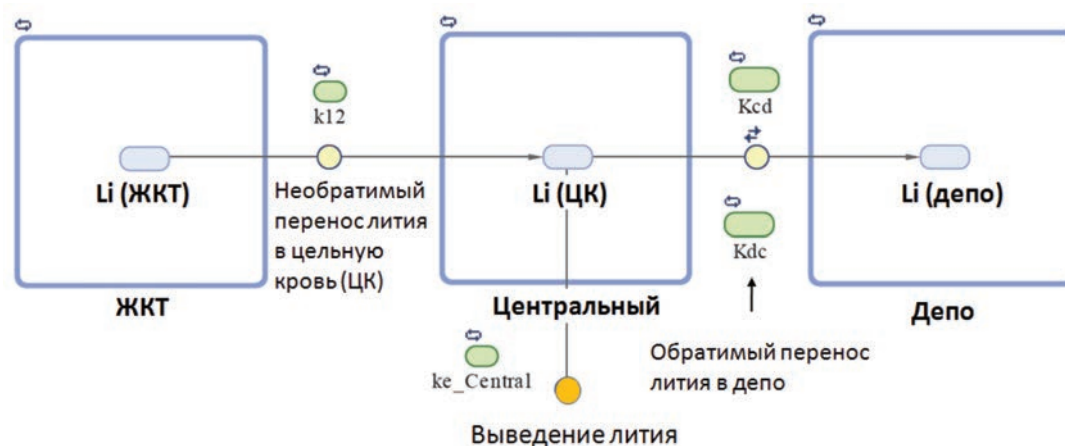


Рис. 4. Трёхкамерная модель фармакокинетики цитрата лития, полученная в результате многокамерного фармакокинетического моделирования в среде MATLAB. Приведены условные обозначения соответствующих констант (k_{12} , K_{cd} , K_{dc} , $k_{e_central}$), использующиеся в тексте статьи

трёх- и четырёхкамерные модели в различных конфигурациях. В результате моделирования было установлено, что самой простой моделью, наиболее точно описывающей исследуемую ФК-кривую (рис. 3) является трёхкамерная модель, включающая ЖКТ (1-й компартмент), центральную кровь (центральный, 2-й компартмент) и депо лития (3-й компартмент), причём элиминация лития осуществляется из центрального компартмента, но не из депо (рис. 4).

Качество исследованных многокамерных моделей характеризовалось значениями стандартного отклонения концентраций между теоретической и экспериментально полученной ФК-кривыми, а также коэффициентом корреляции между теоретическими и экспериментальными значениями концентраций лития в центральной крови (рис. 5). Для полученной трёхкамерной модели, представленной на рис. 4, значение среднеквадратичного отклонения концентраций составило $a = 3,9$ мкг/л (при коэффициенте корреляции — $r = 0,89$), что указывает на приемлемое качество полученной модели.

Полученная модель является оптимальной по качеству и сложности. Более простые многокамерные ФК-модели характеризовались гораздо более низким качеством. Например, удаление компартмента «депо» из модели на рис. 4 приводило к существенному снижению качества модели (ср. кв. откл. $a = 10$ мкг/л), также как и удаление компартмента «ЖКТ» ($a = 15$ мкг/л). Моделирование процесса элиминации только из депо также снижало качество модели ($a = 4,6$ мкг/л).

Более сложные модели не приводили к существенному повышению качества модели. В частности, моделирование элиминации и из депо, и из центрального компартмента не улучшало качество модели ($a = 3,9$ мкг/л). Включение в модель процесса обмена между депо и ЖКТ также снижало качество модели ($a = 4,5$ мкг/л).

Таким образом, трёхкамерная модель фармакокинетики цитрата лития, в которой раствор соли пере-

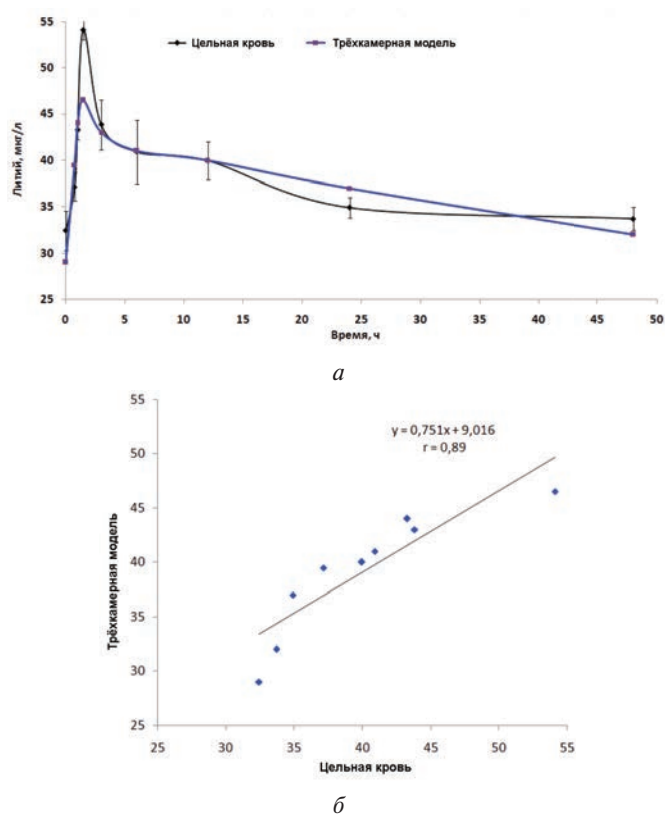


Рис. 5. Показатели качества трёхкамерной ФК-модели: а — Экспериментально полученные точки ФК-кривой («цельная кровь») и теоретическая ФК-кривая («трёхкамерная модель»). Среднеквадратичное отклонение концентраций составило $a = 3,9$ мкг/л; б — Корреляция между теоретическими и экспериментальными значениями концентраций лития. Коэффициент корреляции $r = 0,89$

ходит из ЖКТ в центральный компартмент (цельную кровь), затем — в депо, а элиминация происходит только из центрального компартмента (см. рис. 4) в «нулевой» компартмент (т. е. мочу) является наиболее адекватной из исследованных многокамерных моделей. ФК моделирование позволило получить количественные оценки соответствующих констант

Таблица 1

Параметры полученной трёхкамерной модели фармакокинетики цитрата лития

Параметр	Расшифровка	Ед.	Цитрат лития	Аскорбат лития
V(GI)	Объём компартмента «ЖКТ»	у.е.	1,00	1,00
V(C)	Объём центрального компартмента	у.е.	3,6	4,40
V(D)	Объём компартмента «депо»	у.е.	1,82	1,81
k ₁₂	Константа переноса из ЖКТ в цельную кровь	1/ч	0,73	0,67
ke_Central	Константа элиминации из цельной крови	1/ч	0,01	0,0068
K _{cd}	Константа переноса из цельной крови в депо	1/ч	1,1	0,41
K _{dc}	Константа переноса из депо в цельную кровь	1/ч	0,5	0,27

Примечание: Среднеквадратичное отклонение концентраций – $a = 3,9$ мкг/л, коэффициент корреляции – $r = 0,89$. Проводится сравнение с опубликованными ранее результатами фармакокинетического исследования аскорбата лития ($a = 3,4$ мкг/л, $r = 0,92$).

скорости и объёмов компартментов (табл. 1). Результаты приводятся в сравнении с результатами фармакокинетического исследования аскорбата лития, проведённого с использованием той же трёхкамерной модели [15].

Результаты многокамерного ФК-анализа позволяют выявить ряд интересных особенностей сравнительной фармакокинетики цитрата лития и аскорбата лития. Так, при практически одинаковых относительных объёмах компартментов «ЖКТ» (V(GI)) и «депо» (V(D)), объём центрального компартмента (V(C)) был несколько ниже в случае цитрата лития (V(C) = 3,6), чем в случае аскорбата лития (V(C) = 4,4). При сравнимых значениях константы элиминации из центрального компартмента (т. е. цельной крови) для цитрата лития ($ke_{Central} = 0,010 \text{ ч}^{-1}$) и для аскорбата лития ($ke_{Central} = 0,0068 \text{ ч}^{-1}$) и константы переноса из ЖКТ в цельную кровь ($k_{12} \sim 0,7 \text{ ч}^{-1}$), константа переноса из цельной крови в депо была в 2,5 раза выше для цитрата лития ($K_{cd} = 1,1 \text{ ч}^{-1}$), чем для аскорбата лития ($K_{cd} = 0,41 \text{ ч}^{-1}$). Соотношение констант K_{cd}/K_{dc} составило 1,5 для аскорбата лития и 2,1 для цитрата лития. Все эти отличия указывают на *более интенсивное всасывание цитрата лития в депо* из центрального компартмента, что соответствует большой интенсивности накопления лития в тканях при использовании цитрата лития.

К сожалению, имеющиеся ФК-данные не позволяют сделать количественно достоверных выводов о том, какие же именно органы составляют обсуждаемое «депо» лития. Однако сравнение динамики концентраций лития в депо, полученном в результате моделирования, с динамикой концентрации лития в «депо», состоящем из головного мозга, аорты, почек и бедренной кости указывает на определённую схожесть изменения концентраций (рис. 6). Очевидно, что депо, состоящее из этих органов, по крайней мере, позволяет стабилизировать концентрации лития после первых 10–15 ч эксперимента.

Результаты ФК-моделирования в соответствии с описанной трёхкамерной моделью также соот-

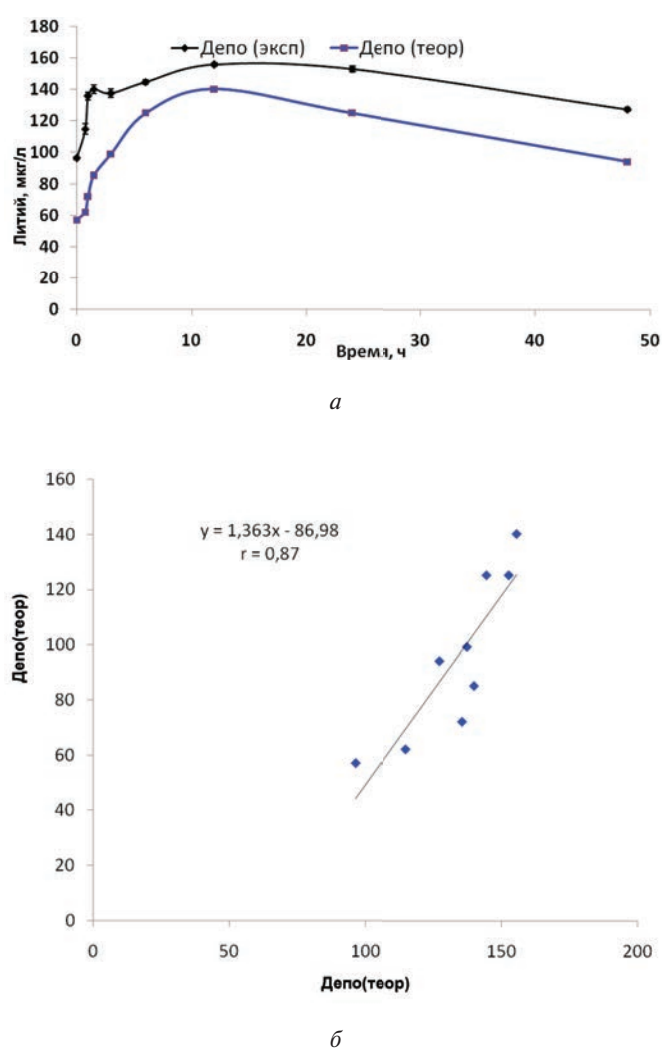


Рис. 6. Динамика концентраций в «депо» лития, полученном в результате многокамерного ФК-моделирования. Экспериментальные данные для «депо» были получены суммированием содержания лития в головном мозге, аорте, почек и бедренной кости:

a — ФК-кривые, экспериментальная и вычисленная в соответствии с трёхкамерной моделью; *б* — Корреляция между теоретическими и экспериментальными значениями, коэффициент корреляции – $r = 0,87$

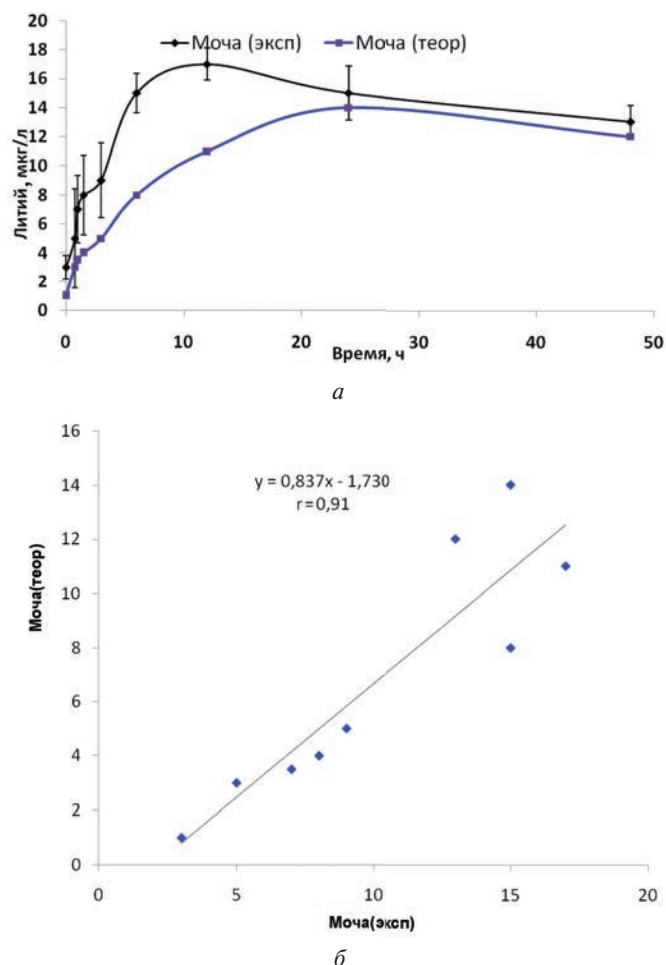


Рис. 7. Динамика концентраций в моче, соответствующей «нулевому компартменту» трёхкамерной модели: *a* — ФК-кривые; *б* — Корреляция между теоретическими и экспериментальными значениями, коэффициент корреляции $r = 0,91$

ветствуют экспериментально определённым уровням лития в моче, которая соответствует «нулевому компартменту» трёхкамерной модели (рис. 7). Коэффициент корреляции между теоретическими и экспериментальными значениями составил $r = 0,91$.

Бескамерный фармакокинетический анализ цитрата лития

Бескамерный анализ позволяет охарактеризовать такие повсеместно используемые ФК параметры препарата, как площадь под кривой, клиренс, период полувыведения, время и максимальное значение достигаемой концентрации T_{max} , C_{max} , объём распределения и др. (табл. 2). Параметры бескамерной модели были рассчитаны для всех исследованных биосубстратов на основании соответствующих ФК-кривых (табл. 3).

Полученные в рамках бескамерного анализа значения ФК параметров цитрата лития подтверждают сделанные выше выводы. Во-первых, время достижения максимума (T_{max}) составило 1–1,5 ч для большинства биосубстратов (за исключением аорты, лёгких, селезёнки, надпочечников и бедренной кости,

Таблица 2

Изученные фармакокинетические параметры бескамерной модели цитрата лития

Параметр	Ед.	Комментарий
C_{max}	мкг/л	Максимальная концентрация лития в биосубстрате
T_{max}	ч	Время достижения максимальной концентрации
C_{last}	мкг/л	Последняя измеренная концентрация лития
AUC_t	мкг/л ч	Площадь под кривой (характеризует биодоступность)
MRT_t	ч	Среднее время удержания — среднее общее время ионы лития препарата проводят в биосубстрате после приёма цитрата в заданной дозе
Lz	1/ч	Наклон участка финального выведения (последние 3–4 точки ФК-кривой)
$T_{1/2}$	ч	Период полувыведения — время, за которое из биосубстрата выводится половина ионов лития
CL	л/ч	Клиренс — объём биосубстрата, из которого все ионы лития удаляются за единицу времени
V_d	л	Объём распределения — отношение общего содержания вещества в организме к его концентрации в исследуемом биосубстрате, т. е. некий условный объём, в котором должно было бы распределиться данное вещество, если бы его концентрация везде была такой же, как в биосубстрате

в которых $T_{max} = 12–24$ ч). Во-вторых, низкое значение наклона участка финального выведения (Lz) и высокое значение периода полувыведения ($T_{1/2}$) были характерны для всех биосубстратов, особенно для цельной крови ($Lz = 0,005 \times 1/ч$, $T_{1/2} = 146$ ч), головного мозга ($Lz = 0,001 \times 1/ч$, $T_{1/2} = 602$ ч), почек ($Lz = 0,0006 \times 1/ч$, $T_{1/2} = 1143$ ч) и бедренной кости ($Lz = 0,0008 \times 1/ч$, $T_{1/2} = 918$ ч). Накопление лития в головном мозге и в кости подтверждается наиболее низкими значениями клиренса именно для этих биосубстратов (головной мозг — $CL = 0,004$ л/ч; бедренная кость — $CL = 0,0026$ л/ч). Таким образом, цитрат лития способствует поддержанию стабильных концентраций иона лития в цельной крови и в головном мозге, что важно для осуществления профилактического и терапевтического потенциала лития.

Сравнение ФК-данных для цитрата лития и аскорбата лития [15], полученных для бескамерной модели при введении в дозе 1 000 мкг/л (см. табл. 3), подтверждает приводимые выше результаты многокамерного анализа. Наиболее выраженные отличия в значениях фармакокинетических параметров бескамерной модели для двух солей лития касались ФК-кривых для головного мозга, аорты, почек и бедренной кости

Таблица 3

Значения фармакокинетических параметров для бескамерной модели при введении в дозе 1000 мкг/л

(А)

Биосубстрат	C_{max} , мкг/л	T_{max} , ч	C_{last} , мкг/л	AUC_0 , мкг/л × ч	MRT_0 , ч	Lz , 1/ч	$T_{1/2}$, ч	CL , л/ч	V_d , л
Цельная кровь	54,11	1,50	33,71	1 776,35	22,70	0,0048	145,86	0,0141	2,97
Головной мозг	41,77	1,50	31,00	1 551,65	23,67	0,0012	602,62	0,0044	3,81
Лобная доля	52,98	6,00	36,23	2 230,21	22,32	0,0092	75,72	0,0202	2,21
Сердце	69,58	3,00	29,64	2 588,14	20,25	0,0202	34,25	0,0308	1,52
Аорта	38,92	24,00	26,72	1 538,49	23,76	0,0019	356,11	0,0082	4,21
Лёгкие	32,82	12,00	17,02	1 281,33	21,61	0,0131	53,03	0,0484	3,70
Печень	89,83	1,50	31,66	1 979,30	20,45	0,0097	71,25	0,0239	2,46
Почки	47,71	1,00	36,53	1 649,55	23,89	0,0006	1143,00	0,0020	3,33
Селезёнка	45,67	12,00	27,08	1 794,92	22,24	0,0095	72,96	0,0269	2,83
Надпочечники	56,66	12,00	34,56	2 041,13	22,02	0,0096	71,97	0,0222	2,31
Бедренная кость	40,79	24,00	35,00	1 793,29	24,01	0,0008	916,90	0,0026	3,44

(Б)

Биосубстрат	C_{max} , мкг/л	T_{max} , ч	C_{last} , мкг/л	AUC_0 , мкг/л × ч	MRT_0 , ч	Lz , 1/ч	$T_{1/2}$, ч	CL , л/ч	V_d , л
Цельная кровь	50,59	1,50	33,71	1 750	22,9	0,005	140,65	0,029	5,91
Головной мозг	46,51	1,50	23,99	1 406	22,2	0,007	96,71	0,053	7,34
Лобная доля	51,94	1,00	40,51	2 094	23,3	0,003	209,71	0,017	5,27
Сердце	65,40	1,50	28,98	2 123	20,6	0,017	40,87	0,065	3,85
Аорта	39,20	1,50	24,22	1 300	22,2	0,008	89,62	0,056	7,30
Лёгкие	31,82	1,50	17,47	1 144	21,3	0,010	66,59	0,089	8,51
Печень	93,39	1,50	30,41	2 031	20,3	0,018	38,91	0,067	3,75
Почки	48,85	1,00	32,02	1 625	23,1	0,004	179,31	0,025	6,53
Селезёнка	44,73	12,00	25,56	1 749	21,7	0,009	73,65	0,056	5,95
Надпочечники	52,47	12,00	33,95	1 969	22,0	0,008	84,48	0,041	4,99
Бедренная кость	42,43	24,00	31,10	1 710	23,9	0,002	451,44	0,011	7,41

Примечание: (А) — цитрат лития; (Б) — аскорбат лития.

(табл. 4), т. е. биосубстратов, составляющих предпологаемое депо лития (см. выше).

В целом, полученные оценки параметров бескамерной модели показывают, что при приёме цитрата лития тенденция накопления лития в тканях условного «депо» более выражена. Так, значения Lz (наклон участка финального выведения) были в 2–8 раз ниже для цитрата лития, чем для аскорбата лития, в то время как значения времени полувыведения лития из головного мозга, аорты, почек и бедренной кости были в 2–6 раз выше. Значения клиренса лития были в 3–10 раз ниже для цитрата лития, а значения объёма распределения, наоборот, в 1,5–2,5 раза выше (табл. 4). Все эти отличия указывают на большее «сродство» лития, поступающего в составе цитрата лития, к тканям головного мозга, аорты, почек и бедренной кости.

Таблица 4

Наиболее выраженные отличия в значениях фармакокинетических параметров

Био- суб- страт	Головной мозг		Аорта		Почки		Бедренная кость	
	ЦЛ	АЛ	ЦЛ	АЛ	ЦЛ	АЛ	ЦЛ	АЛ
Соль	ЦЛ	АЛ	ЦЛ	АЛ	ЦЛ	АЛ	ЦЛ	АЛ
Lz , 1/ч	0,001	0,007	0,002	0,008	0,0006	0,004	0,0008	0,002
$T_{1/2}$, ч	602	96	356	89	1143	179	916	451
CL , л/ч	0,004	0,053	0,008	0,056	0,002	0,025	0,003	0,011
V_d , л	3,81	7,34	4,21	7,3	3,33	6,53	3,44	7,41

Примечание: цитрат лития (ЦЛ) и аскорбат лития (АЛ) для бескамерной модели при введении в дозе 1 000 мкг/л

Заметим, что модель «депо» лития, полученная при анализе ФК аскорбата лития включала надпочечники, аорту, бедренную кость и головной мозг. В случае цитрата лития, модель депо включала почки и, опять же, аорту, бедренную кость и головной мозг. Данный результат вполне отвечает физиологии аскорбат- и цитрат-аниона. Так, аскорбат-анион, действительно, преимущественно накапливается в надпочечниках, где поддерживает секрецию катехоламинов. Цитрат-анион выполняет в почках важнейшую функцию — он препятствует преципитации (выпадению) кристаллов низкорастворимых солей кальция, тем самым профилируя образование почечных камней.

Заключение

Проведено комплексное экспериментальное исследование фармакокинетики цитрата лития (в дозе 1 000 мкг/кг). Получены фармакокинетические кри-

вые для цельной крови и гомогенатов тканей 11 различных биосубстратов (головной мозг, лобная доля головного мозга, сердце, аорта, лёгкие, печень, почки, селезёнка, надпочечники, бедренная кость, моча). Результаты многокамерного и бескамерного подходов к фармакокинетическому анализу показали, что цитрат лития характеризуется большим сродством к «депо», состоящему из головного мозга, аорты, почек и бедренной кости, чем соль сравнения (аскорбат лития). Концентрации лития в цельной крови, в головном мозге, в аорте и в почках оставались весьма стабильными в течение, по крайней мере, 40–50 ч после прохождения пика концентрации. Таким образом, цитрат лития способствует поддержанию стабильных концентраций иона лития в крови и в головном мозге, что важно для осуществления профилактического и терапевтического потенциала ионов лития.

Литература

1. Chang C.M., Wu C.S., Huang Y.W., Chau Y.L., Tsai H.J. Utilization of Psychopharmacological Treatment Among Patients With Newly Diagnosed Bipolar Disorder From 2001 to 2010. *J Clin Psychopharmacol.* 2016; 36 (1): 32–44.
2. Pallanti S., Quercioli L., Sood E., Hollander E. Lithium and valproate treatment of pathological gambling: a randomized single-blind study. *J Clin Psychiatry.* 2002; 63 (7): 559–564.
3. Baumgartner A., Pinna G., Hiedra L., Gaio U., Hessenius C., Campos-Barros A., Eravci M., Prengel H., Thoma R., Meinhold H. Effects of lithium and carbamazepine on thyroid hormone metabolism in rat brain. *Neuropsychopharmacol* 1997; 16 (1): 25–41.
4. El-Balkhi S., Megarbane B., Poupon J., Baud F.J., Galliot-Guilley M. Lithium poisoning: is determination of the red blood cell lithium concentration useful? *Clin Toxicol (Phila).* 2009; 47 (1): 8–13.
5. Kandil E., Dackiw A.P., Alabbas H., Abdullah O., Tufaro A.P., Tufano R.P. A profile of patients with hyperparathyroidism undergoing lithium therapy for affective psychiatric disorders. *Head Neck.* 2011; 33 (7): 925–7.
6. Пронин А.В., Гоголева И.В., Торшин И.Ю., Громова О.А. Нейротрофические эффекты лития при ишемических и нейродегенеративных поражениях мозга. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*, Издательство Медиа Сфера (Москва) ISSN: 1997-7298eISSN: 2309-4729 2016.-N.
7. Торшин И.Ю., Громова О.А., Майорова Л.А., Волков А.Ю. О таргетных белках, участвующих в осуществлении нейропротекторных эффектов цитрата лития. *Журнал Нерология, нейропсихиатрия, психосоматика*. Издательство: ИМА-Пресс (Москва). ISSN: 2074-2711. eISSN: 2310-1342. 2017; 9: 1: 78–83.
8. Гоголева И.В. Влияние органических солей лития, магния, селена на элементный гомеостаз головного мозга на фоне экспериментальной хронической двусторонней окклюзии общих сонных артерий. Дисс... к.м.н. по ВАК 14.00.25, 2009, ИвГМА, 119.
9. Зангиева З.К., Торшин И.Ю., Громова О.А., Никонов А.А. Содержание микроэлементов в нервной ткани и ишемический инсульт. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Издательство: Издательство Медиа Сфера (Москва) ISSN: 1997-7298eISSN: 2309-4729 2013; 113: 3–2: 30–36.
10. Прокопович О., Торшин И., Громова О., Гусев Е. Коморбидность дисциркуляторной энцефалопатии с диабетической полинейропатией, лобной атаксией и уровнями микроэлементов в крови. *Врач.* 2016; 3: 6–11: 99–108.
11. Кураמיшина Д.Б., Новикова Л.Б., Никонов А.А., Торшин И.Ю., Громова О.А. Нарушение баланса микроэлементов у пациентов с ишемическим инсультом на фоне артериальной гипертонии. *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. Издательство: Издательство Медиа Сфера (Москва) ISSN: 1997-7298eISSN: 2309-4729 2012; 112: 3–2: 42–46.
12. Ferreira A.J.M. (2009). MATLAB Codes for Finite Element Analysis. Springer. ISBN 978-1-4020-9199-5. <http://www.mathworks.com/products/simbiology/>.
13. Zhang Y., Huo M., Zhou J., Xie S., Solver P.K. An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed.* 2010 Sep; 99 (3): 306–14.
14. Torshin I.Y., Rudakov K.V. On Metric Spaces Arising During Formalization of Problems of Recognition and Classification. Part 2: Density Properties. *Pattern Recognition and Image Analysis*, 2016; 26: 3: 483–496, ISSN 1054-6618.
15. Пронин А.В., Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В., Жидоморов Н.Ю., Сардарян И.С., Волков А.Ю. Доклиническое изучение фармакокинетики аскорбата лития. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2016; 2: 18–25.

Протеомный анализ эффектов тиоктовой кислоты в составе меглюмина тиоктата

Торшин И.Ю.^{1,3}, Громова О.А.^{1,2}, Койфман О.И.³, Майорова Л.А.³

¹ – ФИЦ ИУ РАН Институт современных информационных технологий в медицине, г. Москва

² – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Иваново

³ – ГБОУ ВО «Ивановский государственный химико-технологический университет», г. Иваново

Резюме. Протеомный анализ указал на 6 целевых белков тиоктовой кислоты (ТК) и 11 белков метаболизма ТК. Все установленные белки являются митохондриальными белками. В целевых белках (Р-белок, Н-белок, липоамид ацилтрансфераза, дигидролипидиллин ацетилтрансфераза, Х-белок пируватдегидрогеназы, дигидролипидилин сукцинилтрансфераза) ТК является кофактором, ковалентно связанным со специфическими остатками лизина и необходима для переработки глицина и других аминокислот, поддержания активности цикла Кребса. Недостаточная активность этих целевых белков (вследствие генетических дефектов или глубокого дефицита ТК) приводит к митохондриальной недостаточности, гиперглициемии, билиарному циррозу, синдрому «мочи кленового сиропа» и другим нарушениям метаболизма. Недостаточная активность 11 белков метаболизма ТК ассоциирована со множественными нарушениями функции митохондрий, лактоацидозом и анемией. Таким образом, ТК принципиально важна для поддержки функции митохондрий и энергетического метаболизма клетки.

Ключевые слова: тиоктовая кислота, меглюмина тиоктат, протеомика, митохондриальная недостаточность, биоинформатика, Тиогамма

Proteomic analysis of the effects of thioctic acid within meglumine thioctate

Torshin I.IU.^{1,3}, Gromova O.A.^{1,2}, Koifman O.I.³, Maiorova L.A.³

¹ – Institute of Modern Information Technologies in Medicine, Federal Research Center «Computer Science and Control», RAS

² – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

³ – «Ivanovo State University of Chemistry and Technology»

Resume. Proteomic analysis indicated 6 target proteins of thioctic acid (TA) and 11 proteins of TA metabolism, all of which are mitochondrial proteins. In the structure of the target proteins (namely, P-protein, H-protein, lipoamide acyltransferase, dihydrolypyline acetyltransferase, X-protein pyruvate dehydrogenase, dihydrolypyline succinyltransferase), TA is a cofactor which is covalently bound to specific lysine residues and which is required for processing glycine and other amino acids, thus maintaining the activity of the Krebs cycle. Insufficient activity of these target proteins (due to either genetic defects or nutritional TA deficiency) leads to mitochondrial insufficiency, hyperglycinemia, biliary cirrhosis, "maple syrup urine" syndrome and other metabolic disorders. Insufficient activity of the 11 proteins of TA metabolism is associated with multiple disorders of mitochondrial function, lactic acidosis and anemia. Thus, TA is fundamentally important for supporting the function of mitochondria and of the cellular energy metabolism.

Keywords: thioctic acid, meglumine thioctate, proteomics, mitochondrial insufficiency, bioinformatics, Thiogamma

Автор, ответственный за переписку:

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

Введение

Тиоктовая кислота (ТК, известна также как липоевая кислота или витамин N) используется как безопасное противодиабетическое средство из группы витаминоподобных веществ, способствующее преодолению инсулинорезистентности и нормализации концентрации глюкозы в крови [1] (рис. 1). Тиоктовая кислота применяется как сама по себе, так и в составе ионных солей (таких как тиоктат меглюмина, см. рис. 1). Являясь кофактором ряда белков энергетического метаболизма, ТК повышает чувствительность клеток к инсулину, стимулирует утилизацию углеводов и аминокислот, снижает гиперинсулинемию. Тиокто-

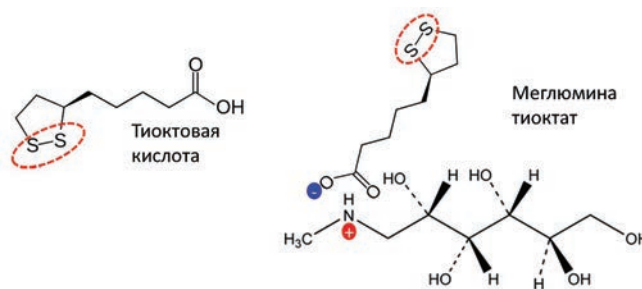


Рис. 1. Химическая структура тиоктовой кислоты и меглюмина тиоктата. Выделены два атома серы в составе молекулы ТК



Рис. 2. Биологические эффекты тиоктовой кислоты в постгеномной перспективе

вая кислота также оказывает гепатопротекторное, гиполипидемическое, гипохолестеринемическое, противовоспалительное действие [2–4]. ТК не только используется для лечения диабетической периферической невропатии, но и может оказывать нейропротекторное действие при болезни Альцгеймера [5, 6]. В базе данных PUBMED представлены 5170 исследований по ТК.

С целью формулировки более детальных механизмов осуществления биологических и фармакологических эффектов ТК в ходе настоящей работы был проведён анализ возможных взаимодействий ТК с белками протеома человека. Для оценки реального масштаба воздействия ТК на организм человека следует рассмотреть их эффекты в постгеномной перспективе (рис. 2): т.е. в рамках воздействия на геном (совокупность всех генов организма), транскриптом

(совокупность всех РНК), протеом (совокупность всех белков) и метаболом (совокупность всех метаболитов).

Важно отметить, что за биологические роли ТК отвечают специфические взаимодействия ТК и её производных с белками *протеома*. Взаимодействия отрицательно заряженных молекул ТК с отрицательно заряженными молекулами ДНК и РНК нестабильны, низкоспецифичны и не представляют биологического интереса. В то же время, проведённые нами поиски по базам данных протеома человека (NCBI PROTEIN, EMBL, UNIPROT, Human Proteome Map (HPM), BIOCYC-HUMAN и др.) показали, что в протеоме человека существуют, по меньшей мере, 17 белков, активность которых связана с метаболизмом ТК. Системно-биологический и биоинформационный анализ этого массива белков посредством метода функционального связывания [7] позволил выделить 6 таргетных белков, посредством которых осуществляются фармакологические эффекты ТК.

Материалы и методы

Протеомные эффекты тиоктовой кислоты анализировались с использованием метода функциональных взаимосвязей – одной из информационных технологий современной биоинформатики. Данный метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов – бел-



Рис. 3. Основы системно-биологического подхода к анализу белков, имеющих отношение к метаболизму ТК

ков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов), в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии [7]. Так, на основе информации определённой геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго очерченный круг специфических функций. Как врождённые мутации гена, так и дефициты кофакторов белков, имеющих отношение к метаболизму ТК, будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической клинической симптоматики (рис. 3).

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней информации (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточных ролях белков, симптоматику и критерии диагностики заболеваний и т. д.) в различных базах данных (БД) позволяет систематически рассмотреть все возможные биологические роли ТК [7]. В целом, при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей (см. рис. 3) каждый белок протеома человека представлен строкой в списке, включающем такие описания белка/гена как:

- аминокислотная последовательность белка;
- список аминокислотных паттернов белка (например, паттернов, соответствующих сайтам связывания тиоктовой кислоты, активным центрам соответствующих ферментов и др.);
- список эссенциальных кофакторов белка (производные витаминов, микроэлементы и т. п.);
- список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка и соответствующего гена;
- список клинических симптомов рассматриваемых моногенных заболеваний;
- список клеточных функций белка (по БД Gene Ontology, GO и др.);
- список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

Далее, в полученном списке выделяются гены, соответствующие таргетным белкам ТК и белкам метаболизма ТК, проводятся последующие анализы биологических ролей этих белков на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия χ -квадрат, критерия Вилкоксона—Манна—Уитни и тест Стьюдента. Для статистической обработки материала использовалась прикладная программа STATISTICA 6.0 и электронные таблицы Microsoft Excel.

Результаты исследования

В результате проведения анализа генома и протеома человека методом функциональных взаимосвязей были установлены 6 таргетных белков, которые осуществляют механизмы воздействия препаратов на основе ТК на метаболизм и регенерацию хряща и 11 белков метаболизма ТК (табл. 1). Следует подчеркнуть, что все перечисленные в табл. 1 ТК-зависимые белки являются белками митохондрий.

Белки с тиоктатным кофактором (таргетные белки ТК)

В результате проведённого анализа протеомных баз данных было найдено 6 белков, в которых тиоктовая кислота является эссенциальным кофактором, ковалентно связанным со специфическими остатками лизина в структурах этих белков. Все 6 белков принципиально важны для энергетического метаболизма клетки и поддержки функции митохондрий. *Дефицит тиоктовой кислоты приведёт к резкому снижению активности этих белков, что будет приводить к клинической картине, схожей с теми или иными клиническими проявлениями описываемых ниже дефектов генов.*

Глицин-декарбоксилирующая дегидрогеназа митохондрий или Р-белок (ген GLDC) катализирует переработку глицина, связывая NH-группу глицина пиридоксальфосфатным кофактором (рис. 4). При этом высвобождается молекула CO_2 , а остающаяся часть глицина в форме метиламина переносится на липоамидный кофактор Н-белка (GCSH). Глицин-декарбоксилирующая дегидрогеназа стимулируется тиоктовой кислотой. Дефекты гена GLDC приводят к некетолической гиперглицинемии, сопровождающейся накоплением значительных количеств глицина в жидкостях организма и характеризующейся тяжёлыми неврологическими симптомами (OMIM: 605899).

Н-белок расщепления глицина в митохондриях (ген GCSH) участвует во второй стадии переработки глицина, переносит метиламиновую группу глицина из рассмотренного выше Р-белка (GLDC) в Т-белок (GCST). В структуре данного белка (рис. 5) молекула тиоктовой кислоты является кофактором, ковалентно связанным с остатком лизин-107 с образованием липоиллизина. При дефектах гена GCSH возникает некетолическая гиперглицинемия и глицинурия (OMIM: 605899).

Липоамид-ацилтрансфераза митохондрий (ген DBT) конвертирует альфа-кетокислоты в ацилкофермент-А и CO_2 . Данный фермент состоит из трёх субъединиц: декарбоксилазы альфа-кетокислот с разветвлённой цепью (субъединица E1), липоамид-ацилтрансферазы (субъединица E2) и липоамиддегидрогеназы (субъединица E3). Тиоктат — кофактор, связанный ковалентно с лизином-105 липоил-связывающего домена белка (рис. 6). При дефектах гена DBT активность фермента резко снижается и формируется

Результаты полнопротеомного анализа тиоктовой кислоты

Ген	Белок	Функция	Роль ТК	Генетические заболевания
Белки с тиоктатным кофактором				
GLDC	Глицин-декарбоксилирующая дегидрогеназа митохондрий (P-белка)	Переработка глицина с выделением CO ₂ , активация H-белка (GCSH)	Активация белка	Некетотическая гиперглицинемия (OMIM: 605899)
GCSH	H-белок расщепления глицина в митохондриях	Переработка глицина, активация T-белка (GCST)	Кофактор, связанный ковалентно	Некетотическая гиперглицинемия (OMIM: 605899)
DBT	Липоамид-ацилтрансфераза митохондрий	Конверсия альфа-кетокислот в ацил-кофермент-A и CO ₂ .	Кофактор, связанный ковалентно	Первичный билиарный цирроз (OMIM: 245348), синдром «мочи кленового сиропа» (OMIM: 248600)
DLAT	Дигидролипоиллин ацетилтрансфераза пируватдегидрогеназы митохондрий	Конверсия пирувата в ацетил-CoA и CO ₂	Ковалентно связанный кофактор	Первичный билиарный цирроз (OMIM: 245348)
PDHX	X-белок пируватдегидрогеназы митохондрий	Закрепление молекулы дигидролипиададегидрогеназы (E3)	Кофактор, связанный ковалентно	Дефицит пируватдегидрогеназы (OMIM: 245349)
DLST	Дигидролипоиллизин сукцинилтрансфераза оксоглутаратдегидрогеназы митохондрий	Конверсия 2-оксоглутарата в сукцинил-CoA и CO ₂ , переработка лизина	Кофактор, связанный ковалентно	Дефицит DLST
Белки биосинтеза и метаболизма тиоктовой кислоты				
NFU1	Белок сборки железо-серных кластеров в митохондриях	Сборка [4Fe-2S] кластеров и их доставка в целевые белки	Биосинтез тиоктовой кислоты	Множественный синдром митохондриальной дисфункции (OMIM: 605711)
OXSM	3-оксоацил-протеин синтаза митохондрий	Биосинтез тиоктовой кислоты, поддержка митохондриальной функции	Биосинтез тиоктовой кислоты	Дефицит OXSM
SLC5A6	Na-зависимый мультитаминный транспортер	Транспортирует пантотенат, биотин и тиоктат	Транспорт тиоктовой кислоты	Дефицит SLC5A6, нарушения обмена витаминов B ₅ и H
BOLA3	VolA-подобный белок 3	Сборка митохондриальных железо-серных кластер-кофакторов	Биосинтез тиоктовой кислоты	Множественный синдром митохондриальной дисфункции 2 (OMIM: 614299)
IBA57	Трансфераза CAF17 митохондрий	Созревание белков с 4Fe-4S кластерами, биосинтез гема	Биосинтез тиоктовой кислоты	Синдром множественных митохондриальных дисфункций 3 (OMIM: 615330)
DLD	Дигидролипоилдегидрогеназа митохондрий	Переработка глицина, компонент пируватдегидрогеназы	Метаболизм тиоктовой кислоты	Дефицит дегидролипоамид дегидрогеназы (OMIM: 246900)
ACSM1	Ацил-кофермент синтаза-1 митохондрий	Тиоктат-активирующий фермент, необходим для поддержки активности липоилтрансферазы	Активация тиоктовой кислоты	Дефицит ACSM1
LIAS	Липоилсинтаза митохондрий	Синтез эндогенной тиоктовой кислоты	Биосинтез тиоктовой кислоты	Гиперглицинемия и лактоацидоз с судорогами (OMIM: 614462)
LIPT1	Липоилтрансфераза 1 митохондрий	Переносит липоильную группу на остатки лизинов тиоктат-зависимых ферментов	Липоилирование белков	Дефицит липоилтрансферазы-1, лактоацидоз (OMIM: 616299)
LIPT2	Липоилтрансфераза 2 митохондрий	Перенос октановой кислоты на тиоктат-зависимые ферменты	Липоилирование белков	Дефицит LIPT2
GLRX5	Связанный с глутаредоксином белок-5 митохондрий	Сборка железо-серных кластеров для липоилирования белков, синтез гемоглобина	Липоилирование белков	пиридоксин-резистентная сидеробластная анемия (OMIM: 616860)

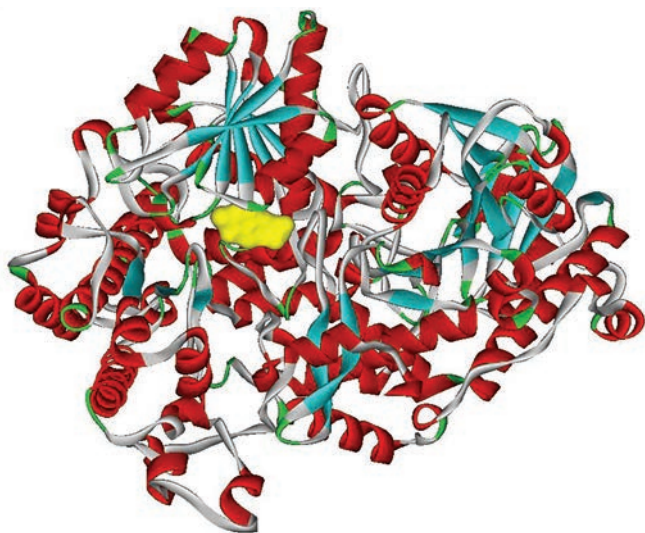


Рис. 4. Пространственная структура глицин-декарбоксилирующей дегидрогеназы митохондрий (Р-белок, ген GLDC). Модель на основе PDB 4lhd. Поверхность жёлтого цвета обозначает сайты связывания молекул глицина и тиоктовой кислоты в данном белке

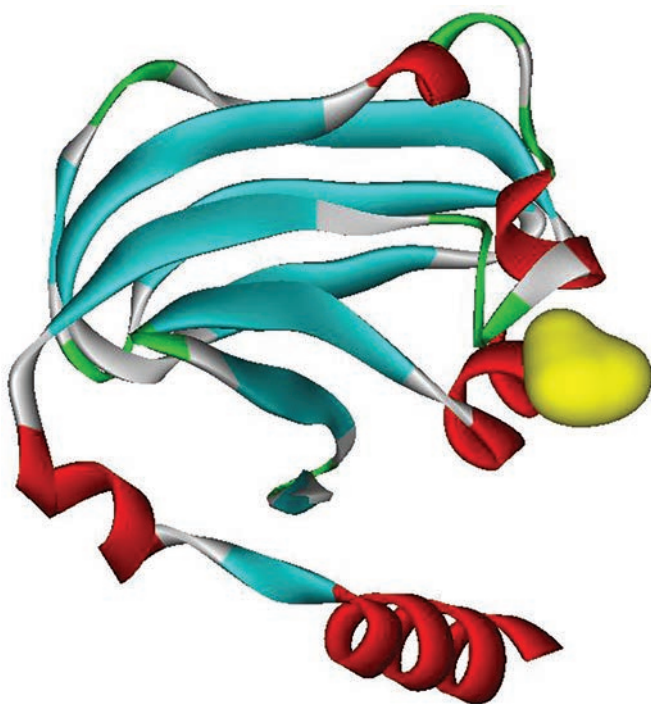


Рис. 5. Пространственная структура липоил-связывающего домена Н-белка расщепления глицина в митохондриях (ген GCSH). Модель на основе PDB 3wdn. Поверхность жёлтого цвета обозначает сайт связывания тиоктовой кислоты

первичный билиарный цирроз — прогрессирующее холестатическое заболевание печени, характеризующееся наличием аутоантител против субъединицы E2 в сыворотке крови, воспалительной облитерацией внутрипечёночного желчного протока, приводящей к

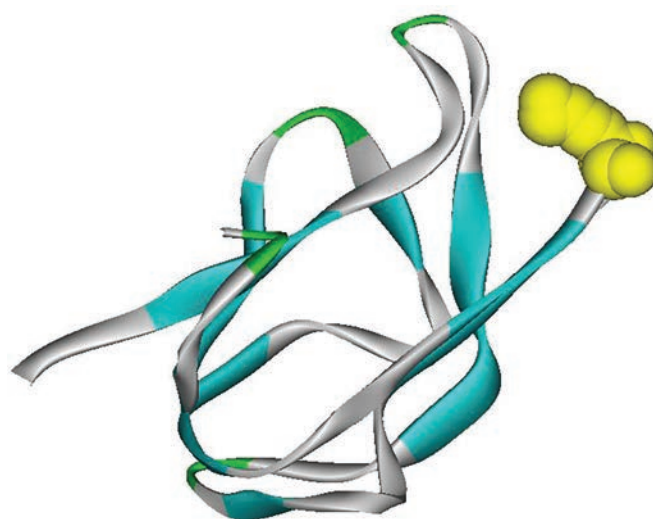


Рис. 6. Пространственная структура липоил-связывающего домена липоамид ацилтрансферазы митохондрий (ген DBT). Модель на основе PDB файла 1k8m. Жёлтым цветом выделен остаток лизина-105, к которому производится ковалентное присоединение молекулы тиоктовой кислоты

повреждению паренхимы печени и циррозу. Дефекты гена DBT также ассоциированы с синдромом «мочи кленового сиропа» — дефектом катаболического пути аминокислот с разветвленной цепью (лейцин, изолейцин и валин), накопление которых приводит к энцефалопатии, прогрессирующей нейродегенерации, задержке умственного и физического развития (OMIM: 248600).

Дигидролипид ацетилтрансфераза митохондрий (ген DLAT) является компонентом пируватдегидрогеназы. Пируватдегидрогеназный комплекс конвертирует пируват в ацетил-CoA и CO₂ и представляет собой центральный узел метаболизма, соединяющий гликолиз и цикл Кребса. В цикле Кребса происходит превращение двух- и трёх-углеродных соединений, образующихся как промежуточные продукты в живых организмах при распаде углеводов, жиров и белков, до CO₂. Кроме синтеза АТФ, цикл Кребса — важный источник молекул-предшественников, из которых в ходе других биохимических превращений синтезируются такие важные для жизнедеятельности клетки соединения как аминокислоты, углеводы, жирные кислоты и др. Все реакции цикла Кребса в эукариотических клетках протекают внутри митохондрий, причём катализирующие их ферменты (кроме сукцинатдегидрогеназы) находятся в митохондриальном матриксе.

Важно отметить, что ферменты, осуществляющие химические реакции цикла Кребса, нуждаются в определённых микронутриентных кофакторах, среди которых наиболее известны витамины группы В и ТК. Во-первых, «вход» в цикл Кребса через пируватный каскад обеспечивается пируватдегидрогеназой, для активности которой принципиально важны ТК, ионы Mg²⁺ и витамин В1 (в форме тиамин фосфата). Во-вторых,

в четырёх реакциях цикла участвует никотинамид аденин динуклеотид (NAD), производное витамина PP (B3). Во-вторых, не менее четырёх реакций цикла осуществляются посредством ацил-кофермента А (CoA), производное пантотеновой кислоты (витамин B5). Для протекания цикла реакций также необходимы такие кофакторы, как кофермент Q, гем, железо-серный кластер (4Fe-4S), кальций, марганец и магний и др [8].

Для активности *тиоктат-зависимой дигидролипоил ацетилтрансферазы* необходимо ковалентное присоединение тиоктовой кислоты к соответствующему остатку лизина в структуре белка. Нуклеотидные дефекты гена DLAT приводят к первичному билиарному циррозу с аутоантителами к субъединице E2 комплекса пируватдегидрогеназы, лактоацидозу, что клинически выражается неврологической дисфункцией, сопровождающейся гипотонией и атаксией (OMIM: 245348).

Х-белок пируватдегидрогеназы митохондрий (ген PDHX) необходим для прикрепления молекулы дигидролипоамадагидрогеназы (субъединица E3) к комплексу пируватдегидрогеназы. Тиоктат – кофактор, ковалентно связанный с лизином-97 Х-белка (рис. 7). Генетические дефекты ассоциированы с дефицитом пируватдегидрогеназы-Е3-связывающего белка, что клинически проявляется гипотонией и задержкой психомоторного развития (OMIM: 245349).

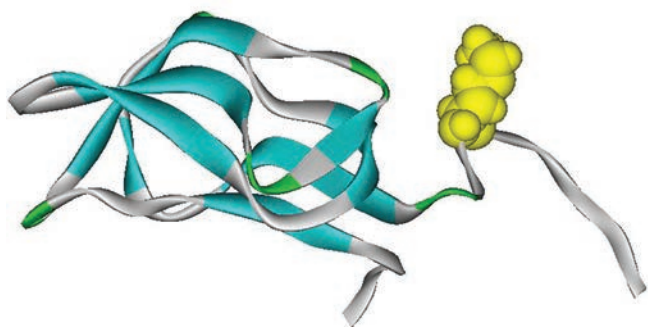


Рис. 7. Пространственная структура Х-белка пируватдегидрогеназы митохондрий (ген PDHX). Жёлтым цветом выделен остаток лизина-97, к которому производится ковалентное присоединение молекулы тиоктовой кислоты

Дигидролипоиллизин сукцинилтрансфераза митохондрий (ген DLST) является частью 2-оксоглутаратдегидрогеназы, которая конвертирует 2-оксоглутарат в сукцинил-CoA и CO_2 , состоит из 2-оксоглутаратдегидрогеназы (субъединица E1), дигидролипоамид сукцинилтрансферазы (субъединица E2) и липоамиддегидрогеназы (субъединица E3). Дефекты гена DLST или глубокий дефицит тиоктовой кислоты, которая является ковалентно связываемым кофактором фермента (рис. 8), приводят к дефициту активности 2-оксоглутаратдегидрогеназы и резкому падению энергетического метаболизма митохондрий и клетки в целом.

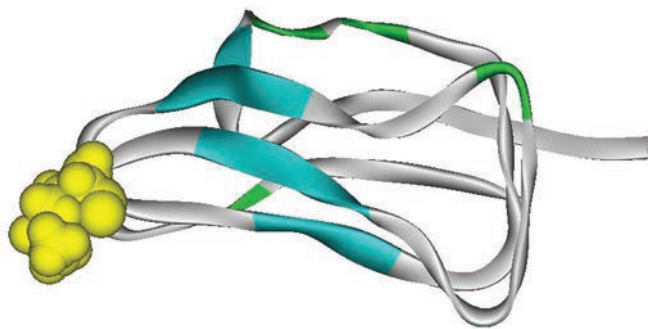


Рис. 8. Пространственная структура липоил-связывающего домена дигидролипоиллизин сукцинилтрансферазы 2-оксоглутаратдегидрогеназы митохондрий (ген DLST). Модель на основе PDB 1pmr. Жёлтым цветом выделен остаток лизина-44, к которому производится ковалентное присоединение молекулы тиоктовой кислоты

Белки биосинтеза и метаболизма тиоктовой кислоты

Несмотря на то что белки этой группы, так или иначе, взаимодействуют с молекулой тиоктовой кислоты, экзогенная (т. е. вносимая с препаратом) тиоктовая кислота не будет оказывать существенного влияния на активность этих белков. Эти белки важны, во-первых, для биосинтеза эндогенной тиоктовой кислоты и, во-вторых, для липоилирования рассмотренных выше белков таргетных белков ТК. Важность этих белков состоит и в том, что для пациентов с дефектами генов, приводящих к нарушению биосинтеза тиоктовой кислоты, принципиально необходимы дотации тиоктовой кислоты со специальными препаратами (например, Тиогамма).

При отсутствии дефектов генов метаболизма тиоктовой кислоты, эндогенная тиоктовая кислота синтезируется в митохондриях клеток из октановой кислоты и железо-серных кластеров типов «4Fe-4S» и «4Fe-2S». Эти железо-серные кластеры необходимы для переноса двух атомов серы в молекулу октановой кислоты с образованием ТК. Данный процесс может протекать по двум различным биохимическим маршрутам. В соответствии с *первым маршрутом*, тиоктовая кислота сначала синтезируется при участии железо-серных кластеров и затем участвует в липоилировании белков в митохондриях (посредством фермента липоилтрансферазы-1, ген LIPT1). По *второму маршруту*, к описанному в предыдущем разделе таргетным белкам сначала ковалентно присоединяется октановая кислота (посредством липоилтрансферазы-2, ген LIPT2), которая затем преобразуется в тиоктовую кислоту при участии железо-серных кластеров. И в том, и в другом случае, для эндогенного биосинтеза тиоктовой кислоты важны процессы сборки железо-серных кластеров в митохондриях и доставка их в структуры целевых белков (прежде всего, в структуру липоилсинтазы митохондрий, ген LIAS).

В метаболизме железо-серных кластеров митохондрий принимают участие следующие белки (см. таблицу): белок сборки железо-серных кластеров (ген NFU1),

BolA-подобный белок 3 (ген BOLA3), трансфераза CAF17 (ген IBA57), связанный с глутаредоксином белок-5 (ген GLRX5). Генетические дефекты в соответствующих этим белкам генах нарушают сборку железо-серных кластеров, что, в свою очередь, тормозит липоилирование белков, синтез гемоглобина и повышает окислительный стресс. В частности, дефекты ТК-зависимых генов NFU1, BOLA3 и IBA57 приводят к синдромам множественной митохондриальной дисфункции (OMIM: 605711, OMIM: 614299, OMIM: 615330) — снижению интенсивности дыхания митохондрий, сопровождающемуся лактоацидозом и гиперглицинемией. У пациентов отмечаются слабость, респираторная недостаточность, замедляются темпы неврологического развития и повышается риск преждевременной смерти.

Нарушения активности ТК-зависимой липоил-синтазы митохондрий (ген LIAS), синтезирующей эндогенную тиоктовую кислоту посредством присоединения двух атомов серы из кофактора ([4Fe-4S] кластер) к октановой кислоте, приводят к нарушениям метаболизма митохондрий, ассоциированным с гиперглицинемией и лактоацидозом. У пациентов отмечается неонатальная эпилепсия, судороги, тяжёлая энцефаломиопатия, задержка развития, психомоторная задержка, мышечная гипотония (OMIM: 614462). Подчеркнём ещё раз, что пациенты с дефектами перечисленных генов биосинтеза тиоктовой кислоты нуждаются в пожизненной высокодозной терапии препаратами тиоктовой кислоты.

Описанная выше клиническая симптоматика относится к врождённым генетическим патологиям. Дефекты генов приводят к аминокислотным заменам в белках и, соответственно, к нарушениям конформации активных центров ТК-зависимых ферментов, перечисленных в табл. 1. В результате активность ферментов резко падает и развиваются генетически-обусловленные заболевания, характеризующиеся выраженной клинической симптоматикой (зачастую, в очень тяжёлой форме).

Однако дефицит тиоктовой кислоты, возникающий вследствие: (1) недостаточного поступления ТК с пищей или (2) повышенной потребности в ней (например, при нарушениях обмена сахаров) или (3) при снижении эндогенного синтеза ТК в митохондриях (вследствие гипоксии, интоксикации, дефицитов других кофакторов и др.), будет приводить к недостаточному липоилированию этих же ферментов. В результате, активная конформация ферментов (см., например, рис. 4–8) также будет нарушена, что будет приводить к падению их ферментативной активности и развитию клинической симптоматики, весьма схожей с описанной симптоматикой генетически обусловленных нарушений обмена тиоктовой кислоты (но, как правило, в более лёгкой форме).

Дефицит ТК необходимо компенсировать высокоочищенными препаратами ТК (например, Тиогамма).

Особенностью этого препарата является использование ионной соли ТК с меглюмином (рис. 1), которая повышает биодоступность ТК при приёме внутрь и при в/в введении. Сама ТК характеризуется достаточно невысокой растворимостью в воде (0,9 г/л) [9] вследствие достаточно длинного гидрофобного «хвоста» этой молекулы (рис. 1). В комбинации с гидрофильным меглюмином, содержащим 5 гидроксильных (—ОН) групп, растворимость ТК существенно повышается и, как следствие, повышается биодоступность (до 60 %).

Заключение

Протеомный анализ указал на 6 целевых белков тиоктовой кислоты (ТК) и 11 белков метаболизма ТК. Все установленные белки являются митохондриальными белками. В целевых белках (Р-белок, Н-белок, липоамид ацилтрансфераза, дигидролипидин ацетилтрансфераза, Х-белок пируватдегидрогеназы, дигидролипидиллин сукцинилтрансфераза) ТК является кофактором, ковалентно связанным со специфическими остатками лизина и необходима для переработки глицина и других аминокислот, поддержания активности цикла Кребса. Недостаточная активность этих целевых белков (вследствие генетических дефектов или глубокого дефицита ТК) приводит к гиперглицинемии, билиарному циррозу, синдрому «мочи кленового сиропа» и другим нарушениям метаболизма. Недостаточная активность 11 белков метаболизма ТК ассоциирована со множественными нарушениями функции митохондрий. Таким образом, ТК принципиально важна для поддержки функции митохондрий и энергетического метаболизма клетки.

Работа выполнена при поддержке государственного задания Минобрнауки РФ (4.1929.2017/4.6).

Литература

1. Клинико-фармакологическая статья «Тиоктовая кислота». Обращение лекарственных средств. ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Росздравнадзора РФ (27.03.2008).
2. Sharma M., Gupta Y.K. Effect of alpha lipoic acid on intracerebroventricular treptozotocin model of cognitive impairment in rats. Eur. Neuropsychopharmacol. 2003; 4 (13): 241–247.
3. Ziegler D., Hanefeld M., Ruhnau K.J. et al. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a 7-month multicenter randomized controlled trial (ALADIN III Study). ALADIN III Study Group. Alpha-Lipoic Acid in Diabetic 4. Malik R.A. Current and future strategies for the management of diabetic neuropathy. Treat Endocrinol. 2003; 2 (6): 389–400.
5. Poon H.F., Farr S.A., Thongboonkerd V. et al. Proteomic analysis of specific brain proteins in aged SAMP8 mice treated with alpha-lipoic acid: implications for aging and age-related neurodegenerative disorders. Neurochem. Int. 2005; 2 (46): 159–168.
6. Cho J.Y., Um H.S., Kang E.B., Cho I.H., Kim C.H., Cho J.S., Hwang D.Y. The combination of exercise training and alpha-lipoic acid treatment has therapeutic effects on the pathogenic phenotypes of Alzheimer's disease in NSE/APPsw-transgenic mice. Int J Mol Med. 2010; 25 (3): 337–346.
7. Torshin I.Yu. Sensing the change from molecular genetics to personalized medicine. Nova Biomedical Books, NY, USA, 2009. In “Bioinformatics in the Post-Genomic Era” series, ISBN 1-60692-217-0.
8. Биохимия: учебник для вузов (ред. Е.С. Северин), М.: 5-е изд., 2009.
9. Teichert J., Hermann R., Ruus P., Preiss R. Plasma kinetics, metabolism, and urinary excretion of alpha-lipoic acid following oral administration in healthy volunteers. J Clin Pharmacol., 2003, 43 (11): 1257–1267. doi:10.1177/0091270003258654.

Димерный дипептидный миметик 1-й петли фактора роста нервов ГК-6, активирующий PI3K/АКТ и MEK/MAPK/ERK, вызывает дифференцировку клеток PC12 по нейрональному типу

Антипова Т.А.¹, Николаев С.В.¹, Ревущин А.В.², Савченко Е.А.²,
Павлова Г.В.², Гудашева Т.А.¹

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

² – Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Резюме. Димерный дипептидный миметик 1-й петли NGF ГК-6 (10^{-6} М), активирующий как фосфатидилинозитол-3/Акт-киназный, так и митоген-активируемый протеинкиназный (MEK/MAPK/ERK) сигнальные каскады, вызывает дифференцировку клеток PC12 по нейрональному типу. В то же время димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF ГК-2 (10^{-6} М), активирующий только фосфатидилинозитол-3/Акт-киназный путь, не обладает дифференцирующим действием.

Ключевые слова: NGF, димерные дипептидные миметики, ГК-2, ГК-6, дифференцировка, PC12, бета-тубулин 3

Dimeric dipeptide mimetic the 1st loop of nerve growth factor of GK-6, which activates PI3K/AKT and MEK/MAPK/ERK, causes a neuronal type differentiation of PC12 cells

Antipova T.A.¹, Nikolaev S.V.¹, Revishchin A.V.², Savchenko E.A.², Pavlova G.V.², Gudasheva T.A.¹

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow

Resume. Dimeric dipeptide mimetic 1st loop of NGF GK-6 (10^{-6} М) activating as phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase MEK/MAPK/ERK signaling cascades causes PC12 cell differentiation into neuron-like cells. At the same time dimeric dipeptide mimetic the 4th loop of NGF GK-2 (10^{-6} М), which activates only phosphatidylinositol 3-kinase/Akt, does not possess the differentiating effect.

Keywords: NGF, dimeric dipeptide mimetics of NGF, differentiation, PC12, beta-tubulin III

Автор, ответственный за переписку:

Антипова Татьяна Алексеевна – заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495) 601-22-43; e-mail: zenina_tatyana@mail.ru

Введение

Развивающиеся нейроны для своего выживания и дифференцировки нуждаются в нейротрофинах, наиболее изученным из которых является фактор роста нервов (NGF). Известно, что эффекты этого нейротрофина на выживаемость и рост отростков нейронов обусловлены взаимодействием с TrkA рецептором. Связывание с NGF ведёт к димеризации и активации TrkA путём аутофосфорилирования внутриклеточных тирозиновых остатков [13]. Это инициирует запуск сигнального трансдукционного каскада, включающего фосфатидилинозитол-3 киназный (PI3K/АКТ) и митоген-активируемый протеинкиназный (MEK/MAPK/ERK) пути. Активация PI3K/АКТ способствует выживанию нейронов. MEK/MAPK/Erk-киназный путь контролирует в основном деление и дифференцировку клеток [10, 12].

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова была сформулирована гипотеза, что разные функции NGF контролируются взаимодействием разных петель с

одним и тем же TrkA-рецептором [7]. В рамках этой гипотезы были получены ГК-2 (гексаметилендиамид *бис*-(*N*-моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина)), димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF, и ГК-6 (гексаметилендиамид *бис*-(*N*-аминокапроил-глицил-*L*-лизина)), миметик 1-й петли NGF. Оба миметика активировали TrkA-рецептор, PI3K/АКТ, и обладали нейропротекторным эффектом [2]. ГК-6, кроме того, активировал ещё и MEK/MAPK/Erk-киназный путь [1].

Цель исследования

Целью настоящего исследования было показать, что миметик 1-й петли ГК-6, но не миметик 4-й петли NGF ГК-2, обладает дифференцирующей активностью.

Материалы и методы

Все манипуляции с клетками выполнялись в строго стерильных условиях. Клетки культивировали при

температуре 37 °C, 5 % CO₂ в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, HyClone, США), содержащей 5 % FBS (фетальной бычьей сыворотки, Gibco, США) для клеток линий HT-22 и PC12 и 10 % FBS для нейробластомы человека линии SH-SY5Y, 2мМ L-глутамин (ICN Pharmaceuticals, США). Смену культуральной среды производили через 24 ч после посева и каждые последующие 3 дня. Рассев на культуральные флаконы общей площадью 75 см² (Corning-Costar, США) осуществляли каждую неделю.

Недифференцированные клетки PC12 рассеивали с плотностью 3,5 тыс на лунку в среде DMEM с 1 % сывороткой FBS. В момент посева в среду культивирования добавляли NGF в качестве положительного контроля в конечной концентрации 100 нг/мл (BD Bioscience, Великобритания), пептиды ГК-2 и ГК-6 в конечных концентрациях 10⁻⁵–10⁻⁸М. Концентрация NGF (≈10⁻⁹ М) используется в экспериментах по выявлению нейротропной и дифференцирующей активности на клетках PC12 [6] и не является токсичной для клеток [16].

В дальнейшем исследуемые пептиды и NGF вносили в среду каждые 48 ч в течение 6 сут. О степени дифференцировки клеток судили по форме и размерам клеток, количеству и длине отростков. Дифференцированными считались клетки, имевшие отростки размером более, чем величина диаметра тела клетки.

Для окраски клеток PC12 на нейрональный маркер бета-тубулин 3 (Abcam, Великобритания) пептиды вносили по той же схеме. После этого клеточную среду отбирали, клетки промывали 2 раза холодным PBS и фиксировали 4 % формальдегидом в PBS. Окрашивание клеток антителами на бета-тубулин 3 в разведении 1:100 проводили в течение ночи при 4 °C в PBS, содержащем 1 % BSA и 0,1 % Tween. В качестве вторичных использовали антитела козы против иммуноглобулина кролика конъюгированные флуоресцентным красителем DyLight 488 (Abcam, США) в разведении 1:250 в течение 1 ч. Фотографирование клеток проводили с использованием флуоресцентного микроскопа Nikon Eclipse TS100-F (Япония) при увеличении 100.

Результаты и обсуждение

Для определения дифференцирующей активности пептидных миметиков фактора роста нервов использовали клетки феохромоцитомы крысы линии PC12. Известно, что эти клетки содержат TrkA рецепторы и при добавлении NGF дифференцируются по нейрональному типу [5].

Дипептидный миметик ГК-2 в отличие от NGF не вызывал дифференцировку клеток линии PC12 ни в одной из исследуемых концентраций от 10⁻⁵ до 10⁻⁸М. Внешний вид клеток PC12 после обработки ГК-2 не отличался от контроля, образование отростков не наблюдалось (рис. 1).

В то же время на 6-й день после внесения в среду культивирования ГК-6 в конечной концентрации 10⁻⁶ М недифференцированные клетки PC12 образовывали цитоплазматические отростки, величина которых превышала диаметр клетки (см. рис. 1).

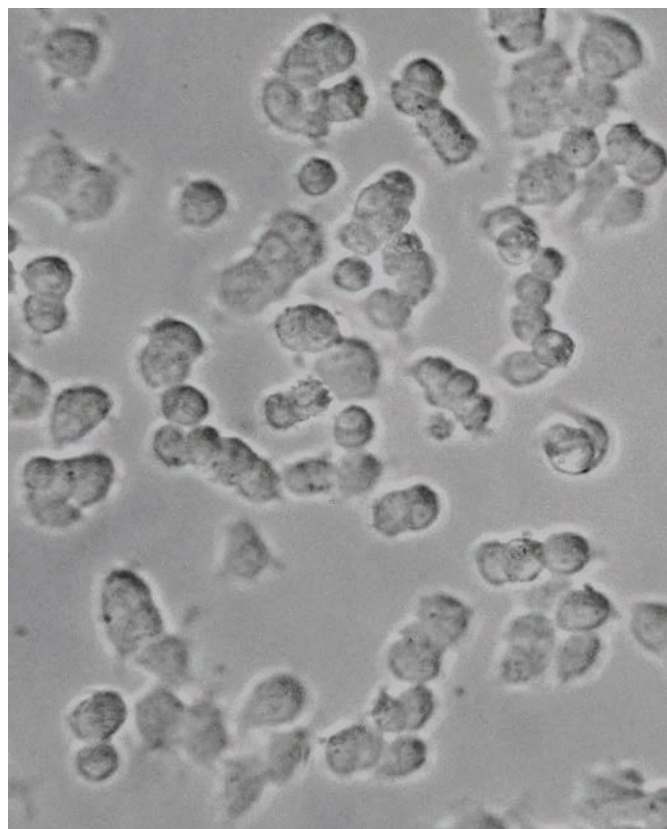
Для подтверждения дифференцировки клеток PC12 по нейрональному типу было использовано окрашивание на нейрональный маркер бета-тубулин III, поскольку последний экспрессируется в дендритах, аксонах и окончаниях аксонов нейронов исключительно при дифференцировке клеток по нейрональному типу [4, 11]. Как видно на рис. 2, в терминалях дифференцированных клеток PC12 как под действием ГК-6 (10⁻⁶ М), так и NGF (≈10⁻⁹ М) действительно обнаруживается бета-тубулин III.

Таким образом, дипептидный миметик 1-й петли фактора роста нервов ГК-6 вызывает дифференцировку клеток PC-12 по нейрональному типу.

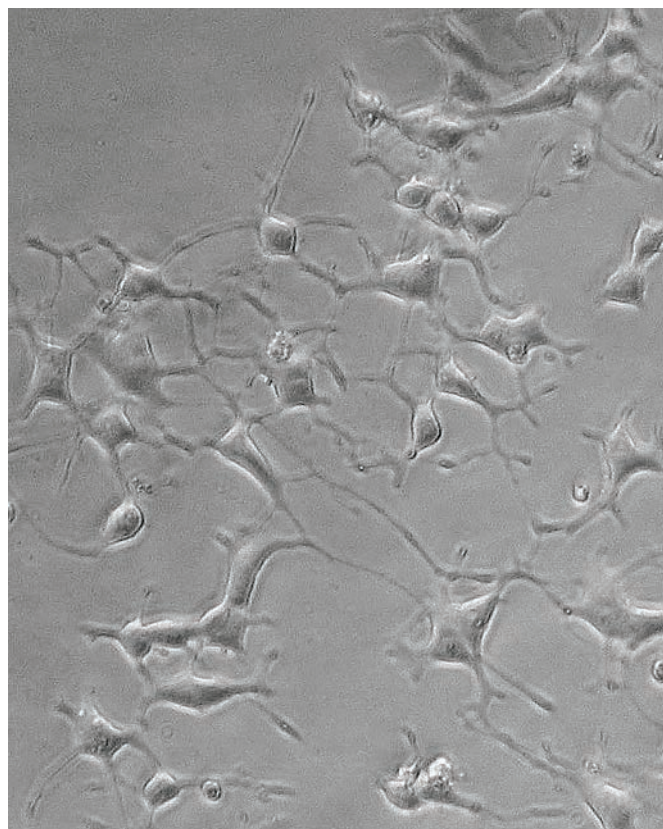
Полученные нами данные об отсутствии дифференцирующего действия у ГК-2, который активирует Akt-путь и не активирует Erk и наличия дифференцирующей активности у ГК-6, который активирует оба сигнальных пути, согласуются с данными литературы [3, 8] о необходимости активации MEK/MAPK/Erk-киназного пути для дифференцировки клеток по нейрональному типу.

Таким образом, выявленная нами способность у исследованных пептидов вызывать дифференцировку (ГК-6) либо отсутствие таковой (ГК-2) свидетельствует в пользу того, что разные петли NGF могут быть ответственны за разные функции этого белка.

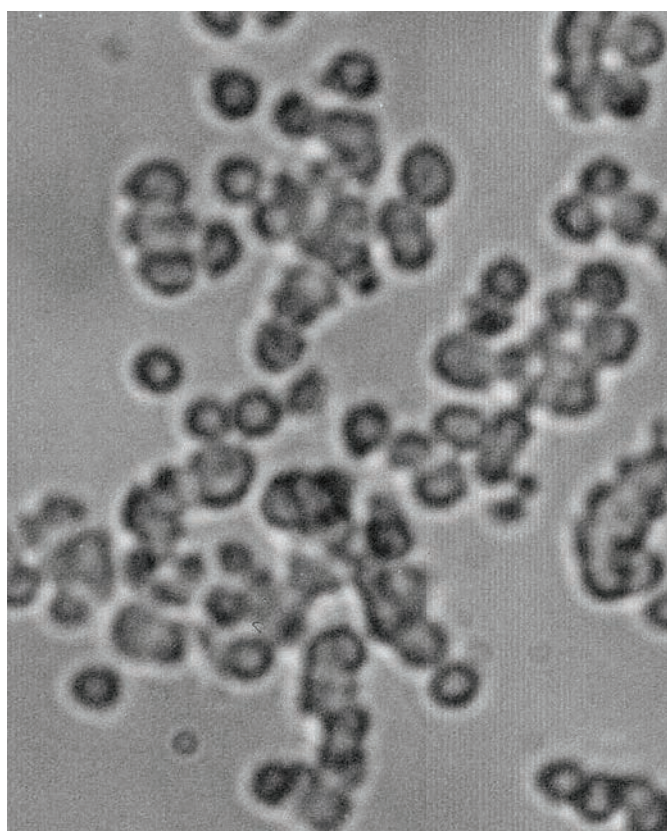
При изучении активации TrkA рецептора после внесения ГК-2 и ГК-6 нами были использованы антитела на TrkA, содержащий фосфорилированный тирозин Y490. Было показано, что оба этих дипептида вызывали фосфорилирование TrkA рецептора по этому тирозину. При этом ГК-2 и ГК-6 имели разный паттерн активации пострецепторных сигнальных киназ. Можно предположить, что фосфорилирование других тирозиновых последовательностей вовлечено в активацию разных пострецепторных сигнальных путей под действием димерных миметиков разных петель фактора роста нервов и, в конечном итоге, в дивергенцию функций NGF. Согласно данным литературы, существует несколько тирозиновых остатков, фосфорилирование которых приводит к активации внутриклеточных сигнальных путей. Три из них, Y670, Y674 и Y675, представлены в активирующей петле киназного домена и регулируют киназную активность рецептора. Фосфорилирование этих остатков необходимо для конформационных изменений, обеспечивающих взаимодействие каталитического центра и С-концевых последовательностей тирозина. Фосфорилирование Y785 связано с активацией фосфолипазы PLC-γ, ответственной за процесс клеточной дифференцировки и активацию Erk1/2 [8]. Мутация хотя бы одного из трёх остатков Y670, Y674 и Y675 активирующей петли



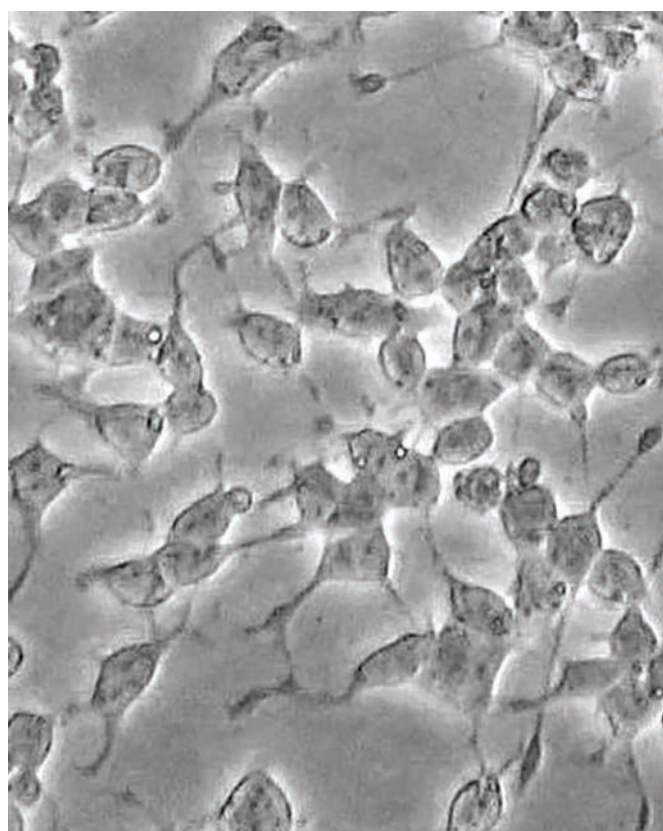
Контроль



NGF 10^{-9} М

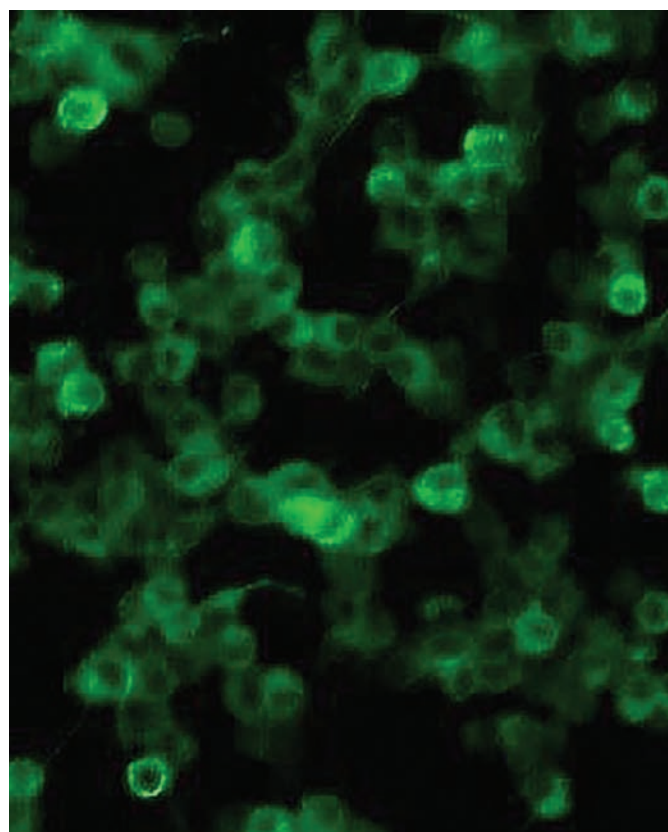


ГК-2 10^{-6} М



ГК-6 10^{-6} М

Рис. 1. Дифференцировка клеток РС-12 после внесения NGF, ГК-2 и ГК-6. Фазовый контраст. Увеличение $\times 200$



Контроль

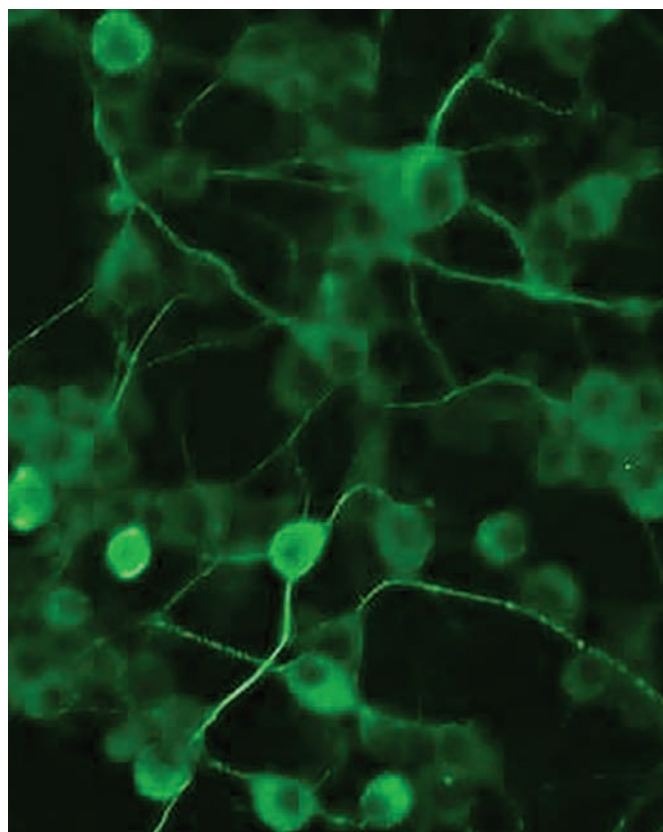
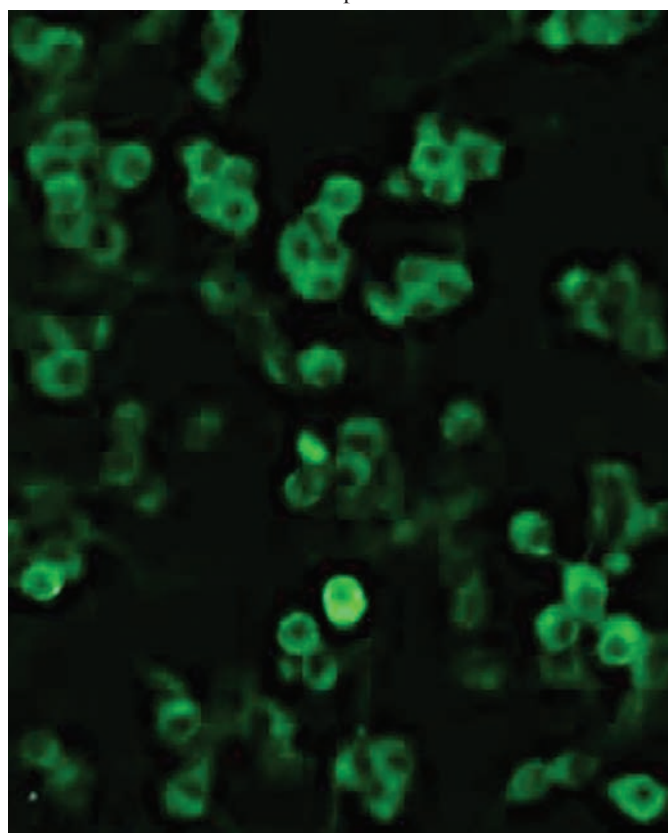
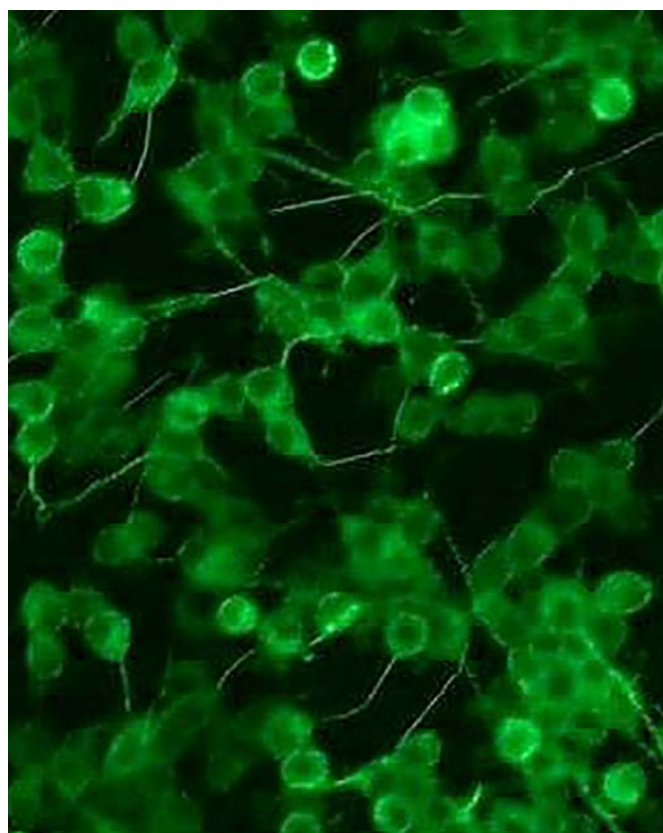
NGF 10^{-9} МГК-2 10^{-6} МГК-6 10^{-6} М

Рис. 2. Обнаружение нейронального маркера β -тубулина III после внесения NGF, ГК-2 и ГК-6 в культуру клеток феохромоцитомы крысы PC-12. Увеличение $\times 200$. Иммуногистохимическое окрашивание антителами к β -тубулину III

полностью предотвращают фосфорилирование Y785 и последующую активацию Erk1/2 и PLC- γ . Фосфорилирование Y499 приводит к активации адапторного белка Shc, фосфорилирование Y760 — к активации PI3 киназы, Y794 — к активации PLC- γ [15]. Отдельные мутации этих трёх остатков тирозина ингибируют рост нейритов в культуре клеток PC12 [9].

Кроме того, существует также независимый от фосфорилирования остатка 490 путь, приводящий к дифференцировке и повышению выживаемости клеток через другие адаптеры. Например, имеются два дополнительных адаптера, γ APS и SH2-B, фосфорилирующиеся при активации Trk-рецептора. Они могут образовывать гомо- и гетеродимеры и образовывать комплекс с адаптерным белком Grb2, обеспечивающий проведение сигнала через белок SOS к Ras/MAPK/ERK и через комплекс белков Ras/Gab к фосфоинозитол-3-киназе. Показано, что использование антител к SH2-B препятствует NGF-зависимой выживаемости, активации Erk и аксональному росту симпатических нейронов [14].

Arevalo J. et al. указывают на наличие ещё одного сигнального комплекса, ответственного за селектив-

ную активацию Erk-киназ [3]. Этот комплекс образуется после взаимодействия трансмембранных доменов TrkA и ARMS. Тирозин Y1096 ARMS фосфорилируется после связывания нейротрофинов с рецепторами и обеспечивает образование докинг сайтов для CrkL, приводящее к Rap1-зависимой долговременной активации Erk-киназ. Нарушения взаимодействия Trk с ARMS или ARMS с CrkL (белком, содержащим домен SH2 и два домена SH3 (src-гомологичные домены)) с помощью мутаций тирозина Y1096 ARMS существенно снижает пролонгированный нейротрофиновый сигналинг Erk, но не влияет на Ras или Akt активацию [3].

Таким образом, конечный ответ клетки на разные сигналы бывает различным, в зависимости от первого участника проведения сигнала от TrkA-рецептора. Активация под действием ГК-2 или ГК-6 одного или двух сигнальных каскадов, а также наличие или отсутствие дифференцирующего действия может быть связано, в частности, с фосфорилированием тирозиновых остатков, отличных от Y490 и далее различных вариантов образующихся комплексов адаптерных белков, участвующих в трансдукции сигнала, что требует дальнейшего изучения.

Литература

1. Антипова Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В., Круглов С.В., Тарасюк А.В., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Сравнительный анализ активации пострецепторных сигнальных путей димерными дипептидными миметиками разных петель NGF. Фармакокинетика и фармакодинамика. 2016; 2: 14–17.
2. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. ДАН. 2010; 434:4: 549–552.
3. Arevalo J.C., Pereira D.B., Yano H., Teng K.K., Chao M.V. Identification of a switch in neurotrophin signaling by selective tyrosine phosphorylation. J Biol Chem. 2006; 281:2:1001–1007.
4. Ceres A., Banker G.A., Binder L. Immunocytochemical localization of tubulin and microtubule-associated protein 2 during the development of hippocampal neurons in culture. J Neurosci. 1986; 6:3: 714–722.
5. Chang J.H., Mellon E., Schanen N.C., Twiss J.L. Persistent TrkA activity is necessary to maintain transcription in neuronally differentiated PC12 cells. J. Biol. Chem. 2003; 278:44: 42877–42885.
6. Gong Y., Wu J., Qiang H., Liu B., Chi Z., Chen T., Yin B., Peng X., Yuan J. BRI3 associates with SCG10 and attenuates NGF-induced neurite outgrowth in PC12 cells. BMB Rep. 2008; 41:4:287–293.
7. Gudasheva T.A., P.Yu. Povarnina, T.A. Antipova, Yu.N. Firsova, M.A. Konstantinopolsky, S.B. Seredenin. Dimeric dipeptide mimetics of the nerve growth factor Loop 4 and Loop 1 activate TRKA with different patterns of intracellular signal transduction. Journal of Biomedical Science (2015) 22:106. DOI 10.1186/s12929-015-0198-z.
8. Huang E.J., Reichardt L.F. Trk receptors: roles in neuronal signal transduction. Annu Rev Biochem. 2003; 72: 609–642.
9. Inagaki N., Thoenen H., Lindholm D. TrkA tyrosine residues involved in NGF-induced neurite outgrowth of PC12 cells. Eur J Neurosci. 1995; 7: 6:1125–1133.
10. Kaplan D.R., Miller F.D. Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr. Opin. Neurobiol. 2000; 10: 3: 381–391.
11. Lee M., Tuttle J., Rebhun L., Cleveland D., Frankfurter A. The expression and posttranslational modification of a neuron-specific beta-tubulin isotype during chick embryogenesis. Cell Motil. Cytoskeleton. 1990; 17: 118–132.
12. Obata K., Noguchi K. MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. Life Sci. 2004; 74: 21: 2643–2663.
13. Pollack S.J., Harper S.J. Small molecule Trk receptor agonists and other neurotrophic factor mimetics. Cur. Drug Targets-CNS and Neurol. Disorders. 2002; 1:1: 59–80.
14. Qian X., Riccio A., Zhang Y., Ginty D.D. Identification and characterization of novel substrates of Trk receptors in developing neurons. Neuron. 1998; 21:5:1017–1029.
15. Rozakis-Adcock M., McGlade J., Mbamalu G., Pelicci G. et al. Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. Nature. 1992; 360: 6405: 689–692.
16. Senger D.L., Campenot R.B. Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. J. Cell Biol. 1997; 138: 2: 411–412.

Содержание возбуждающих и тормозных аминокислот в мозге крыс при литий-пилокарпиновых судорогах и на фоне предварительного введения леветирацетама и нового производного рацетама ГИЖ-290

Ковалёв И.Г., Боков Р.О., Кудрин В.С., Воронина Т.А., Ковалёв Г.И.

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

Резюме. С помощью метода ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией изучено влияние нового производного рацетама с противосудорожной активностью (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)уксусной кислоты; ГИЖ-290) и вещества сравнения леветирацетама на содержание нейроактивных аминокислот аспартата, глутамата, таурина, глицина и ГАМК в гомогенатах гиппокампа и префронтальной коры (ПФК) мозга крыс. В гиппокампах интактных крыс ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б) повышал уровни глутамата, глицина и ГАМК на 22, 42 и 28%, а леветирацетам (600 мг/кг), напротив, приводил к снижению этих показателей на 18, 26 и 26 %. На максимуме литий-пилокарпиновых судорог обнаруживалось уменьшение концентрации аспартата (-19 %) и увеличение глицина в ПФК (+24 %). Предварительное введение ГИЖ-290 и леветирацетама не влияло на эти показатели, но вызывало возрастание концентраций таурина в гомогенатах ПФК. Таким образом, изученные показатели не являются маркерами противосудорожного действия леветирацетама и ГИЖ-290, но указывают на различия в механизмах формирования их противосудорожного эффекта.

Ключевые слова: нейроактивные аминокислоты, «литий-пилокарпиновая» модель судорог, леветирацетам, производное 4-фенил-пирролидона, гиппокамп, префронтальная кора, крысы

The brain excitatory and inhibitory amino acids content in rats with lithium-pilocarpine-evoked seizures and after the preliminary administration of levetiracetam and novel racetam derivative GIZH-290

Kovalev I.G., Bokov R.O., Kudrin V.S., Voronina T.A., Kovalev G.I.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The effects of a new racetam derivative with anticonvulsant activity GIZh-290 (2-oxo-4-phenylpyrrolidin-1-yl) acetic acid and levetiracetam for the content of neuroactive amino acids aspartate, glutamate, taurine, glycine and GABA in homogenates of the hippocampus and prefrontal cortex (PFC) of rat brain using the HPLC method with fluorescent detection were studied. In the hippocampi of intact rats HIZh-290 (5 mg/kg, ip) increased the levels of glutamate, glycine and GABA by 22, 42 and 28 %, and levetiracetam (600 mg/kg), on the contrary, reduced them by 18, 26 and 26 %. At the maximum of lithium-pilocarpine seizures, a decrease in the content of aspartate (-19 %) and an increase in glycine in the PFC (+24 %) were detected. Preliminary administration of GIZh-290 and levetiracetam did not affect these parameters, but caused an increase in taurine concentrations in the PFC homogenates. Thus, the indicators studied are not markers of anticonvulsant action of levetiracetam and GIZH-290, but indicate differences in the mechanisms of the drugs anticonvulsant effect formation.

Keywords: neuroactive amino acids, "lithium-pilocarpine" model of seizures, levetiracetam, 4-phenyl-pyrrolidone derivative, hippocampus, prefrontal cortex, rats

Автор, ответственный за переписку:

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

Введение

Леветирацетам обладает не только уникальным противоэпилептическим эффектом [1], но и специфическим профилем действия на животных моделях [2]. Одной из моделей является т. н. «литий-пилокарпиновая», адекватная для тестирования ПЭП, эффективных по отношению к парциальным и вторично-генерализованным судорогам, блокирующих эпилептогенез, а также проявляющих активность при индуцированном судорогами поведенческом дефиците [3].

В 2016–2017 гг. нами было обнаружено и фармакологически охарактеризовано новое производное рацетама, 2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)уксусной кислоты (ГИЖ-290), значительно превосходящее леветирацетам не только по специфической противосудорожной активности [4], но и по спектру поведенческой активности [5].

Целью настоящей работы стало сравнение влияний ГИЖ-290 и леветирацетама на содержание тормозных (ГАМК, таурина, глицина) и возбуждающих (глутамата, аспартата) аминокислот в префронтальной коре (ПФК) и гиппокампе мозга у нативных крыс,

а также при литий-пилокарпиновых судорогах на фоне предварительного введения обоих веществ.

Материалы и методы

Животные: самцы белых аутбредных крыс (200–250 г) были поставлены из питомника «Столбовая» (Московская обл., РФ) и помещены в условия с контролируемой постоянной температурой и влажностью (40–60 %) воздуха, регулярно сменяемым циклом день–ночь (12 ч–12 ч), доступом к воде и еде *ad libitum*. Организация экспериментов соответствовала этическим нормам, регламентирующим эксперименты на животных (Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST № 123 от 18 марта 1986 г., Страсбург; Об утверждении правил лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19 июня 2003 г. М., 2003).

Вещества: пилокарпин, хлорид лития (оба Sigma, St. Louis, MO); леветирацетам (Некст Фарма САС 17, Франция); производное 4-фенил-пирролидона-2 (ГИЖ-290) синтезировано в Отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова».

Литий-хлорид-пилокарпиновая модель судорог. Эксперименты проводили на аутбредных крысах-самцах массой 220–240 г. Согласно принятому протоколу [1, 6], животным вводили водный раствор хлорида лития – 127 мг/кг (в/б), а через 16 ч – пилокарпин (в/б) в дозе 40 мг/кг. В результате у 97–100 % животных развивается эпилептический статус и гибель. Леветирацетам и ГИЖ-290 вводили внутрибрюшинно за 40 мин до введения пилокарпина.

Животные были случайным образом разделены на 6 групп по 7 особей в каждой. Группа I: контроль (физраствор); группа II: леветирацетам (600 мг/кг, в/б); группа III: ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б); группа IV: LiCl+пилокарпин и физраствор; группа V: LiCl+пилокарпин и леветирацетам; группа VI: LiCl+пилокарпин и ГИЖ-290. Декапитацию крыс проводили через 40 мин после последних инъекций, фронтальную кору и гиппокампы извлекали на лед, быстро замораживали в жидком азоте и сохраняли в криопробирках при –80 °C для проведения хроматографического анализа.

Хроматография. Определение содержания тормозных (ГАМК, глицин, таурин) и возбуждающих (аспартат, глутамат) нейромедиаторных аминокислот в экстрактах ткани мозга проводили методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией, согласно модифицированной методике [7]. Поскольку исследуемые аминокислоты в нативной форме являются очень слабыми хромофорами (не флуоресцируют и не поглощаются в UV области), для устойчивой детекции они были предварительно дериватизированы ортофталевым диальдегидом (ОФА), который обладает флуоресцентными свойствами и, вступая в реакцию с аминокислотой, образует флуоресцирующий комплекс. Для деривации аминокислот к

25 мкл супернатанта добавляли 25 мкл 0,1 М боратного буфера и 10 мкл о-фталальдегид-сульфитного реактива в 0,1 М боратном буфере (pH 9,5). ГАМК, аспартат, глутамат, таурин, глицин в начальной концентрации 0,1 мкМ/мл в 0,1 н HClO₄ использовали в качестве стандартной смеси для калибровки.

Через 20 мин после инкубации при комнатной температуре, 20 мкл реакционной смеси наносили на колонку Hypersil ODS 5 мкМ, 4,6 × 250. Регистрацию продуктов разделения проводили на флуоресцентном детекторе Agilent 1100, США, при длине волны возбуждения 230 нм и длине волны эмиссии 392 нм. Подвижная фаза для определения нейромедиаторных аминокислот состояла из 0,06 М NaH₂PO₄ × H₂O, 0,0032 М Na₂HPO₄, 0,025 мМ ЭДТА, и 1,24 мМ CH₃OH, pH 5,6. Скорость подвижной фазы составляла 1,5 мл/мин.

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0 с привлечением методов параметрической и непараметрической статистики (*t*-тест Стьюдента, тест Манна–Уитни). Тканевое содержание аминокислот выражали в мкмоль/мг сырой ткани. В таблицах представлены средние значения с учётом стандартной ошибки среднего ($\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$).

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования изучали влияние леветирацетама (ЛВТ, 600 мг/кг, в/б) и ГИЖ-290 (5 мг/кг, в/б) на содержание возбуждающих (глутамата и аспартата) и тормозных (ГАМК, таурина, глицина) в префронтальной коре (ПФК) и гиппокампе нативных крыс (группы II и III). Было показано (табл. 1), что под воздействием ЛВТ в гиппокампе происходит увеличение концентрации глутамата до $9,17 \pm 0,66$ мкмоль/мг сырой ткани (контроль – $7,5 \pm 0,44$ мкмоль/мг), глицина до $2,01 \pm 0,21$ (контроль – $1,42 \pm 0,13$ мкмоль/мг), а также ГАМК – до $6,57 \pm 0,42$ мкмоль/мг по сравнению с $5,14 \pm 0,36$ в контроле (для всех $p < 0,05$).

Напротив, в аналогичных условиях ГИЖ-290 проявлял выраженную тенденцию к снижению уровней этих аминокислот в гиппокампе: $6,14 \pm 0,51$ мкмоль/мг для глутамата, $1,05 \pm 0,07$ мкмоль/мг (оба $p < 0,1$) для глицина и $3,79 \pm 0,30$ мкмоль/мг для ГАМК ($p < 0,05$). В образцах ПФК никаких значимых изменений аминокислот не наблюдалось, равно как и в гиппокампах для аспартата и таурина (табл. 1).

Таким образом, значимые изменения в мозге нативных крыс наблюдаются только в гиппокампах, причём под воздействием ЛВТ содержание глутамата, глицина и ГАМК возрастают, соответственно, на 22, 42 и 28 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$), тогда как после введения ГИЖ-290, напротив, происходит уменьшение уровней ГАМК (–26 %; $p < 0,05$), а также в некоторой степени глутамата и глицина ($0,05 < p < 0,10$).

На следующем этапе тканевые уровни нейроактивных аминокислот измеряли на пике судорог, вызванных

Таблица 1

Влияние левитирацетама (ЛВТ) и ГИЖ-290 на содержание (мкмоль/мг ткани) нейроактивных аминокислот в мозге intactных крыс ($m \pm S.E.M.$)

Аминокислоты	Структура мозга	Контроль ($n = 15$)	ЛВТ ($n = 7$)	ГИЖ-290 ($n = 7$)
Аспартат	ПФК	$2,30 \pm 0,07$	$2,36 \pm 0,12$	$2,22 \pm 0,14$
	Гиппокамп	$1,66 \pm 0,09$	$1,88 \pm 0,15$	$1,42 \pm 0,08$
Глутамат	ПФК	$7,28 \pm 0,20$	$6,95 \pm 0,21$	$7,52 \pm 0,39$
	Гиппокамп	$7,5 \pm 0,44$	$9,17 \pm 0,66^*$	$6,14 \pm 0,51\#$
Глицин	ПФК	$3,74 \pm 0,12$	$3,93 \pm 0,19$	$3,57 \pm 0,24$
	Гиппокамп	$1,42 \pm 0,13$	$2,01 \pm 0,21^*$	$1,05 \pm 0,07\#$
Таурин	ПФК	$12,30 \pm 0,47$	$11,2 \pm 0,30$	$13,0 \pm 0,94$
	Гиппокамп	$14,0 \pm 1,24$	$16,50 \pm 2,37$	$11,2 \pm 0,84$
ГАМК	ПФК	$3,57 \pm 0,16$	$3,23 \pm 0,21$	$3,86 \pm 0,28$
	Гиппокамп	$5,14 \pm 0,36$	$6,57 \pm 0,42^*$	$3,79 \pm 0,30^*$

Примечание: #/* — достоверность отличия от Контроля при $p < 0,1/0,05$ (критерий Манна-Уитни).

комбинацией литий+пилокарпин. Результаты свидетельствуют, что в фазе, соответствующей максимуму судорожной активности, в группе IV происходит некоторое снижение концентрации аспартата в ПФК ($0,05 < p < 0,10$) и гиппокампе (-20% ; $p < 0,05$), а также возрастание уровней глутамата ($0,05 < p < 0,10$) и глицина ($+24\%$; $p > 0,05$) в ПФК (табл. 2).

Предварительное введение ни ЛВТ (группа V), ни ГИЖ-290 (группа VI) не изменяло описанных выше эффектов просудорожной комбинации литий + + пилокарпин. Кроме того, под влиянием обоих веществ обнаруживалось увеличение уровней таурина в ПФК, более выраженное для ГИЖ-290: $+21\%$ по сравнению с группой IV (табл. 2). Таурин относится к нейроактивным аминокислотам тормозного действия, вызывающим гиперполяризацию и ингибицию разряда нейронов. Существует предположение, что таурин защищает нейроны от глутаматной токсичности, снижая

внутриклеточное содержание кальция и последующие события для обзора см. [8].

Принято считать, что системное введение пилокарпина вызывает судороги, которые избирательно подавляются с помощью ПЭП, модулирующих ГАМКергическую нейротрансмиссию [9]. Хотя убедительные данные о прямом воздействии ЛВТ на ГАМК-систему пока отсутствуют, но у крыс после введения 375 мг/кг пилокарпина было описано снижение уровня аспартата, возрастание глутамата и ГАМК при неизменности концентрации глицина. Защитное действие левитирацетама (34 мг/кг) выражалось в увеличении аспартата и уменьшении глутамата, ГАМК, а также глицина [10].

В наших экспериментах изменений концентраций этих аминокислот не отмечено ни под воздействием комбинации литий + пилокарпин, ни при предварительном введении обоих веществ, что не позволяет счи-

Таблица 2

Влияние профилактического введения левитирацетама (ЛВТ) и ГИЖ-290 на содержание нейроактивных аминокислот (мкмоль/мг ткани) в мозге крыс с вызванными литий-пилокарпиновыми судорогами ($m \pm S.E.M.$)

Аминокислоты	Структура мозга	Контроль ($n = 15$)	Ф.р. + Токсин (Li + пилокарпин) ($n = 7$)	ЛВТ + Токсин ($n = 7$)	ГИЖ-290 + Токсин ($n = 7$)
Аспартат	ПФК	$2,30 \pm 0,07$	$2,00 \pm 0,13\#$	$2,10 \pm 0,18\#$	$1,83 \pm 0,05^*$
	Гиппокамп	$1,66 \pm 0,09$	$1,34 \pm 0,10^*$	$1,38 \pm 0,07\#$	$1,30 \pm 0,06^*$
Глутамат	ПФК	$7,28 \pm 0,20$	$7,99 \pm 0,20\#$	$8,00 \pm 0,37\#$	$7,27 \pm 0,48$
	Гиппокамп	$7,50 \pm 0,44$	$7,64 \pm 0,38$	$6,93 \pm 0,47$	$7,46 \pm 0,41$
Глицин	ПФК	$3,74 \pm 0,12$	$4,63 \pm 0,13^*$	$4,72 \pm 0,22^*$	$4,59 \pm 0,28^*$
	Гиппокамп	$1,42 \pm 0,13$	$1,17 \pm 0,05$	$1,18 \pm 0,12$	$1,28 \pm 0,09$
Таурин	ПФК	$12,30 \pm 0,47$	$13,30 \pm 0,72$	$14,60 \pm 1,44\#$	$16,10 \pm 1,0^*, ^\wedge$
	Гиппокамп	$14,0 \pm 1,24$	$15,3 \pm 1,83$	$12,9 \pm 0,98$	$14,6 \pm 0,44$
ГАМК	ПФК	$3,57 \pm 0,16$	$4,02 \pm 0,24$	$3,78 \pm 0,13$	$4,05 \pm 0,12\#$
	Гиппокамп	$5,14 \pm 0,36$	$4,92 \pm 0,12$	$4,80 \pm 0,27$	$5,94 \pm 0,60$

Примечание: #/* — достоверность отличия от Контроля при $p < 0,1/0,05$; $^\wedge$ — достоверность отличия от группы IV (критерий Манна-Уитни).

тать изученные показатели нейрохимическими маркерами противосудорожного эффекта ЛВТ и ГИЖ-290. Вместе с тем, разнонаправленность влияний обоих веществ с рацетамовой структурой на уровни глутамата, глицина и ГАМК в гиппокампах нативных крыс (увеличение под влиянием ЛВТ и уменьшение после ГИЖ-290) допускает предположение о различиях механизмов их противосудорожных эффектов.

Выводы

1. Новое производное рацетама, 2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил)уксусной кислоты (ГИЖ-290) в дозе 5,0 мг/кг через 80 мин после в/б введения вызывает в гиппокампах интактных крыс увеличение содержания глутамата, глицина и ГАМК на 22, 42 и 28 %, соответственно. Вещество сравнения леветирacetам (600 мг/кг), напротив, приводит к снижению этих показателей на 18, 26 и 26 %, соответственно.

Литература

1. Klitgaard H., Pitkanen A. Antiepileptogenesis, neuroprotection, and disease modification in the treatment of epilepsy: focus on levetiracetam. *Epileptic Disord* 2003; 5: Suppl. 1: S9–16.
2. Klitgaard H., Matagne A., Gobert J., Wulfer E. Evidence for a unique profile of levetiracetam in rodent models of seizures and epilepsy, *Eur J Pharmacol* 1998; 353: 191–206.
3. Leite J.P., Garcia-Cairasco N., Cavaleiro E.A. New insights from the use of pilocarpine and kainate models. *Epilepsy Res* 2002; 50 (1–2): 93–103.
4. Ковалёв И.Г., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. Изучение эффектов леветирacetам и нового производного 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 в закрытом крестообразном лабиринте у мышей линий BALB/c и C57BL/6. *Эксперим. и клин. фармакол.* 2017; 80 (6): 13–18.
5. Ковалёв И.Г., Васильева Е.В., Боков Р.О., Салимов Р.М. Ковалёв Г.И. Изучение эффектов леветирacetам и нового производного 4-фенилпирролидона ГИЖ-290 в закрытом крестообразном лабиринте у

2. В условиях моделирования судорожного состояния у крыс, вызываемого комбинацией литий + пилокарпин, обнаруживается уменьшение концентрации аспартата в гиппокампе на 19 % и повышение уровня глицина в префронтальной коре мозга на 24 % относительно контроля.

3. Предварительное введение ГИЖ-290 и леветирacetам практически не влияет на указанные показатели, но вызывает рост концентрации аминокислоты таурина в гомогенатах префронтальной коры мозга крыс, более выраженное у ГИЖ-290.

4. Полученные результаты не позволяют рассматривать изученные показатели маркерами противосудорожного действия леветирacetам и ГИЖ-290, но указывают на различия в механизмах формирования их противосудорожного эффекта.

мышей BALB/c и C57BL/6. *Фармакокинетика и фармакодинамика* 2017; 2: 18–21.

6. Jope R.S., Morrisett R.A., Snead O.C. Characterization of lithium potentiation of pilocarpine-induced status epilepticus in rats. *Exp Neurol* 1986; 91: 471–480.

7. Pearson S.J., Czudek C., Mercer K., Reynolds G.P. Electrochemical detection of human brain transmitter amino acids by high-performance liquid chromatography of stable o-phthalaldehyde-sulphite derivatives. *J Neuronal Transm.* 1991; 86: 151–157.

8. Oya S.S., Saransaari P. Taurine and epilepsy. *Epilepsy Res.* 2013; 104: 187–194.

9. Turski W.A., Andrews, J.S., Loschmann P., Bressler K., Bortolotto Z.A., Calderazzo-Filho L.S. et al. Substantia nigra regulates action of antiepileptic drugs. *Brain Res.* 1990; 520: 232–239.

10. Klitgaard H., Matagne A., Grimee R., Vanneste-Goemaere J., Margineanu D.-G. Electrophysiological, neurochemical and regional effects of levetiracetam in the rat pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Seizure.* 2003; 12: 92–100.

Значение количественной ЭЭГ в интерпретации бензодиазепинового теста у больных в вегетативном состоянии

Неробкова Л.Н.¹, Филатова Ю.Б.², Пылев А.Л.², Кац О.Ю.²

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

² – Европейская клиника, г. Москва

Резюме. Основной целью проведения бензодиазепинового теста у больных в вегетативном состоянии является поиск прогностически значимых показателей ЭЭГ для оценки функционального состояния мозга. С использованием многопараметрического метода анализа ЭЭГ с комплексным исследованием когерентных межзональных связей с топографическим картированием и локализацией эквивалентных дипольных источников отдельных ЭЭГ-составляющих получены характерные признаки изменений межцентральных нейрональных связей, на разных стадиях вегетативного состояния, получены характерные признаки изменений межцентральных нейрональных связей характерных для вегетативного состояния на фоне болюсного введения диазепама.

Ключевые слова: ЭЭГ, бензодиазепиновый тест, вегетативное состояние

The importance of quantitative EGG for patients in a vegetative state in benzodiazepine test interpretation

Nerobkova L.N.¹, Filatova Yu.B.², Pylev A.L.², Kats O.Yu.²

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – European clinic, Moscow

Resume. Using the multiparameter method of EEG analysis with a complex study of coherent interband links with topographic mapping and localization of equivalent dipole sources of individual EEG components, characteristic signs of changes in intercentral neuronal connections at different stages of a vegetative state were obtained, features of structural and functional interrelations for patients in a vegetative state in benzodiazepine test interpretation of which identification can represent and interest for the output prediction and selection of adequate therapy.

Keywords: EEG, benzodiazepine test, vegetative state

Автор, ответственный за переписку:

Неробкова Л.Н. – ст.н.с. лаб. психофармакологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В.Закусова»; 125315, г. Москва, ул. Балтийская, 8

Введение

Поиск критериев для дифференциального диагноза минимального сознания, устойчивого вегетативного состояния, комы и смерти мозга продолжает оставаться важным для неврологов и проблемы всё ещё не решены. Определение «вегетативное состояние», предложенное в 1992 году ассоциацией неврологов США, получило широкое распространение и признание [1–5]. Одной из наиболее важных проблем, с которыми сталкиваются фармако-ЭЭГ исследования, является трудность оценки эффектов препаратов у больных в критических состояниях. Количественная фармако-ЭЭГ представляет собой ценный метод определения как при контроле дозировки препарата, так и для демонстрации влияния препаратов на определённые структуры мозга, что было недоступно при визуальном анализе ЭЭГ. Остаётся важным вопрос о прогнозировании по картине ЭЭГ восстановления нормальной деятельности мозга, определении состояния его жизни или смерти. ЭЭГ корреляции являются наиболее надёжными для прогнозирования выхода больных с устойчивым вегетативным состоянием [6, 7]. Исходный паттерн ЭЭГ является отражением функ-

циональной активности устойчивой патологической системы [8]. Для прогнозирования результатов лечения больных с устойчивым вегетативным состоянием (УВС) предлагается проведение бензодиазепинового фармако-ЭЭГ теста: при непрерывной регистрации электроэнцефалограммы пациенту внутривенно методом титрования в возрастающих дозах вводят препарат бензодиазепинового ряда короткого действия. *Тест считается положительным, если на фоне внутривенного введения бензодиазепинов наблюдается перестройка паттерна ЭЭГ.* Исходный паттерн ЭЭГ являлся отражением функциональной активности устойчивой патологической системы. Появление в паттерне биоэлектрической активности головного мозга на ЭЭГ альфа- и бета-волн оценивается как положительный прогностический признак, чем ниже доза препарата, при которой выявляются положительные перестройки ЭЭГ, тем благоприятнее прогноз [9, 10].

В настоящем исследовании предпринята попытка поиска особенностей структурно-функциональных взаимоотношений в интерпретации бензодиазепинового теста у больных в вегетативном состоянии с использованием комплексного исследования когерентных межзональных связей с топографическим

картированием и локализацией эквивалентных дипольных источников отдельных ЭЭГ- составляющих.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе центра инновационных медицинских технологий (Европейская онкологическая клиника) г. Москвы. Регистрация ЭЭГ проводилась с использованием 8-канального электроэнцефалографа Нейрон-спектр 1 (Россия), с установленными фильтрами на 32 Гц и постоянной по времени 0,3. Использовался монополярный способ регистрации ЭЭГ. 8 активных электродов располагались в соответствии с международной системой Джаспера «10–20», с охватом основных зон конвексальной поверхности головы: фронтальные, центральные, окципитальные и темпоральные. В качестве референтных использовались ушные билатеральные электроды (A1, A2). Запись фоновой ЭЭГ проводилась в течение 10 мин с проведением функциональных проб (ритмическая фотостимуляция). Проведение бензодиазепинового теста осуществлял врач анестезиолог-реаниматолог. Обязательным условием являлось наличие возможности проведения искусственной вентиляции лёгких, если возникнет необходимость. Для введения препарата бензодиазепинового ряда (диазепам 20 мг/кг) заранее устанавливался венозный катетер.

Компьютерный анализ ЭЭГ осуществлялся с помощью программы «BRAINSYS». Программный комплекс выполнял следующие функции: ввод в компьютер многоканальной ЭЭГ и её визуальное редактирование, включающее фильтрацию (использовался полосовой фильтр в интервале частот от 32 до 1,5 Гц), выделение артефактов и их устранение из анализируемого отрезка ЭЭГ; спектрально-когерентный анализ

ЭЭГ и статистическую обработку полученных результатов. При проведении спектрально-когерентного анализа использовались 30-секундные фрагменты многоканальной безартефактной записи ЭЭГ. Когерентный анализ проводился для близлежащих и удалённых областей мозга в пределах каждого из полушарий и для одноимённых областей мозга правого и левого полушарий, что позволяло характеризовать короткие и длинные внутри- и межполушарные связи соответственно. Средние внутриполушарные связи определялись для пар: Fp1 — C3, C3 — O1, O1 — T5, Fp2 — C4, C4 — O2, O2 — T6, Fp2 — O2, Fp1 — O1; межполушарные: для Fp1 — Fp2, C3 — C4, O1 — O2, T5 — T6. Для исследования пространственной организации ЭЭГ и взаимосвязей между зонами коры для каждой пары анализируемых отведений учитывали показатели значений когерентности (КОГ) более 0,7 в частотном диапазоне 32–1,5 Гц. с шагом в 1 Гц. Локализация источников генерации биопотенциалов определялась методом эквивалентных дипольных источников с применением программы «BRAINLOC». Перед проведением процедуры для определения зоны локализации, отобранные 10-секундные безартефактные отрезки ЭЭГ подвергались цифровой фильтрации в исследуемых диапазонах.

Результаты исследования

При визуальном анализе ЭЭГ учитывались нарушения основного ритма и наличие патологических знаков. Было показано, что отклонения от нормы характеризовались дезорганизацией биоэлектрической активности, что проявлялось в отсутствии регионарных особенностей с наличием диффузной тета- и дельта-активности с признаками пароксизмальной

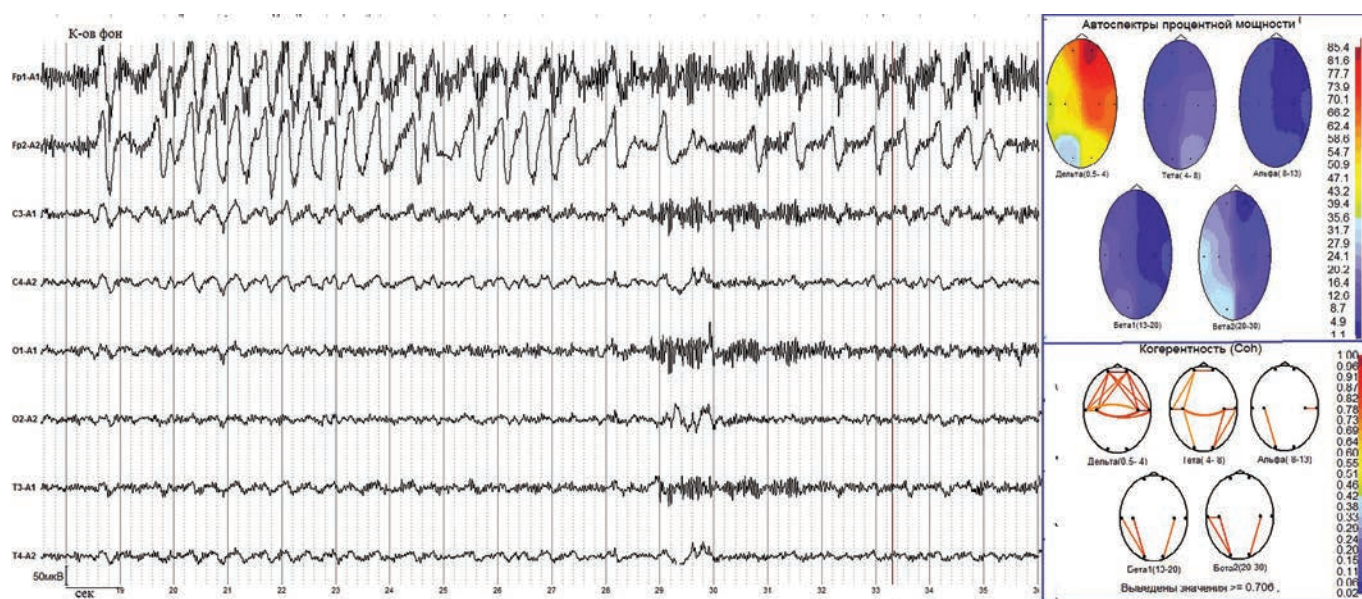


Рис. 1. Примеры различных типов ЭЭГ (слева) и топограммы спектров мощности ЭЭГ и КОГ (справа), 6-го К-ва в вегетативном состоянии, до проведения бензодиазепинового теста

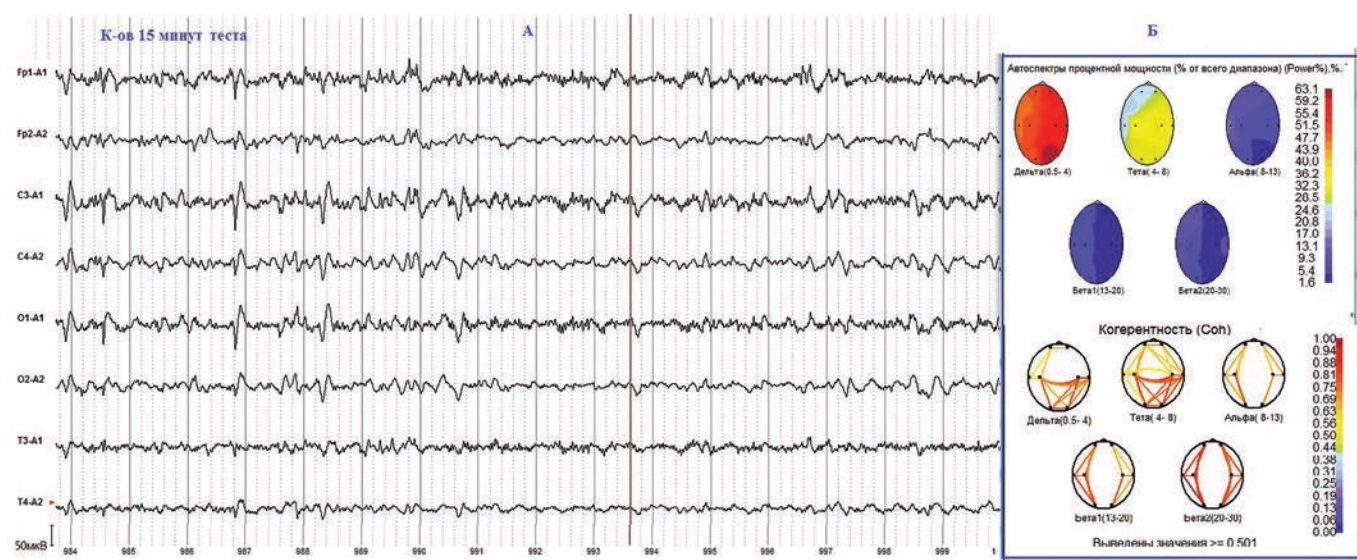


Рис. 2. Примеры различных типов ЭЭГ (слева) и топограммы спектров мощности ЭЭГ и КОГ (справа), 6-го К-ва в вегетативном состоянии, на фоне проведения бензодиазепинового теста (через 15 минут)

активности в виде синхронных билатеральных групп высокоамплитудных дельта/тета-волн в лобных отделах, во всех отведениях левого полушария регистрировалась отчётливая бета-активность (рис. 1, слева).

Анализ средних уровней межполушарной КОГ в диапазоне дельта- и тета-частот выявил высокий уровень межполушарных височно-височных, височно-лобных и центрально-центральных связей, повышение уровня внутриполушарных КОГ отмечалось в центрально-лобных и височно-лобных отделах обоих полушарий без достоверного различия по полушариям. В диапазоне альфа-и бета частот в основном отмечалось снижение среднего уровня КОГ, при этом были нарушены полностью межполушарные связи лобных отделов полушарий, что отражает функциональное рассогласование активности, сохранялись лишь внутриполушарные затылочно-височные и затылочно-центрально-лобные связи левого полушария (рис. 1, справа).

При динамическом анализе средних уровней межполушарной КОГ в диапазоне дельта- и тета-частот на фоне проводимого теста была выявлена определённая последовательность изменений межполушарных связей: в передних отделах мозга уже на первых минутах отмечалось снижение уровня височно-височных, височно-лобных и центрально-центральных межполушарных связей и повышение в центрально-затылочных и височно-затылочных отделах обоих полушарий. В диапазоне альфа-и - бета - частот отмечалось снижение всех межцентральных связей и усиление среднего уровня КОГ для внутриполушарных затылочно-височных, затылочно-центральных и лобно-центральных, височно-центральных связей (рис. 2)

Сравнение двух ЭЭГ- записей с использованием метода попарного сравнения показал, что по сравнению с фоновой записью на фоне проведения теста

отмечалось достоверное снижение уровня когерентности дельта-активности для межполушарных височно-височных и лобно-височных связей и коротких внутриполушарных лобно-височных и лобно-центральных связей правого полушария. Вместе с тем, в диапазоне бета-активности отмечалось усиление связей в средних височно-лобных и височно-затылочных парах и длинных внутриполушарных связей в лобно-затылочных парах левого полушария (рис. 3).

Трёхмерная компьютерная локализация дипольных источников пароксизмальной дельта-активности, наблюдаемой в виде синхронных билатеральных групп высокоамплитудных дельта/тета-волн в лобных отделах выявила источник её генерации в области лобного полюса, нижней и средней лобных извилин и верхней височной извилины правого полушария. Локализация дипольных источников генерализованных разрядов бета-активности отмечалась в лобно-височных областях левого полушария с захватом амигдало-гиппокампальных структур (рис. 4).

Анализ доминирующих видов пароксизмальной активности методом эквивалентных диполей показал, что изменение характера патологической активности, наблюдаемое на фоне проводимой терапии, сопровождалось сменой источников её генерации. На фоне болюсного введения диазепама уже на первых минутах заметно изменился характер пароксизмальной активности, что выражалось в значительной редукции медленноволновых пароксизмов и разрядов полиспайков. Анализ пароксизмальной активности отобранных отрезков ЭЭГ с цифровой фильтрацией в диапазоне частот 20–30 Гц показал снижение активности источников её генерации в лимбико-гипоталамических структурах и базальных ядрах левого полушария. Анализ пароксизмальной активности

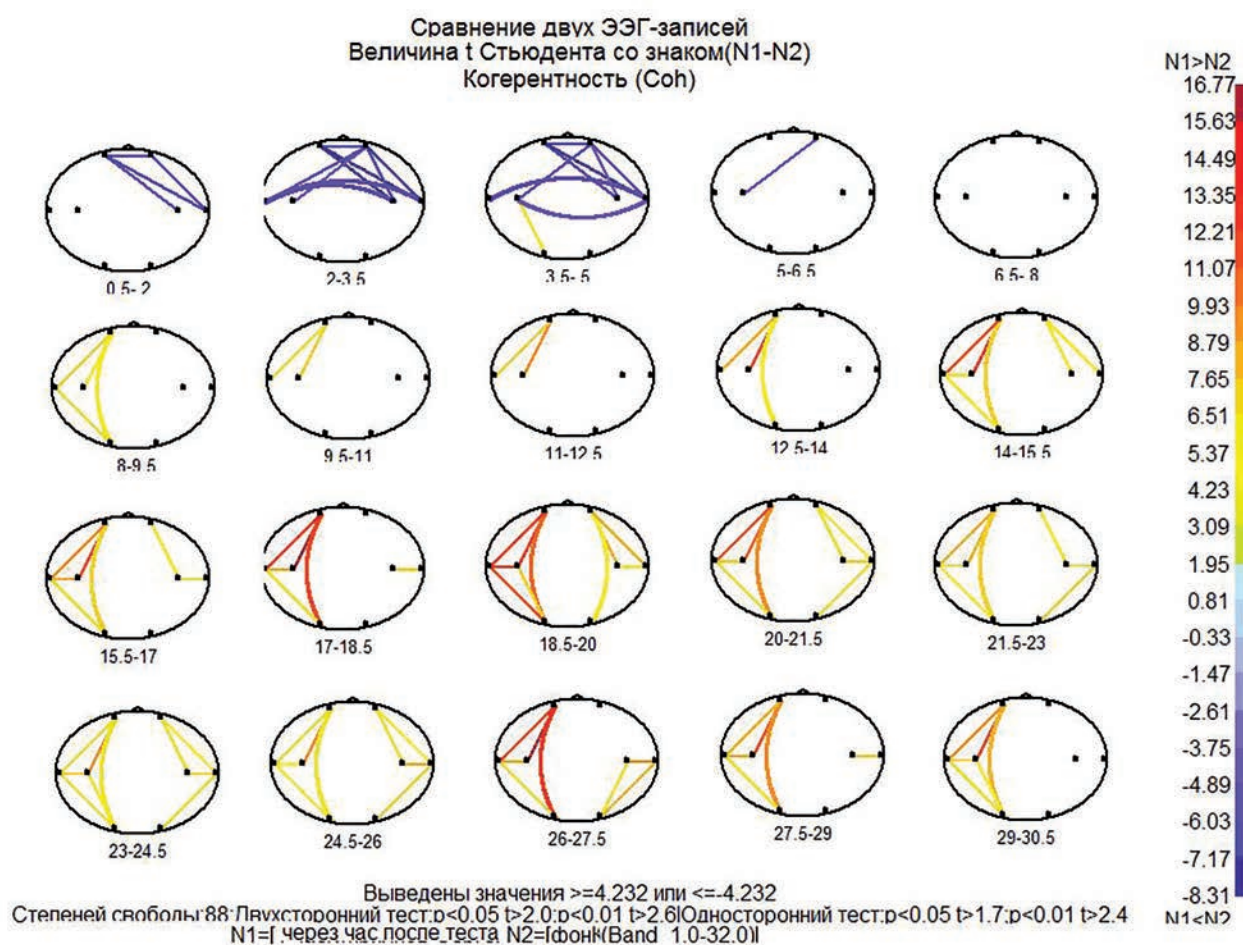


Рис. 3. Сравнение показателей КОГ двух ЭЭГ- записей (N1 – через час после введения диазепама, N2- фоновая запись). Выведены значения t-Стьюдента со знаком (N1 - N2) = 4,23 (достоверные различия при t-2)

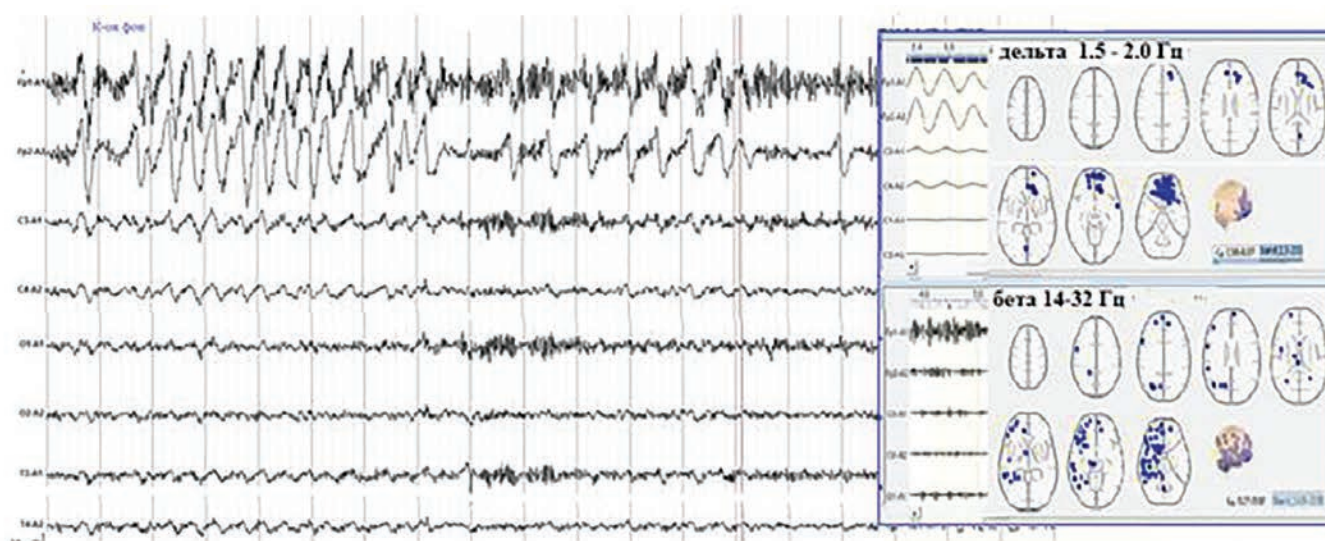


Рис. 4. ЭЭГ и трёхмерная локализация источников пароксизмальной дельта и бета-активности больного К-ва, (до проведения теста)

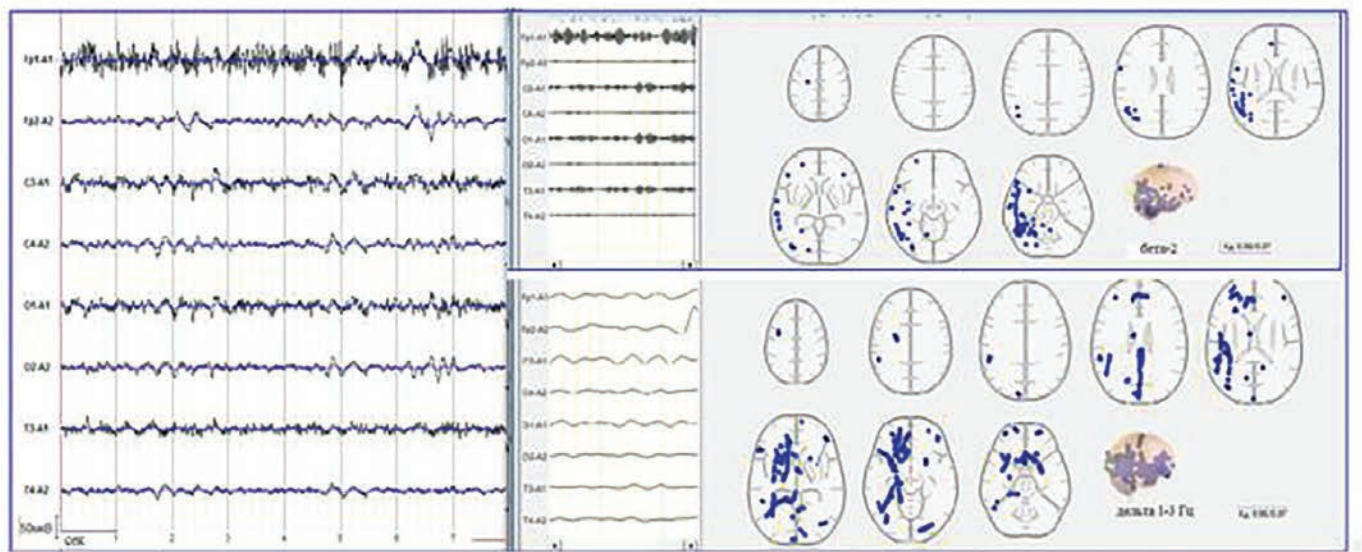


Рис. 5. ЭЭГ и трёхмерная локализация источников пароксизмальной бета- и дельта- активности больного К-ва, на фоне проведения теста

отобранных отрезков ЭЭГ с цифровой фильтрацией в диапазоне дельта-частот выявил смещение источников её генерации в область височных извилин левого полушария (рис. 5).

Обсуждение

ЭЭГ-активность является важным инструментом, который позволяет оценивать различные аспекты когнитивной остаточной функции, обнаруживать наличие сознания и установить способность общения пациента с внешним миром при отсутствии мышечных реакций. Введение новых компьютерных технологий для обработки ЭЭГ позволяет выявить высокоспецифичные ЭЭГ-паттерны у больных с разными вариантами критических состояний. В настоящее время для оценки пациентов с нарушениями сознания всё чаще используется математический анализ электроэнцефалограмм, и накопленные данные указывают на важность ЭЭГ при оценке степени повреждения головного мозга и прогноза восстановления сознания после тяжёлой черепно-мозговой травмы [11–18].

При нарушениях высших корковых функций возникают картины разрушения сбалансированных в норме межцентральных отношений. Показано [19], что в коматозных состояниях, особенно при неблагоприятном течении патологического процесса, уровень КОГ ЭЭГ глобально падает, происходит распад функциональных связей. В наших исследованиях на фоне проведения бензодиазепинового теста в диапазоне бета-активности отмечалось усиление средних и длинных внутривисочных связей в лобно-затылочных, височно-затылочных и лобно-височных парах левого полушария, что является признаком восстановления активности структур среднего мозга и

диэнцефальных структур, трёхмерная компьютерная локализация дипольных источников бета-активности выявила источник её генерации в лобно-височных областях левого полушария с захватом амигдалогиппокампальных структур, что в данном случае прогностировало благоприятный исход. Прогностическая точность для пациентов в вегетативном состоянии вызывает серьёзную этическую озабоченность, поскольку решения о лечении обычно включают в себя возможность отмены жизнеобеспечения.

Литература

1. Jennett B. Thirty years of the vegetative state: clinical, ethical and legal problems. *Prog Brain Res.* 2005;150:537–43.
2. Latronico N., Alongi S., Facchi E., Taricco M., Candiani A. Approach to the patient in vegetative state. Part III: prognosis. *Minerva Anestesiol.* 2000 Apr;66(4):241–8.
3. Laureys S., Owen A.M., Schiff N.D. Brain function in coma, vegetative state, and related disorders // *Lancet Neurol.* 2004, Sep; 3(9):537–6.
4. Overgaard M. How can we know if patients in coma, vegetative state or minimally conscious state are conscious? // *Prog Brain Res.* 2009; 177:11–9.
5. Hodel n-Tablada R. Minimally Conscious State: Evolution of Concept, Diagnosis and Treatment // *MEDICC Rev.* 2016, 43–46.
6. Kotchoubey B., Lang S., Mezger G., Schmalohr D., Schneek M., Semmler A., Bostanov V., Birbaumer N. Information processing in severe disorders of consciousness: vegetative state and minimally conscious state. *Clin. Neurophysiol.* 2005; 116(10): 2441–2453.
7. Kulkarni V.P., Lin K., Benbadis S.R. EEG findings in the persistent vegetative state. // *J Clin Neurophysiol.* 2007; 24(6):433–7.
8. Lehenbre R., Gosseries O., Lugo Z., Jedidi Z., Chatelle C., Sadzot B., Laureys S., Noirohonne Q. Electrophysiological investigations of brain function in coma, vegetative and minimally conscious patients *Arch Ital Biol.* 2012 Jun-Sep; 150(2-3): 122–39.
9. Кондратьев А.Н. Способ прогнозирования исходов лечения больных с персистирующим вегетативным состоянием / А.Н. Кондратьев, Т.Н. Фадеева, М.Л. Асланов, А.М. Малова // Патент на изобретение № 2214164, зарегистрирован в Государственном реестре изобретений РФ 20.10.03 г.
10. Кондратьева Е.А., Авдюнина И.А., Кондратьев А.Н., Улитин А.Ю., Иванова Н.Е., Петрова М.В., Лугинина Е.В., Гречко А.В. Определение признаков сознания и прогнозирование исхода у пациентов в вегета-

тивном состоянии. Вестник Российской Академии медицинских наук. 2016. №. 4. С. 273–280.

11. Гриндель О.М., Романова О.Н., Зайцев В.С., Воронов В.Г., Скорятина И.Г. Математический анализ электроэнцефалограмм в процессе восстановления сознания после тяжелой черепно-мозговой травмы. Ж. неврологии и психиатрии им. СС Корсакова 2006; 106:12: 47–51.

12. Шарова Е. В., Челяпина М.В., Коробкова Е.В., Куликов М.А., Зайцев О.С. ЭЭГ-корреляты восстановления сознания после тяжелой черепно-мозговой травмы. Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко. 2014; 78(1): 14–25.

13. Bagnato S., Boccagni C., Prestandrea C., Sant'Angelo A., Castiglione A., Galardi G. Prognostic value of standard EEG in traumatic and non-traumatic disorders of consciousness following coma. Clin Neurophysiol. 2010 Mar; 121(3): 274–80.

14. Schnakers C., Ledoux D., Majerus S., Damas P., Damas F., Lambermont B., Lamy M., Boly M., Vanhaudenhuyse A., Moonen G., Laureys S. Diagnostic and prognostic use of bispectral index in coma, vegetative state and related disorders Brain Inj. 2008.

15. Fingelkurts A.A., Fingelkurts A.A., Bagnato S., Boccagni C., Galardi G. EEG oscillatory states as neuro-phenomenology of consciousness as revealed

from patients in vegetative and minimally conscious states / Conscious Cogn.. 2012 Mar; 21(1): 149–69.

16. Fingelkurts A.A., Fingelkurts A.A., Bagnato S., Boccagni C., Galardi G. Life or death: prognostic value of a resting EEG with regards to survival in patients in vegetative and minimally conscious States./PLoS One. 2011; 6(10).

17. Kotchoubey B., Lang S., Mezger G., Schmalohr D., Schneck M., Semmler A., Bostanov V., Birbaumer N. Information processing in severe disorders of consciousness: vegetative state and minimally conscious state. Clin. Neurophysiol. 2005;116(10):2441–2453.

18. Lehenbre R., Gosseries O., Lugo Z., Jedidi Z., Chatelle C., Sadzot B., Laureys S., Noirhomme Q. Electrophysiological investigations of brain function in coma, vegetative and minimally conscious patients Arch Ital Biol. 2012 Jun-Sep; 150(2-3): 122–139.

19. Шарова Е.В. Электрографические корреляты реакций мозга на афферентные стимулы при посткоматозных бессознательных состояниях у больных с тяжелой черепно-мозговой травмой реакции. Журнал физиология человека 2005; 31: 3:5–15.

Регуляция формирования соединительной ткани при спайкообразовании блокаторами медленных кальциевых каналов

Скальский С.В.¹, Соколова Т.Ф.¹, Зырянов С.К.²

¹ – ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России, г. Омск

² – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», г. Москва

Резюме. Изучены фармакологические эффекты блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК): производных фенилалкиламина (верапамил), бензотиазепина (дилтиазем), дигидропиридина (нифедипин) в концентрации 0,1 мг/мл культуральной среды в регуляции формирования соединительной ткани при перитонеальном спайкообразовании. Эксперименты выполнены на 89 беспородных белых крысах массой тела 230–240 г на 10-е сутки после моделирования гемоперитонеума в первичной культуре перитонеальных фибробластов и макрофагов. Установлено, что развитие спаечного процесса в брюшной полости сопровождается чрезмерной пролиферативной активностью исследованных клеток с усилением синтеза белковосвязанного оксипролина и гиалуроновой кислоты, провоспалительных цитокинов: TNF- α и IL-1. Верапамил (0,1 мг/мл) подавлял пролиферацию фибробластов, препятствовал трансформации моноцитов в макрофаги, снижал избыточную продукцию оксипролина и гиалуроновой кислоты, уменьшал синтез провоспалительных цитокинов. Дилтиазем (0,1 мг/мл) оказывал нормализующий эффект на функциональную активность перитонеальных фибробластов и макрофагов, избыточную продукцию компонентов межклеточного матрикса и цитокинов, однако эффект был менее значим (в среднем на 35,5 %, $p < 0,05$), чем у верапамила. У нифедипина (0,1 мг/мл) данный эффект отсутствовал.

Ключевые слова: верапамил, дилтиазем, нифедипин, фибробласты, макрофаги, оксипролин, гиалуроновая кислота, цитокины

Regulation of connective tissue development by calcium channel blocking agents in adhesion process

Skalskii S.V.¹, Sokolova T.F.¹, Zyryanov S.K.²

¹ – Omsk State Medical University, Ministry of Public Health, Russia

² – Peoples' Friendship University of Russia, Moscow

Resume. It has been studied the pharmacological effects of calcium channel blocking agents (CCBA), the derivatives of phenylalkilamin (verapamil), benzothiazepine (diltiazem), dihydropyridine (nifedipine) at a concentration of 0,1 mg/ml of the culture medium in the regulation of connective tissues development in the process of peritoneal adhesion. The experiments were carried out on 89 non-native white rats weighing 230–240 g on the 10th day after hemoperitoneum simulation in the primary culture of peritoneal fibroblasts and macrophages. It was specified that the development of peritoneal adhesion was accompanied by excessive proliferative activity of the cells studied with the enhancement of the synthesis of protein-bound oxyproline and hyaluronic acid, the pro-inflammatory cytokines, such as TNF- α and IL-1. Verapamil (0,1 mg/ml) suppressed the proliferation of fibroblasts, prevented the transformation of monocytes into macrophages, reduced the excess production of hydroxyproline and hyaluronic acid, and reduced the synthesis of pro-inflammatory cytokines. Diltiazem (0,1 mg/ml) had a normalizing effect on the functional activity of peritoneal fibroblasts and macrophages, the excess production of the intercellular matrix and cytokines, but the effect was less significant (on average 35,5 %, $p < 0,05$) than in application of verapamil. In using of nifedipine (0,1 mg / ml) this effect was not detected.

Keywords: verapamil, diltiazem, nifedipine, fibroblasts, macrophages, hydroxyproline, hyaluronic acid, cytokines

Автор, ответственный за переписку:

Скальский Сергей Викторович – к.м.н., доцент, заведующий кафедрой фармакологии с курсом клинической фармакологии ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России; 644048, г. Омск, ул. В.с. Иванова, д. 15, корп. 1, кв. 32; тел. +7 (913) 601-22-11; e-mail: sergscalskiy@mail.ru

Введение

До 90 % пациентов, перенёсших большие полостные хирургические операции и, в частности, от 55 до 100 % женщин после гинекологических операций имеют ту или иную степень спаечного процесса, а большинство применяемых в настоящее время способов профилактики спайкообразования недостаточно эффективны [1, 2]. В этой связи большой интерес представляет использование лекарственных средств, способных действовать на патогенетические звенья спаечного процесса и прежде всего на основные клетки соединительной ткани — фибробласты и клетки их микроокружения.

В последние годы появились сообщения о действии блокаторов медленных кальциевых каналов (БМКК) на функциональную активность фибробластов и макрофагов, сопровождающуюся уменьшением образования послеоперационных эпидуральных и внутрисуставных спаек, келоидных и гипертрофических рубцов [3–5]. Однако сведений по предотвращению БМКК избыточного образования соединительной ткани в брюшной полости при асептическом воспалении брюшины практически нет. Более того, БМКК — большая и достаточно неоднородная по химической структуре группа лекарственных средств, включающая высокоспецифичные в отношении медленных кальциевых каналов

(производные фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина) и неспецифичные (производные прениламина, дифенилпиперазины и др.) препараты. Уместно предположить, что БМКК разных групп, даже в одной и той же дозе, обладают различной активностью в отношении регуляции соединительной ткани. В связи с этим возникает необходимость выявления не описанного ранее фармакологического действия у известных, зарекомендовавших себя в кардиологической практике БМКК: производных фенилалкиламина, бензотиазепина, дигидропиридина на функции перитонеальных фибробластов и активность клеток микроокружения. Изучение действия фармакологических веществ непосредственно на клетки, исключаяющее влияние более сложных каскадов реакций на уровне организма, целесообразно проводить культуральным методом. Тестирование лекарственных средств на клеточных культурах, согласно Российскому законодательству и международным нормам биоэтики, является наиболее прогрессивным и этичным методом доклинических испытаний на живых системах [6].

Целью работы явилось исследование влияния БМКК верапамила, дилтиазема и нифедипина на морфофункциональные состояния фибробластов и макрофагов в культуре перитонеальных клеток крыс, перенесших гемоперитонеум.

Материалы и методы

Опыты проводились в первичной культуре перитонеальных фибробластов, инкубируемых совместно с макрофагами. Исследовали перитонеальные клетки 89 беспородных белых крыс с массой тела 230–240 г из питомника Института цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск), которым путём введения в брюшную полость аутокрови моделировали спаечный процесс [7]. Опыты проводили в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.77 и № 701 от 27.07.78 об обеспечении принципов гуманного обращения с экспериментальными животными. На 10-е сутки гемоперитонеума для извлечения клеток перитонеальную полость забитых животных дважды промывали 10 мл среды RPMI-1640, содержащей 250 ЕД гепарина, 100 ЕД/мл пенициллина, 100 ЕД/мл стрептомицина. Образцы перитонеальных смывов центрифугировали при 800 об/мин в течение 10 мин для осаждения клеточных элементов, которые затем трижды отмывали средой RPMI-1640 («Sigma») с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 % глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 ЕД/мл стрептомицина. Клеточные суспензии, содержащие 90–95 % живых клеток, эксплантировали в чашки Петри диаметром 40 мм с покровными стеклами, обработанными поли-D-лизином, в 5 мл полной ростовой среды вышеуказанного состава по 2×10^6 ядросодержащих клеток на мл среды. Проведено 2 серии экспериментов. В 1-й серии в культуре исследовали активированные *in vivo*,

при моделировании гемоперитонеума, фибробласты и макрофаги (основная группа) и неактивированные перитонеальные клетки, забранные у интактных крыс (группа сравнения). Во 2-й серии исследовали влияние БМКК на культуру активированных фибробластов и клеток их микроокружения. Клеточные культуры 2-й серии были разделены на 3 пула клеток, составлявших исследовательские группы. К культуре клеток 1-й группы добавляли верапамил (0,1 мг/мл), 2-й группы — дилтиазем (0,1 мг/мл), 3-й группы — нифедипин (0,1 мг/мл). В эксперименте использовали раствор верапамила 0,25 % концентрации в ампулах по 2 мл производства ОАО «Биосинтез», г. Пенза, Россия; раствор дилтиазема (Diltiazem Hydrochloride Injection) производства компании Hospira во флаконах по 10 мл в концентрации 5 мг/мл; раствор нифедипина (Адалат) производства компании Bayer, Германия, во флаконах по 50 мл в концентрации 100 мкг/мл). Контролем служила культура активированных фибробластов и макрофагов без добавления в ростовую среду лекарственных средств (основная группа 1-й серии экспериментов). После внесения в чашки Петри суспензии клеток и добавления БМКК в ростовую среду, чашки помещали в CO₂-инкубатор на 24 ч ($t - 37^\circ\text{C}$, 5 % CO₂). По окончании культивирования среду сливали, центрифугировали (1 500 об/мин, 10 мин), в супернатантах определяли количество оксипролина и гиалуроновой кислоты, цитокинов: фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) и интерлейкина-1 β (IL-1). Покровные стекла окрашивали по Романовскому–Гимза. Микроскопию проводили с помощью бинокулярного светового микроскопа «Zeiss» (Германия) при иммерсионном увеличении $\times 1\,000$. Пролиферативную активность фибробластов оценивали по количеству клеток с морфологическими признаками митозов путём определения митотического индекса (МИ). Исследование макрофагальной трансформации моноцитов проводили по Т.А. Демченко [8]. Содержание цитокинов TNF- α , IL-1 β в культуральной жидкости определяли методом твёрдофазного иммуноферментного анализа с использованием реактивов фирмы «Иммунотех» (Франция) на планшеточном фотометре «Multiscan» (Финляндия). Основную коллагенсинтетическую функцию фибробластов оценивали по наличию в культуральной среде оксипролина — маркера коллагена. Содержание свободного, суммарного оксипролина и белковосвязанного оксипролина определяли по П.Н. Шараеву [9]. Степень стимуляции коллагеногенеза фибробластами в культуре клеток оценивали по количеству белковосвязанного оксипролина. О синтезе гликозаминогликанов фибробластами судили по количеству гиалуроновой кислоты в культуральной жидкости, которую определяли по П.Н. Шараеву с соавт. [10]. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программы Microsoft Excel и Statistica 6,0 для Windows. Анализ характера распределения полученных данных осуществляли по критерию Шапиро–Уилка. Определя-

лись средняя арифметическая величина (M) и ошибка средней (m). Достоверность различий выявляли по критерию Стьюдента. Критический уровень значимости был принят на уровне $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Морфологические и функциональные характеристики перитонеальных фибробластов и макрофагов в культуре клеток представлены в табл. 1. Выявлено, что в культуре клеток, полученной от интактных крыс группы сравнения, пролиферативная активность фибробластов через 24 ч культивирования была низкой. У фибробластов, полученных от крыс основной группы, через 10 сут после моделирования гемоперитонеума, активность митотического процесса в культуре клеток была высокой, она в 5,3 раза ($p < 0,05$) превышала показатели в группе сравнения. При изучении коллагеносинтетической функции фибробластов выявлено, что в основной группе наблюдалось стимулирование образования белковосвязанного оксипролина. Установлено повышение уровня синтеза оксипролина активированными фибробластами основной группы в 4,2 раза по отношению к группе сравнения ($p < 0,05$). Анализ гиалуроновой кислоты — одного из основных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани, также выявил увеличение её содержания в супернатантах клеточных культур активированных фибробластов. Отмечено 3-кратное увеличение синтеза гиалуроновой кислоты в культуре активированных клеток крыс основной группы ($p < 0,05$).

Исследование клеток микроокружения (моноцитов и макрофагов) перитонеальных фибробластов выявило, что моноциты, полученные от крыс на 10-е сутки гемоперитонеума, демонстрировали в культуре высокую способность к трансформации в макрофаги (см. табл. 1). В течение 24 ч культивирования $60,5 \pm 3,1$ % из них дифференцировались в макрофаги, что в 2,5 раза превышало показатели группы сравнения. Следствием активации макрофагов при моделировании асептического воспаления брюшины является усиленная секреция ими цитокинов, прежде всего провоспалительного характера: TNF- α и IL-1. Наи-

более выраженные отклонения регистрировались при определении количества TNF- α , которое превышало контрольные значения в 19 раз (табл. 1). Это согласуется с имеющимися данными о биологических свойствах данного цитокина, о его участии в процессах деструкции и репарации, сопутствующих воспалению, способности TNF- α индуцировать пролиферацию фибробластов и синтез коллагена при активации фиброгенеза на этапах завершения воспаления [11, 12]. Известно, что высокая концентрация TNF- α влечёт за собой хроническое воспаление, способствует неблагоприятному течению патологического процесса и является ключевым фактором в развитии спаечной болезни [13]. Наряду с усилением выработки TNF- α , в культуре клеток основной группы наблюдалось изменение уровня IL-1, которое достигало 3,6-кратного увеличения по сравнению с группой сравнения (см. табл. 1). Известно, что IL-1 индуцирует пролиферацию фибробластов и такие изменения их функционирования способствуют развитию фиброза [14]. Под влиянием IL-1 усиливается формирование рубцов, связанное с повышенным образованием соединительной ткани [15].

Исследования, проведённые во 2-й серии экспериментов по определению влияния БМКК (верапамила, дилтиазема, нифедипина) на культуру активированных фибробластов и макрофагов, выявили, что добавление верапамила к культуре клеток (1-я группа) в концентрации 0,1 мг/мл предотвращало чрезмерную активацию фибробластов и клеток моноцитарно-макрофагального ряда (табл. 2). В присутствии верапамила количество оксипролина и гиалуроновой кислоты в культуральной среде через 24 ч инкубации также было ниже (1-я группа), чем в контроле. Исследование уровней TNF- α и IL-1 выявило, что введение в культуру клеток верапамила предотвращало повышение наработки данных цитокинов (см. табл. 2).

Выявление наличия фармакологического эффекта у дилтиазема в концентрации 0,1 мг/мл в отношении перитонеальных фибробластов и макрофагов, оценка его выраженности по сравнению с верапамилем показали, что дилтиазем, хотя и снижает чрезмерную функциональную активность данных клеток соединительной ткани, но его нормализующее действие менее выраже-

Таблица 1

Морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов и макрофагов ($M \pm m$)

Показатели	Группы	
	основная	сравнения
МИ фибробластов, %	$12,3 \pm 0,4^*$	$2,3 \pm 0,2$
Оксипролин, мкмоль/л	$26,7 \pm 1,7^*$	$6,5 \pm 0,4$
Гиалуроновая кислота, ммоль/л	$1,6 \pm 0,12^*$	$0,5 \pm 0,03$
МТМ, %	$60,5 \pm 3,1^*$	$24,1 \pm 5,2$
TNF- α , пг/мл	$321,3 \pm 21,1^*$	$17,1 \pm 1,8$
IL-1, пг/мл	$54,4 \pm 4,2^*$	$14,9 \pm 2,1$

Примечание: * — достоверность различий между группами, $p < 0,05$

Таблица 2

Влияние БМКК на морфофункциональные показатели перитонеальных фибробластов и макрофагов ($M \pm m$)

Показатели	Верапамил	Дилтиазем	Нифедипин
МИ фибробластов, %	$5,1 \pm 0,1^*$	$9,4 \pm 0,3^*$	$11,5 \pm 0,3$
Оксипролин, мкмоль/л	$8,9 \pm 0,2^*$	$14,3 \pm 1,1^*$	$23,1 \pm 0,5$
Гиалурионовая кислота, ммоль/л	$0,98 \pm 0,05^*$	$1,28 \pm 0,06^*$	$1,48 \pm 0,08$
МТМ, %	$36,2 \pm 2,6^*$	$47,3 \pm 2,9^*$	$56,1 \pm 3,4$
TNF- α , пг/мл	$97,4 \pm 6,8^*$	$198,1 \pm 10,1^*$	$271,2 \pm 14,2$
IL-1, пг/мл	$27,1 \pm 2,6^*$	$39,8 \pm 2,3^*$	$47,4 \pm 3,9$

Примечание: * – достоверность различий между 1-й группой (верапамил), 2-й группой (дилтиазем), 3-й группой (нифедипин) и контролем (основная группа, табл. 1), $p < 0,05$.

но, чем у верапамила (см. табл. 2). Добавление к культуральной среде дилтиазема в концентрации 0,1 мг/мл приводило к статистически значимому в сравнении с контролем снижению уровней митозов фибробластов, макрофагальной трансформации моноцитов, коллагена и гиалурионовой кислоты, TNF- α и IL-1 ($p < 0,05$). Нифедипин в концентрации 0,1 мг/мл не оказывал действия на культуру активированных фибробластов и макрофагов, не влиял на количество оксипролина и гиалурионовой кислоты, уровни TNF- α и IL-1. Различия между группами с нифедипином (3-я группа) и контролем были статистически недостоверны (см. табл. 2).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов выявлено, что при развитии спаечного процесса в брюшной полости через 10 дней после моделирования гемоперитонеума наблюдалась чрезмерная активация перитонеальных фибробластов и усиление функциональной активности клеток микроокружения – макрофагов при совместном их культивировании *in vitro*. Активация фибробластов реализовалась 5,3-кратным увеличением митотической активности клеток ($p < 0,05$) и синтеза ими основных компонентов межклеточного матрикса соединительной ткани: 4,2-кратным повышением уровня оксипролина ($p < 0,05$) и 3-кратным – гиалурионовой кислоты ($p < 0,05$). Избыточная активность макрофагов проявлялась 2,5-кратным ростом макрофагальной трансформации моноцитов ($p < 0,05$), 19-кратным увеличением количества TNF- α ($p < 0,05$), 3,6-кратным – IL-1 ($p < 0,05$).

Исследование не описанного ранее фармакологического действия БМКК на клетки соединительной ткани показало, что верапамил и дилтиазем оказывали различное нормализующее влияние на усиленную асептическим воспалением брюшины пролиферативную активность и основную синтезирующую функцию фибробластов и макрофагов. Наиболее выраженный модулирующий эффект на культуру клеток оказывал верапамил в концентрации 0,1 мг/мл. Выявленные фармакологические эффекты верапамила в отношении перитонеальных фибробластов реализовались прямым угнетением пролиферативной и синтетической активности последних, а также моделированием функциональной активности их микроокружения, прежде

всего клеток системы мононуклеарных фагоцитов. В культурах фибробластов и макрофагов, инкубируемых с верапамилем, активность митотического процесса уменьшалась более значимо, чем с дилтиаземом. Синтез белковосвязанного оксипролина, гиалурионовой кислоты, TNF- α и IL-1 в культуре активированных клеток при действии верапамила также был ближе к показателям в культуре клеток интактных крыс, чем при действии дилтиазема. Результаты исследований *in vitro* позволяют утверждать, что присутствие в инкубационной среде таких БМКК, как верапамил и дилтиазем, оказывают дозозависимое влияние на морфофункциональные характеристики перитонеальных клеток в культуре, течение процессов пролиферации и синтеза компонентов межклеточного матрикса, провоспалительных цитокинов. У нифедипина эффекта влияния на клетки соединительной ткани (чрезмерную пролиферативную и синтетическую активность перитонеальных фибробластов и макрофагов) выявить не удалось. Различия между изученными показателями в культурах клеток с добавлением нифедипина и без него были статистически недостоверны.

Выводы

1. Моделирование гемоперитонеума вызывает повышение (в среднем 6-кратное) пролиферативной активности фибробластов в культуре, их коллаген-синтетической функции, продукции ими гиалурионовой кислоты, усиливает функциональную активность макрофагов, увеличивая темпы их трансформации из моноцитов, синтез провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1.

2. Верапамил (0,1 мг/мл) в культуре клеток тормозит чрезмерную при гемоперитонеуме митотическую активность перитонеальных фибробластов и макрофагальную трансформацию моноцитов, снижает избыточную продукцию оксипролина и гиалурионовой кислоты, уменьшает синтез провоспалительных цитокинов TNF- α и IL-1.

3. Дилтиазем (0,1 мг/мл) оказывает менее значимый (в среднем на 35,5 %, $p < 0,05$), чем верапамил, нормализующий эффект на функциональные показатели фибробластов и макрофагов в культуре.

4. У нифедипина (0,1 мг/мл) эффект влияния на клетки соединительной ткани в культуре на этапе пролиферации и завершения процесса воспаления при гемоперитонеуме отсутствует. Нифедипин не тормозит

чрезмерную митотическую и коллагенсинтетическую активность перитонеальных фибробластов, не обеспечивает ограничение макрофагальной трансформации моноцитов, избыточной продукции TNF- α , IL-1.

Литература

1. Дронов А.И., Задорожная К.О., Дронова В.Л. и соавт. Патогенез, осложнения и контроль перитонеального спаечного процесса в гинекологии и хирургии. Хирургия. Восточная Европа 2015; 2 (14): 124–129.
2. Robertson D., Lefebvre G. Adhesion Prevention in Gynaecological Surgery. Clinical Practice Guideline. JOGC 2010; 32: 6: 598–602.
3. Li Y., Ma X Yu P. et al. Intra-articular adhesion reduction after knee surgery in rabbits by calcium channel blockers. Med Sci Monit. 2014; 20: 2466–2471.
4. Wang R., Mao Y., Zhang Z. et al. Role of verapamil in preventing and treating hypertrophic scars and keloids. Int Wound J. 2015; doi: 10.1111/iwj.12455.
5. Wang Z., Wang Y., Xie P. et al. Calcium channel blockers in reduction of epidural fibrosis and dural adhesions in laminectomy rats. Eur J Orthop Surg Traumatol. 2014; 24: 1: 293–298.
6. Волова Л.Т. Биологическая система оценки качества биоимплантатов с помощью клеточных технологий. Успехи современного естествознания. 2008; 5: 86–87.
7. Скальский С.В., Шамрай Г.А., Долгих Т.И. и соавт. Экспериментальная модель перитонеального спайкообразования. Бюл. эксперим. биологии и медицины. 2007; 10: 19–20.
8. Демченко Т.А. Определение феномена макрофагальной трансформации мононуклеарных клеток в культуре лейкоцитов крови для оценки иммунологического состояния организма. Методические рекомендации. Л.: Ленуприздат, 1980; 14.
9. Шараев П.Н. Метод определения свободного и связанного оксипролина в сыворотке крови. Лабораторное дело 1990; 5: 283–285.
10. Шараев П.Н., Стрелков Н.С., Гунчев В.В. Определение гиалуронидазной активности в биологических жидкостях. Клин. лаб. диагностика. 1996; 3: 21–22.
11. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. Санкт-Петербург: Фолиант. 2008; 549.
12. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека. Медицинский академический журнал. 2013; 3: 18–41.
13. Филленко Б.П., Земляной В.П., Борсак И.И. и соавт. Спаечная болезнь: профилактика и лечение, С-П.: 2013: 171.
14. Симбирцев А.С. Интерлейкин-1. Физиология. Патология. Клиника. Санкт-Петербург: Фолиант, 2011: 480с.
15. Пигарева Н.В., Королькова Т.Н., Симбирцев А.С. и соавт. Уровень цитокинов у пациентов с рубцами после акне. Эксперим. и клиническая дерматокосметология. 2011; 3: 3–6.

Белоусову Юрию Борисовичу

к 75-летию со дня рождения
От редакции

Юрий Борисович Белоусов родился 23 сентября 1942 г. в Москве, в семье служащих. В 1959 году он поступил во 2-й Московский государственный медицинский институт им. Н.И. Пирогова (2-й МГМИ) на лечебное отделение. С этого года и до последнего дня вся его жизнь была связана с этим институтом.

В 1965 году, после государственных выпускных экзаменов, *Юрий Белоусов* получив диплом врача-лечебника, сдаёт кандидатский минимум в целевую ординатуру, но вместо неё, берёт распределение на работу в качестве главного врача Ильинской участковой больницы Кольчугинского района Владимирской области. «Поеду работать в деревню, там больше всего нужны руки и знания врача» — говорил он.

В августе 1967 года *Юрий Борисович* передал больницу новому доктору, и вернулся в Москву, в аспирантуру, на кафедру госпитальной терапии 2-й МОЛГМИ, которой руководил в то время известный кардиолог, видный клиницист широкого профиля, академик АМН СССР, профессор Павел Евгеньевич Лукомский. Основным направлением научной работы аспиранта, ассистента и доцента *Юрия Борисовича Белоусова* было изучение гемостаза, свёртывания крови и тромбообразования при сердечно-сосудистых заболеваниях, в том числе, возможности их коррекции с помощью антитромботических средств, поэтому его имя тесно связано со становлением и развитием современной кардиологии в нашей стране.

В 1971 году *Юрий Борисович* успешно защитил кандидатскую диссертацию на тему «Функциональные свойства тромбоцитов при инфаркте миокарда». После защиты кандидатской диссертации его зачислили на должность ассистента кафедры, а затем доцента.

В 1976 г. вместе с проф. Люсовым В.А., Бокаревым И. им был обобщён опыт лечения больных с тромбозами и геморрагиями в книге «Лечение



тромбозов и геморрагий в клинике внутренних болезней», и даны представления о механизме нарушения гемостаза при наиболее часто встречающихся заболеваниях в клинике внутренних болезней (инфаркта миокарда, тромбоэмболии лёгочной артерии и её ветвей, болезни почек и других). В книге подробно описаны механизм действия и тактика применения основных фармакологических средств, растворяющих тромбы и снижающих или повышающих свёртываемость крови; приведены конкретные показания и противопоказания к применению средств, активно влияющих на свёртываемость крови. Описаны методы контроля за лечением и тактика борьбы с осложнениями.

В 1983 году *Юрий Борисович Белоусов* обобщил большой цикл своих научных исследований в докторской диссертации «Клинико-патогенетические аспекты диссеминированной внутрисосудистой коагуляции при ишемической болезни сердца и недостаточности кровообращения».

Юрий Борисович одним из первых в стране использовал сегодня уже известные антитромботические (стрептокиназа и урокиназа, антиагреганты — аспирин, пентоксифиллин) и гемостатические средства. За цикл работ в этой области он неоднократно награждался дипломами и медалями 2-го МОЛГМИ и ВДНХ.

Эти работы сразу выдвинули молодого учёного в ряд видных клиницистов, занимающихся исследованиями лекарственных средств. Однако *Юрий Борисович* вышел далеко за рамки признанного специалиста кардиолога-коагулолога. В последние три десятилетия его научная деятельность была ориентирована на изучение клинической фармакологии лекарственных средств, применяемых для лечения различных заболеваний.

В 1984 году он организовал первую в СССР кафедру клинической фармакологии лечебного и педиатрического факультетов 2-го МОЛГМИ

им. Н.И. Пирогова, которой и руководил до 2016 года, а затем был избран её почетным профессором. А в 1987 году *Юрий Борисович* открыл при кафедре первые в стране курсы усовершенствования врачей по клинической фармакологии и фармакокинетики на факультете усовершенствования врачей. За время его руководства последипломную подготовку на кафедре прошли более 4000 врачей, 200 ординаторов и аспирантов.

В это же время *Юрий Борисович* и его кафедральный коллектив стали принимать активное участие в клинических испытаниях лекарственных средств, включая международные исследования. Во многом благодаря именно его активности был внесён существенный вклад в столь широкое привлечение российских лечебных учреждений к крупнейшим интернациональным проектам в этой области, ставшими вехами в прогрессе медикаментозного лечения важнейших заболеваний.

Как клинический фармаколог он руководил работами по изучению антибиотиков, широкого спектра препаратов для лечения лёгочных, гастроэнтерологических, неврологических заболеваний, артериальной гипертонии, сердечной недостаточности.

Преподавание новой для России специальности — «клиническая фармакология», научная и практическая деятельность в этой области требовали большой организационной работы: создания программ, различных методических материалов, освоения и внедрения специфических методов исследования.

Он автор более 500 научных работ, в том числе первого в стране учебника и руководства для врачей по клинической фармакологии. Такие издания как «Клиническая фармакология», «Клиническая фармакология и фармакотерапия», «Национальное руководство по клинической фармакологии», «Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии. Руководство для практикующих врачей», «Клиническая фармакокинетика. Практика дозирования лекарств» выдержали несколько переизданий, на них учились и продолжают учиться десятки тысяч врачей.

Помимо того, им были выпущены следующие монографии: «Клиническая фармакология болезней органов дыхания», серия «Атлас лекарственных средств» для педиатра, гастроэнтеролога, терапевта, уролога.

Следует отдельно отметить, что, являясь одним из лидеров клинической фармакологии в стране, *Юрий Борисович* многое сделал для формирования системы организации проведения клинических исследований лекарственных средств. Для привле-

чения внимания и разрешения этических проблем проведения клинических испытаний под его руководством были разработаны и изданы учебные пособия и руководства: «Планирование и проведение клинических исследований лекарственных средств» (2000 г.), «Клинический проектный менеджмент» (2003 г.), «Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации» (2005 г.).

Юрием Борисовичем были организованы циклы тематического усовершенствования: «Клиническая фармакология в клинике внутренних болезней», «Клиническая фармакология в кардиологии», «Клиническая фармакокинетика», «Организация и проведение клинических исследований лекарственных средств», «Фармакоэкономика», «Фармаконадзор» и, наконец, «Клиническая фармакология в педиатрии». Последний цикл хотелось бы выделить отдельно, так как именно организация преподавания клинической фармакологии на педиатрическом факультете является особым вкладом *Юрия Борисовича* в становление и развитие дисциплины в России.

Кроме того, он разработал фармакокинетические и фармакодинамические подходы к применению пролонгированных теофиллинов при муковисцидозе и бронхиальной астме. Впервые выявлена дисфункция пуриновых и стероидных рецепторов при бронхиальной астме и возможность их коррекции препаратами теофиллина. Учёный впервые показал благоприятное воздействие антагонистов кальция на функцию серотониновых рецепторов у больных с артериальной гипертензией.

Под руководством *Юрия Борисовича* успешно проводились изучение сравнительной эффективности и безопасности современных средств: антагонистов кальция, β -блокаторов, ингибиторов ангиотензин-превращающего фермента, которые впоследствии успешно внедрялись в клиническую практику.

Областью научных поисков *Белоусова* также являлось проведение клинко-фармакологических исследований сравнительной оценки эффективности новых лекарственных средств (сердечно-сосудистых, бронхолитических, противоязвенных, антибактериальных) у детей и взрослых.

В 90-е годы им на кафедре была создана лаборатория фармакокинетических исследований, где в течение многих лет проводилось изучение биоэквивалентности лекарственных средств, а также терапевтический лекарственный мониторинг у детей и взрослых, который имеет важное практическое значение для индивидуализации и повышения качества фармакотерапии. Кроме того, в сферу его



научных интересов входили оценка безопасности использования лекарственных препаратов в популяции, фармакоэкономические и фармакоэпидемиологические исследования.

Юрий Борисович внёс существенный вклад в подготовку терапевтических и педиатрических кадров. Под его руководством были защищены 38 кандидатские и 6 докторские диссертации. Обладая огромным практическим опытом и зная новейшие достижения медицинской науки, он щедро передавал их студентам, клиническим ординаторам, аспирантам, сотрудникам кафедры и Университета.

Юрий Борисович активно сочетал научную работу с общественной: он был главным клиническим фармакологом Росздравнадзора РФ, заместителем председателя Фармакологического комитета МЗ РФ, председателем Межведомственного совета по антибиотической политике при МЗ РФ, председатель Комиссии по клинической фармакологии и клинической эпидемиологии Формулярного комитета РАМН, член рабочей группы по законодательству в области лекарственного обеспечения Государственной думы РФ.

По его инициативе были созданы многие российские общественные организации:

Межрегиональное общественное объединение «Общество клинических фармакологов и фармакотерапевтов» (вице-президент);

Межрегиональная общественная организация «Общество фармакоэкономических исследований» (вице-президент);

Национальная ассоциация по борьбе с инсультом (вице-президент);

Национальное общество по атеротромбозу (генеральный директор);

Российское общество клинических исследователей (президент).

Юрий Борисович был одним из основателей Российского национального конгресса «Человек и Лекарство», организатор, руководитель научной программы и бессменный вице-президент конгрессов I–XXI созывов.

Большой вклад внёс *Юрий Борисович* в укрепление и развитие отечественной внутренней медицины и как президент Российского научного медицинского общества терапевтов, и как инициатор возобновления, а также один из активнейших основателей Национального конгресса терапевтов.

Обширной была и сфера его редакторской деятельности. С 1998 года *Юрий Борисович* являлся членом Научно-редакционного совета системы справочников «Регистр лекарственных средств России®», а в 2000 году он возглавил совет экспертов редакционно-издательского комитета по разработке и созданию «Федерального руководства по использованию лекарственных средств (формулярная система)», которые в настоящее время ежегодно обновляются. *Ю.Б. Белоусов* являлся заместителем главного редактора переводного русского издания «Фармакопея США — Национальный формуляр» (USP); под его руководством вышли в свет 6 выпусков. *Юрий Борисович* был председателем редакционного совета серии руководств для врачей «Рациональная фармакотерапия», являлся главным редактором ряда рецензируемых медицинских журналов: «Качественная клиническая практика»;

«Фарматека»; «Архив внутренней медицины», а также был членом редколлегий многих журналов: «Ремедиум»; «Атеротромбоз»; «Фармакокинетика и фармакодинамика»; «Фармакогенетика и фармакогеномика»; «Клиническая эпидемиология»; «Клиническая фармакология и терапия»; «Антибиотики и химиотерапия»; «Терапия»; «Системные гипертензии»; «Педиатрическая фармакология»; «Проблемы женского здоровья» и ещё нескольких авторитетных журналов.

Юрий Борисович по праву считается основоположником клинической фармакологии в РФ, заслужено пользовался авторитетом среди клиницистов и специалистов фармотрасли в нашей стране и за рубежом. Он неоднократно принимал участие в работе всесоюзных, российских и международных конгрессов по фармакологии и клинической фармакологии, кардиологии, пульмонологии и гастроэнтерологии.

Юрий Борисович предъявлял высокие требования к себе и сотрудникам, был принципиальным и самокритичным, пользовался заслуженным авторитетом и уважением коллег по работе. Благодаря высочайшему профессионализму, пунктуальности и постоянному стремлению помочь больному он снискал исключительное уважение и большую любовь сотрудников РНИМУ и больных.

Юрий Борисович Белоусов войдёт в историю российской медицины как кардиолог и коагулолог, один из пионеров отечественной клинической фармакологии, крупный и успешный организатор, талантливый редактор и общественный деятель. Занимая многочисленные посты, он не снижал требовательности к себе и тем, кто работал с ним в этих учреждениях, казалось, что именно эта сфера его деятельности является главной.

Высокие профессиональные качества учёного, врача, педагога, неизменная доброжелательность и открытость всегда привлекали к нему самых разных людей. *Юрий Борисович* помог очень многим в трудных жизненных ситуациях, нет человека, который обратился бы к нему и кому он бы отказал в помощи. Эти свойства, а также поразительная работоспособность были и останутся примером для его учеников, сотрудников и соратников.

23 сентября 2017 г. исполнилось бы 75 лет член-корреспонденту РАН, профессору, доктору медицинских наук *Юрию Борисовичу Белоусову*, однако 11 апреля 2017 года он ушёл из жизни.

Редколлегия журнала
«Фармакокинетика и фармакодинамика»



Учебное пособие «Управление клиническими исследованиями» описывает методологию эффективного управления проектом по изысканию, разработке и выводу на фармацевтический рынок лекарственных средств, начиная с этапа поиска перспективных химических соединений, проведения доклинических испытаний веществ—кандидатов, клинических исследований лекарств—кандидатов, фармаконадзора, управления данными, анализа полученных данных, составления окончательного отчёта об исследовании, получения регистрационного удостоверения, публикации результатов, заканчивая организацией пострегистрационных исследований безопасности, проведением неинтервенционных и фармакоэпидемиологических исследований, а также процесс обеспечения качества, проведения аудита и инспекций уполномоченных органов здравоохранения, создания стандартных операционных процедур, архивирования документов исследования.

Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и стран — участниц Евразийского экономического союза. Кропотливая работа авторского коллектива практикующих специалистов по клиническим исследованиям позволила сделать сложные понятия ясными в изложении и простыми для понимания читателем любого уровня опыта и подготовки.

Студентам, мониторам клинических исследований, стремящимся стать проектными менеджерами, и предназначено данное учебное пособие. Также книга будет интересна тем, кто непосредственно участвует в процессе разработки новых лекарственных средств: клиническим проектным менеджерам, специалистам по клиническим исследованиям, фармаконадзору, управлению данными, статистическому анализу, обеспечению качества, медицинским писателям, регистрации, представителям регуляторных и медицинских отделов, работающих в инновационных фармацевтических компаниях и контрактных исследовательских организациях. Представленные материалы будут полезны опытным врачам-исследователям, сотрудникам научно-исследовательских институтов и организаций, участвующих в поиске новых лекарственных веществ, организующих доклинические и клинические испытания, а также служащим уполномоченных органов здравоохранения, регулирующих их проведение.

Приобрести книгу

можно в офисе ООО «Издательство ОКИ»

тел.: +7 (910) 449-22-73

e-mail: eva88@list.ru

Выходные данные

Управление клиническими исследованиями / под общ. ред. Белоусова Д.Ю., Зырянова С.К., Колбина А.С. — 1-е изд. — М.: Буки Веди: Издательство ОКИ, 2017. — 676 с.: ил. ISBN 978-5-4465-1602-5



Издательство ОКИ

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

Сайт издательства: www.izdat-oki.ru



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

Сайт журнала: www.clinvest.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

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



- Независимая научная организация в области изучения экономики программ здравоохранения
- Более 200 исследований в области оценки медицинских технологий
- Опубликовано около 210 научных работ в рецензируемых медицинских журналах
- Партнёры – 40 ведущих зарубежных и российских фармацевтических компаний

Основные направления научной деятельности

- разработка научно-методических основ фармакоэкономических, фармакоэпидемиологических исследований и оценки качества жизни
- развитие методологии проведения оценки медицинских технологий

ПОЛНЫЙ СПЕКТР УСЛУГ ПО ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ

- фармакоэкономические исследования
- фармакоэпидемиологические исследования
- наблюдательные неинтервенционные исследования
- не прямые сравнительные исследования
- оценка технологий здравоохранения
- оценка качества жизни, связанного со здоровьем
- систематический литературный обзор и мета-анализ
- разработка математических моделей и локальная адаптация
- анализ больших баз данных
- создание мобильных приложений и интерактивных онлайн-презентаций
- формирование доказательной базы
- экспертиза и разработка клинико-экономического досье
- образовательные услуги
- информационно-консультационные услуги

Экзактэ Лабс

Лабораторный центр
с 2011 года выполняет исследования
в области разработки лекарственных
средств и средств медицинского
применения

Биоаналитические исследования:

- Разработка и валидация биоаналитических методов.
- Анализ концентрации лекарственных средств в биообъектах.
- Изучение метаболизма лекарственных средств.
- Проведение исследований ADME.

Фармацевтический анализ:

- Сравнительный тест кинетики растворения.
- Аprobация аналитических методик.

Анализ данных:

- Расчет фармакокинетики и биоэквивалентности.

Клиническая диагностика:

- T-Spot-тест на туберкулез.
- ЭПР-тест для ранней диагностики рака.
- Определение гормонов в слюне.
- ВЭЖХ-МС/МС-анализы (витамины, гормоны, кислоты).

ООО «Экзактэ Лабс»

Россия, 117246, Москва,
Научный проезд, д. 20, стр. 2,
тел.: +7 (499) 963-9001
info@exactelabs.com
www.exactelabs.com

*от лат. *exacte* – точность

