ISSN 2587-7836

ФАРМАКОКИНЕТИКА и ДИНАМИКА

№3.2018

www.PharmacoKinetica.ru

Центр
Фармакоэкономических
Исследований

17 лет научно-исследовательской работы

- **Независимая научная организация в области изучения экономики программ здравоохранения**
- **Более 220 исследований в области оценки медицинских технологий**
- **Опубликовано около 210 научных работ в рецензируемых медицинских журналах**
- **Партнёры – 44 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**
- **непрямые 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**

Социальная премия Da.Signa

Награждён в 2013 и 2014 гг. Всероссийской социальной премией в области организации здравоохранения, фармакоэкономики и рациональной фармакотерапии «Da.Signa»

www.HealthEconomics.ru ✉ clinvest@mail.ru ☎ (910) 449-22-73

ФАРМАКОКИНЕТИКА И ФАРМАКОДИНАМИКА

№3
2018

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

Белолипецкая 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 Абрек 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

Демидова Яна Владимировна
Дизайн и верстка
e-mail: yan4ik_dem@mail.ru

Подписано в печать 01.10.2018 г. **Тираж** 400 экз.
Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com
115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

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

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

Сайты	Журналы
www.Antibiotics-Chemotherapy.ru	Антибиотики и Химиотерапия
www.ClinVest.ru	Качественная клиническая практика
www.Clinical-Pharmacy.ru	Клиническая фармация
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru	Центр Фармакоэкономических Исследований
www.Market-Access-Solutions.ru	Market Access Solutions
www.izdat-Oki	Издательство ОКИ

СОДЕРЖАНИЕ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Афобазол предотвращает нарушения двигательной активности мышей при моделировании болезни паркинсона 6-гидроксидофамином
Кадников И.А., Воронин М.В, Середенин С.Б. *3*

Нейропротекторное действие миоинозитола на клеточной модели глутаматного стресса как основа для профилактики нарушений внутриутробного развития головного мозга
Калачева А.Г., Торшин И.Ю., Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Александрова О.П., Хаспеков Л.Г., Громова О.А. *9*

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Афобазол ослабляет индуцированную этанолом поведенческую сенсибилизацию у мышей DBA/2
Надорова А.В., Колик Л.Г. *21*

Метаболит афобазола М-11 ингибирует хинон-редуктазу-2
Кадников И.А., Воронин М.В, Середенин С.Б. *27*

Нейропротекторные свойства *in vitro* новых замещённых глипролинов
Антипова Т.А., Колясникова К.Н., Волкова Ю.С., Антипов П.И., Кузнецова Е.А., Николаев С.В. *31*

Сравнение нейропротекторных свойств дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора на модели окислительного стресса *in vitro*
Логвинов И.О., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Антипов П.И., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. *37*

Влияние ноотропных препаратов на 5-HT_{2A}-рецепторы стриатума аутбредных мышей с различной эффективностью исследовательского поведения
Фирстова Ю.Ю., Васильева Е.В., Ковалёв Г.И. *42*

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

Изучение фармакокинетики [^{3}H]-циклопролилглицина в крови крыс
Ковалёв Г.И., Золотарёв Ю.А., Дадаян А.К., Шрам С.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. *48*

Фармакокинетический анализ препаратов витамина D для перорального приёма
Торшин И.Ю., Громова О.А., Фролова Д.Е., Гришина Т.Р., Лапочкина Н.П. *57*

СОДЕРЖАНИЕ

PHARMACOKINETICS AND PHARMACODYNAMICS

№3
2018

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

Editotial 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

DemidovaYana
Design and layout
e-mail: yan4ik_dem@mail.ru

Signed in print 01.10.2018 r. **Circulation** 400 copies.
Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com
115093, Moscow, Partiynyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

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

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

Sites	Journals
www.Antibiotics-Chemotherapy.ru	Antibiotics and Chemotherapy
www.ClinVest.ru	Good Clinical Practice
www.Clinical-Pharmacy.ru	Clinical Pharmacy
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru	Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru	Center of Pharmacoeconomics Research Market Access Solutions
www.Market-Access-Solutions.ru	
www.izdat-Oki	Publisher OKI

CONTENTS

STUDIES OF PHARMACODYNAMICS

Afobazole prevents motor function impairment in mice with 6-OHDA induced Parkinsonism
Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B. 3

Neuroprotective effect of myoinositol on the cellular model of glutamate stress as a basis for the prevention of disorders of intrauterine development of the brain
Kalacheva A.G., Torshin Y.U. , Stelmashuk E.V. , Genrikhs E.E., Alexandrova O.P., Khaspekov L.G. Gromova O.A. 9

MODE OF ACTION

Afobazole inhibits ethanol-induced behavioral sensitization in DBA/2 mice
Nadorova A.V., Kolik L.G.. 21

Afobazole metabolite M-11 inhibits quinone reductase 2
Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B. 27

Neuroprotective properties of novel substituted glyprolines *in vitro*
Antipova T.A., Kolyasnikova K.N., Volkova Y.S., Antipov P.I., Kuznetsova E.A., Nikolaev S.V. 31

Comparison of neuroprotective properties of the dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of the brain-derived neurotrophic factor on the model oxidative stress *in vitro*
Logvinov I.O., Tarasiuk A.V., Sazonova N.M., Antipov P.I., Antipova T.A., Gudasheva T.A. 37

The Effects of Nootropic Drugs on Striatal 5-HT2A-Receptors in Outbred Mice with Different Efficacy of Exploratory Behavior
Firstova Yu.Yu., Vasileva E.V., Kovalev G.I. 42

PRECLIC PHARMACODYMAMIC AND PHARMACOKINETIC STUDIES

The Study of [3H]-Cycloprolylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood
Kovalev G.I., Zolotarev Yu.A., Dadayan A.K., Shram S.I., Abdullina A.A., Vasileva E.V., Kolyvanov G.B., Zherdev V.P. 48

Pharmacokinetic analysis of drugs vitamin D for oral administration
Torshin I.Yu., Gromova O.A., Frolova D.E., Grishina T.R., Lapochkina N.P. 57

CONTENTS

Афобазол предотвращает нарушения двигательной активности мышей при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином

Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б.

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

Резюме. *Актуальность.* Недостаточная эффективность терапии болезни Паркинсона обусловливает поиск новых фармакологических мишеней для достижения нейропротекторного действия и уменьшения выраженности моторных нарушений. Известно, что лигандная активация шаперона sigma-1 (SigmaR1) и ингибирование хинон-редуктазы-2 (NQO2) оказывают защитное влияние на клетки. Анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) взаимодействует с SigmaR1 и регуляторным сайтом NQO2, ингибируя фермент. Афобазол обладает нейропротекторной активностью в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, однако комплексного изучения влияния препарата на координацию движений и уровень моторного дефицита при моделировании болезни Паркинсона не проводилось. *Цель.* Изучить влияние афобазола на время удерживания мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании болезни Паркинсона введением 6 гидроксидофамина (6-OHDA). *Методы.* Исследовали поведение мышей самцов CD-1 (ICR) в тесте «вращающийся стержень» при постоянной и возрастающей скоростях вращения. Афобазол вводили в дозе 2,5 мг/кг в/б в течение 14 суток с началом курса через 30 мин после унилатерального интрастриатного введения 5 мкг 6-OHDA. *Результаты.* Хроническое введение афобазола увеличивает время удерживания опытных животных в 3,9 раза при тестировании на стержне с постоянной скоростью вращения по сравнению с группой плацебо. Афобазол нивелирует действие 6-OHDA при тестировании на стержне с возрастающей скоростью вращения, увеличивая время удерживания опытных животных в 1,6 раза по сравнению с группой плацебо. *Заключение.* Афобазол предотвращает нарушения поведения мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании болезни Паркинсона 6-OHDA. Выявленный эффект афобазола может быть следствием его нейропротекторных свойств, обусловленных воздействием на SigmaR1 и NQO2.

Ключевые слова: 6-гидроксидофамин; вращающийся стержень; афобазол

Для цитирования:
Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б. Афобазол предотвращает нарушения двигательной активности мышей при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.3–8. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10017.

Afobazole prevents motor function impairment in mice with 6-OHDA induced Parkinsonism

Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Objective.* Current insufficiency in treatment of Parkinson's disease determines the search for new pharmacological targets to achieve neuroprotection and reduce the severity of motor impairment. It is known that ligand activation of chaperone sigma-1 (SigmaR1) and inhibition of quinone reductase 2 (NQO2) cause cytoprotection. Anxiolytic drug afobazole (5-Ethoxy-2-[2-(morpholino)-ethylthio]benzimidazole dihidrochloride) interacts with SigmaR1 and regulatory site of NQO2, inhibiting it. *In vivo* and *in vitro* experiments have demonstrated neuroprotective effect of afobazole. However, the effect of afobazole on motor deficit and motion coordination in model of Parkinson's disease was not studied. *Aim.* To study the influence of afobazole on latency to fall in rotarod test in mice with induced 6-hydroxydopamine (6-OHDA) Parkinsonism. *Methods.* Male CD-1 (ICR) mice were tested at accelerated and constant speed rotarod. Afobazole was administered during 14 days (2.5 mg/kg, ip) at course start 30 minutes after unilateral intrastriatal injection of 5 μg 6-OHDA. *Results.* Chronic administration of afobazole (2.5 mg/kg) to hemiparkinsonian mice increases their latency to fall 3.9 fold contrary to placebo treated mice in constant speed rotarod. Afobazole negates 6-OHDA in accelerating rotarod increasing latency to fall 1.6 fold as compared to placebo group. *Conclusion.* Afobazole prevents motor function impairment in hemiparkinsonian mice with 6-OHDA lesion in rotarod test. Observed effect of afobazole can be a result of it neuroprotective properties derived from SigmaR1 and NQO2 interaction.

Keywords: 6-OHDA; rotarod; afobazole

For citations:
Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Afobazole prevents motor function impairment in mice with 6-OHDA induced Parkinsonism. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;3:3–8. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10017.

Введение

Болезнь Паркинсона (БП) – хроническое нейродегенеративное заболевание, вызванное прогрессирующим разрушением нейронов чёрной субстанции. Ведущими симптомами заболевания являются гипокинезия, тремор, постуральная неустойчивость и мышечная ригидность. Одним из критериев успешности терапии БП является уменьшение тяжести этих симптомов [1]. Однако современные противопаркинсонические средства оказывают временное симптоматическое действие, что обусловливает поиск новых фармакологических мишеней для эффективной терапии БП. Ряд исследований указывает, что такими мишенями могут быть шаперон sigma-1 (SigmaR1) и фермент хинон-редуктаза-2 (NQO2). Шаперон SigmaR1 играет важную роль в адаптации клеток нервной системы к стрессовым воздействиям, регулируя процессы фолдинга белков в ЭПР и энергетический баланс митохондрий [2–4]. Лигандная активация SigmaR1 способствует его внутриклеточному перераспределению и проявлению шаперонной активности в отношении ионных каналов, рецепторов и ферментов цитоплазматической мембраны, что вносит важный вклад в нейропротекторное влияние [5, 6]. NQO2 катализирует восстановление орто- и пара-хинонов, в том числе хинонных производных дофамина, до гидрохинонов [7]. Известно, что гидрохинонные производные дофамина являются нестабильными соединениями, подверженными автоокислению, которое сопровождается генерацией супероксиданион радикала [8–10]. Поэтому ингибирование NQO2 может приводить к снижению продукции АФК и оказывать защитное действие на нейроны [11].

Анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) обладает сродством к SigmaR1 рецептору и мелатонинзависимому регуляторному сайту NQO2 (MT_3-рецептор) [12], при взаимодействии с которым афобазол ингибирует фермент [13]. В моделях *in vitro* и *in vivo* афобазол проявляет цитопротекторную и нейропротекторную активность. Данные научной периодики и собственные результаты показывают, что обе мишени вносят вклад в действие препарата [14–16]. В нашем недавнем исследовании выявлена способность афобазола препятствовать падению уровня дофамина в стриатуме мышей на модели БП, вызванной интрастриатным введением 6-OHDA [17]. При моделировании БП в эксперименте развитие дискинезии у животных является важным критерием повреждения дофаминергических структур [18]. Одной из наиболее распространённых методик оценки нарушений двигательной активности является тест «вращающийся стержень» [19], который широко применяется для оценки эффективности действия различных соединений с противопаркинсонической активностью. Таким образом, целью нашей работы стало изучение влияния афобазола на время удерживания мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании БП унилаинтрастриатным интрастриатным введением 6-OHDA.

Материалы и методы

Реактивы

Афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид); ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»), 6-гидроксидофамина гидрохлорид (6-OHDA), аскорбиновая кислота, NaCl (Sigma-Aldrich), хлоралгидрат (Serva).

Животные

В работе использовали мышей-самцов аутбредной линии CD-1 (ICR) весом 25-30 г (n = 30). Животные были получены из НПП Питомника лабораторных животных ФИБХ. Мышей содержали в условиях вивария (20-22 °C, относительная влажность 30-70 %, 12-часовой световой цикл) по 10 особей в пластиковых клетках со свободным доступом к пище и воде.

Все процедуры с животными в исследовании были рассмотрены и утверждены комиссией Института по биоэтике на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными.

Моделирование болезни Паркинсона интрастриатным введением 6-OHDA

За 30 минут до операции животное анестезировали хлоралгидратом (400 мг/кг, внутрибрюшинно). Анестезированное животное помещали в стереотаксические рамки (Stoelting Motorized Stereotaxis, Stoelting Co., Великобритания), где 6-OHDA однократно вводили в правый стриатум в координатах A = 0,4; L = 1,8; V = -3,5, относительно брегмы [24]. Концентрация 6-OHDA составляла 5 мкг на 1 мкл раствора, содержащего 0,9 % NaCl и 0,02 % аскорбиновой кислоты. Опытным животным (рис. 1) вводили 1 мкл раствора 6-OHDA со скоростью 0,5 мкл/мин гамильтоновским шприцом с иглой из нержавеющей стали (30 gauge), спустя 2 минуты после инъекции иглу извлекали. Ложно-оперированным животным вводили 1 мкл контрольного раствора, содержащего 0,9 % NaCl и 0,02 % аскорбиновой кислоты, в тех же координатах (рис. 1).

Схема введения афобазола

Афобазол в дозе 2,5 мг/кг в/б и плацебо (вода для инъекций) вводили ежедневно на протяжении 14 суток с началом курса через 30 минут после интрастриатной инъекции 6-OHDA или контрольного раствора (рис. 1). Животные были разделены на 3 группы: ложно оперированные, получавшие плацебо (n = 10); опытные, получавшие плацебо (n = 10); опытные, получавшие афобазол (n = 9).

Тест вращающийся стержень

Исследование двигательной активности мышей линии CD-1 в тесте вращающийся стержень проводили на экспериментальной установке Rota-rod/RS LE 8500 (диаметр стержня 3,2 см) (Panlab/Harvard Apparatus) (рис. 1). Для адаптации мышей в установке и исключения из исследования малоподвижных животных в эксперимент были включены две обучающие сессии. Первую обучающую сессию проводили на 12-е сутки после введения 6-OHDA (рис. 1). Каждое животное дважды помещалось в экспериментальную установку при скорости вращения стержня 4 об./мин с перерывом не менее 60 минут. Вторую обучающую сессию проводили на 13-е сутки после введения 6-OHDA при скорости вращения стержня 10 об./мин (рис. 1). Манипуляции с животными были аналогичны первой обучающей сессии. Животные, находившиеся на вращающемся стержне менее минуты в одной из обучающих сессий, исключались из эксперимента [20].

На 14-е сутки после введения 6-OHDA исследовали способность мышей удерживаться в тесте при постоянной и увеличивающейся скоростях вращения стержня (рис. 1). Для этого экспериментальное животное помещали на вращающийся стержень с постоянной скоростью 20 об./мин и засекали время до падения животного со стержня на платформу. Во втором варианте теста экспериментальное животное помещали на стержень, вращающийся с начальной скоростью 4 об./мин, и замеряли время до падения на платформу. Максимальное число оборотов (40 об./мин) [21] достигалось за 1 минуту. Каждое животное проходило оба варианта теста по 3 раза с перерывом 30 минут между попытками. Замер времени прекращали после 120 секунд удерживания животного на стержне. Для статистической обработки данных каждого варианта теста отбиралось максимальное время удерживания из трёх попыток.

Математическая обработка экспериментальных данных

Табличные данные представлены в виде медианы и квартилей (Mdn (q25-75)). Проверку экспериментальных данных на соответствие нормальному распределению проводили с помощью теста Д'Агостино–Пирсона. Оценку статистической значимости полученных результатов проводили с применением одностороннего дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса (Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc). Статистическую обработку и визуализацию полученных данных осуществляли с помощью программного пакета GraphPad 5.0.2 (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Результаты

В условиях постоянной и возрастающей скоростей вращения стержня медианы времени удерживания для ложно-оперированных животных составили 117,5 секунды и 36 секунд соответственно (табл. 1). На 14-е сутки после унилатерального интрастриатного введения 6-OHDA животные, получавшие плацебо, демонстрировали статистически значимые признаки моторного дефицита и нарушения координации движений. А именно, время удерживания опытных животных на стержне при постоянной скорости вращения уменьшалось на 82 % по сравнению с ложно-оперированными животными (табл. 1). При тестировании опытных мышей на стержне с возрастающей скоростью вращения время их удерживания на стержне снизилось на 50 % в сравнении с ложно-оперированными животными (табл. 1).

Хроническое введение афобазола в дозе 2,5 мг/кг на протяжении 14 суток после унилатерального интрастриатного введения 6-OHDA приводит к увеличению времени удерживания в 3,9 раза при тестировании на стержне с постоянной скоростью вращения по сравнению опытными животными, получавшими плацебо, что составляет 70 % времени удерживания ложно-оперированных животных (табл. 1). Афобазол нивелировал действие 6-OHDA при тестировании на стержне с возрастающей скоростью вращения, увеличивая время удерживания опытных животных в 1,6 раза (табл. 1) по сравнению с опытными животными, получавшими плацебо.

Обсуждение результатов

Использованные в работе варианты теста «вращающийся стержень» дают возможность комплексно описать параметры поведения животных в модели БП с учётом влияния таких факторов, как адаптация к условиям теста, продолжительность проведения теста [22] и степень повреждения нигростриатного пути [23]. Вариант теста с постоян-

ной скоростью вращения обладает высокой чувствительностью при оценке моторного дефицита, вызванного небольшими морфологическими и функциональными изменениям нигростриатного пути. Вариант теста с возрастающей скоростью вращения преимущественно отражает нарушение координации движений [23, 24]. Полученные в нашем исследовании параметры поведения ложно-оперированных животных при фиксированной скорости вращения стержня соответствуют ранее опубликованным данным, где большинство животных находились на стержне на протяжении всего времени тестирования [20, 25]. Снижение времени удерживания опытных животных на стержне в обоих вариантах теста в сравнении с ложно-оперированными животными свидетельствует о нарушении двигательной активности, характерном для повреждения нигростриального пути в условиях унилатерального интрастриатного введения 6-OHDA [25]. Полученные данные соответствуют снижению уровня дофамина в стриатуме опытных животных, получавших плацебо, зафиксированном нами в данной экспериментальной модели БП [17]. Предотвращение нарушений двигательной активности афобазолом в дозе 2,5 мг/кг в тесте «вращающийся стержень» соответствует нейропротекторному действию и согласуется с антипаркинсоническими эффектами других соединений [20, 26, 27].

Полученные результаты могут быть следствием регуляции SigmaR1 и NQO2. В ряде экспериментов было продемонстрированно агонистическое действие препарата на SigmaR1. Афобазол снижал вход ионов Ca^{2+} и H^{+} в кортикальные нейроны в условиях ишемии и ацидоза. Антагонист SigmaR1 BD-1063 препятствовал развитию действия афобазола [28]. Афобазол блокирует миграцию микроглии в ответ на ATP и UTP. Эти эффекты также статистически значимо ослаблялись антагонистами SigmaR1 [29]. Известно, что агонисты SigmaR1 оказывают нейропротекторное действие при моделировании БП. Хроническое введение селективного агониста SigmaR1 PRE-084 приводит к восстановлению нервных волокон при повреждении среднемозгового пучка головного мозга мышей, вызванном 6-OHDA [30]. На модели менадионовой генотоксичности *in vitro* было установлено, что цитопротекторное действие афобазола обусловлено не только взаимодействием препарата с SigmaR1, но и с MT_3-рецептором [14]. Вклад регуляции NQO2 в защитные механизмы подтверждён на модели нейродегенерации, вызванной паракватом. Установлено, что введение селективного ингибитора NQO2 в чёрную субстанцию головного мозга мышей снижало в тканях мозга содержание малонового диальдегида – маркёра перекисного окисления липидов [31].

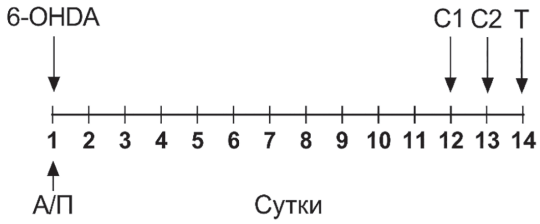


Рис. 1. Дизайн эксперимента
Примечания: 6-OHDA – однократное унилатеральное интрастриатное введение 6-гидроксидофамина, А – начало курса введения афобазола, П – начало курса введения плацебо, С1 – первая обучающая сессия, С2 – вторая обучающая сессия, Т – тест «вращающийся стержень».

Таблица 1

Влияние 14-суточного введения афобазола на время удерживания в тесте «вращающийся стержень» мышей линии CD-1 при однократном унилатеральном интрастриатном введении 6-OHDA

Экспериментальные группы		Время удерживания (с)	
		20 об./мин	4–40 об./мин
Л.О.	Плацебо $n = 10$	117,5 (101–120)	36 (24,75–42,25)
6-OHDA	Плацебо $n = 10$	21 (16,25–37,75) ** $p < 0,001$	18 (14,5–26,5) * $p = 0,031$
	Афобазол (2,5 мг/кг) $n = 9$	82 (69,5–102) # $p = 0,024$	28 (24,5–33)

Примечания: Данные представлены в виде Mdn (q25–75). *N* – количество животных в группе. Л.О. – ложно-оперированные животные. 6-OHDA – опытные животные. * – статистически значимые различия по сравнению с группой ложно-оперированных животных ($p < 0,05$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc). ** – статистически значимые различия по сравнению с группой ложно-оперированных животных ($p < 0,001$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc). # – статистически значимые различия по сравнению с группой опытных животных, получавших плацебо ($p < 0,05$, Kruskal–Wallis test, Dunn's post hoc)

Таким образом, в настоящей работе показано, что афобазол при двухнедельном введении в дозе 2,5 мг/кг в/б предотвращает нарушения поведения мышей в тесте «вращающийся стержень» при моделировании БП унилатеральным интрастриатным введением 6-OHDA. Выявленный эффект афобазола может быть следствием его нейропротекторных свойств, обусловленных воздействием на SigmaR1 и NQO2.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кадников Илья Андреевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: ikadnikov@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-8202-3967
SPIN-код: 8995-0919
н. с. лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Воронин Михаил Владимирович
ORCID ID: 0000-0003-2477-0563
SPIN-код: 6321-4709
к. м. н., с. н. с., лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Середенин Сергей Борисович
ORCID ID: 0000-0003-4482-9331
SPIN-код: 3896-4655
д. м. н., проф., академик РАН, заведующий лабораторией фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kadnikov Ilya
Corresponding author
e-mail: ikadnikov@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-8202-3967
SPIN code: 8995-0919
Research Officer laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Voronin Mikhail
ORCID ID: 0000-0003-2477-0563
SPIN code: 6321-4709
Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer, laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Seredenin Sergey
ORCID ID: 0000-0003-4482-9331
SPIN code: 3896-4655
Doctor of Medical Sciences, Prof., Academician of RAS, Head of the laboratory of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Ebrahimi-Fakhari D, Saidi LJ, Wahlster L. Molecular chaperones and protein folding as therapeutic targets in Parkinson's disease and other synucleinopathies. *Acta Neuropathol Commun*. 2013;1:79. DOI: 10.1186/2051-5960-1-79
2. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival. *Cell*. 2007;131(3):596–610. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.036
3. Harada S, Fujii C, Hayashi A, et al. An association between idiopathic Parkinson's disease and polymorphisms of phase II detoxification enzymes: glutathione S-transferase M1 and quinone oxidoreductase 1 and 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288(4):887–892. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5868
4. Nguyen L, Lucke-Wold BP, Mookerjee SA, et al. Role of sigma-1 receptors in neurodegenerative diseases. *J Pharmacol Sci*. 2015;127(1):17–29. DOI: 10.1016/j.jphs.2014.12.005
5. Su TP, Su TC, Nakamura Y, et al. The Sigma-1 Receptor as a Pluripotent Modulator in Living Systems. *Trends Pharmacol Sci*. 2016;37(4):262–278. DOI: 10.1016/j.tips.2016.01.003
6. Ruscher K, Wieloch T. The involvement of the sigma-1 receptor in neurodegeneration and neurorestoration. *J Pharmacol Sci*. 2015;127(1):30–35. DOI: 10.1016/j.jphs.2014.11.011.
7. Vella F, Ferry G, Delagrange P, et al. NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol*. 2005;71(1-2):1–12. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.09.019
8. Segura-Aguilar J, Paris I, Mucoz P, et al. Protective and toxic roles of dopamine in Parkinson's disease. *J Neurochem*. 2014;129(6):898–915. DOI: 10.1111/jnc.12686
9. Reybier K, Perio P, Ferry G, et al. Insights into the redox cycle of human quinone reductase 2. *Free Radic Res*. 2011;45(10):1184–1195. DOI: 10.3109/10715762.2011.605788
10. Asanuma M, Miyazaki I, Diaz-Corrales FJ, et al. Quinone formation as dopaminergic neuron-specific oxidative stress in the pathogenesis of sporadic Parkinson's disease and neurotoxin-induced parkinsonism. *Acta Med Okayama*. 2004;58(5):221–233. DOI: 10.18926/AMO/32105
11. Cassagnes LE, Chhour M, Perio P, et al. Oxidative stress and neurodegeneration: The possible contribution of quinone reductase 2. *Free Radic Biol Med*. 2018;120:56–61. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.002
12. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейропротекторные механизмы действия афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2009. – Т. 72. – №1. – С.3–11. [Seredenin SB, Voronin MV Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009;72(1):3–11. (In Russ).].
13. Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Effect of afobazole on activity of quinone reductase 2. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;47(10):514–516. DOI: 10.1007/s11094-014-0993-y
14. Voronin MV, Kadnikov IA. Contribution of Sigma-1 receptor to cytoprotective effect of afobazole. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4(6):e00273. DOI: 10.1002/prp2.273
15. Behensky AA, Yasny IE, Shuster AM, et al. Stimulation of Sigma Receptors with Afobazole Blocks Activation of Microglia and Reduces Toxicity Caused by Amyloid-beta25-35. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347(2):458–467. DOI: 10.1124/jpet.113.208348
16. Behensky AA, Yasny IE, Shuster AM, et al. Afobazole Activation of sigma-1 Receptors Modulates Neuronal Responses to Amyloid-beta25-35. *J Pharmacol Exp Ther*. 2013;347(2):468–477. DOI: 10.1124/jpet.113.208330
17. Воронин М.В., Кадников И.А., Середенин С.Б. Афобазол восстанавливает содержание дофамина при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином Афобазол восстанавливает содержание дофамина при моделировании болезни Паркинсона 6-гидроксидофамином // *Нейрохимия*. 2019 (в печати). [Voronin MV, Kadnikov IA, Seredenin SB. Afobazole restores strial dopamine in 6-hydroxydopamine

model of Parkinson disease. *Neurochemical Journal*. 2019. (In Russ).].

18. Blum D, Torch S, Lambeng N, et al. Molecular pathways involved in the neurotoxicity of 6-OHDA, dopamine and MPTP: contribution to the apoptotic theory in Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;65(2):135–172. DOI: 10.1016/S0301-0082(01)00003-X

19. Deacon RM. Measuring motor coordination in mice. *J Vis Exp.* 2013(75):e2609. DOI: 10.3791/2609

20. Goes ATR, Jesse CR, Antunes MS, et al. Protective role of chrysin on 6-hydroxydopamine-induced neurodegeneration a mouse model of Parkinson's disease: Involvement of neuroinflammation and neurotrophins. *Chem Biol Interact.* 2018;279:111–120. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.10.019

21. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(7):519–529. DOI: 10.1038/nrn2652

22. Jones BJ, Roberts DJ. The quantiative measurement of motor incoordination in naive mice using an acelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol.* 1968;20(4):302–304

23. Monville C, Torres EM, Dunnett SB. Comparison of incremental and accelerating protocols of the rotarod test for the assessment of motor deficits in the 6-OHDA model. *J Neurosci Methods.* 2006;158(2):219–223. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2006.06.001

24. Капица И.Г., Кокшенев И.И., Вальдман Е.А., и др. Изучение эффектов инъекционной формы гимантана на экспериментальных моделях паркинсонического синдрома // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2012;2(5):10–16. [Kapitsa IG, Kokshenev II, Val'dman EA, et al. Izuchenie effektov in"ektsionnoi formy gimantana na eksperimental'nykh modelyakh parkinsonicheskogo sindroma. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2012;2(5):10–16. (In Russ).].

25. Alvarez-Fischer D, Henze C, Strenzke C, et al. Characterization of the striatal 6-OHDA model of Parkinson's disease in wild type and alpha-synuclein-deleted mice. *Exp Neurol.* 2008;210(1):182–193. DOI: 10.1016/j.expneurol.2007.10.012

26. Thornton E, Vink R. Treatment with a substance P receptor antagonist is neuroprotective in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of early Parkinson's disease. *PLoS One.* 2012;7(4):e34138. DOI: 10.1371/journal.pone.0034138

27. Morroni F, Tarozzi A, Sita G, et al. Neuroprotective effect of sulforaphane in 6-hydroxydopamine-lesioned mouse model of Parkinson's disease. *Neurotoxicology.* 2013;36:63–71. DOI: 10.1016/j.neuro.2013.03.004.

28. Cuevas J, Rodriguez A, Behensky A, et al. Afobazole modulates microglial function via activation of both sigma-1 and sigma-2 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(1):161–172. DOI: 10.1124/jpet.111.182816

29. Cuevas J, Behensky A, Deng W, et al. Afobazole modulates neuronal response to ischemia and acidosis via activation of sigma-1 receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011;339(1):152–160. DOI: 10.1124/jpet.111.182774

30. Francardo V, Bez F, Wieloch T, et al. Pharmacological stimulation of sigma-1 receptors has neurorestorative effects in experimental parkinsonism. *Brain.* 2014;137(Pt 7):1998-2014. DOI: 10.1093/brain/awu107

31. Janda E, Parafati M, Aprigliano S, et al. The antidote effect of quinone oxidoreductase 2 inhibitor against paraquat-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol.* 2013;168(1):46–59. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01870.x

Нейропротекторное действие миоинозитола на клеточной модели глутаматного стресса как основа для профилактики нарушений внутриутробного развития головного мозга

Калачёва А.Г.[1], Торшин И.Ю.[2], Стельмашук Е.В.[3], Генрихс Е.Е.[3], Александрова О.П.[3], Хаспеков Л.Г.[3], Громова О.А.[1,2]

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

[2] – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва

[3] – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение«Научный центр неврологии», Москва

Резюме. Миоинозитол – основа для синтеза важной группы сигнальных молекул, инозитолфосфатов, которые опосредуют передачу сигнала от рецепторов ростовых факторов и нейротрансмиттеров. Дотации миоинозитола способствуют профилактике фолат-резистентных пороков развития и нейропротекции мозга плода в условиях ишемии. В работе представлены результаты исследования эффектов миоинозитола на рост нейронов мозжечка в культуре в условиях глутаматного стресса. Показано, что эффекты миоинозитола на выживание нейронов (+17 %) превосходят эффекты средств, которые обычно используются для нейропротекции (пептидные экстракты – +10 %, холиновые препараты – не более 3 %). Подтверждённое в настоящей работе прямое нейропротекторное действие миоинозитола указывает на важность использования миоинозитола во время беременности с целью нейропротекции мозга плода.

Ключевые слова: нейроцитология; нейропротекция; нейротрофичность; нейропластичность; развитие мозга плода; цитидин-5-дифосфохолин; церебролизин; миоинозитол

Для цитирования:
Калачёва А.Г., Торшин И.Ю., Стельмашук Е.В., Генрихс Е.Е., Александрова О.П., Хаспеков Л.Г., Громова О.А. Нейропротекторное действие миоинозитола на клеточной модели глутаматного стресса как основа для профилактики нарушений внутриутробного развития головного мозга // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.9–20. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10018.

Neuroprotective effect of myoinositol on the cellular model of glutamate stress as a basis for the prevention of disorders of intrauterine development of the brain

Kalacheva A.G.[1], Torshin Y.U.[2], Stelmashuk E.V.[3], Genrikhs E.E.[3], Alexandrova O.P.[3], Khaspekov L.G.[3], Gromova O.A.[1, 2]

[1] – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo

[2] – Federal Research Center «Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences, Moscow

[3] – Research Center of Neurology, Moscow

Abstract. Myoinositol is the basis for the synthesis of an important group of signal molecules, inositolphosphates, which mediate signal transmission from receptors of growth factors and neurotransmitters. Grants myo-Inositol promote the prevention of folate-resistant defects and neuroprotection of the fetal brain ischemia. The paper presents the results of a study of the effects of myoinositol on the growth of cerebellar neurons in culture under glutamate stress. It is shown that the effects of myoinositol on the survival of neurons (+17 %) exceed the effects of drugs that are usually used for neuroprotection (peptide extracts – + 10 %, choline preparations – no more than 3 %). Confirmed in the present work, a direct neuroprotective effect of myo-Inositol indicates the importance of the use of myo-Inositol during pregnancy with the aim of neuroprotection of the fetal brain.

Keywords: neurocytology; neuroprotection; neurotrophines; neuroplasticity; brain development of the fetus; cytidine-5-diphosphocholine; Cerebrolysin; myoinositol

For citations:
Kalacheva AG, Torshin YU, Stelmashuk EV, Genrikhs EE, Alexandrova OP, Khaspekov LG, Gromova OA. Neuroprotective effect of myoinositol on the cellular model of glutamate stress as a basis for the prevention of disorders of intrauterine development of the brain. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;3:9–20. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10018.

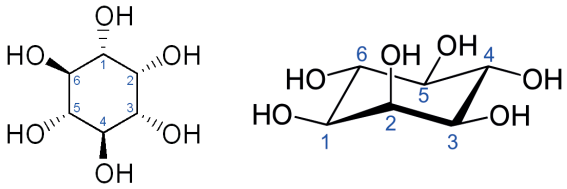


Рис. 1. Химическая структура миоинозитола (цис-1,2,3,5-транс-4,6-циклогексангексол)
Примечания: Сплошные треугольные стрелки обозначали связи, направленные из условной плоскости рисунка к читателю, и соответствуют приставке «цис-» в полном названии молекулы, штрих-пунктирные из плоскости рисунка от читателя («транс-» в полном названии молекулы).

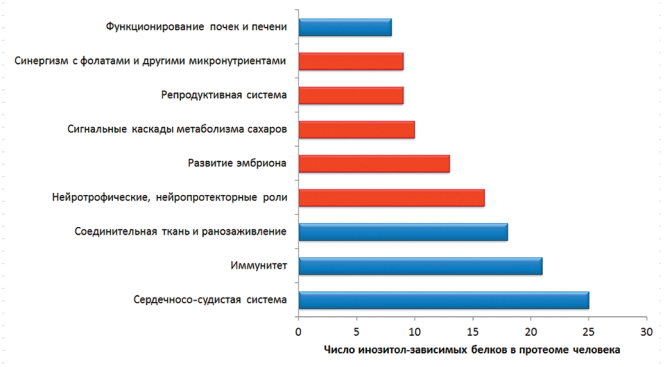


Рис. 2. Результаты анализа биологических и физиологических ролей белков, участвующих во внутриклеточной передачи сигнала посредством производных миоинозитола
Примечания: Приведены числа белков в каждой из категорий. Красным цветом выделены группы белков, поддержание активности которых принципиально важно для профилактики ВПРМ.

Введение

Нейропротекция мозга плода чрезвычайно важна на всех стадиях беременности. На ранних сроках беременности нейропротекция необходима для профилактики врождённых пороков развития мозга (ВПРМ); в течение всей беременности (особенно в последнем триместре) – для профилактики ишемии головного мозга плода.

Аномалии развития ЦНС плода возникают вследствие нарушений процессов размножения, миграции, дифференциации и программированной гибели клеток во время роста эмбриона. Важным фактором формирования ВПРМ является сахарный диабет, осложняющий течение беременности не менее чем у 2,4 % беременных [1]. Профилактика ВПРМ фолатами не эффективна в случае т. н. «фолат-резистентных» пороков развития, так как фолаты далеко не единственный микронутриент, необходимый для развития ЦНС плода.

Одним из важнейших нейроактивных микронутриентов, который принимает комплексное участие в эмбриогенезе и развитии мозга плода, является миоинозитол (витамин B8), специфическая разновидность шестиатомных спиртов – инозитолов. Инозитолы (циклогексан-1,2,3,4,5,6-гексолы) представлены девятью стереоизомерами, из которых именно миоинозитол (рис. 1) имеет принципиальное значение для функционирования всех типов клеток. Миоинозитол и его фосфатные производные (инозитолфосфаты, фосфатидилинозитоловые липиды) выступали в качестве важных передатчиков сигнала во внутриклеточных сигнальных каскадах.

В реферируемых научных журналах представлено более 40 000 публикаций о молекулярно-физиологических механизмах действия миоинозитола, включающих также и результаты клинических исследований. В работе [2] представлены результаты анализа всего массива публикаций по миоинозитолу, проведённого посредством современных методов интеллектуального анализа данных. Показано, что производные миоинозитола участвуют в передаче сигналов от рецепторов ростовых факторов, рецептора инсулина [3], расщеплении жиров и снижении уровня холестерина в крови [4], модуляции активности нейротрансмиттеров [5] и др.

Анализ 120 миоинозитол-зависимых белков протеома человека показал, что более половины этих белков вовлечены в поддержку жизнедеятельности сердечно-сосудистой системы, иммунитета и структуры соединительной ткани (включая эффекты на поддержание состояния костей, хряща, кожи и процессы заживления ран). Не менее важно участие миоинозитола в метаболизме сахаров (прежде всего, сигнальном каскаде инсулина) и в поддержании функционирования ЦНС (включая нейротрофические и нейропротекторные роли, рис. 2) [2].

Аномалии метаболизма миоинозитола ассоциированы с когнитивными нарушениями [6], депрессией [7], диабетической нейропатией [8] и др. Фундаментальные и клинические исследования показали, что миоинозитол необходим для поддержки нейрональной функции, включая синаптическую передачу и осуществление физиологических эффектов таких нейротрансмиттеров, как *серотонин, дофамин, ГАМК, нейромедин.* Миоинозитол необходим для *нейрогенеза (нейротрофический эффект), нейропротекции* (в т. ч. защиты клеток сетчатки глаза), осуществления процессов зрения, слуха, вкуса и долговременной потенциации в гиппокампе (поддержка памяти).

Столь широкий спектр биологических активностей миоинозитола позволяет предположить, что миоинозитол может проявлять и более специфические воздействия на сигнальные каскады выживания нейронов в условиях стресса (гипоксия, нейротоксичность глутамата, энергетический дефицит и гипогликемия, дисфункция митохондрий, избыточное воспаление и др.). В настоящей работе проведена валидация нейропротекторных эффектов миоинозитола методами нейро-

цитологии, изучающими действие веществ непосредственно на нейроны [9–11].

Нейроцитологические исследования позволяют установить прямые нейропротекторные эффекты препаратов при разных стрессорных воздействиях. Например, при ишемии головного мозга таковыми являются энергетический дефицит, нейротоксичность глутамата, оксидативный стресс, дисфункция митохондрий, метаболический ацидоз [12]. Нейроцитологические исследования позволяют демонстрировать влияние препаратов на конкретные факторы стресса и доказывать непосредственное действие исследуемого препарата именно на выживание нейронов (а не на другие типы клеток) [13, 14].

В настоящей работе представлены результаты экспериментальной валидации прямого нейропротекторного действия миоинозитола (в синергидной комбинации с фолиевой кислотой, препарат Фертина, 1 пакетик-саше содержит порошок растворимый Инозит 1000 мг и Фолиевую кислоту 100 мкг, пр-во Орион Фарма, рег. №: RU.77.99.88.003.E.002116.05.18 от 25.05.18). Исследования проводились на зернистых нейронах мозжечка новорождённых крыс, выращиваемых в культуре в условиях глутаматного стресса. Эти исследования предоставили уникальную возможность продемонстрировать прямое нейропротекторное действие миоинозитола на нейроны мозга плода. Во-первых, воспроизведение глутаматного стресса физиологически адекватно моделирует условия умеренной ишемии мозга, возникающей при внутриутробном развитии плода. Во-вторых, изучение воздействия миоинозитола непосредственно на нейроны, без прохождения через центральное кровообращение, печень и другие системы организма, позволяет доказать, что именно миоинозитол (а не какие-то другие изменения в организме, вызываемые приёмом препарата) проявляет нейропротекторное действие.

Материалы и методы

В работе использовались 7-8-суточные культуры, полученные методом ферментно-механической диссоциации клеток мозжечка 7-дневных крыс по общепринятой методике. Крысы подвергались летальной дозе эфирного наркоза, после чего 5 минут стерилизовались 70 % спиртом. Далее производилось извлечение мозжечка и перенесение его в пластиковую чашку Петри, заполненную фосфатным буфером, лишенным ионов кальция и магния. Фрагменты ткани инкубировали 15 мин при 37 °С в фосфатном буфере, содержащем 0,05 % трипсина, 0,02 % ЭДТА и 0,8 % глюкозы. После инкубации ткань промывали в двух сменах фосфатного буфера и один раз средой культивирования, далее подвергали механической диссоциации в питательной среде для культивирования. В состав питательной среды входит 90 % минимальной среды «Игла», 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, 2 мМ глутамина, 5 мМ KCl и 10 мМ буфера HEPES, pH7,2–7,4. Суспензию клеток центрифугировали 1 мин при 1000 об./мин, супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в питательной среде.

Культивирование нейронов производили в 96-луночных пластиковых планшетах, покрытых полиэтиленимином или полилизином (25 мМ хлорида калия). В каждую ячейку планшета добавляли по 0,1 мл суспензии клеток. Культивирование производили 7–8 суток в CO_2-инкубаторе, заполненном газовой смесью (95 % воздуха +5 % CO_2), при температуре 35,5 °С и относительной влажности 98 %. К этому сроку культивированные зернистые нейроны (КЗН) достигали своей морфо-

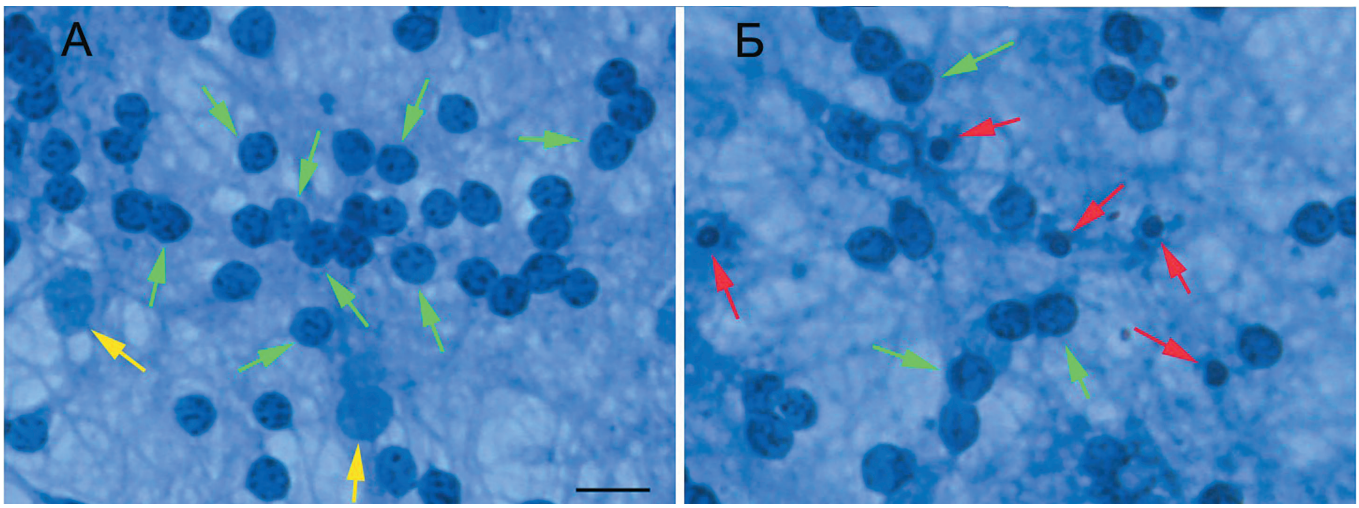


Рис. 3. Первичная диссоциированная фиксированная культура клеток мозжечка, окрашенная трипановым синим. А – контроль, Б – обработка 24 часа глутаматом (L-Glutamic acid monosodium salt 99–100 %, Sigma, USA, N.G-1626)
Примечания: Зелёные стрелки указывали на зернистые нейроны с нормальной морфологией, жёлтые – на ядра глиальных клеток, красные показывали пикнотические ядра погибших нейронов. Масштаб 15 мкм.

логической и нейрохимической зрелости. Состояние культур контролировали ежедневно и на каждом этапе эксперимента путём визуального просмотра в инвертированном микроскопе при фазовом контрасте. Вещества добавляли в среду культивирования на 2 сутки *in vitro* на весь срок культивирования (до 7 суток). Исходя из концентрации вещества в пробирке (10 мМ), его минимально возможное разведение для добавления к культурам 1:10, чтобы сохранить необходимые свойства питательной среды, т. е. 1 мМ. 96-луночные пластиковые планшеты дали возможность тестировать сразу 4 различные концентрации образцов. Были выбраны следующие концентрации: 0,1; 0,2; 0,5; 1 мМ.

Количественную оценку выживаемости клеток производили с помощью прямого подсчёта живых нейронов. Клетки-зерна легко идентифицировать прижизненно как небольшие, 7-10 мкм в диаметре, округлые или овальные нейроны. При окраске фиксированных культур трипановым синим хорошо видны ядра КЗН, занимающие большую часть тел нейронов и окруженные тонким ободком цитоплазмы (рис. 3).

Для каждого вещества было выполнено как минимум 3 эксперимента, при этом на каждую точку брали по 3 культуры, в каждой из которых фотографировали и просчитывали по 5 последовательных полей зрения (как минимум 45 полей зрения из 9 культур 3 независимых экспериментов). Количество нейронов с неизмененной морфологией в контрольных культурах принимали за 100 % выживаемости. Для статистического анализа использовали тест ANOVA с поправками Бонферони и Даннета. Отличия между группами считали достоверными при $p < 0,05$. Результаты выражали как среднее ± SEM.

Результаты и обсуждение

Предварительное моделирование повреждения культур нейронов глутаматом показало, что глутамат оказывал дозозависимый токсический эффект на выживание нейронов (рис. 4). Выбор концентрации глутамата в каждом опыте осуществлялся таким образом, чтобы выживаемость КЗН составляла 30–80 % от интактного контроля (что соответствует умеренному глутаматному стрессу). При выживаемости нейронов менее 30 % (сильный глутаматный стресс) или более 80 % (слабый глутаматный стресс) нейропротекторные эффекты веществ гораздо менее наглядны.

Известно, что нейропротекторные свойства различных препаратов выявляются, как правило, при достаточно длительном применении. Поэтому при исследовании нейропротекторных свойств миоинозитола и других нейропротекторных средств мы пользовались отработанной нами ранее «профилактической» схемой эксперимента: вещество вносится в среду культивирования на 2-е сутки и оставляется до 7-х суток эксперимента. Затем проводится обработка клеток глутаматом и осуществляется подсчёт числа выживших нейронов [9].

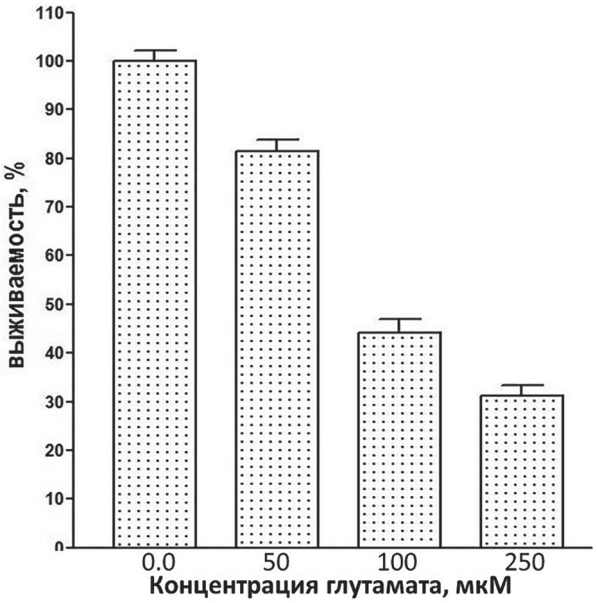


Рис. 4. Влияние глутамата на выживаемость культур (подсчёт морфологически неизмененных нейронов на фиксированных окрашенных трипановым синим препаратах)

Нейроцитологические эксперименты были проведены для миоинозитола (действующее вещество препарата Фертина, производства ОрионФарма) и таких нейропротекторных средств, как экстракт пептидов мозга свиньи (церебролизин), цитидин-5-дифосфохолин (цитиколин), цитидин-5-дифосфохолинат лития. В ходе исследования было использовано 1 920 культур и произведены подсчёты более чем для 200 тыс. нейронов.

Миоинозитол не проявлял токсических эффектов и не влиял на выживаемость КЗН в контроле, т. е. в «холостом» эксперименте (без добавления глутамата, рис. 5). При воздействии глутамата миоинозитол в концентрации 0,2–0,5 мМ достоверно повышал выживаемость нейронов на 12...17 % (0,2 мМ миоинозитола – 54,9 ± 2,6 %; 0,5 мМ миоинозитола – 59,1 ± 2,9 %, контроль – 42,6 ± 2,2 %, рис. 5). Примеры изображений обсчитанных культур нейронов приведены на рис. 6.

Нейроцитологические исследования других средств показали гораздо менее выраженные нейропротекторные свойства. Например, в случае пептидного экстракта поросят до 6 мес. (церебролизин) был выявлен слабый, но достоверный нейропротекторный эффект – увеличение выживаемости на 5...8 % (общая выживаемость при концентрации пептидного экстракта, равной 0,1 мМ – 53 ± 3 %, при концентрации 0,2 мМ – 52 ± 3 %, контроль – 45 ± 2 %, $p < 0,05$). Более того, при концентрации пептидного экстракта, равной 1,0 мМ был выявлен слабый токсический эффект – выживало всего 36,3 ± 2,6 %

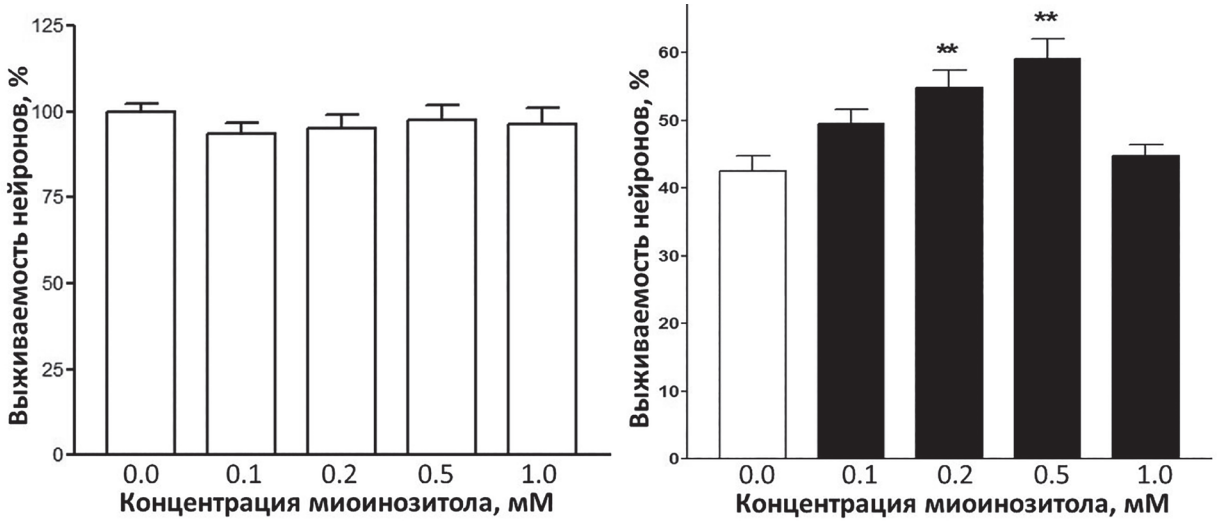


Рис. 5. Результаты нейроцитологических исследований препарата Фертина (миоинозитол)
Примечания: Белые столбики – результаты «холостого эксперимента» (в отсутствие глутамата), чёрные – действие миоинозитола в условиях глутаматной токсичности (100 мкМ). ** – $p < 0,01$ по сравнению с действием глутамата без добавления вещества. Количество просчитанных полей зрения – 36–45.

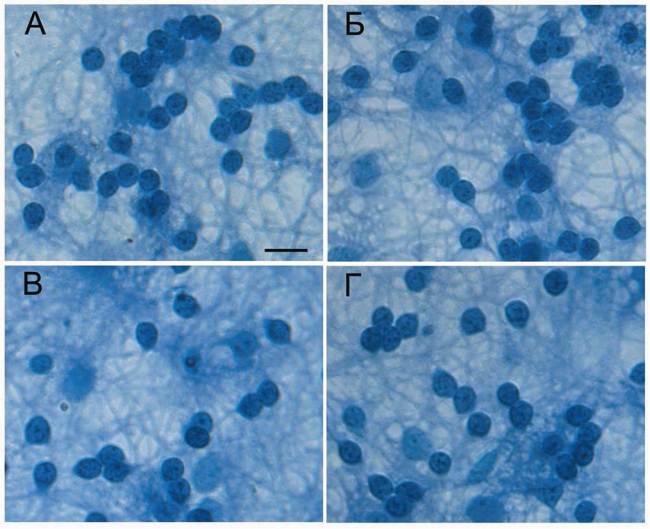


Рис. 6. Действие миоинозитола на выживаемость КЗН при глутаматной токсичности: А – контроль; Б – №3 (0,5 мМ); В – глутамат (100 мкМ); Г – №3 (0,5 мМ) на фоне глутамата (100 мкМ)
Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Масштаб – 15 мкм.

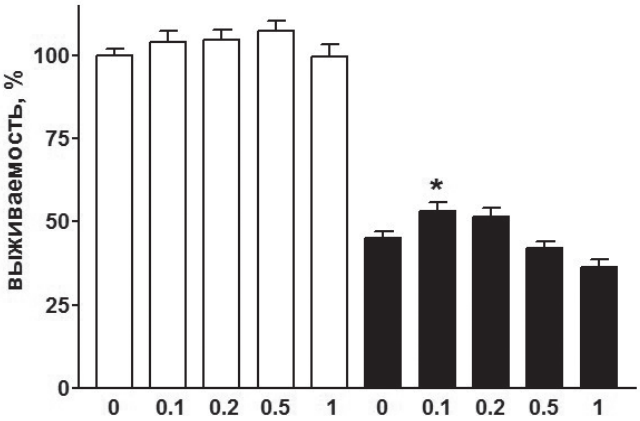


Рис. 7. Действие пептидного экстракта церебролизина на выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс в условиях глутаматного стресса
Примечания: Белые столбики – результаты «холостого эксперимента» (в отсутствие глутамата), чёрные – на фоне 100 мкМ глутамата в среде культивирования. По оси абсцисс показана концентрация пептидного экстракта в мМ, ординат – выживаемость КЗН в процентах от контроля (первый белый столбец). * – $p < 0,05$ по сравнению с действием глутамата без добавок.

нейронов (рис. 7). Примеры фотографий культур из просчитанных полей зрения приведены на рис. 8.

В случае других исследованных нейропротекторных средств непосредственный нейропротекторный эффект на выживание нейронов практически отсуствовал. Например, при воздействии цитидин-5-дифосфохолина выживаемость в контроле при действии глутамата составила 59,3 ± 3,0 %, а при добавлении цитидин-5-дифосфохолина – не превышала 65 % (0,1 мМ – 63,6 ± 3,6 %, нет достоверных различий, $p > 0,05$). При этом более высокая концентрация цитидин-5-дифосфохолина, 1 мМ, несколько уменьшала выживаемость КЗН (43,6 ± 2,4 %, рис. 9, 10). Схожая ситуация наблюдалась и при использовании потенциального нейропротектора – цитидин-5-дифосфохолината лития (рис. 11, 12).

Обсуждение результатов

Результаты проведённого нейроцитологического исследования весьма важны как с точки зрения оценки

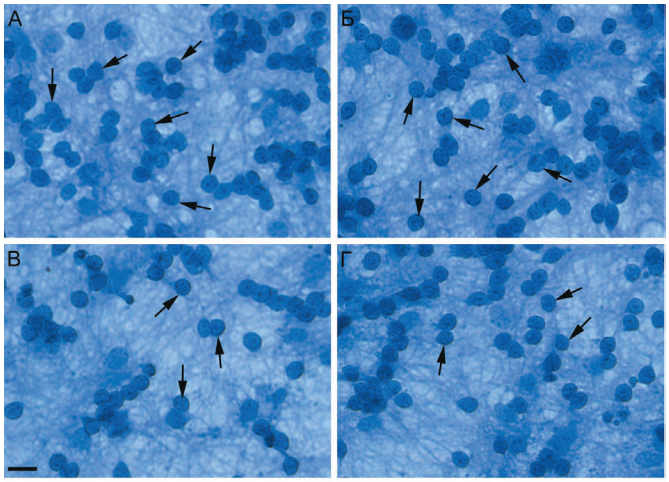


Рис. 8. Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс при действии глутамата и пептидного экстракта. А – контроль, Б – пептидный экстракт 0,1 мМ, В – глутамат 100 мкМ, Г – совместно глутамат и пептидный экстракт

Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштабный отрезок 15 мкМ.

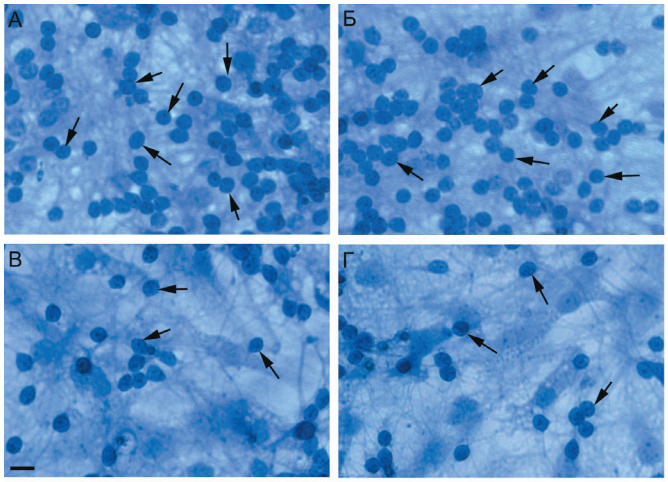


Рис. 10. Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс при действии глутамата и цитидин-5-дифосфохолина. А – контроль, Б – цитидин-5-дифосфохолин, 1 мМ, В – глутамат 100 мкМ, Г – совместно глутамат и цитидин-5-дифосфохолин

Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштабный отрезок 15 мкМ.

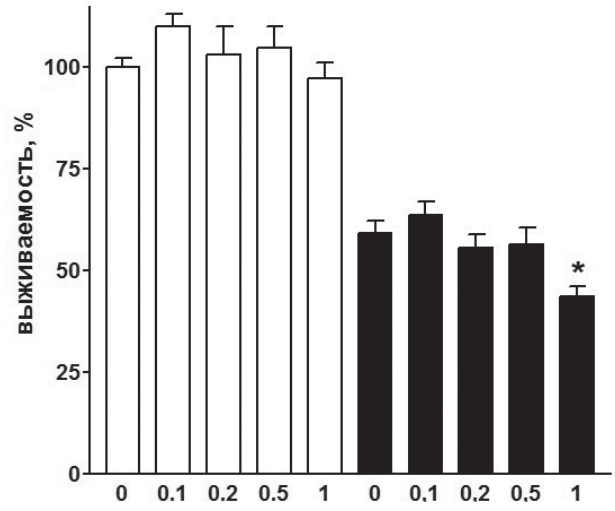


Рис. 9. Действие глутамата и цитидин5-дифосфохолина на выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс

Примечания: Белые столбики в отсутствие глутамата, чёрные на фоне 100 мкМ глутамата в среде культивирования. По оси абсцисс показана концентрация цитидин 5-дифосфохолина в мМ, ординат – выживаемость КЗН в процентах от контроля (первый белый столбец). * – $p < 0,05$ по сравнению с действием глутамата без добавок.

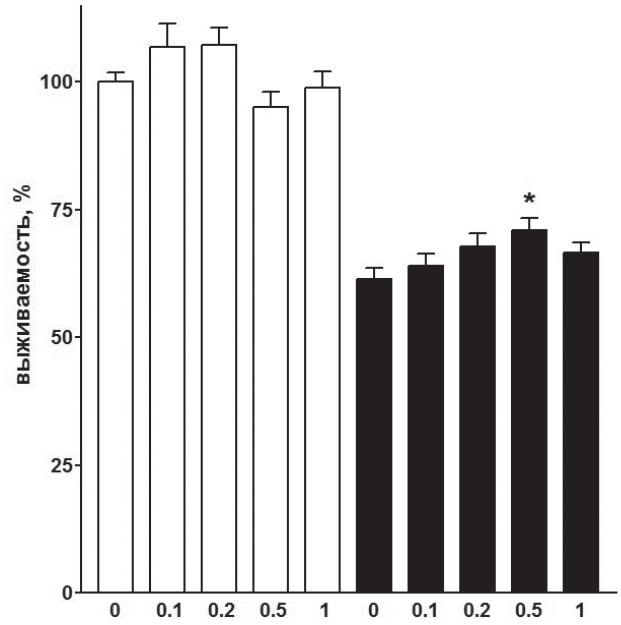


Рис. 11. Действие глутамата и цитидин-5-дифосфохолината лития на выживаемость культивированных зернистых нейронов мозжечка крыс

Примечания: Белые столбики в отсутствие глутамата, чёрные на фоне 100 мкМ глутамата в среде культивирования. По оси абсцисс показана концентрация цитидин-5-дифосфохолината лития в мМ, ординат – выживаемость КЗН в процентах от контроля (первый белый столбец). * – $p < 0,05$ по сравнению с действием глутамата без добавок.

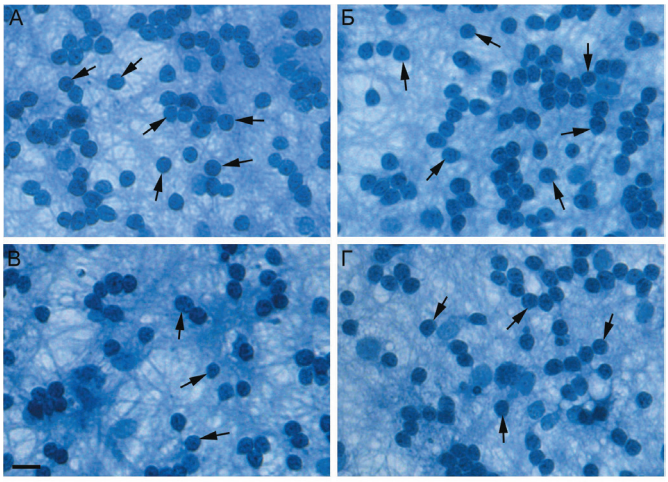


Рис. 12. Культивированные зернистые нейроны мозжечка крыс при действии глутамата и цитидин-5-дифосфохолината лития. А – контроль, Б – цитидин-5-дифосфохолината лития 0,5 *мМ, В – глутамат 100 мкМ, Г – совместно глутамат и цитидин-5-дифосфохолината лития

Примечания: Фиксированные культуры, окрашенные трипановым синим. Стрелками указаны интактные КЗН. Масштабный отрезок 15 мкм.

нейропротекторных эффектов миоинозитола, так и с точки зрения эффектов «признанных» нейропротекторов. Как было отмечено выше, нейроцитологические исследования уникальны в том смысле, что позволяют подтвердить прямое нейропротекторное действие изучаемых веществ непосредственно на растущие нейроны плода. В то же время действие других нейропротекторов может быть опосредованным: фосфохолин, например, может оказывать нейропротекторное действие через поддержку функции печени [15].

В результате проведения настоящей серии экспериментов было показано, что «профилактическое» применение действующего вещества препарата Фертина – миоинозитола (за 5 сут. до создания глутаматного стресса) достоверно и существенно (в среднем, на 12...17 %, $p = 0,01$) повышает выживаемость нейронов в культуре. Создание глутаматного стресса в культуре нейронов моделирует ишемию мозга плода, особенно при патологических родах. Обогащение клеточной среды миоинозитолом до создания глутаматного стресса соответствует профилактическим дотациям миоинозитола во время беременности. Поэтому полученные результаты нейроцитологического исследования имеют существенное значение для антиишемической защиты мозга плода и в ранние, и в поздние сроки беременности.

Ишемический стресс, переносимый эмбрионом в ранние сроки беременности, стимулирует формирование врождённых пороков развития мозга. ВПРМ возникают под действием разнообразных факторов тератогенеза, к которым относятся алкоголь, инфекционные заболевания, передающиеся от матери плоду, ионизирующее излучение, фармацевтические препараты, никотин сигаретного дыма и др. Формирование ВПРМ также является следствием дисбаланса (как правило, недостатка) ростовых факторов, необходимых для роста эмбриона: витамина А, фолатов (витамин В9) и синергидных с ними пиридоксина (витамин В6), цинка, миоинозитола (витамин В8) и других эссенциальных микронутриентов [16].

Большинство ВПРМ (в т. ч. дефекты нервной трубки, ДНТ, расщелины нёба) являются фолат-чувствительными (более 70 %) и их возникновение может профилактироваться дотациями фолатов (предпочтительно в составе витаминно-минеральных комплексов) в ранние сроки беременности. В то же время формирование ВПРМ у пациенток вопреки дотациям фолатов указывает на существование т. н. «фолат-резистентных» ВПРМ (30 %). Риск фолат-резистентных ВПРМ может быть существенно снижен при приёме препаратов миоинозитола [17], поддерживающего эмбриогенез и развитие плода [18].

Установленный нами непосредственный нейропротекторный эффект миоинозитола является важной составляющей эмбриопротекторного действия миоинозитола. В частности, трудно переоценить роль миоинозитола в профилактике ВПР, связанных с инсулинорезистентностью: ведь производные миоинозитола участвуют в процессах передачи сигнала от инсулинового рецептора [19]. Истощение миоинозитола в эмбриональной ткани на этапе органогенеза играет, по всей видимости, важную роль в индуцированнии эмбриопатий, вызываемых гипергликемией. В эксперименте с моделями стрептозоцинового диабета содержание миоинозитола в эмбрионах было снижено на 36 % ($p = 0,01$) по сравнению с контролем и было ассоциировано с задержкой развития (длина эмбриона $3,37 \pm 0,04$ мм, контроль – $3,87 \pm 0,03$ мм, $p = 0,01$; число сомитов – $27,5 \pm 0,2$, контроль – $29,1 \pm 0,2$, $p = 0,01$) и значительно повышенной частотой нейронных повреждений (17,6 %, контроль – 1,9 %, $p < 0,001$) [20].

Миоинозитол способствует снижению инсулинрезистентности и одновременно весьма важен для преодоления негативного воздействия повышенных уровней глюкозы на нейроны. В эксперименте приём миоинозитола приводил к значительному снижению частоты развития ДНТ в модели стрептозотоцинового диабета (9,5 %, контроль – 20,4 %, $p < 0,05$) [21].

Анализ фолат-чувствительных и фолат-резистентных моделей ДНТ [22] в экспериментах по делеции генов позволил установить более 60 генов, инактивация которых приводит к линиям мышей с ДНТ [23]. Не менее 22 из этих 60 генов кодируют белки и ферменты, активность или уровни которых существенно зависят от наличия определённых микронутриентных кофакторов (табл. 1).

Таблица 1

Гены, мутации которых приводят к ДНТ в эксперименте, а соответствующие белки нуждаются в соответствующих микронутриентных кофакторах (МНК)

Ген	МНК	Функция
Abl, Arg	Mg	Рост и выживание клеток, реконструкция активнового цитоскелета в ответ на повреждение ДНК, апоптоз и ряд внеклеточных сигналов
Axd	-	Метаболизм метионина
BRCA1	Zn	Ремонт ДНК в ответ на повреждение ДНК
Grhl3	B8	Нейруляция, линия «закрученный хвост» («curly tail»)
Dbf4	Zn	Репликация ДНК во время размножения клеток
Dnmt3b	B9,Zn	Метилирование ДНК во время роста эмбриона
Fgfr1	B8	Рецептор факторов роста фибробластов
fog1	Zn	Дифференцировка мегакариоцитов
Gli3	Zn	Рост хондроцитов, формирование черепа и конечностей
Itga6	Ca	Интегрин, рецептор ламинина
Itgb1	Mg	Интегрин, рецептор коллагена
JMJ	B9	Эмбриональное развитие, в т. ч. сердца, печени и нервной трубки
Macs	Ca, B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста через протеинкиназу С, регуляция актина
Mlp	Ca	Движение клетки за счёт актинового цитоскелета
Pfn1	B8	Поддержка структуры цитоскелета
Rara	A	Рецептор ретиноевой кислоты, необходим для роста клеток
Tcfap2a	A	Развитие нервной трубки, глаз, лица
Trp53	Zn	Регулировка роста/апоптоза клеток
PIP5K1C	B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста
IP3R1	B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста
Itpk1	B8	Передача сигнала от рецепторов факторов роста

Воздействие миоинозитола (витамин B8) на процессы роста эмбриона неразрывно связано с активностью сигнального белка *протеинкиназы С*, которая поддеживает передачу сигнала от белковых ростовых факторов, гормонов и нейротрансмиттеров (простагландинов, адреналина, ацетилхолина, серотонина, ангиотензина и др.), регулирует вазодилатацию и гликолиз и принципиально важна для процессов роста эмбриона. В эксперименте, проведённом во время нейруляции, было установлено, что противодействие миоинозитола формированию ДНТ связанно с активностью PKC-β1 и PKC-γ [24].

Из перечисленных в табл. 1 генов/белков рассмотрим несколько примеров. В частности, фермент *инозитол 1,3,4-трифосфат 5/6-киназа* (ген Itpk1) является ключевым регуляторным ферментом синтеза сигнальной молекулы инозитол гексакисфосфата (IP6) – внутриклеточной сигнальной молекулы, участвующей в регуляции ионных каналов, транспорте нутриентов и строительных материалов через клеточную мембрану (эндоцитоз, экзоцитоз), транскрипции и репарации ДНК [25]. Животные с делецией/инактивацией гена жизнеспособны, фертильны, но их эмбрионы часто обнаруживали ДНТ, осевые дефекты скелета, замедление роста и повышенную гибель нейронов (рис. 13). Таким образом, миоинозитол-зависимый фермент Itpk1 необходим для адекватного развития нервной трубки и профилактики ДНТ (рис. 14) [26].

Фермент *фосфатидилинозитол-4-фосфат 5-киназа* (PIP5K, ген PIP5K1C) катализирует синтез одной из основных внутриклеточных сигнальных молекул – фосфатидил инозитол дифосфата (PIP2). Изоформа фермента PIP5K-γ необходима для развития сердечно-сосудистой и центральной нервной систем. Целенаправленная инактивация γ-изофермента PIP5K в эксперименте вызывала многочисленные нарушения роста клеток и развития тканей, в т. ч. приводящие к сердечной недостаточности (рис. 15), усилению гибели

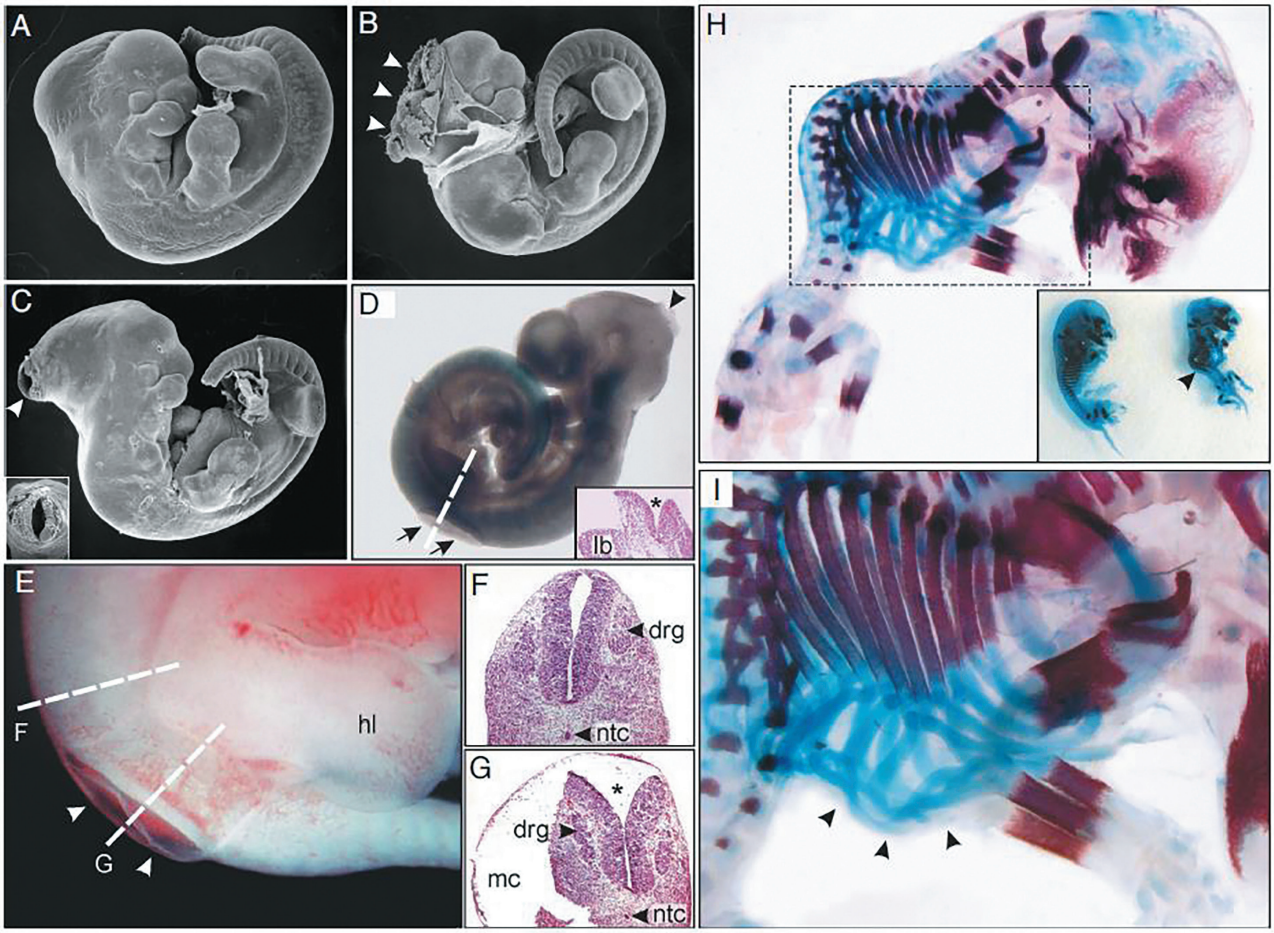


Рис. 13. ДНТ и осевые пороки развития скелета в эмбрионах, гомозиготных по инактивации гена Itpk1 (*инозитол 1,3,4-трифосфат 5/6-киназа,* данные [26]). (A-C) Сканирующие электронные микрофотографии эмбрионов на 11-е сутки (E11.5). A – нормальный эмбрион, (B, C) 2 представителя того же помёта с различной степенью экзенцефалии (стрелки). Вставка на панели C – открытая нервная трубка. (D) Xgal-окраска мест экспрессии дефектного гена *Itpk1* у эмбриона с экзэнцефалией (стрелка) и расщеплением позвоночника (стрелки). Пунктирная линия указывает на ориентацию среза ткани, показанной на вставке, звездочка на вставке указывает открытый конец нервной трубки. (E-G) Образующаяся миеломенингоцеле (E, стрелки) в эмбрионе E11.5. (F, G) Пунктирные линии указывали на ориентацию срезов ткани через неповреждённую часть нервной трубки (F) и открытую часть нервной трубки (G, звездочка). (H, I) Скелеты эмбрионов E14.5, окрашенные альциановым синим и ализарином красным для визуализации хряща и кости соответственно. Вставка на панели показывает другие эмбрионы помета, один из которых имеет кифосколиоз (стрелка). Обратите внимание на наличие неправильного сформированного ребра (наконечники стрел в I). *Обозначения:* drg – ганглии задних корешков; hl – задние конечности; lb – зачатки конечностей; mc – миелоцеле; ntc – хорда

нейронов и дефектам нервной трубки (рис. 16) [27].

Заключение

Ишемические повреждения ЦНС плода – основная причина многочисленных заболеваний нервной системы у новорождённых. На ранних сроках беременности хроническая ишемия ЦНС приводит к порокам развития мозга. Хроническая ишемия мозга плода на более поздних сроках ассоциирована с высоким риском асфиксии в родах, дискоординацией родовой деятельности; повышается риск пост-гипоксической энцефалопатии, т. н. «минимальной мозговой дисфункции» и детского церебрального паралича. Хроническая ишемия мозга плода усугубляется на фоне инсулинрезистентности и глюкозотолератности.

Миоинозитол необходим для синтеза инозитолфосфатов и фосфатидилинозитоловых липидов, которые опосредуют передачу сигнала от рецепторов ростовых факторов и нейротрансмиттеров внутрь клетки. Эти производные миоинозитола крайне важны для развивающегося мозга, т. к. обеспечивают адекватную коммуникацию между нейронами, снижают хроническую ишемию нейронов и противодействуют глюкозотолератности.

Представленные в работе результаты указывают на выраженный нейропротекторный эффект миоинози-

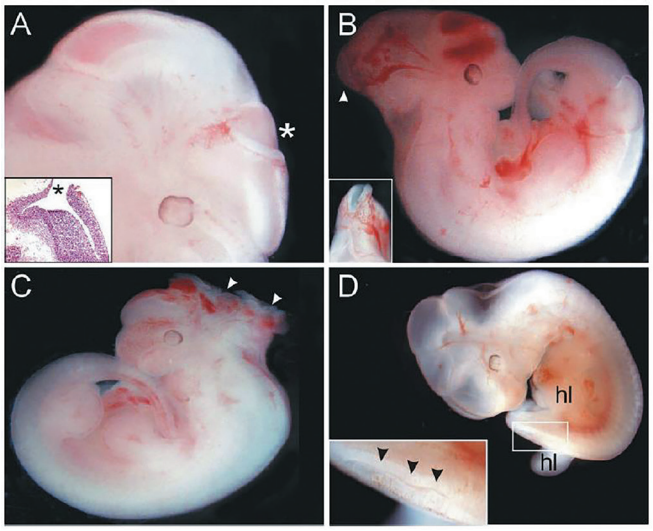


Рис. 14. ДНТ при делециях гена Itpk1 (данные [25]). (A) Экзэнцефалия эмбриона, 12-е сутки (E12.5). На вставке показана окраска эозином разреза открытой нервной трубки («*»). (B) Экзэнцефалия, 12-е сутки. На вставке показан дорсальный вид на открытую нервную трубку (стрелка). (C) Тяжёлая экзэнцефалия, 11-е сутки. (D) Расщеплённые задние конечности (hl) в сочетании с хвостовым ДНТ, 12-е сутки. Показана открытая и искривленная нервная трубка (стрелки)

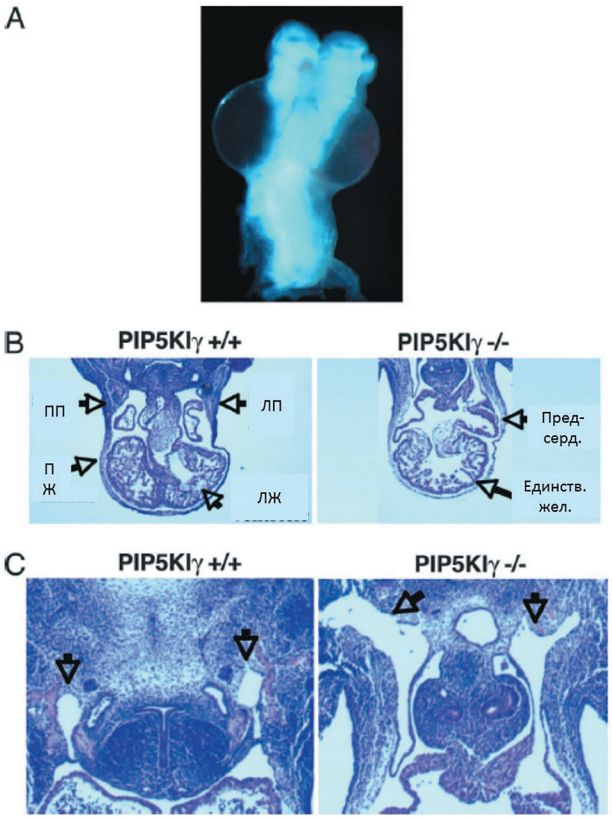


Рис. 15. Делеция гена PIP5K1C приводит к выраженным сердечно-сосудистым дефектам эмбрионов (данные [27]) – перикардиту (A, вид спереди), единственному желудочку (B), увеличенным кардинальным венам (C, стрелки)

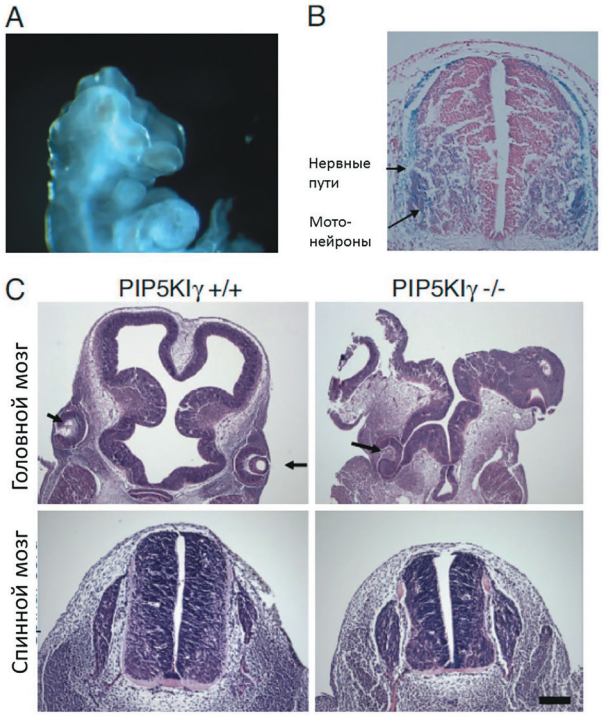


Рис. 16. Нейрональные дефекты при делециях гена PIP5K1C в эксперименте (данные [27])

Примечания: (A) У PIP5K-нулевых эмбрионов нейроэпителий не может закрыться. (B) Распределение экспресии гена PIP5K1C по спинному мозгу эмбриона. Окрашивание показывает, что PIP5K1C наиболее экспрессирован в моторных нейронах и развивающиеся восходящих и нисходящих нервных путей спинного мозга. (C) Сечения конечного мозга (вверху) и промежуточного мозга (внизу) эмбрионов E10.5 на уровне глаз (стрелки). Контрольный эмбриона отображает нормальное развитие (слева). Делеция *PIP5K1C* (справа) приводит к незакрыванию нервной трубки и аномально структурированному нейроэпителию. Хотя при делеции *PIP5K1C* спинномозговой «шнур» имеет нормальную общую морфологию, он уменьшен по дорсовентральной оси и медиолатеральной толщине. Масштабная метка – 25 микрон.

тола на рост нейронов в культуре в условиях глутаматного стресса (повышение выживаемости нейронов, в среднем на +17%). Прямое нейропротекторное действие миоинозитола указывает на важность использования миоинозитола как для профилактики пороков развития, возникающих на ранних сроках беременности, так и для нейропротекции мозга плода на поздних сроках беременности. Подчеркнём, что в дотациях миоинозитола особенно нуждаются беременные с диетой, перегруженной углеводами, женщины с диабетом (в т. ч. гестационным), женщины, ранее родившие ребёнка с тем или иным пороком развития.

Работа выполнена при поддержке грантов 18-07-00929, 17-07-01419, 16-07-01133 РФФИ, эксперименты на культивированных зернистых нейронах мозжечка крыс выполнены по плановой теме ФГБНУ «Научный центр неврологии».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Громова Ольга Алексеевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN-код: 6317-9833
д. м. н, профессор, в. н. с., научный руководитель Института Фармакоинформатики, ФИЦ ИУ РАН, Москва

Калачева Алла Геннадьевна
ORCID ID: 0000-0001-6144-5781
SPIN-код: 4917-2391
к. м. н., доцент, доцент кафедры фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Торшин Иван Юрьевич
ORCID iD 0000-0002-2659-7998
SPIN-код: 1375-1114
к. х. н., с. н. с., ФИЦ ИУ РАН, Москва; с. н. с., МГУ, Москва

Стельмашук Елена Викторовна
SPIN-код: 7884-9625
д. б. н. ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейроцитологии отдела исследований мозга ФГБУ «Научный Центр Неврологии» Минобрнауки России

Генрихс Елизавета Евгеньевна
SPIN-код: 8722-6305
к. б. н. научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейроцитологии отдела исследований мозга ФГБУ «Научный Центр Неврологии» Минобрнауки России

Александрова Ольга Петровна
SPIN-код: 2705-7186
к. б. н. научный сотрудник лаборатории экспериментальной нейроцитологии отдела исследований мозга ФГБУ «Научный Центр Неврологии» Минобрнауки России

Хаспеков Леонид Георгиевич
ORCID ID: 0000-0002-6652-9412
SPIN-код: 5112-5038
д. б. н. зав. лабораторией экспериментальной нейроцитологии ФГБУ «Научный Центр Неврологии» Минобрнауки России

Gromova Olga
Corresponding author
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN code: 6317-9833
DM, professor, Institute of pharmacoinformatics FRC CSC RAS, Moscow

Kalacheva Alla
ORCID ID: 0000-0001-6144-5781
SPIN code: 4917-2391
assistant professor, Department of pharmacology FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Torshin Ivan
ORCID iD 0000-0002-2659-7998
SPIN code: 1375-1114
Candidate of Chemical Sciences, Senior researcher in of Institute of Pharmacoinformatics at the Department of Intellectual Systems FRC CSC RAS, Moscow; Senior Research Officer MSU, Moscow

Stelmashook Elena
SPIN code: 7884-9625
Ph.D., MBA, leading researcher, laboratory of experimental neurocytology, Brain Research Department, Research Center of Neurology, Moscow

Genrikhs Elizaveta
SPIN code: 8722-6305
Ph.D., Senior researcher, laboratory of experimental neurocytology, Brain Research Department, Research Center of Neurology, Moscow

Alexandrova Olga
SPIN code: 2705-7186
Ph.D, researcher, Brain Research Department, laboratory of experimental neurocytology, Research Center of Neurology, Moscow

Khaspekov Leonid
ORCID ID: 0000-0002-6652-9412
SPIN code: 5112-5038
Ph.D., MBA, laboratory of experimental neurocytology, Brain Research Department, Research Center of Neurology, Moscow

Литература / References

1. Здравоохранение в России. 2017: Стат.сб./Росстат. ISBN 978-5-89476-448-1, –М.: 2017, 170 с
2. Лиманова О.А., Громова О.А., Торшин И.Ю., и др. Систематический анализ молекулярно-физиологических эффектов мио-инозитола: данные молекулярной биологии, экспериментальной и клинической медицины // *Эффективная фармакотерапия*. –2013;28 с. 32-41. [Limanova OA, Gromova OA, Torshin IYu, et al. Systematic analysis of molecular mechanisms and physiological effects of myo-inositol: findings of molecular biology, experimental and clinical medicine. *Effektivnaya farmakoterapiya*. 2013;28:32-41. (In Russ).]
3. Larner J. D-chiro-inositol--its functional role in insulin action and its deficit in insulin resistance. *Int J Exp Diabetes Res*. 2002;3(1):47-60.
4. Rapiejko PJ, Northup JK, Evans T, et al. G-proteins of fat-cells. Role in hormonal regulation of intracellular inositol 1,4,5-trisphosphate. *Biochem J*. 1986;240(1):35-40.
5. Fu C, Xu J, Cheng W, et al. Neuronal migration is mediated by inositol hexakisphosphate kinase 1 via α-actinin and focal adhesion kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Feb 21;114(8):2036-2041. DOI: 10.1073/pnas.1700165114.
6. Walecki J, Barcikowska M, Cwikla JB, Gabryelewicz T. N-acetylaspartate, choline, myoinositol, glutamine and glutamate (glx) concentration changes in proton MR spectroscopy (1H MRS) in patients with mild cognitive impairment (MCI). *Med Sci Monit*. 2011;17(12):MT105-MT111.
7. Coupland NJ, Ogilvie CJ, Hegadoren KM, et al. Decreased prefrontal Myo-inositol in major depressive disorder. *Biol Psychiatry*. 2005;57(12):1526-34. DOI: 10.1016/j.biopsych.2005.02.027.
8. Holub BJ. Metabolism and function of myo-inositol and inositol phospholipids. *Annu Rev Nutr*. 1986;6:563-97.
9. Андреева Н.А., Стельмашук Е.В., Исаев Н.К., и др. Нейропротекторные эффекты ноотропного дипептида ГВС-111 при кислородно-глюкозной депривации, глутаматной токсичности и оксидатовном стрессе *in vitro* // *Бюлл. эксперим. биол. мед*. –2000. –Т130(10). –С.418-421. [Andreeva NA, Stel'mashuk EV, Isaev NK, et al. Nejroprotektornye ehffekty nootropnogo dipeptida GVS-111 pri kislorodno-glyukoznoj deprivacii, glutamatnoj toksichnosti i oksidatovnom stresse in vitro/ *Byull. ehksperim. biol. med*. 2000;130(10):418-421 (In Russ).]
10. Стельмашук Е.В., Новикова С.В., Исаев Н.К. Влияние глутамина на гибель культивированных зернистых нейронов, индуцированную глюкозной депривацией и химической гипоксией // *Биохимия*. –2010. –Т. 75(8). –С.1150-1156. [Stel'mashuk EV, Novikova SV, Isaev NK. Vliyanie glutamina na gibel' kul'tivirovannyh zernistyh nejronov, inducirovannuyu glyukoznoj deprivaciej i himicheskoj gipoksiej. *Biochemistry*. 2010; 75(8):1150-1156. (In Russ).]
11. Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В., и др. Фармакокинетический и фармакодинамический синергизм между нейропептидами и литием в реализации нейротрофического и нейропротективного действия церебролизина // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С.Корсакова*. –2015. –Т. 115(3). –С. 65-72. [Gromova OA, Torshin IYu, Gogoleva IV, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic synergism between neuropeptides and lithium in the neurotrophic and neuroprotective action of cerebrolysin. *Zhurnal nevrologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2015;115(3):65-72. (In Russ).] DOI: 10.17116/jnevro20151153165-72
12. Guo MF, Yu JZ, Ma CG. Mechanisms related to neuron injury and death in cerebral hypoxic ischaemia. *Folia Neuropathol*. 2011;49(2):78-87.
13. Ганнушкина И.В., Шафранова В.П., Рясина Т.В. *Функциональная ангиоархитектоника головного мозга* / АМН СССР –М.: Медицина. –1977. –240 с. [Gannushkina IV, Shafranova VP, Ryasina TV. *Funkcional'naya angioarhitektonika golovnogo mozga* / AMN SSSR Moscow: Medicina. 1977:240. (In Russ).]
14. Hernandez-Fonseca K, Cardenas-Rodmguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L. Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *J Neurosci Res*. 2008;86(8):1768-1780.
15. Громова О.А., Торшин И.Ю. Мультимодальный эффект церебролизина против воинствующего редукционизма. *Неврологический вестник*. –2008. –3. –С.83-91. [Gromova OA, Torshin IYu. Multimodal effect of Cerebrolysin versus aggressing reductionalism. *Nevrologicheskii vestnik*. 2008;3:83-91. (In Russ).]
16. Cavalli P, Tonni G, Grosso E, Poggiani C. Effects of inositol supplementation in a cohort of mothers at risk of producing an NTD pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2011 Nov;91(11):962-5. doi: 10.1002/bdra.22853. Epub 2011 Sep 28.
17. Cavalli P, Tedoldi S, Riboli B. Inositol supplementation in pregnancies at risk of apparently folate-resistant NTDs. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2008;82(7):540-2.
18. Beemster P, Groenen P, Steegers-Theunissen R. Involvement of inositol in reproduction. *Nutr Rev*. 2002;60(3):80-87.
19. Eriksson UJ, Wentzel P. Diabetic embryopathy. *Methods Mol Biol*. 2012;889:425-36.
20. Akashi M, Akazawa S, Akazawa M, et al. Effects of insulin and myo-inositol on embryo growth and development during early organogenesis in streptozocin-induced diabetic rats. *Diabetes*. 1991 Dec;40(12):1574-9.
21. Khandelwal M, Reece EA, Wu YK, Borenstein M. Dietary myo-inositol therapy in hyperglycemia-induced embryopathy. *Teratology*. 1998 Feb;57(2):79-84. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9926(199802)57:2<79::AID-TERA6>3.0.CO;2-1.
22. Copp AJ, Greene ND. Neural tube defects: Prevention by folic acid and other vitamins. *The Indian Journal of Pediatrics*. 2000;67(12):915-921.
23. Juriloff DM, Harris MJ. Mouse models for neural tube closure defects. *Hum Mol Genet*. 2000 Apr 12;9(6):993-1000.
24. Cogram P, Hynes A, Dunlevy LPE, et al. Specific isoforms of protein kinase C are essential for prevention of folate-resistant neural tube defects by inositol. *Hum Mol Genet*. 2004;13(1):7-14.
25. Majerus PW, Wilson DB, Zhang C, et al. Expression of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase (ITPK1) and its role in neural tube defects. *Adv Enzyme Regul*. 2010;50(1):365-72.
26. Wilson MP, Hugge C, Bielinska M, et al. Neural tube defects in mice with reduced levels of inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(24):9831-5.
27. Wang Y, Lian L, Golden JA, et al. PIP5KI gamma is required for cardiovascular and neuronal development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(28):11748-53.
28. Carlomagno G, Unfer V. Inositol safety: clinical evidences. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2011Aug;15(8):931-936.

Афобазол ослабляет индуцированную этанолом поведенческую сенсибилизацию у мышей DBA/2

Надорова А.В., Колик Л.Г.

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

Резюме. *Актуальность.* Неблагоприятные медицинские и социальные последствия злоупотребления алкоголем определяют актуальность поиска новых средств и методов эффективной профилактики и лечения алкоголизма. Значительным ограничением использования бензодиазепиновых анксиолитиков в терапии алкогольных расстройств является их способность потенцировать эффекты этанола. Ранее установлено, что оригинальный отечественный препарат афобазол, эффективный при лечении тревожных расстройств, в диапазоне анксиолитических доз не влияет на продолжительность алкогольного наркоза и вызываемую этанолом миорелаксацию. *Цель.* Изучение действия афобазола на гиперлокомоторную реакцию и проявление поведенческой сенсибилизации, индуцированные этанолом. *Методы.* В опытах *in vivo* с использованием актометра OPTO-VARIMEX 4 исследовано влияние афобазола в дозах 1,0 и 10,0 мг/кг, в/б, на обусловленную этанолом в дозе 2,0 г/кг, в/б, стимуляцию поведения и сформированную поведенческую сенсибилизацию у инбредных мышей линии DBA/2, обладающих повышенной чувствительностью к активирующему действию этанола. *Результаты.* Афобазол в дозе 10,0 мг/кг, но не 1,0 мг/кг при однократном введении предупреждал этанол-индуцированную гиперлокомоторную реакцию, подобно налоксону 1,0 мг/кг, в/б, и препятствовал проявлению вызываемой этанолом поведенческой сенсибилизации. *Заключение.* Полученные данные позволяют предположить модулирующее влияние афобазола на формирование алкогольной мотивации при моделировании экспериментального алкоголизма.

Ключевые слова: этанол; афобазол; гиперлокомоторная активность; поведенческая сенсибилизация; мыши DBA/2

Для цитирования:
Надорова А.В., Колик Л.Г. Афобазол ослабляет индуцированную этанолом поведенческую сенсибилизацию у мышей DBA/2 // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.21–26. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10019.

Afobazole inhibits ethanol-induced behavioral sensitization in DBA/2 mice

Nadorova A.V., Kolik L.G.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Background.* Adverse medical and social consequences of alcohol abuse determine the relevance of the search for new targets and methods of effective prevention and treatment of alcoholism. A significant limitation of the use of benzodiazepine anxiolytics in the treatment of alcohol disorders is their ability to potentiate the effects of ethanol. Earlier it was found that the original afobazol, effective in the treatment of anxiety disorders, in the range of anxiolytic doses does not affect the duration of alcoholic sleep and ethanol-induced muscle relaxation. *The aim* of the present work was to investigate the effects of afobazole on hyperlocomotion and expression of behavioral sensitization induced by ethanol. *Methods.* The effect of afobazole at the doses 1.0 and 10.0 mg/kg, i.p., on the ethanol-induced hyperlocomotion and behavioral sensitization was assessed in actometer OPTO-VARIMEX in male DBA/2 mice with increased sensitivity to the activating effect of ethanol. *Results.* Afobazole at a dose of 10.0 mg/kg, but not 1.0 mg/kg after acute administration prevented the development of ethanol-induced (2.0 g/kg, i.p.) hyperlocomotion, like naloxone 1.0 mg/kg, i.p., and antagonized ethanol-induced behavioral sensitization. *Conclusion.* Thus, the data obtained suggest that afobazole is capable of modeling the motivational effects of ethanol.

Keywords: ethanol; afobazole; hyperlocomotion; behavioral sensitization; DBA/2 mice

For citations:
Nadorova AV, Kolik LG. Afobazole inhibits ethanol-induced behavioral sensitization in DBA/2 mice. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;3:21–26. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10019.

Введение

По данным ВОЗ, чрезмерное потребление алкоголя служит третьей причиной глобального бремени болезней и относится к ведущим факторам уменьшения продолжительности жизни и повышения смертности населения. Неблагоприятные медицинские и социальные последствия злоупотребления алкоголем определяют актуальность поиска новых средств и методов эффективной профилактики и лечения алкоголизма.

В соответствии с теорией побудительной сенсибилизации [1], аддиктивные состояния возникают вследствие вызываемой психоактивными веществами (ПАВ) гиперчувствительности в мезокортикальных системах головного мозга. При многократном действии этанола наблюдается развитие поведенче-

ской психомоторной сенсибилизации, которая играет важную роль в формировании алкогольной зависимости [2]. Повышенная чувствительность некоторых линий мышей к развитию этанол-индуцированной сенсибилизации сравнивается с аналогичным наблюдением в популяциях людей с высоким риском развития алкогольной зависимости [3]. Несмотря на то, что физиологические механизмы развития двигательной сенсибилизации остаются до конца неясными, предполагается, что она связана с определёнными нейропластическими изменениями, обусловленными многократным действием алкоголя.

Психомоторная активация отражает включение стимулирующих систем мозга, в том числе дофаминергической системы, и может быть использована как подтверждение гиперчувствительности соответствующих мотивационных цепей, которые и выполняют основную роль в формировании аддиктивного влечения к ПАВ. У мышей этанол в низких и умеренных дозах вызывает стимуляцию двигательной активности, что, по мнению ряда авторов, имитирует алкоголь-индуцированную эйфорию у людей [4, 5].

В комплексной медикаментозной терапии алкоголизма важное место занимают анксиолитики бензодиазепинового ряда, временно купирующие проявления психопатологической симптоматики, возникающей на фоне абстинентного синдрома. Однако значительным ограничением их использования в фармакотерапии алкогольных расстройств является их способность потенцировать эффекты этанола. С другой стороны, ранее установлено, что оригинальный отечественный препарат афобазол, эффективный при лечении тревожных расстройств [6], в диапазоне анксиолитических доз 1,0–5,0 мг/кг при однократном введении не влияет на продолжительность алкогольного наркоза и не влияет на миорелаксацию, индуцированную этанолом [7].

В данной работе изучено действие афобазола при однократном введении на вызванную этанолом гиперлокомоторную реакцию и проявление поведенческой сенсибилизации.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на инбредных мышах-самцах линии DBA/2 (n = 158, масса тела 18-22 г) и беспородных белых крысах-самцах (n = 44, масса 200-250 г) (ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая»). Мышей содержали по 10-12 особей в клетке (370 х 200 х 150 мм) в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при регулируемом световом режиме 12 ч/12 ч (свет/темнота) и постоянной температуре (21-23 ˚С) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 суток до начала тестирования. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России №199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (виварием)» от 29 августа 2014 г. №51. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Афобазол (субстанция, синтезированная в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова) в дозах 1,0 и 10,0 мг/кг, налоксон гидрохлорид (Sigma Aldrich) в дозе 1,0 мг/кг и этанол, 20 % р-р (ООО «Главспирт») в дозе 2,0 г/кг для мышей и в дозах 0,5; 0,75; 1,5 г/кг для крыс растворяли в воде для инъекций. Все вещества вводили внутрибрюшинно (в/б) из расчёта: мышам – 0,1 мл/10 г; крысам объём 20 % раствора этанола вводили соответственно дозе и весу животного. Животным из контрольных групп вводили воду для инъекций в эквивалентных объёмах. Выбор доз афобазола для исследования основан на ранее полученных данных о способности афобазола ослаблять эффекты морфина в опытах *in vivo* [8].

Тест «Стимуляция двигательной активности этанолом»

Двигательную активность мышей и крыс регистрировали в актометре OPTO-VARIMEX 4 (Columbus Instruments, USA), оснащённом 8 парами ИК-датчиков на высоте 1,27 см от пола, расположенных по периметру 40х40 см экспериментальной установки, при естественном освещении в течение 10 минут. Сразу после введения этанола (крысам – в дозах 0,5; 0,75; 1,5 г/кг и мышам – в дозе 2,0 г/кг в виде 20 % раствора, в/б) животных помещали в OPTO-VARIMEX 4 и автоматически фиксировали общее расстояние (в см), пройдённое животными. Исследуемые препараты вводили за 30 мин до инъекции этанола. Для оценки влияния афобазола на формирование и проявление двигательной сенсибилизации, индуцированной этанолом, использовали описанные ранее схемы эксперимента [7, 9].

Тест «Двигательная сенсибилизация, индуцированная этанолом»

Для оценки влияния афобазола на проявление двигательной сенсибилизации, индуцированной этанолом, использовали описанную ранее 15-днев-

ную схему эксперимента [9]: 0-й день – определение базового уровня двигательной активности мышей; с 1-го по 9-й день – формирование поведенческой сенсибилизации (этанол в дозе 2,0 г/кг/день, в/б); с 10-го по 14-й день – отмена этанола; 15-й день – проявление сенсибилизации (регистрация двигательной активности после предъявления этанола в тест-дозе 2,0 г/кг, в/б). Регистрировали двигательную активность у животных на 0 (фон), 1, 9, 14 и 15-й дни в течение 10 мин. Афобазол в дозе 10,0 мг/кг вводили однократно на 15-й день эксперимента за 30 мин до тест-дозы этанола. Способность фармакологических агентов ослаблять проявление поведенческой сенсибилизации, вызываемой этанолом, может указывать на влияние изучаемых веществ на подкрепляющие свойства этанола.

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим применением критерия Дункана, а также t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни. Данные графиков представлены в виде средних значений и стандартной ошибки среднего.

Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования было необходимо выбрать адекватную биологическую модель для оценки острых эффектов этанола на двигательную активность животных. Большинство исследований по изучению активности афобазола в отношении алкогольного поведения ранее проведены на беспородных и инбредных крысах [7], поэтому сначала для эксперимента были выбраны беспородные крысы. Животных после введения 20 % раствора этанола в дозах 0,5; 0,75 и 1,5 г/кг, в/б, сразу помещали в актометр на 10 мин для регистрации спонтанной двигательной активности. Показано, что в диапазоне низких (анксиолитических) доз этанол вызывал дозозависимое снижение двигательной активности у крыс (рис. 1). Статистически значимое уменьшение пройдённого расстояния отмечалось начиная с дозы 0,75 г/кг, а максимальное угнетение локомоторной реакции наблюдалось под действием этанола в дозе 1,5 г/кг ($p < 0,001$). Подобное седативное действие, а также выраженная атаксия и нарушение координации движений, возникающие под действием низких доз этанола у беспородных взрослых крыс, описаны в работе *Chuck TC, et al.* (2006). Авторы отмечают значительное угнетение локомоторной реакции при действии этанола уже начиная с дозы 0,25 г/кг [10]. С другой стороны, имеются единичные доказательства стимулирующих свойств этанола в дозе 2,0 г/кг, полученные на беспородных крысах в подростковом возрасте (постнатальный период 32 дня) [11]. Таким образом, полученные результаты указывают на неадекватность данной биологической модели поставленным целям исследования, поскольку использование крыс (постнатальный период 65-70 дней) из беспородной популяции не позволяет выявить фармакологический эффект этанола – стимуляцию двигательной активности.

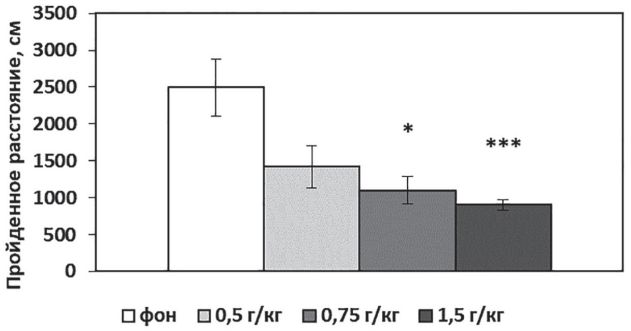


Рис. 1. Оценка острого эффекта этанола на спонтанную двигательную активность беспородных крыс-самцов. M±SEM

Примечания: $p < 0,05$, *** – $p < 0,001$ по отношению к фоновой группе, согласно непараметрическому критерию Манна-Уитни; число животных в каждой группе $n = 11$.

На втором этапе исследований, опираясь на данные литературы, в эксперимент были включены инбредные мыши-самцы линии DBA/2, отличающиеся повышенной чувствительностью к формированию поведенческой сенсибилизации при повторном действии этанола [9, 12]. При предварительном (фоновом) тестировании мышей линии DBA/2 в актометре показано, что базовый уровень двигательной активности животных из контрольных и опытных групп не отличается. Этанол при однократном введении в дозе 2,0 г/кг, в/б, вызывал у мышей DBA/2 статистически значимое увеличение двигательной активности в течение 10 минут наблюдения по сравнению с контрольной группой, получавшей воду для инъекций (рис. 2). Эти данные соответствует ранее опубликованным результатам, свидетельствующим о роли генотипа в формировании локомоторной сенсибилизации к этанолу и подчеркивающим феноменологическую особенность именно мышей линии DBA/2, которые, в отличие от мышей линии C57Bl/6, как в подростковом, так и во взрослом состоянии демонстрируют наиболее выраженную реакцию на стимулирующее действие этанола [12].

Оценка влияния афобазола на индуцированную этанолом двигательную активность

Опыты выполнены на интактных мышах-самцах линии DBA/2 ($n = 134$). Этанол в дозе 2,0 г/кг вызывал статистически значимое увеличение двигательной активности у мышей DBA/2 ($p < 0,05$) по сравнению

с контрольной группой (рис. 2). Афобазол в анксиолитической дозе 1,0 мг/кг, в/б, при отсутствии влияния на спонтанную двигательную активность животных *per se*, не изменял этанол-индуцированную гиперлокомоторную реакцию при предварительном введении. При увеличении дозы препарата до 10,0 мг/кг, в/б, афобазол *per se* вызывал активацию поведения мышей DBA/2 ($p < 0,05$), однако при предварительном введении препятствовал формированию этанол-индуцированной гиперлокомоторной реакции ($p < 0,05$) (см. рис. 2), что указывает на возможное взаимодействие афобазола в большой дозе с этанолом. Выбранный в качестве препарата сравнения налоксон в дозе 1,0 мг/кг, в/б, не обладая собственной психостимулирующей активностью, препятствовал формированию этанол-индуцированной гиперлокомоторной реакции ($p < 0,05$), как и афобазол (рис. 2).

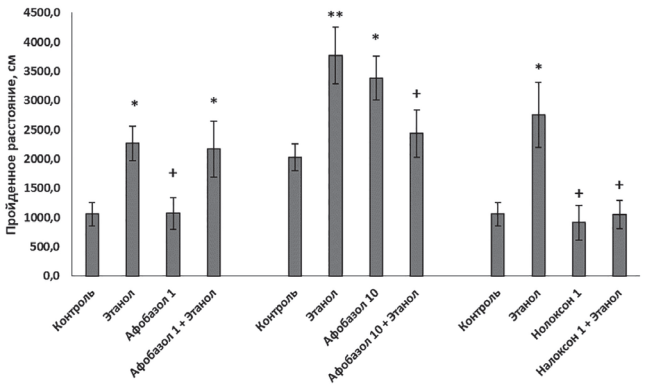


Рис. 2. Действие афобазола (1,0 и 10,0 мг/кг) и налоксона (1,0 мг/кг) на этанол-индуцированную гиперлокомоторную двигательную активность у мышей линии DBA/2 (M ± SEM)

Примечания: значения ANOVA для всех трёх экспериментов $p < 0,05$. * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$ – статистически значимо по отношению к соответствующей группе «Контроль»; + – $p < 0,05$ статистически значимо по отношению к соответствующей группе «Этанол» согласно критерию Дункана. Количество животных в каждой группе $n = 8 – 15$.

Оценка влияния афобазола на проявление поведенческой сенсибилизации, вызываемой этанолом

Опыты выполнены на мышах-самцах линии DBA/2 ($n = 24$) со сформированной двигательной сенсибилизацией. У мышей, получавших этанол с 1-го по 9-й дни, на 9-й день эксперимента при предъявлении тест-дозы этанола 2,0 г/кг, в/б, наблюдалась выраженная гиперлокомоторная реакция в обеих группах, которая превосходила двигательную активность в 1-й день эксперимента ($p < 0,01$). На 15-й день эксперимента после 5-дневного перерыва при предъявлении тест-дозы этанола 2,0 г/кг, в/б, в группе «контроль» также наблюдалась выраженная гиперлокомоторная реакция ($p < 0,001$), что доказывает развитие гиперчувствительности к этанолу. Афобазол в эффективной дозе 10,0 мг/кг, в/б, препятствующей формированию этанол-индуцированной гиперлокомоторной реакции, при однократном введении статистически значимо ($p < 0,05$) блокировал проявление двигательной сенсибилизации, вызываемой этанолом на 15-й день (рис. 3).

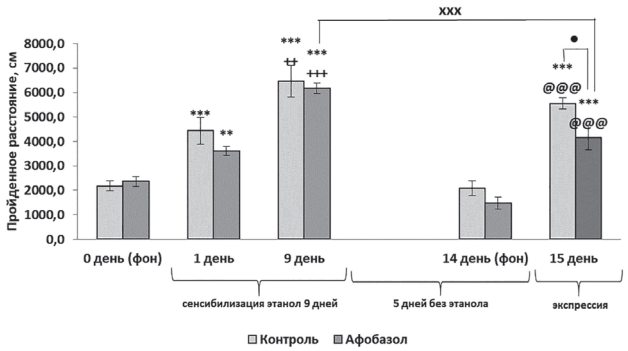


Рис. 3. Действие афобазола (10,0 мг/кг) при однократном введении (15-й день эксперимента) на проявление этанол-индуцированной сенсибилизации у мышей линии DBA/2 (M ± SEM)

Примечания: ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$ – статистически значимо по отношению к соответствующей точке «0-й день (фон)»; ++ – $p < 0,01$, +++ – $p < 0,001$ – статистически значимо по отношению к соответствующей точке «1-й день»; @@@ – $p < 0,001$ – статистически значимо по отношению к соответствующей точке «14-й день (фон)» согласно критерию Дункана. Значения ANOVA для экспериментов $p < 0,001$; xxx – $p < 0,001$ – статистически значимо между соответствующими точками «9-й день» и «15-й день» согласно критерию Дункана. Значения ANOVA – $p < 0,001$. ● – $p < 0,05$ – статистически значимо между группами «Контроль» и «Афобазол» согласно t-критерию Стьюдента. По оси абсцисс – дни эксперимента. Количество животных в каждой группе $n = 12$.

Ранее нами была показана способность неселективного антагониста опиоидных рецепторов налоксона в дозе 1,0 мг/кг, в/б, блокировать индуцированную этанолом гиперлокомоторную реакцию у мышей DBA/2 [9], что согласуется с полученными в настоящей работе данными.

Афобазол, одной из рецепторных мишеней которого являются σ1-рецепторы [13–15], в анксиолитической дозе не оказывал влияния на этанол-индуцированную гиперлокомоторную реакцию у мышей DBA/2, подобно другим агонистам σ1-рецепторов [16]. При увеличении дозы афобазола в 10 раз наблюдалось статистически значимое ослабление вызванной этанолом стимуляции двигательной активности мышей DBA/2, что может быть обусловлено вовлечением иных механизмов действия афобазола, в частности MT1 и MT3 рецепторов [14].

В настоящем исследовании впервые установлена способность афобазола купировать проявление (экспрессию) сформированной поведенческой сенсибилизации к этанолу. Информации о роли σ1-рецепторов в развитии этанол-индуцированной поведенческой сенсибилизации (ЭИПС) нет, однако известно, что вызываемое при повторных введениях кокаина прогрессивное увеличение экспрессии гена σ1-рецепторов, совпадающее с устойчивым увеличением двигательной активности у мышей, наблюдается в отделах мозга, ответственных за формирование аддиктивных состояний. Кроме того, блокада σ1-рецепторов приводит к ослаблению описанных выше молекулярных адаптаций и кокаин-индуцированной поведенческой сенсибилизации [17], поэтому гипотеза о возможности афобазола купировать ЭИПС за счёт взаимодействия с σ1-рецепторами представляется маловероятной.

Имеются объективные доказательства того, что мелатонин модифицирует физиологический и поведенческий ответ на действие психостимуляторов, при этом установлена роль MT1 и MT2-рецепторов мелатонина в формировании метамфетамин-индуцированной поведенческой сенсибилизации. Показано, что даже после однократного введения метамфетамина через 8 дней при предъявлении тест-дозы метамфетамина наблюдалось статистически значимое увеличение двигательной активности у мышей с высокой экспрессией мелатонина C3H/HeN и низкой экспрессией мелатонина C57BL/6, но не у мышей-нокаутов по MT1-рецептору [18], что позволяет рассматривать MT1-рецепторы как новую перспективную мишень для фармакологической коррекции состояний лекарственной зависимости.

С другой стороны, на мышах-нокаутах установлена роль α1-субъединицы ГАМКА-рецептора в стимуляции поведения при остром введении этанола [19], а в ряде публикаций двигательная сенсибилизация в ответ на многократные введения этанола у мышей DBA/2 ассоциируется с изменениями экспрессии генов субъединиц ГАМКА-рецептора и чувствительности к ГАМК-ергическим препаратам [20]. Учитывая модулирующее действие афобазола на ГАМК-ергическую систему [21], нельзя исключить, что его ослабление проявления поведенческой сенсибилизации, вызываемой этанолом, в определённой степени связаны с регуляторным влиянием на ГАМК-систему.

Учитывая полученные результаты о взаимодействии афобазола с этанолом на модели поведенческой сенсибилизации, представляется целесообразным продолжить исследования афобазола на других моделях лекарственной зависимости. Таким образом, в ходе выполненных исследований была установлена способность афобазола в дозе 10,0 мг/кг при однократном системном введении предупреждать этанол-индуцированную стимулирующую реакцию и препятствовать проявлению вызываемой этанолом поведенческой сенсибилизации.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Участие авторов. Надорова А.В. – выполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Колик Л.Г. – постановка задачи, написание текста, редактирование, финальное утверждение.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Надорова Анна Владимировна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: av-nadorova@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-0463-2190
н. с. лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Колик Лариса Геннадьевна
ORCID ID: 0000-0002-9847-8058
д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Nadorova Anna
Corresponding author
e-mail: av-nadorova@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-0463-2190
Research Officer, Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Kolik Larisa
ORCID ID: 0000-0002-9847-8058
Grand PhD in Biological Sciences, Professor of RAS, head Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1993 Sep-Dec;18(3):247–91.
2. Kim AK, Souza-Formigoni ML. Alpha1-adrenergic drugs affect the development and expression of ethanol-induced behavioral sensitization. *Behav Brain Res.* 2013 Nov 1;256:646–54. DOI: 10.1016/j.bbr.2013.09.015
3. Newlin DB, Thomson JB. Chronic tolerance and sensitization to alcohol in sons of alcoholics. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1991 Jun;15(3):399–405.
4. Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev.* 1987 Oct;94(4):469–92.
5. Koob GF. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 May;13(5):177–84.
6. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Чумаков Д.В., Маметова Л.Э. Новый селективный анксиолитик афобазол // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. – 2005. – Т.105. – №4. – С.35–40. [Neznamov GG, Siuniakov SA, Chumakov DV, Mametova LE. Novyj selektivnyj anksiolitik afobazol. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2005;105(4):35–40. (In Russ).]
7. Виглинская И.В., Середенин С.Б., Колик Л.Г. Исследование потребления этанола и антиалкогольных эффектов афобазола у MR и MNRA крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2000. – Т.63. – №3. – С.52–54. [Viglinskaia IV, Seredenin SB, Kolik LG. Issledovanie potrebleniya ehtanola i antialkogol'nykh ehffektov afobazola u MR i MNRA krys. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2000;63(3):52–54. (In Russ).]
8. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. Влияние афобазола на антиноцицептивные свойства морфина // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2009. – Т.72. – №1. – С.22–23. [Kolik LG, Zhukov VN, Seredenin SB. Vliyanie afobazola na antinotsitseptivnye svojstva morfina. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009;72(1):22–23. (In Russ).]
9. Колик Л.Г., Надорова А.В., Середенин С.Б. Селанк ослабляет индуцированную этанолом гиперлокомоторную реакцию и проявление поведенческой сенсибилизации у мышей линии DBA/2 // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2016. – Т.161. – №7. – С.67–71. [Kolik LG, Nadorova AV, Seredenin SB. Selank inhibits ethanol-induced hyperlocomotion and manifestation of behavioral sensitization in DBA/2 mice. *Bull Exp Biol Med*. 2016;161(1): 67–71. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-016-3544-6
10. Chuck TL, McLaughlin PJ, Arizzi-LaFrance MN, et al. Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. *Life Sci.* 2006 Jun 6;79(2):154–61. DOI: 10.1016/j.lfs.2005.12.045
11. Pautassi RM, Nizhnikov ME, Acevedo MB, Spear NE. Naloxone blocks ethanol-mediated appetitive conditioning and locomotor activation in adolescent rats. *Behav Brain Res.* 2011 Jan 1;216(1):262–9. DOI: 10.1016/j.bbr.2010.08.005
12. Melyn LC, Boehm SL 2nd. Role of genotype in the development of locomotor sensitization to alcohol in adult and adolescent mice: comparison of the DBA/2J and C57BL/6J inbred mouse strains. *Alcohol Clin Exp Res.* 2011 Jul;35(7):1351–60. DOI: 10.1111/j.1530-0277.2011.01471.x
13. Середенин С.Б., Антипова Т.А., Воронин М.В., и др. Взаимодействие афобазола с σ1-рецепторами // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2009. – Т.148. – №7. – С.53–55. [Seredenin SB, Antipova TA, Voronin MV, et al. Interaction of afobazole with sigma1-receptors. *Bull Exp Biol Med*. 2009;148(7):53–55. (In Russ).]
14. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2009. – Т.72. – №1. – С.3–11. [Seredenin SB, Voronin MV. Nejroretseptornye mekhanizmy dejstviya afobazola. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009;72(1):3–11. (In Russ).]
15. Абрамова Е.В., Воронин М.В., Середенин С.Б. Радиолигандный анализ σ1 рецепторов в P2 и P3 фракциях головного мозга мышей в условиях эмоционального стресса и при введении афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2017. – Т.80. – №2. – С.3–7. [Abramova EV, Voronin MV, Seredenin SB. Radioligandnyj analiz σ1 retseptorov v P2 i P3 fraktsiyakh golovnogo mozga myshej v usloviyakh ehmotsional'nogo stressa i pri vvedenii afobazola. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2017;80(2):3–7. (In Russ).]. DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2017-80-2-3-7
16. Maurice T, Casalino M, Lacroix M, Romieu P. Involvement of the sigma 1 receptor in the motivational effects of ethanol in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2003 Mar;74(4):869–76.
17. Liu Y, Matsumoto RR. Alterations in fos-related antigen 2 and sigma1 receptor gene and protein expression are associated with the development of cocaine-induced behavioral sensitization: time course and regional distribution studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008 Oct;327(1):187–95. DOI: 10.1124/jpet.108.141051
18. Hutchinson AJ, Ma J, Liu J, Hudson RL, Dubocovich ML. Role of MT1 melatonin receptors in methamphetamine-induced locomotor sensitization in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2014 Jan;231(1):257–67. DOI: 10.1007/s00213-013-3228-0
19. June HL Sr, Foster KL, Eiler WJ 2nd, et al. Dopamine and benzodiazepine-dependent mechanisms regulate the EtOH-enhanced locomotor stimulation in the GABAA alpha1 subunit null mutant mice. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Jan;32(1):137–52. DOI: 10.1038/sj.npp.1301097
20. Linsenbardt DN, Boehm SL 2nd. Ethanol-induced locomotor sensitization in DBA/2J mice is associated with alterations in GABA(A) subunit gene expression and behavioral sensitivity to GABA(A) acting drugs. *Pharmacol Biochem Behav*. 2010 May;95(3):359–66. DOI: 10.1016/j.pbb.2010.02.014
21. Калинина Т.С., Шимширт А.А., Волкова А.В., и др. Влияние анксиолитиков на тревожные реакции, обусловленные блокадой ГАМК-рецепторов, у крыс Вистар и мышей инбредных линий BALB/c и C57BL/6 // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2016. – Т.79. – №10. – С.3–7. [Kalinina TS, Shimshirt AA, Volkova AV, et al. Anxiolytic effects of diazepam and afobazole on the anxiety response evoked by gaba a receptor blockade in wistar rats and inbred mice of balb/c and c57bl/6 strains. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2016;79(10):3–7. (In Russ).]. DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2016-79-10-3-7

Метаболит афобазола М-11 ингибирует хинон-редуктазу-2

Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б.

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

Резюме. *Актуальность.* Ингибирование хинон-редуктазы-2 (NQO2) является перспективным для достижения нейропротекторного действия. Анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) и его метаболит М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид) взаимодействуют с регуляторным мелатонин-зависимым сайтом NQO2. Ранее нами показано, что афобазол ингибирует фермент. Влияние М-11 на NQO2 не изучено. *Цель.* Изучить действие метаболита афобазола М-11 на активность NQO2. *Методы.* Влияние М-11 на активность человеческого рекомбинантного фермента хинон-редуктаза-2 (hNQO2) исследовали методом флуоресцентной спектроскопии. *Результаты.* Установлено, что М-11 ингибирует hNQO2 в концентрациях 0,5 и 1,0 мМ, снижая скорость реакции на 12 и 24 % соответственно. В этих же концентрациях соединение М-11 уступает действию афобазола. *Заключение.* Соединение М-11 ингибирует NQO2 и может использоваться для изучения фармакологических эффектов афобазола, обусловленных взаимодействием с регуляторным сайтом фермента.

Ключевые слова: метаболит афобазола; хинон-редуктаза-2; МТ3-рецептор

Для цитирования:
Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б. Метаболит афобазола М-11 ингибирует хинон-редуктазу-2 // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.27–30. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10020.

Afobazole metabolite M-11 inhibits quinone reductase 2

Kadnikov I.A., Voronin M.V., Seredenin S.B.

FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Objective.* Inhibition of quinone reductase 2 (NQO2) is a perspective target to achieve neuroprotective effect. Anxiolytic drug afobazole (5-Ethoxy-2-[2-(morpholino)-ethylthio]benzimidazole dihidrochloride) and its main metabolite M-11 (2-[2-(3-oxomorpholin-4-il)-ethylthio]-5-ethoxybenzimidazole hydrochloride) can interact with melatonin dependent regulatory site of NQO2. Previously we have figured that afobazole inhibits NQO2. However, the role of interaction between M-11 and NQO2 is unclear. *Aim.* To study the effect of M-11 on activity of NQO2. *Methods.* The influence of M-11 on activity of human recombinant NQO2 (hNQO2) was measured utilizing fluorescent spectroscopy. *Results.* M-11 inhibits hNQO2 in concentrations of 0.5 and 1.0 mM, decreasing enzymatic reaction velocity on 12 and 24 % respectively. In same concentrations, M-11 is inferior to afobazole. *Conclusion.* Compound M-11 inhibits NQO2 and can be used to study pharmacological effects of afobazole caused by interaction with regulatory site of enzyme.

Keywords: afobazole metabolite; NQO2; MT3 receptor

For citations:
Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Afobazole metabolite M-11 inhibits quinone reductase 2. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;3:27–30. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10020.

Введение

Фермент NQO2 является цитозольным флавопротеином [1], катализирующим двухэлектронное восстановление пара- и орто-хинонов. Субстратной специфичностью к NQO2 обладают эндогенные и экзогенные хиноны, такие как производные катехоламинов и менадион (витамин K_3) [2, 3]. У человека фермент экспрессируется в скелетных мышцах, почках, печени, лёгких, сердце, отделах головного мозга [4, 5]. Установлено, что NQO2 имеет мелатонин-зависимый регуляторный сайт (MT_3 рецептор) [6], а мелатонин ингибирует фермент [7]. Известно, что катализируемое NQO2 восстановление хинонов ведёт к образованию свободно-радикальных продуктов [8], а повышенная экспрессия фермента коррелирует с развитием болезни Альцгеймера [9] и идиопатической формы болезни Паркинсона [10]. В фармакологических экспериментах показано, что ингибирование NQO2 опосредует нейропротекторное влияние и стимулирует когнитивные функции [11, 12].

В предыдущих опытах установлено, что анксиолитик афобазол (5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид) и его основной метаболит М-11 (2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид) обладают лигандными свойствами к MT_3-рецептору с IC_{50} = $9{,}9*10^{-7}$ и $4{,}0*10^{-7}$ М соответственно [13]. Выявлено, что афобазол обладает ингибирующим действием на NQO2,

которое реализуется по смешанному типу, а значения K_i афобазола и мелатонина сопоставимы [14]. Взаимодействие М-11 с MT_3 рецептором позволяет предположить наличие у данного соединения ингибирующей активности по отношению к NQO2. Поэтому целью данного этапа исследований стало *in vitro* изучение влияния М-11 на активность рекомбинантного NQO2 человека в сравнении с афобазолом.

Материалы и методы

Химические реактивы

Сульфат аммония, 2-метилнафтален-1,4-дион (менадион), метанол, рекомбинантный фермент хинон-редуктаза-2 человека (hNQO2), 1xPBS (Sigma-Aldrich, США, Сент-Луис), 1-бензил-1,4-дигидроникотинамид (BNAH) (US Biological, США, Салем), 5-этокси-2-[2-(морфолино)-этилтио] бензимидазола дигидрохлорид (афобазол) и его основной метаболит 2-[2-(3-оксоморфолин-4-ил)-этилтио]-5-этоксибензимидазола гидрохлорид (М-11) (синтезированы в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»).

Определение скорости реакции катализируемой NQO2

Влияние М-11 на активность NQO2 изучали в диапазоне конечных концентраций 0,1–1,0 мМ методом флуоресцентной спектроскопии на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse (США, Санта-Клара). В качестве субстрата NQO2 использовали менадион в конечной концентрации 1,0 мМ. Флуоресцирующим агентом служил косубстрат фермента BNAH в конечной концентрации 0,75 мМ. Как препарат сравнения использовали афобазол в тех же конечных концентрациях, что и М-11 (0,1–1,0 мМ). Матричные растворы менадиона (30 мМ) и BNAH (22,5 мМ) готовили в метаноле и хранили при -20 °С. Матричные растворы М-11 (30 мМ) и афобазола (30 мМ) готовили в 1xPBS и хранили при 4 °С. Матричный раствор NQO2 (635 U) готовили в 2,78 М растворе сульфата аммония (1 мг NQO2/1 мл $(NH_4)_2SO_4$) и хранили при температуре -20 °С. Раствор NQO2 для ферментативной реакции готовили путём доведения 2,8 мкл матричного раствора до 100 мкл 2,78 М сульфатом аммония. Все рабочие растворы готовили в день эксперимента.

Ферментативную реакцию проводили в кювете для флуоресценции объёмом 100 мкл (длина оптического пути 1 см). Инкубационная среда содержала по 2 мкл матричных растворов менадиона, BNAH, афобазола или М-11 и 52 мкл 1xPBS. Реакцию инициировали добавлением в инкубационную среду 2 мкл рекомбинантного NQO2 человека для достижения конечной активности 0,1 U. Скорость реакции измеряли по убыванию флуоресценции BNAH при длине волны возбуждения 370 нм и длине волны испускания 450 нм в условиях постоянной температуры 37 °С. Все измерения проводили в 5 повторениях. Скорость ферментативной реакции определяли по убыванию интенсивности флуоресценции BNAH на прямом участке кривой и сопоставлением полученных данных с калибровочными значениями.

Математическая обработка результатов

Полученные экспериментальные данные были нормированы на единицу ферментативной активности. Оценку статистической значимости полученных результатов проводили с применением одностороннего дисперсионного анализа, критерий Холма-Шидака. Данные представлены в виде среднее ± стандартное отклонение. Для статистической обработки результатов и построения графиков использовали программный пакет GraphPad Prism version 5.02 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Результаты

В экспериментах показано, что скорость ферментативной реакции составляет 2,96 ± 0,141 мМ/мин. Основной метаболит афобазола М-11 снижает активность hNQO2 в концентрациях 0,5 мМ и 1,0 мМ до 2,6 ± 0,058 мМ/мин ($p = 0,02$) и 2,26 ± 0,056 мМ/мин ($p < 0,001$) соответственно (рис. 1). Установлена зависимость ингибирования hNQO2 от концентрации М-11 в инкубационной среде. А именно, М-11 в концентрации 1,0 мМ статистически значимо снижает активность hNQO2 в сравнении с концентрацией 0,5 мМ ($p = 0,03$) и 0,1 мМ ($p = 0,001$) (рис. 1). М-11 в концентрации 0,1 мМ не оказывает влияния на скорость реакции hNQO2 (2,86 ± 0,234 мМ/мин) в сравнении с контрольными значениями ($p = 0,32$) (рис. 1). М-11 уступает афобазолу в ингибирующем действии на hNQO2. Афобазол в концентрации 0,1 мМ снижает активность фермента до 2,52 ± 0,094 мМ/мин ($p = 0,003$) (рис. 1), статистически значимо уменьшая скорость реакции в сравнении с М-11 ($p = 0,01$). В концентрациях 0,5 мМ и 1,0 мМ афобазол снижал активность hNQO2 до 2,29 ± 0,085 ($p < 0,001$) и 1,73 ± 0,122 мМ/мин ($p < 0,001$), превосходя действие М-11 на 12 % ($p = 0,02$) и 24 % ($p = 0,001$) соответственно (рис. 1). Как и для М-11, для афобазола показана концентрационная зависимость скорости ферментативной реакции hNQO2. Афобазол в концентрации 1,0 мМ обладает большим ингибирующим действием, чем в концентрациях 0,1 мМ ($p < 0,001$) и 0,5 мМ ($p < 0,001$) (рис. 1). Влияние 0,5 мМ афобазола на активность hNQO2 статистически не отличается от его действия в концентрации 0,1 мМ ($p = 0,06$) (рис. 1).

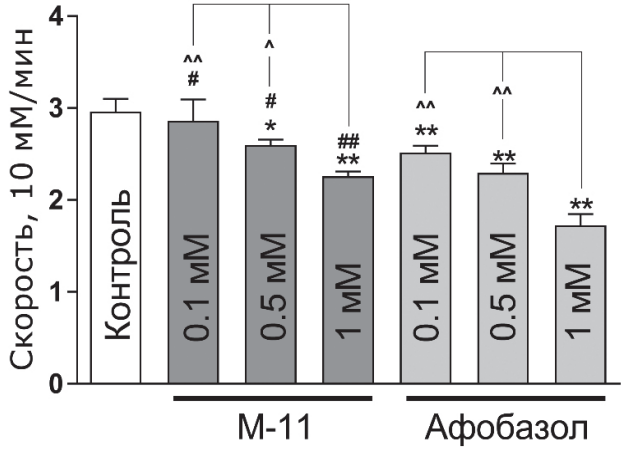


Рис. 1. Влияние афобазола и его основного метаболита М-11 на активность человеческого рекомбинантного фермента NQO2

Примечания: Данные представлены в виде M ± S.D., $n = 5$. * – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,05$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ** – статистически значимые различия по сравнению с контролем ($p < 0,01$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). # – статистически значимые различия между эффектами афобазола и М-11 в идентичной концентрации ($p < 0,05$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ## – статистически значимые различия между эффектами афобазола и М-11 в идентичной концентрации ($p < 0,01$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ^ – статистически значимые различия по сравнению с действием соединения в концентрации 1,0 мМ ($p < 0,05$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc). ^^ – статистически значимые различия по сравнению с действием соединения в концентрации 1,0 мМ ($p < 0,01$, ANOVA, Holm-Sidak post-hoc).

Обсуждение

Проведённое исследование подтвердило предположение об ингибирующем влиянии основного метаболита афобазола М-11 на активность hNQO2. Результаты экспериментов согласуются с выявленным ранее ингибированием hNQO2 [14] лигандами MT_3 - рецепторов афобазолом [13] и мелатонином [15] в использованной бесклеточной системе и соответствуют данным научной периодики, полученным для рекомбинантного hNQO2 в других экспериментальных условиях. Так, мелатонин и его производные, проявляющие селективные лигандные свойства к MT_3 рецептору в наномолярном диапазоне [7], ингибировали активность hNQO2 выделенной из клеток линии CHO-K1/hQR2 в микромолярных концентрациях [15]. В экспериментах *in vitro* и *ex vivo* показано ингибирующие действие на фермент других лигандов MT_3 рецептора разных химических групп, а именно флаваноидов ресвератрола [15] и кверцитина [16], производных бензимидазола TBB, TBBz и DMAT [17].

В нашей работе показано, что М-11 уступает в ингибирующей активности hNQO2 афобазолу. Из научной периодики известно, что вещества с более высоким сродством к MT_3 рецептору могут слабее ингибировать hNQO2 [7]. Различия во влиянии М-11 и афобазола на активность hNQO2 может быть связана с типом ингибирования фермента. Например, 2-йодомелатонин – конкурентный ингибитор NQO2 с высоким сродством к MT_3 рецептору слабее ингибирует фермент, чем действующее по бесконкурентному типу соединение S28128 с меньшей аффинностью к MT_3 рецептору [7]. Показано, что афобазол ингибирует hNQO2 по смешанному типу [14], однако полученные в настоящем исследовании результаты не позволяют сделать заключение о типе ингибирования NQO2 соединением М-11, для чего требуется проведение дополнительных кинетических исследований.

М-11 отличается от афобазола по спектру молекулярных мишеней. Если афобазол взаимодействует с σ1, MT_1 и MT_3 рецепторами и регуляторным сайтом МАО А, то М-11 – только с MT_3 рецептором [13]. Поэтому сочетание афобазола – М-11 можно рекомендовать для оценки вклада MT_3 рецептора в фармакологические эффекты афобазола.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Кадников Илья Андреевич
Автор, ответственный за переписку
e-mail: ikadnikov@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-8202-3967
SPIN-код: 8995-0919
н. с. лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kadnikov Ilya
Corresponding author
e-mail: ikadnikov@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-8202-3967
SPIN code: 8995-0919
Research Officer, laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Воронин Михаил Владимирович
ORCID ID: 0000-0003-2477-0563
SPIN-код: 6321-4709
к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Середенин Сергей Борисович
ORCID ID: 0000-0003-4482-9331
SPIN-код: 3896-4655
д. м. н., проф., академик РАН, заведующий лабораторией фармакологической генетики, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Voronin Mikhail
ORCID ID: 0000-0003-2477-0563
SPIN code: 6321-4709
Candidate of Medical Sciences, Senior Research Officer laboratories of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Seredenin Sergey
ORCID ID: 0000-0003-4482-9331
SPIN code: 3896-4655
Doctor of Medical Sciences, Prof., academician of RAS, head of the laboratory of pharmacological genetics, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Iskander K, Li J, Han S, et al. NQO1 and NQO2 regulation of humoral immunity and autoimmunity. *J Biol Chem*. 2006;281(41):30917–30924. DOI: 10.1074/jbc.M605809200
2. Fu Y, Buryanovskyy L, Zhang Z. Quinone reductase 2 is a catechol quinone reductase. *J Biol Chem*. 2008;283(35):23829–23835. DOI: 10.1074/jbc.M801371200
3. Liao S, Dulaney JT, Williams-Ashman HG. Purification and properties of a flavoprotein catalyzing the oxidation of reduced ribosyl nicotinamide. *J Biol Chem*. 1962;237:2981–2987.
4. Jaiswal AK. Human NAD(P)H:quinone oxidoreductase2. Gene structure, activity, and tissue-specific expression. *J. Biol. Chem*. 1994;269(20):14502–14508.
5. Tissue expression of NQO2. The Human Protein Atlas Web site. https://www.proteinatlas.org/ENSG00000124588-NQO2/tissue.
6. Nosjean O, Ferro M, Coge F, et al. Identification of the melatonin-binding siteMT3 as the quinone reductase 2. *J. Biol. Chem*. 2000;275(40):31311–31317. DOI: 10.1074/jbc.M005141200
7. Mailliet F, Ferry G, Vella F, et al. Characterization of the melatoninergic MT3 binding site on the NRH:quinone oxidoreductase 2 enzyme. *Biochem Pharmacol*. 2005;71(1-2):74–88. DOI: 10.1016/j.bcp.2005.09.030
8. Reybier K, Perio P, Ferry G, et al. Insights into the redox cycle of human quinone reductase 2. *Free Radic Res*. 2011;45(10):1184–1195. DOI: 10.3109/10715762.2011.605788
9. Hashimoto T, Nakai M. Increased hippocampal quinone reductase 2 in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*. 2011;502(1):10–12. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.07.008
10. Wang W, Le WD, Pan T, et al. Association of NRH:quinone oxidoreductase 2 gene promoter polymorphism with higher gene expression and increased susceptibility to Parkinson's disease. *The Journals of Gerontology: Series A*. 2008;63(2):127–134. DOI: 10.1093/gerona/63.2.127
11. Benoit CE, Bastianetto S, Brouillette J, et al. Loss of quinone reductase 2 function selectively facilitates learning behaviors. *J Neurosci*. 2010;30(38):12690–12700. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2808-10.2010
12. Janda E, Parafati M, Aprigliano S, et al. The antidote effect of quinone oxidoreductase 2 inhibitor against paraquat-induced toxicity *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol*. 2013;168(1):46–59. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.01870.x
13. Середенин СБ, Воронин МВ. Нейропротекторные механизмы действия афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2009. – Т.72. – №1. – С.3–11. [Seredenin SB, Voronin MV. Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009;72(1):3–11. (In Russ).]https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19334502 DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2009-72-1-3-11
14. Kadnikov IA, Voronin MV, Seredenin SB. Effect of afobazole on activity of quinone reductase 2. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2014;47(10):514–516 DOI: 10.1007/s11094-014-0993-y
15. Ferry G, Hecht S, Berger S, et al. Old and new inhibitors of quinone reductase 2. *Chem Biol Interact*. 2010;186(2):103–109. DOI: 10.1016/j.cbi.2010.04.006
16. Wu K, Knox R, Sun XZ, et al. Catalytic properties of NAD(P)H:quinone oxidoreductase-2 (NQO2), a dihydronicotinamide riboside dependent oxidoreductase. *Arch Biochem Biophys*. 1997;347(2):221–228. DOI: 10.1006/abbi.1997.0344
17. Leung KK, Shilton BH. Quinone reductase 2 is an adventitious target of protein kinase CK2 inhibitors TBBz (TBI) and DMAT. *Biochemistry*. 2015;54(1):47–59. DOI: 10.1021/bi500959t

Нейропротекторные свойства *in vitro* новых замещённых глипролинов

Антипова Т.А., Колясникова К.Н., Волкова Ю.С., Антипов П.И., Кузнецова Е.А., Николаев С.В.

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

Резюме. Ранее в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был сконструирован и синтезирован линейный замещенный глипролин ГЗК-111, этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина, способный превращаться в нейропептид цикло-пролилглицин (ЦПГ) в биологических средах и проявляющий характерные для последнего ноотропную, анксиолитическую, антигипоксическую и нейропротекторную активность. Цель данной работы состояла в изучении нейропротекторной активности аналогов замещённого глипролина ГЗК-111 по С- и N-концу *in vitro* на модели оксидативного стресса в сравнении с ЦПГ. Оксидативный стресс, вызванный H_2O_2 (1,5 мМ), приводил к достоверному снижению жизнеспособности гиппокампальных клеток линии НТ-22. L-ЦПГ защищал клетки от повреждения H_2O_2 в концентрациях до 10^{-7}М при внесении как за 24 ч до, так и сразу после повреждения. Соединение с открытой карбоксильной группой (ГЗК-115) защищало клетки НТ-22 от гибели, подобно L-ЦПГ, в обеих схемах эксперимента в концентрациях до 10^{-7}М. Замещённый амид ГЗК-119, внесённый за 24 ч до повреждения клеток, обладал цитопротекторным эффектом в концентрации 10^{-7}М, а после повреждения перекисью – в концентрациях 10^{-6} – 10^{-7}М. D-энантиомер этилового эфира N-фенилацетил-глицил-L-пролина (ГЗК-121) и соединение с удлинением N-ацильного фрагмента на CH_2-группу (ГЗК-45) были эффективны в концентрациях до 10^{-6}М в обеих схемах эксперимента. Одновременное удлинение N-ацильного фрагмента на CH_2-группу и замена эфира на амид (ГЗК-50) приводило к защите клеток от гибели только при внесении соединения после H_2O_2. Таким образом, установлено, что все исследуемые замещённые глипролины обладали нейропротекторной активностью в экспериментах *in vitro* в условиях окислительного стресса на клетках НТ-22, причём наиболее выражена она была у соединений ГЗК-119 и ГЗК-115.

Ключевые слова: циклопролилглицин; оксидативный стресс; НТ-22; замещённые глипролины

Для цитирования:
Антипова Т.А., Колясникова К.Н., Волкова Ю.С., Антипов П.И., Кузнецова Е.А., Николаев С.В. Нейропротекторные свойства *in vitro* новых замещённых глипролинов // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.31–36. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10021.

Neuroprotective properties of novel substituted glyprolines *in vitro*

Antipova T.A., Kolyasnikova K.N., Volkova Y.S., Antipov P.I., Kuznetsova E.A., Nikolaev S.V.

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow

Resume. Previously in the Zakusov Institute of Pharmacology the linear substituted glyproline GZK-111, N-phenylacetyl-glycyl-L-proline ethyl ester, which is capable to convert into the neuropeptide cyclo-prolylglycine (CPG) in biological media and displaying the nootropic, anxiolytic, antihypoxic and neuroprotective activity, was designed and synthesized. The aim of the work was to study the neuroprotective activity of analogues of substituted glyproline GZK-111 at the C- and N-terminus in vitro on the oxidative stress model in comparison to the GPG. Oxidative stress caused by H_2O_2 (1.5 mM) led to significant decrease in the hippocampal cells HT-22 viability. L-CPG protected cells against H_2O_2 in concentrations up to 10^{-7}M when applied both 24 h before and immediately after damage. The compound with an open carboxylic group (GZK-115) like CPG protected HT-22 cells from death in both experimental schemes at concentrations up to 10^{-7}M. The substituted amide GZK-119 added 24 h before cell damage, had a cytoprotective effect at a concentration of 10^{-7}M, and after peroxide damage in concentrations of 10^{-6} – 10^{-7}M. The D-enantiomer of ethyl ester N-phenylacetyl-glycyl-proline (GZK-121) and the compound with the extension of the N-acyl fragment to the CH_2-group (GZK-45) were effective at concentrations up to 10^{-6}M in both experimental schemes. Simultaneous extension of the N-acyl fragment to the CH_2 group and replacement of the ester with an amide (GZK-50) resulted to protection of the cells from death only after H_2O_2. Thus, it was established that all investigated substituted glyprolines possessed neuroprotective activity in experiments in vitro under conditions of oxidative stress in HT-22 cells. The most active compounds were GZK-119 and GZK-115.

Keywords: cycloprolylglycine; oxidative stress; HT-22; substituted glyproline

For citations:
Antipova TA, Kolyasnikova KN, Volkova YS, Antipov PI, Kuznetsova EA, Nikolaev SV. Neuroprotective properties of novel substituted glyprolines *in vitro*. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;3:31–36. (In Russ).
DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10021.

Введение

В 1996 г. в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова был открыт эндогенный пептид циклопролилглицин (ЦПГ) [1], для которого были выявлены ноотропные [2], анксиолитические [3], антигипоксические [4] и нейропротекторные свойства [5]. Было показано, что ЦПГ по структуре и фармакологической активности подобен пирацетаму [2–5]. Кроме того, было выявлено, что ЦПГ аналогично пирацетаму оказывает положительное модулирующее действие на глутаматные AMPA-рецепторы [6] и усиливает синтез нейротрофина BDNF [7].

Нами был сконструирован линейный замещённый глипролин ГЗК-111, этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина, химическая структура которого предполагает возможность превращения его в ЦПГ в биологических средах. Действительно, ГЗК-111 *in vitro* в плазме крови крысы превращается в ЦПГ и проявляет весь спектр фармакологической активности, характерный для последнего [8, 9].

Для расширения группы фармакологически активных замещенных глипролинов в настоящей работе был синтезирован ряд аналогов ГЗК-111 с разным замещением по С- и N-концу и изучена их нейропротекторная активность *in vitro*.

Цель исследования

Цель данной работы состояла в изучении нейропротекторной активности аналогов замещённого глипролина ГЗК-111 по С- и N-концу *in vitro* на модели оксидативного стресса в сравнении с ЦПГ.

Материалы и методы

Экспериментальная химическая часть

В работе использовали коммерческие аминокислоты (Sigma, Reanal). Используемые растворители очищали и сушили стандартными методами. Температуру плавления определяли в открытых капиллярах на приборе Optimelt MPA100 (Stanford Research Systems, США) и не корректировали. ПМР-спектры регистрировали в растворах диметилсульфоксида-$_{d6}$ (ДМСО-$_{d6}$) или $CDCl_3$ в шкале δ, м. д. (*J*, Гц) на спектрометре Fourier 300 (Bruker, Германия) с рабочей частотой 300 МГц. В качестве внутреннего стандарта использовали тетраметилсилан. Удельное оптическое вращение измеряли на поляриметре ADP 440 Polarimeter (Bellingham + Stanley Ltd., Англия). ТСХ проводили на пластинках Kieselgel 60 G/F254 (Merck, Германия) в системах диоксан – вода 9:1 (А), хлороформ – метанол 9:1 (Б) и бензол – уксусная кислота – вода 3:1:1 (В). Соединения с амидными группами обнаруживали в парах йода, соединения с открытой карбоксильной группой – бромкрезоловым зелёным, содержащие ароматические группы – в УФ-лучах. Элементный анализ проводили на приборе для определения углерода и водорода с четырьмя электрическими печами (600-900 °С, тип МА-Г/6Р, завод ЛЭТО, Россия) в токе кислорода и на аппарате для определения азота с тремя такими же электрическими печами в токе углекислого газа. Данные элементного анализа соединений относительно процентного содержания С, Н и N отклоняются от теоретических не более чем на 0,4 %.

Энантиомеры этилового эфира *N*-фенилацетил-глицилпролина (C_6H_5-CH_2-C(O)-Gly-Pro-OC_2H_5). Получали аналогично [8].

C_6H_5-CH_2-C(O)-Gly-L-Pro-OC_2H_5 (ГЗК-111): т.пл. 111-112 °С; $[\alpha]^{23}_D$ -90,0 ° (*c* 1, вода); R_f = 0,80 (А).

C_6H_5-CH_2-C(O)-Gly-D-Pro-OC_2H_5 (ГЗК-121): т.пл. 112-113 °С; $[\alpha]^{23}_D$ +90,0 ° (*c* 1, вода); R_f = 0,80 (А).

***N*-фенилацетил-глицил-*L*-пролин (C_6H_5-CH_2-C(O)-Gly-L-Pro-OH, ГЗК-115).** Получали аналогично [9]. Т.пл. 165-166 °С; $[\alpha]^{23}_D$ -75 ° (*c* 1, метанол); R_f = 0,35 (А).

Метиламид *N*-фенилацетил-глицил-*L*-пролина (C_6H_5-CH_2-C(O)-Gly-L-Pro-$NHCH_3$, ГЗК-119). Получали аналогично [9]. Т.пл. 180-181 °С; $[\alpha]^{23}_D$ -76 ° (*c* 1, метанол); R_f = 0,31 (Б).

Этиловый эфир N-фенилпропионил-глицил-L-пролина (C_6H_5-$(CH_2)_2$-C(O)-Gly-L-Pro-OC_2H_5, ГЗК-45). К охлажденному до -10 °С раствору 3 г (14,5 ммоль) *N*-фенилпропионил-глицина в 10 мл диметилформамида (ДМФА) при интенсивном перемешивании одновременно прибавляли 1,89 мл (14,5 ммоль) изобутилхлорформиата и 2,32 мл (18,125 ммоль) *N*-этилморфолина. После 2-3 мин перемешивания прикапывали раствор 3,25 г (18,125 ммоль) хлоргидрата этилового эфира пролина и 1,86 мл (14,5 ммоль) *N*-этилморфолина в 15 мл ДМФА. Реакционную смесь перемешивали ещё 30 мин при -10 °С и 1 ч при комнатной температуре. Осадок отфильтровывали, фильтрат упаривали в вакууме, остаток растворяли в $CHCl_3$. Раствор последовательно промывали 3 % $NaHCO_3$, водой, 1М раствором HCl и вновь водой, высушивали безводным сульфатом натрия и упаривали. Полученное масло перекристаллизовывали из смеси этилацетата и гексана и получали 3 г (62 %) этилового эфира *N*-фенилпропионил-глицил-*L*-пролина в виде кристаллического продукта. Т.пл. 111-112 °С; $[\alpha]^{23}_D$ -83° (*c* 1, этанол); R_f = 0,8 (В). ПМР-спектр (ДМСО-d_6) δ, м.д.: 1,21 (м, 3H, CH_3CH_2O), 1,73-2,27 (м, 5H, $C^{\gamma}H_2$ Pro, $C^{\beta}H_1$ Pro, Ph-CH_2-CH_2), 2,46 (м, 1H, $C^{\beta}H_1$ Pro), 2,83 (м, 2H, J1 = 7,82, Ph-CH_2-CH_2), 3,38-3,62 (м, 2H, $C^{\delta}H_2$ Pro), 3,78-4,2 (м, 4H, CH_3CH_2O, $C^{\alpha}H_2$ Gly), 4,3 (д.д., 1H,

$C^{\alpha}H$ Pro, мажорный конформер), 4,68 (д.д., 1H, $C^{\alpha}H$ Pro, минорный конформер), 8,06 (т, 1H, J = 5,12, NH Gly). Элементный анализ: вычислено, %: C 63,39; H 7,37; N 8,20; найдено, %: C 63,18; H 7,33; N 8,75; $C_{18}H_{24}N_2O_4 * 0{,}5H_2O$.

Амид *N*-фенилпропионил-глицил-*L*-пролина (C_6H_5-$(CH_2)_2$-C(O)-Gly-*L*-Pro-NH_2, ГЗК-50). Раствор 0,300 г (0,9036 ммоль) этилового эфира *N*-фенилпропионил-глицил-*L*-пролина в 5,625 мл насыщенного аммиаком метанола оставляли плотно закрытым на 14 дней при комнатной температуре. Окончание реакции определяли с помощью ТСХ. После завершения реакции метанольный раствор упарили досуха, полученное масло перекристаллизовывали из этилового спирта. Получали 0,170 г (85 %) амида *N*-фенилпропионил-глицил-*L*-пролина в виде кристаллического продукта. Т.пл. 188-190 °C. $[\alpha]^{23}_{D}$ -62,2 ° (*c* 1, метанол). R_f = 0,41 (Б). ПМР-спектр ($CDCl_3$) δ, м.д.: 1,93-2,4 (м, 4H, $C^{\beta}H_2$Pro, $C^{\gamma}H_2$ Pro), 2,57 (м, 2H, Ph-CH_2-CH_2), 2,99 (м, 2H, Ph-CH_2-CH_2), 3,42-3,59 (м, 2H, $C^{\delta}H_2$ Pro), 4,05 (д, J = 4,32, 2H, $C^{\alpha}H_2$ Gly), 4,3 (д.д., 1H, $C^{\alpha}H$ Pro, мажорный конформер), 4,57 (д.д., 1H, $C^{\alpha}H$ Pro, минорный конформер), 5,45 и 6,68 (два с, 2H, NH_2), 6,45 (*c*, 1H, NH Gly), 7,2-7,3 (м, 5H, Ar).

Экспериментальная биологическая часть

Для экспериментов использовались реактивы: H_2O_2 (Panreac), MTT (Sigma Aldrich), ДМСО (Panreac), среда ДМЕМ (HyClone), фетальная бычья сыворотка FBS (Gibco).

Эксперименты проводились на клетках гиппокампа мыши линии HT-22 (Голландия, Утрехт). Клетки культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 5 % FBS в CO_2-инкубаторе при температуре 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO_2.

Оксидативный стресс моделировали путём внесения перекиси водорода в конечной концентрации 1,5 мМ) [10]. Спустя 30 мин среду заменяли на обычную. Через 4 ч выполняли измерение жизнеспособности клеток.

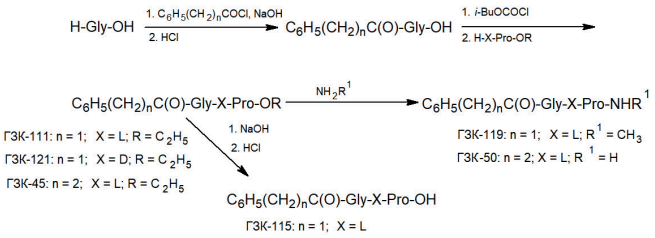
Жизнеспособность клеток измеряли с использованием MTT-теста с добавлением 0,5 % раствора бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия (MTT), для растворения образующихся кристаллов формазана использовали ДМСО. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Multiscan EX при длине волны 600 нм [11].

Исследуемые соединения (ЦПГ, ГЗК-115, ГЗК-119, ГЗК-121, ГЗК-45 и ГЗК-50) растворяли в деионизованной воде и вносили за 24 ч до повреждения или сразу после смены среды в конечных концентрациях 10^{-5} – 10^{-8}М.

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены в виде m. ± s.d. Данные считались достоверными при $p \le 0{,}05$.

Результаты и обсуждение

Синтез замещённых глипролинов был осуществлён по общей схеме:



Низкоалкильные эфиры *N*-фенилалканоил-глицилпролинов (ГЗК-111, ГЗК-121, ГЗК-45) получали (схема 1) методом смешанных ангидридов с использованием изобутилхлорформиата в условиях Андерсона [12]. В качестве карбоксильной компоненты использовали *N*-фенилалканоилглицин, полученный из глицина и хлорангидрида соответствующей фенилалкановой кислоты по Шоттен-Бауману [13], а в качестве аминокомпоненты – метиловый или этиловый эфир пролина, полученные из метанола или абсолютного этанола в присутствии хлористого тионила по методу Бреннера [14]. Амиды *N*-фенилалканоил-глицил-пролинов (ГЗК-113 и ГЗК-50) получали обработкой этилового эфира соответствующего *N*-замещённого дипептида аммиаком в метаноле. Дипептид ГЗК-115 с открытой карбоксильной группой получали гидролизом 1 М щёлочью этилового эфира *N*-фенилацетил-глицил-*L*-пролина. Метиламид *N*-фенилацетил-глицил-*L*-пролина (ГЗК-119) получали аминолизом метиламином соответствующего метилового эфира.

Оксидативный стресс, вызванный H_2O_2 (1,5 мМ), приводил к достоверному снижению жизнеспособности гиппокампальных клеток линии HT-22. L-ЦПГ защищал клетки от повреждения H_2O_2 в концентрациях до 10^{-7}М в обеих схемах внесения соединения. ГЗК-115 защищал клетки HT-22 от гибели, подобно L-ЦПГ, в обеих схемах эксперимента в концентрациях до 10^{-7}М. ГЗК-119, внесённый за 24 ч до повреждения клеток, обладал цитопротекторным эффектом в концентрации 10^{-7}М, а после повреждения перекисью – в концентрациях 10^{-6} – 10^{-7}М. ГЗК-121 и ГЗК-45 были эффективны в концентрациях до 10^{-6}М в обеих схемах эксперимента. ГЗК-50

Таблица 1

Нейропротекторная активность *in vitro* замещённых глипролинов в сравнении с ЦПГ

Соединение	*n*	X	R	Концентрация, М	Нейропротекторная активность А (%)	
					Внесение за 24 ч до H_2O_2 (*n* = 16)	Внесение после H_2O_2 (*n* = 16)
L-ЦПГ	-	-	-	10^{-5}М	37*	32*
				10^{-6}М	37*	32*
				10^{-7}М	39*	35*
				10^{-8}М	37*	13
ГЗК-115	1	L	OH	10^{-5}М	19*	25*
				10^{-6}М	22*	27*
				10^{-7}М	20*	27*
				10^{-8}М	13	9
ГЗК-119	1	L	NHCH3	10^{-5}М	29	33*
				10^{-6}М	31	31*
				10^{-7}М	33*	22
				10^{-8}М	31	17
ГЗК-121	1	D	OC2H5	10^{-5}М	40*	56*
				10^{-6}М	33*	43*
				10^{-7}М	38*	26
					23	1
ГЗК-45	2	L		10^{-5}М	31*	21*
				10^{-6}М	36*	33*
				10^{-7}М	12	24*
				10^{-8}М	3	18
ГЗК-50	2	L		10^{-5}М	7	14*
				10^{-6}М	10	17*
				10^{-7}М	10	15*
					10	13*

Примечания: * $p \le 0,05$ – от Контроля, ^ $p \le 0,05$ – от H_2O_2 (критерий Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну). Глипролины общей формулы C_6H_5-(CH_2)n-C(O)-Gly-X-Pro-R где *n* = 1, 2; X = L, D; R = OC_2H_5, OH, NH_2, $NHCH_3$.

защищал клетки от гибели только в схеме внесения соединения после H_2O_2 (табл.1).

Таким образом, все полученные замещённые глипролины обладали нейропротекторной активностью в экспериментах *in vitro* в условиях окислительного стресса на клетках НТ-22, причём наиболее выраженная наблюдалась для соединений ГЗК-119 и ГЗК-115. Можно предположить, что выявленные нами различия в защитном действии исследуемых замещённых глипролинов на модели оксидативного стресса могут быть обусловлены особенностью строения их молекул.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Участие авторов. Антипова Т.А. – разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание текста, редактирование и финальное утверждение рукописи. Колясникова К.Н. – исполнение экспериментальной работы, написание текста. Волкова Ю.С. – исполнение экспериментальной работы, написание текста. Антипов П.И. – исполнение экспериментальной работы, написание текста. Кузнецова Е.А. – исполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов. Николаев С.В. – исполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Антипова Татьяна Алексеевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: zenina_tatyana@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-9309-4872
SPIN-код: 7723-6008
к. б. н., заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Коляснikова Ксения Николаевна
ORCID ID: 0000-0001-6797-692X
SPIN-код: 5682-2035
н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Волкова Юлия Сергеевна
Студент, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Москва

Антипов Пётр Иванович
ORCID ID: 0000-0002-6093-8805
SPIN-код: 2591-3379
к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Кузнецова Елена Александровна
ORCID ID: 0000-0001-9228-0596
к. х. н., с. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Николаев Сергей Владимирович
ORCID ID: 0000-0002-9309-4872
SPIN-код: 7723-6008
н. с. лаборатории фармакологии нейропротекции, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Antipova Tatyana
Corresponding author
e-mail: zenina_tatyana@mail.ru
ORCID ID: 0000-0002-9309-4872
SPIN code: 7723-6008
Candidate of Biological Sciences, head of the Laboratory of pharmacology of neuroprotection, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Koliasnikova Ksenia
ORCID ID: 0000-0001-6797-692X
SPIN code: 5682-2035
Research Officer, Laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Volkova Yulia
Student of Dmitry Mendeleev University, Moscow

Antipov Petr
ORCID ID: 0000-0002-6093-8805
SPIN code: 2591-3379
Candidate of Chemical Sciences, Senior Research Officer laboratory of peptide bioregulators of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Kuznetsova Elena
ORCID ID: 0000-0001-9228-0596
Candidate of Chemical Sciences, Senior Research Officer, laboratory of fine organic synthesis of the Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Nikolaev Sergey
ORCID ID: 0000-0002-9309-4872
SPIN code: 7723-6008
Research Officer, laboratory of pharmacology of neuroprotection, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Gudasheva TA, Boyko SS, Akparov VKh, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Letters*. 1996;391:149–152.

2. Гудашева Т.А., Островская Р.У., Трофимов С.С., и др. Новый эндогенный дипептид циклопролилглицин подобен пирацетаму по селективности мнемотропного эффекта // *Бюлл. экспер. биол. мед.* – 1999. – Т.128. – №10. – С.411–413. [Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Trofimov SS, et al. New Endogenous Dipeptide Cycloprolyl-Glycine Is Similar To Piracetam By Its Mnemotropic Selectivity. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 1999;128(4):411–413. (In Russ).]

3. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., Середенин С.Б. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного пептида циклопропилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюлл. экспер. биол. мед.* – 2001. – Т.131. – №5. – С.547–550. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, Seredenin SB. Anxiolytic Activity Of Endogenous Nootropic Dipeptide Cycloprolylglycine In Elevated Plus-Maze Test. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2001;131(5):464–466. (In Russ).]

4. Колясникова К.Н., Гудашева Т.А., Назарова Г.А., и др. Сходство цикло-пролилглицина с пирацетамом по антигипоксическому и нейропротекторному эффектам // *Экспер. клин. фармакол.* – 2012. – Т.75. – №9. – С.3–6. [Kolyasnikova KN, Gudasheva TA, Nazarova GA, et al. Similarity of Cycloprolylglycine to Piracetam in Antihypoxic and Neuroprotective Effects. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiia*. 2012;75(9):3–6. (In Russ).] DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2012-75-9-3-6

5. Поварнина П.Ю., Колясникова К.Н., Николаев С.В., и др. Нейропептид циклопролилглицин проявляет нейропротекторную активность при системном введении на модели неполной глобальной ишемии у крыс и в условиях глутаматной нейротоксичности *in vitro* // *Бюлл. экспер. биол. мед.* – 2015. – Т.160. – №11. – С.600–603. [Povarnina PY, Kolyasnikova KN, Nikolaev SV, et al. Neuropeptide Cycloprolylglycine Exhibits neuroprotective activity after systemic administration to rats with modeled incomplete global ischemia and in vitro modeled glutamate neurotoxicity. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2015;160(11):600–603. (In Russ).]

6. Гудашева Т.А., Григорьев В.В., Колясникова К.Н., и др. Нейропептид циклопролилглицин является эндогенным положительным модулятором AMPA-рецепторов // *Доклады Академии наук*. – 2016. – Т.471. – №1. – С.106–108. [Gudasheva TA, Koliasnikova KN, Seredenin SB, et al. Neuropeptide cycloprolylglycine is an endogenous positive modulator of ampa receptors. *Doklady Akademii nauk*. 2016;471(1):387–389 (In Russ).]. DOI: 10.7868/S0869565216310273

7. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках // *Доклады Академии наук*. – 2016. – Т.469. – №4. – С.492–495. [Gudasheva TA, Koliasnikova KN, Antipova TA, Seredenin SB. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Doklady Akademii nauk*. 2016;469(4):273–276. (In Russ).]. DOI: 10.7868/S0869565216220254

8. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А., и др. Этиловый эфир N-фенилацетил-глицил-L-пролина метаболизируется до цикло-L-пролилглицина, проявляя сходный спектр нейропсихотропной активности // *Хим.-фарм. журн.* – 2016. – Т.50. – №11. – С.3–8. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, et al. N-Phenylacetylglycyl-L-Proline Ethyl Ester Converts Into Cyclo-L-Prolylglycine Showing A Similar Spectrum Of Neuropsychotropic Activity. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2016;50(11):3–8. (In Russ).]. DOI: https://doi.org/10.30906/0023-1134-2016-50-11-3-8

9. Колясникова К.Н., Кузнецова Е.А., Николаев С.В., и др. Анализ зависимости антигипоксической активности от структуры соединений в ряду замещенных глипролинов // *Хим.-фарм. журн.* – 2018. – Т.52. – №6. – С.13–17. [Kolyasnikova KN, Kuznetsova EA, Nikolaev SV, et al. Investigation of the Structure - Antihypoxic Activity Relationship in a Series of Substituted Glyprolines. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2018;52(6):13–17. (In Russ).]. DOI: https://doi.org/10.30906/0023-1134-2018-52-6-13-17

10. Jackson GR, Werrbach-Perez K, Ezell EL, et al. Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. *Brain Res*. 1992;592:239–248.

11. Twentyman PR, Luscombe M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *Br. J. Cancer*. 1987;56(3):279–285.

12. Anderson GW, Zimmerman JE, Callahan FM. Reinvestigation of the mixed carbonic anhydride method of peptide synthesis. *J. Am. Chem*. Soc. 1967;89:5012–5017.

13. Baumann E. Ueber eine einfache Methode der Darstellung von Benzolsduredthern. *Ber. Dtsch. Chem. Ges*. 1886;19:3218–3222.

14. Brenner M, Huber W. Herstellung von α-Aminosdureestern durch Alkoholyse der Methylester. *Helv. Chim. Acta*. 1953;36:1109–1115.

Сравнение нейропротекторных свойств дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора на модели окислительного стресса *in vitro*

Логвинов И.О., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Антипов П.И., Антипова Т.А., Гудашева Т.А.

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

Резюме. Цель настоящей работы состояла в сравнении нейропротекторных свойств димерных дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF – ГСБ-214 (гептаметилендиамид бис-моносукцинил-метионил-серина), ГТС-201 (гексаметилендиамид бис-гексаноил-серил-лизина) и ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-серил-лизина) на гиппокампальных клетках линии НТ-22 в условиях окислительного стресса. Установлено, что миметик 4-й петли BDNF проявляет нейропротекторный эффект в более низких концентрациях по сравнению с миметиками на основе 1-й и 2-й петель, как при внесении за 24 часа до повреждения, так и сразу после деструктивного воздействия.

Ключевые слова: нейропротекция; окислительный стресс; BDNF; димерные дипептидные миметики; ГСБ-214; ГТС-201; ГСБ-106

Для цитирования:
Логвинов И.О., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Антипов П.И., Антипова Т.А., Гудашева Т.А. Сравнение нейропротекторных свойств дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель мозгового нейротрофического фактора на модели окислительного стресса *in vitro* // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.37–41. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10022.

Comparison of neuroprotective properties of the dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of the brain-derived neurotrophic factor on the model oxidative stress *in vitro*

Logvinov I.O., Tarasiuk A.V., Sazonova N.M., Antipov P.I.,
Antipova T.A., Gudasheva T.A.
FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow

Resume. The purpose of this study was to compare neuroprotective properties of the dimeric dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of BDNF – GSB-214 (heptamethylenediamide bis-monosuccinyl-methionyl-serine), GTS-201 (hexamethylenediamide bis-hexanoyl-seryl-lysine) and GSB-106 (hexamethylenediamide bis-monosuccinyl-seryl-lysine) in the HT-22 hippocampal cells in conditions of oxidative stress. It has been established that the mimetic of the 4th loop of BDNF shows a neuroprotective effect in lower concentrations compared to mimetics based on the 1st and 2nd loops when applied 24 hours before and immediately after the damages.

Keywords: neuroprotection; oxidative stress; BDNF; dimeric dipeptide mimetics; GSB-214; GTS-201; GSB-106

For citations:
Logvinov IO, Tarasiuk AV, Sazonova NM, Antipov PI, Antipova TA, Gudasheva TA. Comparison of neuroprotective properties of the dipeptide mimetics of the 1st, 2nd and 4th loops of the brain-derived neurotrophic factor on the model oxidative stress *in vitro*. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;3:37–41. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10022.

Введение

Мозговой нейротрофический фактор (BDNF) относится к семейству нейротрофинов. Благодаря своей способности увеличивать выживаемость нейронов нейротрофины рассматриваются как перспективные антинейродегенеративные средства. BDNF особенно привлекателен в этом отношении, так как он улучшает выживание и предупреждает дегенерацию нейронов, вовлеченных в такие заболевания, как амиотрофический латеральный склероз (мотонейроны), сенсорные нейропатии (сенсорные нейроны), болезнь Альцгеймера (базальные холинергичекие нейроны переднего мозга), болезнь Паркинсона (дофаминергические нейроны чёрной субстанции). В ряде нейродегенеративных заболеваний выявлено снижение содержания нейротрофина BDNF [1, 2]. Существуют хорошо документированные доказательства участия BDNF в патогенезе депрессии. При центральном введении BDNF проявляет выраженный антидепрессивный эффект [3]. Несмотря на многообещающие данные доклинических исследований, клинические испытания BDNF

в качестве лечебного средства не увенчались успехом в первую очередь из-за таких фармакокинетических ограничений, как малое время жизни в кровотоке, низкая способность проникать через гематоэнцефалический барьер и наличие нежелательных побочных эффектов [4, 5].

В рамках развития новой группы нейропротекторов в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются β-изгибы их шпилькообразных петель, были синтезированы димерные дипептидные миметики 1-й, 2-й и 4-й петли BDNF – ГСБ-214 (гептаметилендиамид бис-моносукцинил-метионил-серина), ГТС-201 (гексаметилендиамид бис-гексаноил-серил-лизина) и ГСБ-106 (гексаметилендиамид бис-моносукцинил-серил-лизина) соответственно. Миметики, аналогично BDNF, проявляли нейропротекторную активность на модели окислительного стресса в культуре гиппокампальных нейронов линии НТ-22 при внесении за 24 ч до повреждения в интервале концентраций 10^{-5}–10^{-8} М [6, 7].

Цель настоящей работы состояла в сравнительном изучении нейропротекторных свойств полученных миметиков BDNF в зависимости от времени внесения.

Материалы и методы

Культура гиппокампальных клеток линии НТ-22

Иммортализованные клетки гиппокампа мыши линии НТ-22 рассеивали на 96-луночные планшеты обработанные поли-Д-лизином (BD Biosciences, США; 5 мкг/см^2) с плотностью 3,5 тыс. на лунку в среде ДМЕМ (Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 5 % телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco Life Technologies, США) и 2 мМ *L*-глутамина (ICN, Германия), и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO_2.

Модель окислительного стресса

Окислительный стресс моделировали путём внесения в клеточную среду культивирования раствора перекиси водорода (H_2O_2) в конечной концентрации 1,5 мМ. Клетки с H_2O_2 инкубировали в атмосфере 5 % CO_2 при 37 °С 30 мин. Далее среду заменяли на нормальную и через 4 ч определяли жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста (бромида 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5 дифенилтетразолия (МТТ) (Sigma, США)) [8]. В качестве положительного контроля использовали BDNF (BD Bioscience, Великобритания) в конечной концентрации 50 нг/мл (10^{-9}М). ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 вносили в конечных концентрациях 10^{-5} – 10^{-8}М за 24 ч до повреждения клеток и после отмывки H_2O_2. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре “Multiscan EX” (Thermo, США) при длине волны 600 нм.

Статистический анализ

Статистическую обработку данных проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим тестом по Данну (ANOVA). Данные представлены с указанием стандартного отклонения mean ± s.d. Результаты считались достоверными при $p \le 0{,}05$.

Результаты и их обсуждение

Окислительный стресс является важным звеном повреждения нейронов при различных нейродегенеративных заболеваниях. Последовательность событий, происходящих при этом в клетке, достаточно хорошо изучена [9]. Можно считать доказанным вовлечение окислительного стресса в механизм повреждения мозга при ишемии, нейродегенеративных заболеваниях и других патологических состояниях. Поэтому модель окислительного стресса особенно интересна с точки зрения исследования действия новых потенциальных нейропротекторов.

Для выявления нейропротекторного действия димерных дипептидных миметиков ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 была использована модель окислительного стресса на культуре иммортализованных клеток гиппокампа мыши линии НТ-22.

Нами показано, что перекись водорода, внесенная в культуральную среду, достоверно снижает жизнеспособность клеток НТ-22. BDNF (10^{-9}М) защищал клетки от гибели как при внесении за 24 ч до повреждения, так и сразу после деструктивного воздействия. Ранее было установлено, что миметики 1-й петли – ГСБ-214, 2-й петли – ГТС-201 и 4-й петли – ГСБ-106 обладали нейропротекторным действием при внесении за 24 ч до окислительного стресса (рис. 1) [6, 7]. При этом в концентрации 10^{-8}М нейропротекторный эффект ГСБ-214 и ГТС-201 начинает убывать, а защитное действия ГСБ-106 было наиболее выражено. В данном исследовании выявлено, что при внесении сразу после повреждения дипептиды ГСБ-214 и ГТС-201 достоверно увеличивали жизнеспособность гиппокампальных нейронов только в концентрации 10^{-5}М, в то время как ГСБ-106 оказывал нейропротекторное действие в более низкой концентрации 10^{-6}М (рис. 2).

Таким образом, в данной работе в экспериментах *in vitro* на модели окислительного стресса было установлено, что димерные дипептидные миметики, соз-

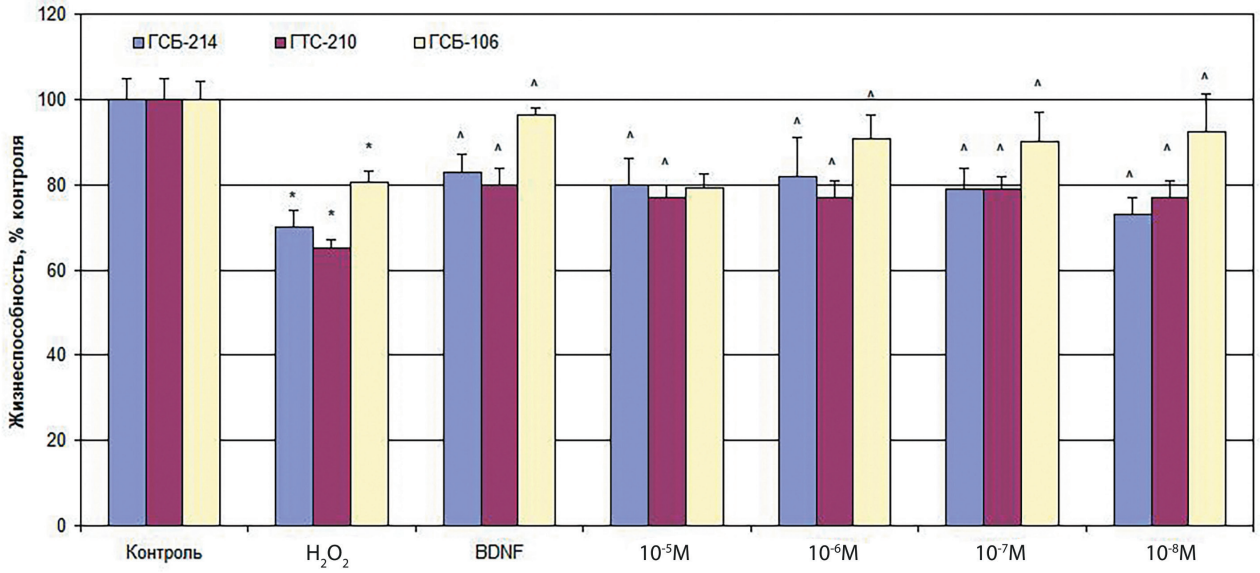


Рис. 1. Влияние различных концентраций ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 на модели окислительного стресса (результаты МТТ-теста). Внесение пептидов за 24 ч до перекиси водорода

Примечания: * – $p \leq 0{,}05$ по сравнению с контролем; ^ – $p \leq 0{,}05$ по сравнению с перекисью водорода.

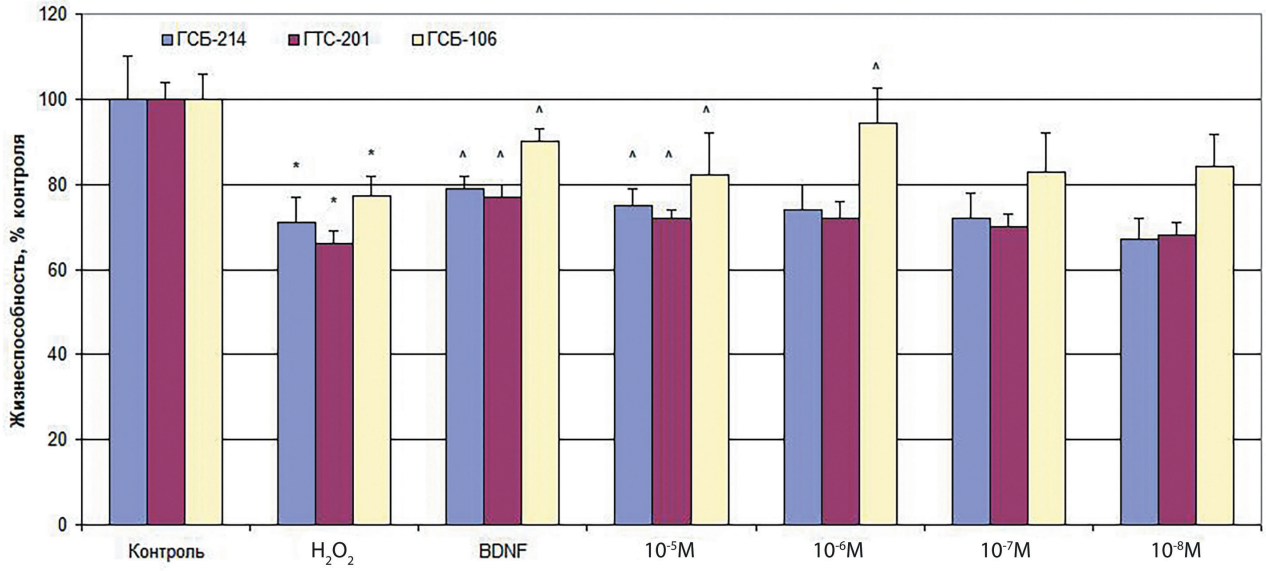


Рис. 2. Влияние различных концентраций ГСБ-214, ГТС-201 и ГСБ-106 на жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 на модели окислительного стресса (результаты МТТ-теста). Внесение пептидов сразу после отмывки перекиси водорода

Примечания: * – $p \leq 0{,}05$ по сравнению с контролем; ^ – $p \leq 0{,}05$ по сравнению с перекисью водорода.

данные на основе β-изгибов 1-й петли (ГСБ-214), 2-й петли (ГТС-201) и 4-й петли (ГСБ-106) BDNF, обладают более выраженным нейропротекторным действием при внесении за 24 ч до повреждения. Также выявлено различие в проявлении нейропротекторного эффекта у изученных дипептидов. Миметик ГСБ-106 в более низких концентрациях увеличивает жизнеспособность гиппокампальных нейронов линии HT-22 в условиях окислительного стресса. Наличие нейропротекторного эффекта у всех исследованных миметиков

может служить подтверждением рабочей гипотезы о том, что фармакофорными участками нейротрофинов являются центральные фрагменты β-изгибов их шпилькообразных петель как геометрически наиболее выгодные для взаимодействия с рецептором. Полученные в работе данные показывают целесообразность дальнейшего изучения димерных дипептидных миметиков 1-й, 2-й и 4-й петель BDNF в качестве соединений с потенциальными нейропротекторными свойствами.

Вывод

Установлено, что миметик 4-й петли BDNF проявляет нейропротекторный эффект в более низких концентрациях на модели окислительного стресса по сравнению с миметиками на основе 1-й и 2-й петель как при внесении за 24 ч до повреждения, так и сразу после деструктивного воздействия.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Участие авторов. Логвинов И.О. – исполнение экспериментальной работы, анализ и интерпретация результатов, написание текста; Тарасюк А.В. – синтез исследуемых соединений, написание текста; Сазонова Н.М. – синтез исследуемых соединений; Антипов П.И. – анализ исследуемых соединений методом ВЭЖХ; Антипова Т.А. – анализ и интерпретация результатов, написание и редактирование текста; Гудашева Т.А. – работа над текстом статьи, редактирование и финальное утверждение рукописи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Логвинов Илья Олегович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: logvinov_ilya@mail.ru
ORCID ID: 0000-0001-6101-1035
SPIN-код: 9909-9630
н. с. лаборатории фармакологии нейропротекции, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Тарасюк Алексей Валерьевич
ORCID ID: 0000-0001-9750-4157
SPIN-код: 9670-2415
н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Сазонова Нелля Михайловна
ORCID ID: 0000-0002-7608-7419
SPIN-код: 8835-7887
к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Антипов Пётр Иванович
ORCID ID: 0000-0002-6093-8805
SPIN-код: 2591-3379
к. х. н., с. н. с. лаборатории пептидных биорегуляторов отдела химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Logvinov Ilya
Corresponding author
e-mail: logvinov_ilya@mail.ru
ORCID ID: 0000-0001-6101-1035
SPIN code: 9909-9630
Research Scientist, Laboratory of neuroprotection pharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Tarasiuk Aleksey
ORCID ID: 0000-0001-9750-4157
SPIN code: 9670-2415
Research Scientist, Laboratory of peptide bioregulators, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Sazonova Nellya
ORCID ID: 0000-0002-7608-7419
SPIN code: 8835-7887
PhD, Senior Research Scientist, Laboratory of peptide bioregulators, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Antipov Petr
ORCID ID: 0000-0002-6093-8805
SPIN code: 2591-3379
PhD, Senior Research Scientist, Laboratory of peptide bioregulators, Department of medicinal chemistry, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Антипова Татьяна Алексеевна
ORCID ID: 0000-0002-9309-4872
SPIN-код: 7723-6008
к. б. н., заведующая лабораторией фармакологии нейропротекции, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Гудашева Татьяна Александровна
ORCID ID: 0000-0002-5185-4474
SPIN-код: 4970-0006
д. б. н., проф., член-корреспондент РАН, руководитель отдела, отдел химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Antipova Tatyana
ORCID ID: 0000-0002-9309-4872
SPIN code: 7723-6008
Candidate of Biological Sciences, head of the laboratory of pharmacology of neuroprotection, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Gudacheva Tatiana
ORCID ID: 0000-0002-5185-4474
SPIN code: 4970-0006
PhD, Head of the Laboratory of neuroprotection pharmacology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Zuccato C, Cattaneo E. Brain-derived neurotrophic factor in neurodegenerative diseases. Nature reviews. *Neurology*. 2009;5:311–322.
2. Schmidt HD, Duman RS. Peripheral BDNF Produces Antidepressant-Like Effects in Cellular and Behavioral Models. *Neuropsychopharmacology*. 2010;35:2378–2391.
3. Castren E, Rantamaki T. The role of BDNF and its receptors in depression and antidepressant drug action: Reactivation of developmental plasticity. *Developmental Neurobiology*. 2010;70:289–297. DOI: http://dx.doi.org/10.1002/dneu.20758
4. BDNF Study Group (Phase III). *Neurology*. 1999;52:1427–1433.
5. Poduslo JF, Curran GL. Permeability at the blood-brain and blood-nerve barriers of the neurotrophic factors: NGF, CNTF, NT-3, BDNF. Brain Res. *Mol. Brain Res*. 1996;36:280–286.
6. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., и др. Дизайн и синтез дипептидных миметиков мозгового нейротрофического фактора // *Биоорганическая химия*. – 2012; – Т.38. – №3: – С.280–290. [Gudasheva TA, Tarasyuk AV, Pomogaibo SV, et al. Design and synthesis of dipeptide mimetics of the brain-derived neurotrophic factor. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. 2012;38(3):243–252. (In Russ).]
7. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., и др. Новый дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора селективно активирует сигнальный путь MAPK-Erk // *Доклады Академии наук*. – 2017. – Т.476. – №1. – С. 108–112. [Gudasheva TA, Tarasiuk AV, Sazonova NM, et al. A novel dimeric dipeptide mimetic of the BDNF selectively activates the MAPK-Erk signaling pathway. *Doklady Biochemistry and Biophysics*. 2017;47(1).108–112. (In Russ).]. DOI: 10.7868/S0869565217250235
8. Jackson GR, Werrbach-Perez K, Ezell EL, et al. Nerve growth factor effects on pyridine nucleotides after oxidant injury of rat pheochromocytoma cells. *Brain Res*. 1992;592(1-2):239–248.
9. Kanazawa I. How do neurons die in neurodegenerative diseases? *Trends Mol Med*. 2001;7(8):339–344.

Влияние ноотропных препаратов на 5-HT_{2A}-рецепторы стриатума аутбредных мышей с различной эффективностью исследовательского поведения

Фирстова Ю.Ю., Васильева Е.В., Ковалёв Г.И.

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

Резюме. Изучено влияние субхронического введения ноотропных препаратов различного строения (пирацетама 200 мг/кг/день, пантокальцина 200 мг/кг/день, семакса 0,6 мг/кг/день, нооглютила 50 мг/кг/день) мышам аутбредной линии 1CR на спонтанную исследовательскую активность в закрытом крестообразном лабиринте и на характеристики связывания серотониновых рецепторов 5-HT_{2A}-типа в мембранах стриатума. В экспериментах с использованием [^{3}H](+)Кетансерина установлено, что мозг мышей, проявляющих низкую эффективность исследовательского поведения (НЭИП) в тесте «закрытый крестообразный лабиринт», отличается более низкой плотностью 5-HT_{2A}-рецепторов (B_{max} = 519 ± 13 фмоль/мг, p = 0,02) по сравнению с субпопуляцией с высокой эффективностью исследовательского поведения (ВЭИП) (639 ± 48 фмоль/мг). После 5-кратного введения ноотропов лишь в группах с НЭИП наблюдалось значимое увеличение величины B_{max} под действием всех исследованных ноотропов: пирацетама (643 ± 42 фмоль/мг); пантокальцина (662 ± 29 фмоль/мг); семакса (742 ± 29 фмоль/мг) и нооглютила (1145 фмоль/мг) при p = 0,01. По величине Kd субпопуляции исходно не различались и не претерпевали значимых изменений под действием препаратов. Наличие серотонин-позитивных эффектов у всех исследованных препаратов на животных с пониженным содержанием рецепторов согласуется с гипотезой об избирательном, модулирующем характере действия веществ с ноотропным эффектом.

Ключевые слова: ноотропы; 5-HT_{2A}-рецепторы; [G-^{3}H](+)Кетансерин; пирацетам; нооглютил; семакс; пантокальцин; стриатум; крестообразный лабиринт; исследовательское поведение

Для цитирования:
Фирстова Ю.Ю., Васильева Е.В., Ковалёв Г.И. Влияние ноотропных препаратов на 5-HT_{2A}-рецепторы стриатума аутбредных мышей с различной эффективностью исследовательского поведения // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.42–47. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10023.

The Effects of Nootropic Drugs on Striatal 5-HT_{2A}-Receptors in Outbred Mice with Different Efficacy of Exploratory Behavior

Firstova Yu.Yu., Vasileva E.V., Kovalev G.I.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The effect of subchronic administration of nootropic drugs of different structures (piracetam 200 mg/kg/day, pantocalcin 200 mg/kg/day, semax 0.6 mg/ kg/day, nooglutil 50 mg/kg/day) to mice of the outbred line 1CR on spontaneous research activity in a closed cross-maze and on the binding characteristics of 5-HT_{2A}-receptors in striatal membranes. In experiments using [^{3}H] (+)Ketanserin, it has been established that the mice brains exhibiting a low efficacy of exploratory behavior (LEEB) in the closed cross-maze test has a lower density of 5-HT_{2A} receptors (B_{max} = 519 ± 13 fmol/ mg , p = 0.02) in comparison with the subpopulation with high efficacy of exploratory behavior (HEEB) (639 ± 48 fmol / mg). After 5-fold administration of nootropics, only in groups with LEEB there was a significant increase in the Bmax value under the action of all investigated nootropics: piracetam (643 ± 42 fmol/mg); pantocalcine (662 ± 29 fmol/mg); semax (742 ± 29 fmol/mg) and nooglutil (1145 fmol/mg) at p = 0.01. By the Kd value, the subpopulations did not initially differ and did not undergo significant changes under the action of the drugs. The presence of serotonin-positive effects of all drugs studied in animals with initially reduced receptor density is consistent with the hypothesis of the selective, modulating nature of the nootropics action.

Keywords: nootropics; 5-HT_{2A}-receptors; [G-^{3}H] (+) Ketanserin; piracetam; nooglutil; semax; pantocalcine; striatum; closed cross-maze; exploratory behavior

For citations:
Firstova YuYu, Vasileva EV, Kovalev GI. The Effects of Nootropic Drugs on Striatal 5-HT_{2A}-Receptors in Out-Bred Mice with Different Efficacy of Exploratory Behavior. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;3:42–47. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10023.

Введение

Серотонинергическая система осуществляет в мозге модулирующее влияние на большинство основных функций центральной нервной системы, включая память, мышление, эмоции, восприятие, настроение и сознание [1–4]. В осуществлении этих процессов задействовано множество взаимодействующих друг с другом нейромедиаторных систем мозга. В частности, существуют точки зрения о зависимости процессов памяти от баланса активностей серотонин- и дофаминергической систем мозга [5, 6], серотониновой и глутаматергической [7]. Из 14 подтипов серотониновых рецепторов отдельный интерес для фармакологии интегративных функций представляют 5-HT_{2A}-рецепторы [8]. Обладая возбуждающим действием, эти рецепторы способны усиливать выброс глутамата, обеспечивая его взаимодействие (модулирующее действие) с различными типами глутаматных рецепторов (AMPA, mGluR2/3, mGluR5) [9]. С другой стороны, в ранее проведённых нами экспериментах с ноотропными препаратами, обладающими прокогнитивными свойствами, на фенотипических и генотипических моделях дефицита исследовательской активности в крестообразном лабиринте [10, 11] было показано, что все они проявляют своё избирательное модулирующее действие на н-холино- и NMDA-рецепторы в префронтальной коре и гиппокампе животных с исходным дефицитом исследовательской активности [12–15]. Вместе с тем известно, что определённую роль в осуществлении процессов обучения и памяти играют базальные ядра мозга – хвостатое ядро, скорлупа, бледный шар, субталамическое ядро, чёрная субстанция, обладающие отдельными нейронными связями с зонами коры мозга [16]. Однако роль 5-HT_{2A}-рецепторов стриатума в механизме формирования ноотропного эффекта оставалась неизученной.

Таким образом, в предпринятом исследовании предполагалось: (а) сравнить вклад 5-HT_{2A}-рецепторов в стриатуме в активность исследовательского поведения типированных по эффективности поведения в крестообразном лабиринте мышей 1CR; и (б) оценить на них влияние отечественных ноотропов пантокальцина, семакса и нооглютила в сравнении с пирацетамом.

Материалы и методы

Животные. Исследования проводили на 75 самцах мышей аутбредной линии 1CR (питомник Филиал "Столбовая" ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) массой 30-35 г. Содержание животных соответствовало действующим санитарным правилам по содержанию лабораторных животных. Использовался полный рацион экструдированного брикетированного корма (ГОСТ на корм Р 50258-92). Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3-96 и 51000.4-96), Приказу МЗ и СР РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики» [17]. Эксперименты проводили с 10 до 16 часов. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Препараты и дозы. Пирацетам – 200 мг/кг/день (UCB); пантокальцин – 200 мг/кг/день (ФГУП СКТБ «Технолог»); семакс – 0,6 мг/кг/день (ОХФАВ ИМГ РАН), нооглютил – 50 мг/кг/день (Отдел химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»). Препараты были использованы в дозах, эквипотенциальных по антиамнестическому эффекту, согласно результатам ранее проведённых экспериментов в тестах УРПИ [11].

Тест исследовательского поведения в закрытом крестообразном лабиринте. Оценку ноотропной активности пирацетама, нооглютила, семакса и пантокальцина осуществляли на мышах по тесту спонтанной ориентации (поведения патрулирования) в крестообразном лабиринте, который позволяет одновременно выявлять признаки ноотропного, анксиолитического, седативного, психостимулирующего действия веществ [10, 12]. С помощью теста мышей аутбредной линии 1CR разделяли на две субпопуляции с высокой (ВЭИП) и низкой (НЭИП) исследовательской активностью. Далее типированных животных случайным образом разделяли на группы, получавшие исследуемые препараты. Инъекции проводили в/б ежедневно в течение 5 дней. По истечении этого срока животных повторно тестировали в крестообразном лабиринте, через 24 часа после последней инъекции декапитировали, выделяли стриатумы, которые размещали по группам в криопробирки и хранили в жидком азоте для последующего радиолигандного анализа. Подробное описание метода и результатов поведенческих тестов описано в наших ранних работах [13, 15].

Радиолигандное связывание

Приготовление мембранного материала. Через 24 часа после последней инъекции животных подвергали цервикальной дислокации и декапитации, быстро извлекали мозг на лёд. Стриатумы после выделения замораживали в жидком азоте.

В дальнейшем структуры размораживали и гомогенизировали в отмывочном буфере (50 мМ Tris-HCl, pH 7,4). Полученный гомогенат разбавляли 50 объёмами отмывочного ледяного (0-40 °С) и центрифугировали при 40 000 об/мин в течение 20 мин. Полученный супернатант сливали, осадок ресуспендировали в том же объёме отмывочного буфера и повторно центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный конечный осадок ресуспендировали в 10 мл инкубационного буфера.

Радиолигандный анализ 5-HT$_{2A}$-рецепторов. В эксперименте использовали меченный тритием (+)Кетансерин ("Perkin Elmer") с удельной активностью 40 Кюри/ммоль. Реакционная смесь (конечный объём 0,5 мл) содержала 200 мкл инкубационного буфера (Tris-base – 6,050 г, NaCl – 6,955 г, KCl – 0,369 г, $CaCl_2$ – 0,293 г, $MgCl_2$ – 0,202 г, паргилин –2 мг, аскорбиновая кислота – 1 г, pH = 7,4), 50 мкл меченного лиганда (в диапазоне концентраций от 0,1 до 30 нМ) и 250 мкл суспензии белка мембран. Неспецифическое связывание оценивали в присутствии 50 мкл немеченого лиганда (+) Кетансерина (1μM), которое составляло 12-14 % общего. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Реакционную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа при непрерывном встряхивании в шейкере. По окончании инкубации пробы фильтровали через стекловолокнистые фильтры GF/B (Whatman), предварительно смоченные в 0,3 % полиэтиленимине в течение 2 часов при 40 °С. Каждую пробирку промывали один раз холодным буфером, затем фильтры промывали три раза тем же объёмом буфера. Фильтры просушивали на воздухе и переносили в сцинтилляционные флаконы. Фильтры заливали 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе толуола (4 г PPO, 0,2 г POPOP на 1 л толуола). Радиоактивность определяли на счетчике Tri-Carb 2900TR ("Perkin Elmer") с эффективностью счёта 45-50 %.

Для обработки результатов радиолигандного связывания использовали программу GraphPad Prism 4 Demo. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с помощью программы Statistica 6.0 ("Stat Soft", Tulsa, OK, USA). При обработке полученных результатов использовали методы параметрической и непараметрической статистики (t-тест Стьюдента, χ^2, F-критерий Фишера) согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [17].

Результаты и их обсуждение

Нейромедиатор серотонин выполняет множественные функции по модулированию информационных процессов посредством активации обширного семейства 5-НТ-рецепторов, включающего подтипы семиспиральных рецепторов GPCRs (5-HT$_1$, 5-HT$_2$, 5-HT$_{4\text{-}7}$) и канальный 5-HT$_3$. Наибольшая популяция серотонергических нейронов локализована в среднем мозге, особенно в ядрах шва (raphe nuclei). Медиальное и дорзальное ядра шва обеспечивают общие проекции, иннервация базальных ядер (стриатума, субталамических ядер, чёрной субстанции) осуществляется из второго, входя в т. н. «кортико-базально-таламические» пути, играющие роль в контроле моторных, эмоциональных и когнитивных функций [16, 18]. Следовательно, 5-HT$_{2A}$-рецепторы представляют собой важные мишени для воздействия фармакологическими средствами [8]. Открытие [^{3}H]-Кетансерина в качестве селективного лиганда для рецепторов 5-HT$_{2A}$-подтипа [19] оказалось важным событием, которое существенно продвинуло исследования этих важных рецепторов.

Для изучения индивидуально-типологического рецепторного профиля препаратов использовали апробированный комплексный поведенческо-нейрохимический подход с привлечением неинвазивной методики типирования животных по уровню эффективности исследовательского поведения в закрытом крестообразном лабиринте [13]. После субхронического введения ноотропных препаратов типированным животным в условиях насыщения радиолигандного связывания *ex vivo* тритированного лиганда серотониновых рецепторов кетансерина изучали изменение характеристик связывания 5-HT$_{2A}$-рецепторов в стриатуме.

Модуляция эффективности синаптической передачи рецепторами осуществляется двумя молекулярными механизмами. С одной стороны, это изменение чувствительности (сродства) к рецептору, с другой – увеличение или снижение количества активных рецепторов на мембране. Чтобы определить, с чем связаны изменения в специфическом связывании [^{3}H](+)Кетансерина с мембранами стриатума – с изменениями в сродстве или количестве мест связывания, – были проведены кинетические исследования по определению параметров связывания – константы диссоциации K_d и максимального числа мест связывания B_{max}. Для этого был применён метод насыщения связывания радиолиганда мембранами стриатума, результаты которого для субпопуляций НЭИП и ВЭИП приведены на рис. 1А и Б соответственно. Далее эти зависимо-

сти были преобразованы в координатах Скетчарда (рис. 2А и Б), из которых были рассчитаны величины B_{max} и K_d, представленные в табл. 1.

Таблица 1

Параметры рецепторного связывания [^{3}H] (+) Кетансерина под влиянием 5-кратного введения ноотропов (m ± S.E.M.)

	НЭИП		ВЭИП	
	B_{max} *(фмоль/мг)*	K_d *(нМ)*	B_{max} *(фмоль/мг)*	K_d *(нМ)*
Контроль	519 ± 13#	11 ± 1	639 ± 48	14 ± 2
Пирацетам	643 ± 42*	14 ± 2	603 ± 18	12 ± 1
Нооглютил	1145 ± 136*	15 ± 4	572 ± 44	15 ± 2
Семакс	742 ± 29*	14 ± 2	664 ± 49	11 ± 2
Пантокальцин	662 ± 29*	10 ± 1	675 ± 48	10 ± 2

Примечания: # – статистически достоверное отличие между субпопуляциями ($p < 0,02$); * – статистически достоверное отличие от контроля ($p < 0,01$).

Таким образом, было установлено, что у контрольных животных из субпопуляции с НЭИП количество мест связывания [^{3}H](+)Кетансерина в стриатуме на 20 % ниже (B_{max} = 519 ± 13 фмоль/мг), чем у субпопуляции с ВЭИП (B_{max} = 639 ± 48).

Эти данные совпадают со сведениями о меньшем содержании 5-HT_{2A}-рецепторов в мозге больных с мягкими когнитивными нарушениями, которые были получены с помощью методов ядерно-магнитного резонанса (MRI) и позитронно-эмиссионной томографии (PET) с использованием [^{18}F]-алтансерина. При этом сниженная плотность 5-HT_{2A}-рецепторов в стриатумах больных существенно коррелировала с проявлением депрессии и тревоги по шкале NPI-Q [20].

С другой стороны, оставалась не изученной роль 5-HT_{2A}-рецепторов в механизме действия ноотропных препаратов. В ранее опубликованных работах нами было показано, что специфический эффект ноотропов проявляется при использовании животных с когнитивным дефицитом, который сопровождался сниженной плотностью NMDA-рецепторов и концентрацией мозгового фактора BDNF в гиппокампе, увеличенным количеством н-холинорецепторов в префронтальной коре мозга мышей [11, 13, 15].

Поэтому в следующей серии экспериментов были изучены эффекты субхронического введения отечественных ноотропов пантокальцина, семакса и нооглютила в сравнении с пирацетамом на связывание [^{3}H](+)Кетансерина мембранами стриатумов мышей с низкой и высокой эффективностью поведения в закрытом крестообразном лабиринте.

Субхроническое введение каждого из четырёх препаратов увеличило количество мест связывания [^{3}H](+)Кетансерина только у животных с НЭИП: пирацетам на 24 % (B_{max} = 643 ± 42 фмоль/мг); нооглютил на 120 % (B_{max} = 1145 ± 136 фмоль/мг); семакс на 43 % (B_{max} =742 ± 29 фмоль/мг) и пантокальцин на 28 % (B_{max} = 662 ± 29 фмоль/мг). В группах с ВЭИП статистически значимых изменений в количестве рецепторов серотонина под действием препаратов не наблюдалось (см. табл. 1) (рис. 2).

Величина константы диссоциации (Kd) оставалась неизменной между субпопуляциями. После субхронического введения препаратов также не наблюдалось статистически значимых изменений в данном параметре радиолигандного связывания

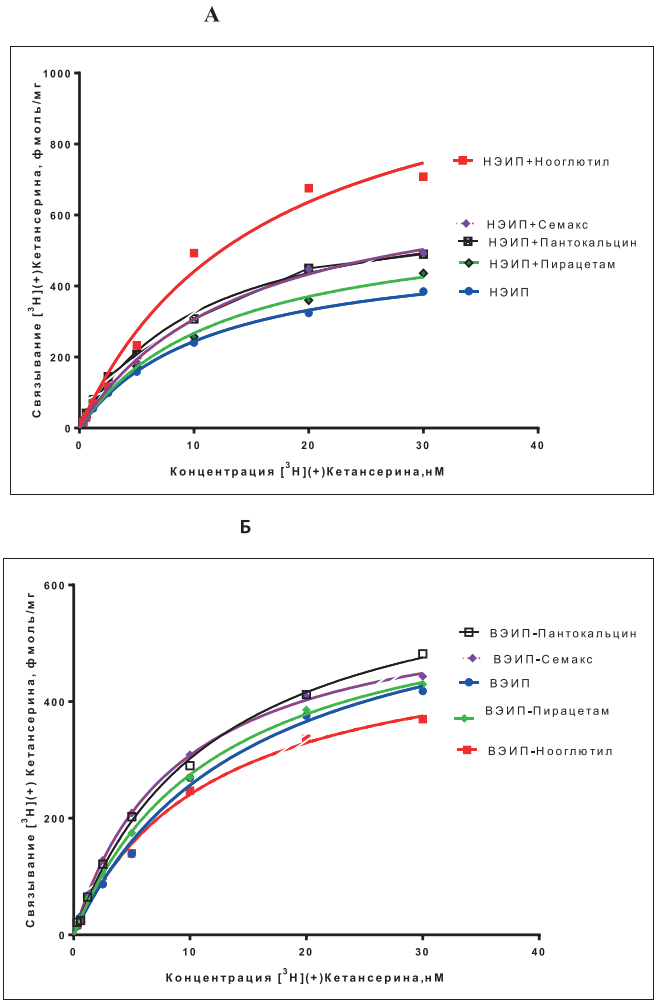
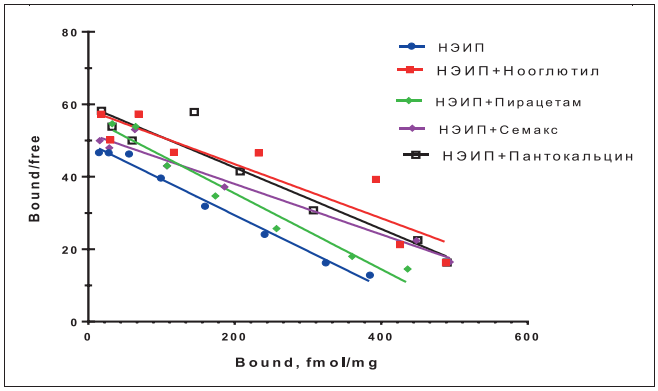


Рис. 1. Кривые насыщения специфического связывания [^{3}H](+)Кетансерина с 5-HT_{2A}-рецепторами мембран стриатума мышей 1CR с (А) низкой (НЭИП) и (Б) высокой эффективностью исследовательского поведения (ВЭИП)

А



Б

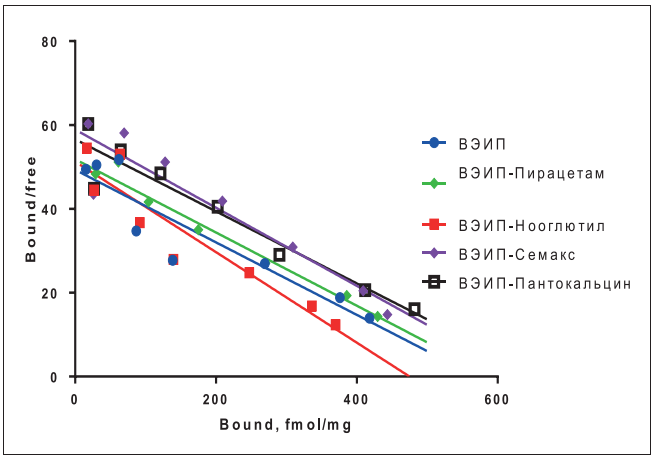


Рис. 2. Графики Скетчарда для связывания [^{3}H] (+) Кетансерина с мембранами стриатума мышей 1CR с (А) низкой (НЭИП) и (Б) высокой эффективностью исследовательского поведения (ВЭИП)

(табл. 1) (рис. 1–2).

Следовательно, наличие серотонин-позитивных эффектов у всех исследованных препаратов на животных с пониженным содержанием рецепторов согласуется с ранее полученными данными [11] об избирательном, модулирующем характере действия веществ с ноотропным эффектом. Обнаруженное увеличение количества 5-HT$_{2A}$-рецепторов серотонина, возможно, связано со стимуляцией препаратами нейропластических процессов в головном мозге.

Выводы

1. Субпопуляция мышей линии 1CR, характеризующаяся низкой эффективностью исследовательского поведения в крестообразном лабиринте, обладает 20 % дефицитом мест специфического связывания [^{3}H](+)Кетансерина в мембранах стриатума по сравнению с мышами с высокой исследовательской активностью.

2. Показано, что 5-кратное системное введение пирацетама, пантокальцина, семакса и ноотропила увеличивает, соответственно, на 24, 28, 43 и 120 % показатели плотности 5-HT$_{2A}$-рецепторов мембранами стриатума лишь в субпопуляции со сниженной эффективностью исследовательского поведения.

3. Результаты указывают на специфический модулирующий характер участия 5-HT$_{2A}$-рецепторов стриатума в механизме действия ноотропных препаратов при неинвазивном моделировании дефицита исследовательской активности.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ковалёв Георгий Иванович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: kovalev@academpharm.ru
ORCID ID: 0000-0002-8597-7018
SPIN-код: 8461-8814
д. м. н., проф., заведующий лабораторией радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Фирстова Юлия Юрьевна
к. б. н., с. н. с. лаборатория радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kovalev Georgy
Corresponding author
e-mail: kovalev@academpharm.ru
ORCID ID: 0000-0002-8597-7018
SPIN code: 8461-8814
Doctor of Medical Sciences, Prof., Head of the laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Firstova Yuliya
Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer, laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Васильева Екатерина Валерьевна
ORCID ID: 0000-0002-9178-2823
SPIN-код: 1054-4872
к. б. н., с. н. с. лаборатория радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Vasil'eva Ekaterina
ORCID ID: 0000-0002-9178-2823
SPIN code: 1054-4872
Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer, laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Archer T. Serotonin and fear retention in the rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1982;96:491–516. DOI: 10.1037/h0077897
2. Aghajanian GK, Andrade R. Electrophysiology of 5-HT receptors. In: Baumgarten HG, Gothert M, eds. Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. *Berlin: Springer-Verlag;* 1997. p. 499–535. DOI: 10.1007/978-3-642-60921-3_19
3. Harvey JA. Role of the Serotonin 5-HT 2A Receptor in Learning. *Learning & Memory.* 2003;10(5):355–362. DOI: 10.1101/lm.60803
4. Aznar S, El-Sayed Hervig M. The 5-HT2A serotonin receptor in executive function: Implications for neuropsychiatric and neurodegenerative diseases. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 2016;64:63–82. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2016.02.008
5. Prinssen EP, Kleven MS, Koek W. Effects of dopamine antagonists in a two way active avoidance procedure in rats: Interactions with 8-OH-DPAT, ritanserin, and prazosin. *Psychopharmacology.* 1996;128:191–197. DOI: 10.1007/s002130050124
6. Luciana M, Collins PF, Depue RA. Opposing roles for dopamine and serotonin in the modulation of human spatial working memory functions. *Cerebral Cortex.* 1998;8:218–226. DOI: 10.1093/cercor/8.3.218
7. Zhang C, Marek GJ. AMPA receptor involvement in 5-hydroxytryptamine 2A receptor-mediated pre-frontal cortical excitatory synaptic currents and DOI-induced head shakes. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2008;32(1):62–71. DOI: 10.1016/j.pnpbp.2007.07.009.
8. Roth B. Irving Page Lecture: 5-HT 2A serotonin receptor biology: Interacting proteins, kinases and paradoxical regulation. *Neuropharmacology.* 2011;61:348–354. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.012
9. Meneses A. Neurotransmitters and Memory: Cholinergic, Glutamatergic, GABAergic, Dopaminergic, Serotonergic, Signaling, and Memory. *Identification of Neural Markers Accompanying Memory.* 2014;5–45. DOI: 10.1016/B978-0-12-408139-0.00002-X
10. Салимов Р.М. Оценка упорядоченности пути в процессе исследовательского поведения у мышей // *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* – 1988. – Т.38. – №3. – С.569–571. [Salimov RM. Otsenka uporyadochennosti puti v protsesse issledovatel'skogo povedeniya u myshej. *Zhurnal vysshej nervnoj deyatel'nosti im. I.P. Pavlova.* 1988;38(3):569–571. (In. Russ).]
11. Ковалев Г.И. Фармакодинамика ноотропных средств. *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2018. – Т.81. – №S. – С. 114. [Kovalev GI. Farmakodinamika nootropnyih sredstv. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya.* 2018;(81 suppl. S):114. (In. Russ).]
12. Salimov RM, Kovalev GI. Effects of N-cholinergic drugs on behavior in the explorative cross-maze in mice: comparison with cognitive enhancers. *Eur. Neuropsychopharmacology.* 2005;15(2):230–234. DOI: 10.1016/s0924-977x(05)80455-9
13. Ковалев Г.И., Фирстова Ю.Ю., Салимов Р.М. Влияние пирацетама и ацефена на NMDA и никотиновые рецепторы мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения в крестообразном лабиринте // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2008. – Т.71. – №1 – С.12–17. [Kovalev GI, Firstova YuYu, Salimov RM. Effects of piracetam and meclofenoxate on the brain NMDA and nicotinic receptors in mice with different exploratory efficacy in the cross maze test. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya.* 2008;71(1):12–17. (In Russ).]. DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2008-71-1-12-17
14. Ковалёв Г.И., Фирстова Ю.Ю., Салимов Р.М., и др. Механизмы избирательного действия Семакса при когнитивном дефиците у мышей // *Психиатрия.* – 2010. – Т.3. – №45. – С.23–28. [Kovalev GI, Firstova YuYu, Salimov RM, et al. Mehanizmy Mekhanizmy izbiratel'nogo dejstviya Semaksa pri kognitivnom deficite u myshej. *Psihiatriya.* 2010;3(45):23–28. (In Russ).]
15. Фирстова Ю.Ю., Абаимов Д.А., Капица И.Г., и др. Влияние скополамина и ноотропного препарата фенотропила на рецепторы нейромедиаторов мозга крыс в тесте условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) // *Нейрохимия.* – 2011. – Т.28. – №2. – С.130–141. [Firstova YY, Abaimov DA, Kapitsa IG, et al. The effects of scopolamine and the nootropic drug phenotropil on rat brain neurotransmitter receptors during testing of the conditioned passive avoidance task. *Neurochemical Journal.* 2011; 5(2):115–125. (In Russ).]
16. Seger CA. The basal ganglia in human learning. *The Neuroscientist.* 2006;12(4):285–290. DOI: 10.1177/1073858405285632
17. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств.* Часть первая. / Под ред. Миронова А.Н. – М.: Гриф и К.; 2012. [*Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv.* CHast' pervaya. Ed by Mironov A.N. Moscow: Grif I K.; 2012. (In Russ).]
18. Miguelez C, Morera-Herreras T, Torrecilla M, et al. Interaction between the 5-HT system and the basal ganglia: functional implication and therapeutic perspective in Parkinson's disease. *Frontiers in Neural Circuits.* 2014;8(21):1–9. DOI: 10.3389/fncir.2014.00021
19. Leysen JE, Niemegeers CJ, Van Nueten JM, et al. [3H]Ketanserin (R 41 468), a selective 3H-ligand for serotonin2 receptor binding sites. Binding properties, brain distribution, and functional role. *Mol. Pharmacol.* 1982;21(2):301–314.
20. Hasselbalch SG, Madsen K, Svarer C, et al. Reduced 5-HT 2A receptor binding in patients with mild cognitive impairment. *Neurobiology of aging.* 2008;29:1830–1838. DOI: 10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.011
21. Фирстова Ю.Ю., Долотов О.В., Кондрахин Е.А., и др. Влияние ноотропных препаратов на уровень BDNF в гиппокампе и коре мозга мышей с различной эффективностью исследовательского поведения // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* – 2009. – Т.72. – №6. – С.3–6. [Firstova YuYu, Dolotov OV, Kondrakhin EA, et al. Effects of Nootropic Drugs on Hippocampal and Cortical BDNF Levels in Mice with Different Exploratory Behavior Efficacy. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya.* 2009;72(6):3–6. (In Russ).]

Изучение фармакокинетики [^{3}H]-циклопролилглицина в крови крыс

Ковалёв Г.И.[1], Золотарёв Ю.А.[2], Дадаян А.К.[2], Шрам С.И.[2], Абдуллина А.А.[1], Васильева Е.В.[1], Колыванов Г.Б.[1], Жердев В.П.[1]

[1] – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва
[2] – ФГБУН «Институт молекулярной генетики», Москва

Резюме. Изучена фармакокинетика меченого по тритию метаболита ноопепта циклопролилглицина [^{3}H]-ЦПГ после внутривенного болюсного введения в дозе 5,7 мкг (2 мКи). Мечение субстанции ЦПГ проводили с помощью реакции высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена. Обнаружено, что временной характер изменений концентрации [^{3}H]-ЦПГ в крови крыс подчиняется двухкамерной модели. Расчёт фармакокинетических параметров показал, что α-фаза (фаза распределения) протекает очень быстро, а β-фаза элиминации [^{3}H]-ЦПГ достаточно продолжительна. При этом величина $T_{1/2\alpha}$ составляет 1 мин, а $T_{1/2\beta}$ – 80 мин. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами по фармакокинетике ЦПГ как метаболита, образующегося из лекарственного препарата ноопепт. ЦПГ существенно отличается от других дипептидных соединений по величинам фармакокинетических параметров ($T_{1/2e}$, MRT и др.), что предполагает наличие у него большей продолжительности фармакологического действия.

Ключевые слова: циклопролилглицин (ЦПГ); фармакокинетика [^{3}H]-ЦПГ; фармакокинетическое моделирование; фармакокинетические параметры; крысы; кровь

Для цитирования:
Ковалёв Г.И., Золотарёв Ю.А., Дадаян А.К., Шрам С.И., Абдуллина А.А., Васильева Е.В., Колыванов Г.Б., Жердев В.П. Изучение фармакокинетики [3H]-циклопролилглицина в крови крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* – 2018. – №3. – С.48–56. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10024.

The Study of [^{3}H]-Cycloprolylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood

Kovalev G.I.[1], Zolotarev Yu.A.[2], Dadayan A.K.[2], Shram S.I.[2], Abdullina A.A.[1], Vasileva E.V.[1], Kolyvanov G.B.[1], Zherdev V.P.[1]

[1] – FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow
[2] – Institute of Molecular Genetics, RAS, Moscow

Resume. The objective of this study is to evaluate pharmacokinetic parameters of tritium-labeled cycloprolylglycine [^{3}H] –CPG following intravenous bolus administration of 5.7 μg (2 mCi). [^{3}H] –CPG was prepared by solid-state catalytic isotopic exchange with spillover-tritium. It was found that plasma concentration-time profile of [^{3}H] –CPG is adequately fit by a two-compartment model. The pharmacokinetic parameter estimates revealed rapid α-phase (distribution phase) ($T_{1/2\alpha}$ 1 min) followed by a slower β-phase of elimination ($T_{1/2\beta}$ 80 min). These findings are consistent with previous results of pharmacokinetic study of CPG as a noopept metabolite. CPG is differ significantly from other therapeutic peptides in pharmacokinetic profile ($T_{1/2}$, MRT, etc), which implies that CPG has a more prolonged duration of action.

Keywords: cycloprolylglycine (CPG); pharmacokinetics; [^{3}H] –CPG; pharmacokinetic modeling; pharmacokinetic parameters; rats; blood

For citations:
Kovalev GI, Zolotarev YuA, Dadayan AK, Shram SI, Abdullina AA, Vasileva EV, Kolyvanov GB, Zherdev VP. The Study of [3H]-Cycloprolylglycine Pharmacokinetics in Rat Blood. *Farmakokinetika i farmakodinamika.* 2018;3:48–56. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10024.

Введение

Циклопролилглицин (ЦПГ, цикло-(Про-Гли)) был сначала описан в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова в качестве одного из основных метаболитов препарата ноопепт [1].

Впоследствии ЦПГ был обнаружен в мозге крыс с помощью ВЭЖХ и ГЖХ, а также масс-спектрометрического анализа с ионизацией электронным ударом в качестве эндогенного соединения, средняя концентрация которого составила 2,8 ± 0,3 нмоль/г сырой ткани [2]. Фармакологическое изучение позволило выявить у него антиамнестическую [3], анксиолитическую [4], антигипоксическую, нейропротекторную [5] активности, которые он проявляет в диапазоне доз от 0,05 до 1 мг/кг. Помимо этого, ЦПГ увеличивал содержание нейротрофина BDNF в культурах гиппокампальных мышиных клеток линии HT-22 и клеток нейробластомы человека линии SH-SY5Y как в норме, так и при моделировании повреждения с помощью глутамата и 6-гидроксидофамина [6].

Целью настоящего исследования стало изучение фармакокинетики пептида циклопролилглицин с использованием его радиоактивномеченного тритием производного [G-^{3}H]-ЦПГ.

Материалы и методы

Получение радиоактивномеченного тритием пептида ЦПГ. Реакцию ВТКИО с газообразным тритием проводили при температуре 170 °С в твёрдой смеси, образованной ЦПГ, нанесённым на неорганический носитель, и высокодисперсным катализатором платиновой группы. ЦПГ в количестве 1,0 мг растворяли в 1 мл воды и смешивали с 20 мг неорганического носителя. Воду удаляли при уменьшенном давлении при 20 °С. Неорганический носитель с нанесённым препаратом смешивали с 10 мг гетерогенного катализатора платиновой группы. В ампулу объёмом 10 мл помещали полученную твёрдую смесь, вакуумировали, заполняли газообразным тритием до давления 250 торр и проводили реакцию ВТКИО при повышенной температуре. Ампулу охлаждали, вакуумировали, продували водородом. Пептид десорбировали 20 % водным этанолом. Для удаления лабильного трития меченый пептид ещё дважды растворяли в 20 % водном этаноле и упаривали досуха. Хроматографическую очистку проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Кромасил в градиенте метанола в присутствии 0,1 % трифторуксусной кислоты (рис. 1). Пептид упаривали и растворяли в этаноле до радиоактивной концентрации 1 мКи/мл.

Реакцией ВТКИО с тритием были получен меченый тритием пептид [^{3}H]-ЦПГ с молярной радиоактивностью 54 Ки/ммоль в количестве 20 мКи и радиохимической чистотой более 98 %, с использованием уникальной установки по обмену водорода на тритий ОВТ-1 (Отдел химии физиологически активных веществ ИМГ РАН).

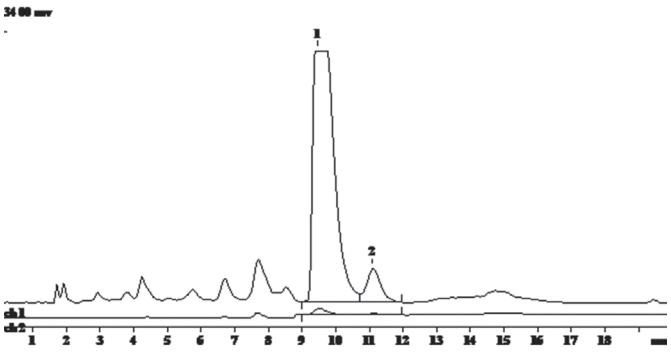


Рис. 1. Выделение меченого тритием пептида [^{3}H]-ЦПГ на колонке Кромасил С18 8 х 150 мм в градиенте концентрации метанола 0-10 % в присутствии 0,1 % TFA. Скорость подачи: 2,5 мл/мин. УФ детекция 225 нм, 1,0 A(Ch 1); 254 нм, 1,0 A(Ch 2)

Животные и их содержание. В исследованиях использовали здоровых половозрелых крыс-самцов линии Вистар (n = 3), весом 340 ± 10 г. Содержание животных соответствовало действующим санитарным правилам по содержанию лабораторных животных. Исследование выполнялось согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [7] и Правилам лабораторной практики в Российской Федерации [8]. Все процедуры в исследовании выполнялись согласно утверждённым Комиссией по гуманному обращению с животными протоколам.

Введение животным пептида ЦПГ и отбор крови. Введение пептида ЦПГ и отбор крови осуществляли через ярёмные вены. Перед введением пептида крыс анестезировали смесью кетамина (91 мг/кг) и ксилазина (9,1 мг/кг), после чего с вентральной стороны справа и слева препарировали две ярёмные вены и устанавливали внутривенные катетеры, слева – Flexicath G24 (Apexmed, Нидерланды), а в правую – Flexicath G22 (Apexmed, Нидерланды). В левую ярёмную вену вводили 80 мкл гепарина и затем в течение 10-15 с – раствор радиоактивно меченого пептида ЦПГ (2000 мкКи, 5,7 мг/кг) в объеме 200 мкл. По истечении определенного времени (1; 2,5; 4; 6; 10; 20; 40; 60 и 90 мин) из правой ярёмной вены отбирали примерно по 0,4 мл венозной крови, которую помещали в пластиковые пробирки и быстро замораживали в жидком азоте.

Анализ содержания пептида [^{3}H]-ЦПГ в образцах крови. При приготовлении препаратов для ВЭЖХ анализа замороженные и взвешенные образцы крови в пластиковых пробирках подвергались лиофильной сушке в течение 2 суток. После чего, высушенные образцы прогревались для удаления пептидазной активности тканей. Для приготовления пептидного экстракта проводили последовательные экстракции органическими растворителями, упаривание под уменьшенным давлением и центрифугирование. Лиофильно высушенные образцы крови прогревали при 65 °С в течение 30 минут, после чего образцы измельчались в этих же пластиковых пробирках горизонтальными ножами, вращающимися со скоростью 5000 об./мин. Первую экстракцию этих образцов проводили 90 % водным ацетонитрилом, содержащим 1 % трифторуксусной кислоты. После центрифугирования раствор, содержащий меченый тритием пептид и компоненты плазмы крови, подвергался сушке под уменьшенным давлением, реэкстракции метанолом и повторному центрифугированию. Полученный при этом раствор, содержащий меченый тритием пептид и компоненты плазмы крови, подвергался сушке под уменьшенным давлением, реэкстракции 0,1 % водным раствором гептафтормасляной кислоты и последующему центрифугированию.

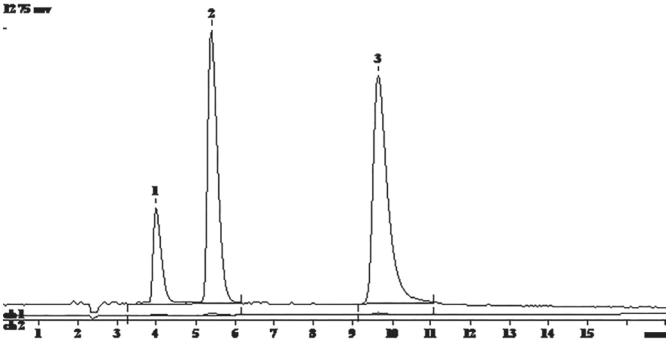


Рис. 2. Хроматография смеси пептидов: 50 мкг PG (Пик №1), 20 мкг GP (Пик №2), 30 мкг ЦПГ (Пик №3), на колонке Кромасил С18 8 х 150 мм, подвижная фаза градиент метанола 0-10 % 0,1 % TFA, 3,0 мл/мин. УФ детекция 225 нм, 1,0 А (Ch 1), 254 нм, 1,0 А (Ch 2)

Радиохроматографический анализ проводили с помощью ВЭЖХ на колонке Кромасил С18,5 мкм, 150 х 4 мм в присутствии 0,1 % трифторуксусной кислоты. Выбраны условия анализа с помощью ВЭЖХ, позволяющие выделить фракцию, соответствующую ЦПГ, и отделить дипептиды PG и GP, являющиеся возможными пептидными метаболитами протеолитического гидролиза (рис. 2).

Хроматографические фракции, соответствующие пептиду ЦПГ, собирали и анализировали с помощью жидкостного сцинтилляционного счётчика TriCarb 2900TR ("PerkinElmer") с эффективностью счёта 45 %. Количественные значения радиоактивномеченого ЦПГ в пробе нормировали по внутреннему стандарту.

Анализ фармакокинетических данных. Анализ фармакокинетических параметров ЦПГ проводили в рамках модельного подхода согласно Рекомендациям по проведению доклинических исследований [7]. Для расчётов параметров и построения графиков использовали программу Sigma Plot 11.0. Фармакокинетические кривые («концентрация ЦПГ-время») для расчёта фармакокинетических параметров были построены по усреднённым значениям концентраций ЦПГ в крови, полученным из данных для 3 животных

Результаты и обсуждение

Соединения пептидной природы находят все большее применение при разработке новых лекарственных препаратов [9, 10]. Важными их преимуществами являются высокая эффективность и чрезвычайно низкая токсичность. Однако исследование их фармакокинетических свойств сопряжено с целым рядом проблем. Прежде всего это обусловлено их быстрой деградацией в тканях и образованием множества метаболитов. Уникальные возможности для получения корректных результатов при

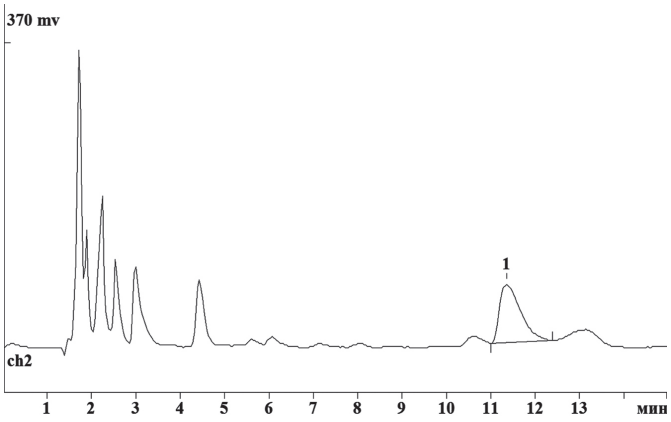


Рис. 3. Анализ меченого тритием пептида [^{3}H] –ЦПГ в пептидном экстракте крови крысы в присутствии 10 мкг ЦПГ (Пик №1) с помощью хроматографии на колонке Кромасил С18 4 х 150 мм, подвижная фаза 0,1 % TFA, 1,0 мл/мин. УФ детекция 225 нм, 1,0 А (Ch 2)

анализе фармакокинетики пептидов даёт использование равномерно меченных изотопами водорода пептидов, содержащих изотопную метку во всех аминокислотных остатках [11]. Для получения таких пептидов ранее было предложено использовать реакцию высокотемпературного твердофазного каталитического изотопного обмена (ВТКИО) [12, 13]. В Отделе химии физиологически активных соединений Института молекулярной генетики РАН в течение ряда лет проводятся исследования по изучению твёрдофазных каталитических реакций с изотопами водорода, получившие признание в нашей стране

Таблица 1

Концентрация [^{3}H]-ЦПГ в крови крыс (нг/мл) после внутривенного болюсного введения в дозе 5,7 мкг (n = 3)

№	Время, мин	Радиоактивность ЦПГ, DPM/мл*10^6	ЦПГ, нг/мл
1	1	12,5 ± 1,0	16,1 ± 1,3
2	2,5	7,8 ± 0,6	10,0 ± 0,7
3	4	6,2 ± 0,6	7,9 ± 0,7
4	6	5,5 ± 0,4	7,1 ± 0,5
5	10	5,3 ± 0,6	6,9 ± 0,8
6	20	3,9 ± 0,4	5,0 ± 0,5
7	40	3,6 ± 0,4	4,6 ± 0,5
8	60	3,1±0,3	4,0±0,4
9	90	2,7 ± 0,3	3,5 ± 0,4

Примечания: значения концентраций [^{3}H]-ЦПГ представлены в виде среднее ± ошибка среднего ($\bar{x}\ \bar{x} \pm S\bar{x}\ \bar{x}$).

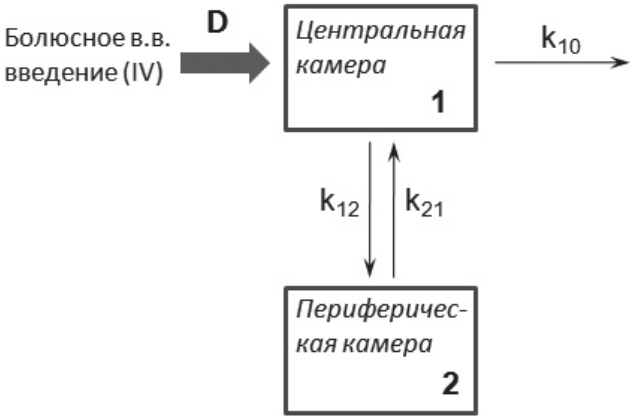


Рис. 4. Схематическое представление открытой двухкамерной фармакокинетической модели с элиминацией фармакологического вещества из центральной камеры

и за рубежом. Важной особенностью реакции ВТКИО является то, что изотопный обмен в пептидах и белках происходит с сохранением их биологических свойств [14]. Метод позволяет получать изотопномеченные белки и пептиды, в которых атомы изотопов распределены по всей молекуле, что открывает возможность мониторинга всех фрагментов, образующихся при их протеолитическом гидролизе в тканях организма.

Эта реакция была использована при синтезе меченого по тритию дипептида ЦПГ с молярной радиоактивностью 54 Ки/моль, что позволило использовать его для проведения фармакокинетических исследований на экспериментальных животных.

На рисунке 3 приведена типичная хроматограмма, полученная в ходе анализа ЦПГ в пептидных экстрактах из образцов крови.

В результате проведённого анализа были рассчитаны значения концентрации ЦПГ в цельной веноз-

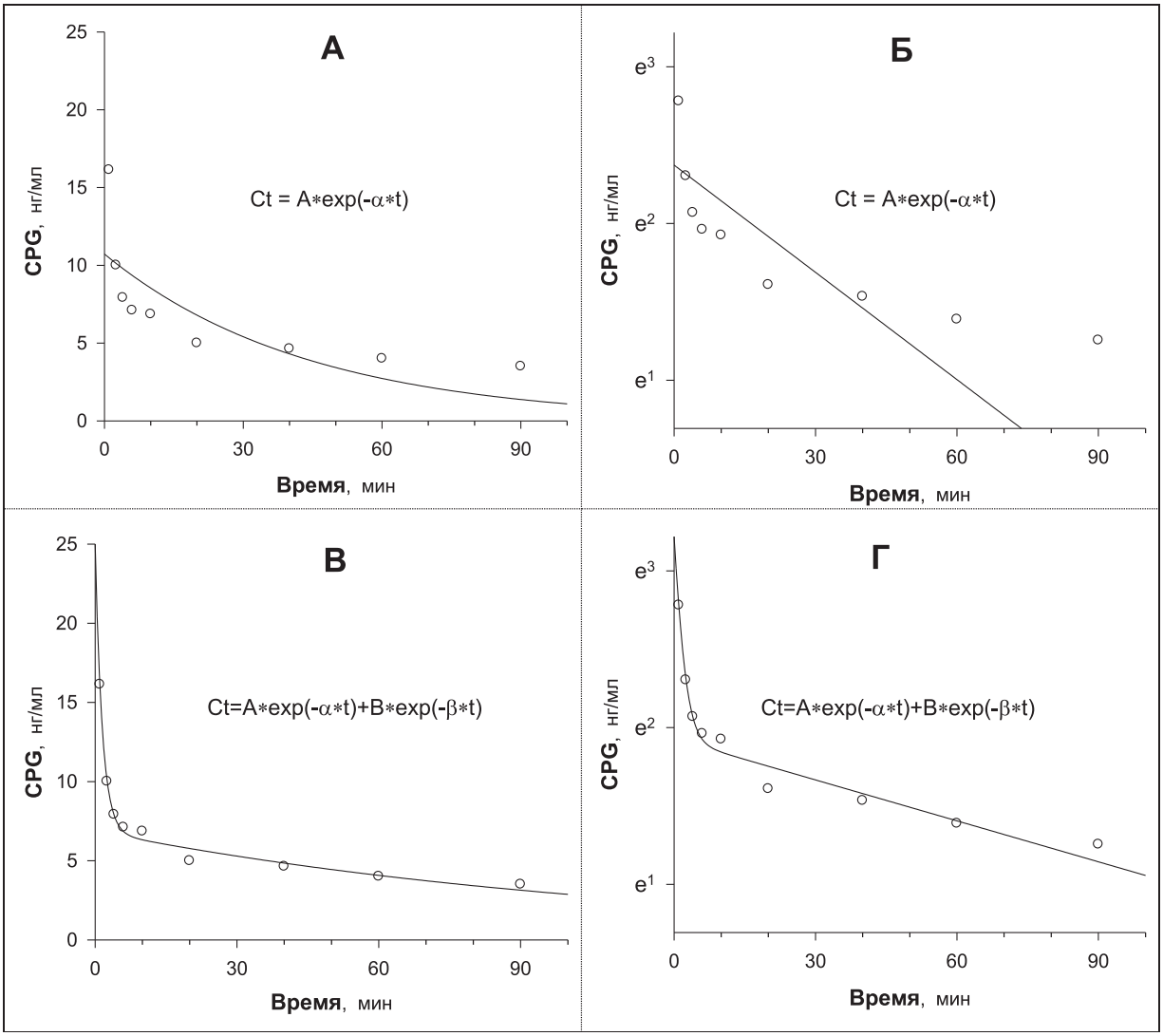


Рис. 5. Аппроксимация экспериментальных данных уравнениями убывающих экспонент: моно- (А, Б) и биэкспоненциальных (В, Г) зависимостей с использованием нелинейной регрессии

Таблица 2

Оценка «качества» аппроксимации экспериментальных данных в рамках одно- и двухкамерной фармакокинетических моделей

Показатель/критерий	Однокамерная модель	Двухкамерная модель
Математическая модель	$C_t = A \cdot \exp(-\alpha \cdot t)$	$C_t = A \cdot \exp(-\alpha \cdot t) + B \cdot \exp(-\beta \cdot t)$
r	0,7565	0,9953
r^2	0,5722	0,9906
Скорректированный r^2	0,5722	0,9850
Стандартная ошибка оценки регрессии	2,7487	0,4816
Дисперсионный анализ	F = 9,3636 p = 0,0183	F = 175,990 p < 0,0001
Нормальность распределения (тест Шапиро-Уилка)	W = 0,8667 p = 0,1134	W = 0,9445 p = 0,6304

Таблица 3

Значения макроконстант в уравнении (2) для экспериментальных данных, представленных в таблице 1

Макроконстанта	Среднее	Ошибка среднего (SE)	t-критерий Стьюдента	p
A	18,13	2,04	8,902	0,0003
B	6,87	0,43	16,113	<0,0001
α	0,6685	0,1075	6,221	0,0016
β	0,0087	0,0017	5,188	0,0035

ной крови крысы при однократном внутривенном болюсном введении (табл. 1).

Для расчёта фармакокинетических параметров был использован модельный подход. Минимальная ФК-модель, пригодная для описания полученных экспериментальных данных – открытая двухкамерная модель с элиминацией пептида из центральной камеры (рис. 4).

Это хорошо видно из графического представления данных (концентрация/время) в прямых и полулогарифмических координатах (рис. 5).

Убывающая моноэкспоненциальная зависимость используется для математического описания однокамерной ФК-модели, а убывающая биэкспоненциальная зависимость – для описания простейшей двухкамерной ФК-модели (рис. 1). Уравнения убывающих моно- и биэкспоненциальных зависимостей можно представить в виде:

$$Ct = A \cdot \exp(-\alpha \cdot t) \quad (1)$$

$$Ct = A \cdot \exp(-\alpha \cdot t) + B \cdot \exp(-\beta \cdot t) \quad (2)$$

где: C_t – *концентрация фармакологического вещества в крови в момент времени t;* а A, B, α и β – *гибридные константы (макроконстанты) интегральных уравнений (1) и (2).*

В случае биэкспоненциальной зависимости (двухкамерная модель) первая экспонента (макроконстанты A и α) в основном отражает процесс распределения вещества между центральной и периферической камерами, а вторая экспонента (макроконстанты B и β) – процесс элиминации вещества из центральной камеры.

Для наилучшей подгонки значений параметров уравнений (1) и (2) (макроконстант) экспериментальным данным применяли нелинейную регрессию и метод наименьших квадратов с помощью Sigma Plot 11.0.

Корректность применения той или иной модели для описания имеющихся экспериментальных данных была оценена с помощью коэффициента детерминации (r^2) и скорректированного коэффициента детерминации (adjusted r^2). Значения этих и некоторых других показателей для двух рассматриваемых моделей приведены в таблице 2. Представленные результаты указывают на то, что экспериментальные данные хорошо описываются биэкспоненциальной зависимостью (уравнение (2)). Следовательно, полученные экспериментальные данные (табл. 2) корректно анализировать в рамках двухкамерной ФК-модели.

С использованием нелинейной регрессии определены значения макроконстант в уравнении (2) (табл. 3).

Исходя из значений макроконстант были рассчитаны значения микроконстант k_{10}, k_{12} и k_{21} (см. схему на рис. 1), периодов полуэлиминации фазы распределения ($T_{1/2\alpha}$) и фазы элиминации ($T_{1/2\beta}$) и ряд системных ФК-параметров (табл. 4).

Таблица 4

Расчётные значения фармакокинетических параметров пептида [^{3}H]-ЦПГ в крови крысы при однократном болюсном внутривенном введении в дозе 5,7 мкг

ФК-параметр	Размерность	Расчётное значение
C_0	нг/мл	25,01
$t_{1/2\alpha}$	мин	1,04
$t_{1/2\beta}$	мин	79,67
Микроконстанты для 2-камерной модели		
k_{12}	мин$^{-1}$	0,4565
k_{21}	мин$^{-1}$	0,1901
k_{10}	мин$^{-1}$	0,0306
Системные фармакокинетические параметры		
AUC	мин×нг/мл	817
AUMC	мин^2×нг/мл	90864
MRT	мин	111,18
k_{el}	мин$^{-1}$	0,0306
Cl_T	мл/мин	6,974
V_c	мл	228
Vd_{ss}	мл	775
$Vd_{d\beta}$	мл	802

где:

C_0	Концентрация фармакологического вещества в крови в начальный момент времени (t = 0 мин)
$t_{1/2\alpha}$	Период полуэлиминации фазы распределения фармакологического вещества между центральной и периферической камерами
$t_{1/2\beta}$	Период полуэлиминации фазы элиминации фармакологического вещества из центральной камеры
k_{12}	Константа скорости (первого порядка) переноса фармакологического вещества из центральной камеры в периферическую
k_{21}	Константа скорости (первого порядка) переноса фармакологического вещества из периферической камеры в центральную
k_{10}	Константа скорости (первого порядка) элиминации фармакологического вещества из центральной камеры
AUC	Площадь под кривой зависимости Ct от t
AUMC	Площадь под кривой зависимости CtЧt от t
MRT	Среднее время удерживания вещества в организме
k_{el}	Константа скорости (первого порядка) элиминации фармакологического вещества из центральной камеры
Cl_T	Общий клиренс
V_c	Объём центральной камеры (объём распределения фармакологического вещества в начальный момент времени – t = 0 мин)
Vd_{ss}	Объём распределения фармакологического вещества при достижении квазистационарного состояния в периферической камере (т. е. в момент достижения максимальной концентрации фармакологического вещества в периферической камере)
Vd_{β}	Объём распределения фармакологического вещества в фазе элиминации

Усреднённая концентрационная кривая [^{3}H]-ЦПГ и рассчитанные из неё фармакокинетические параметры исследуемого соединения в крови животных после однократного внутривенного введения (в/в) представлены на рис. 5 и в табл. 4. [^{3}H]-ЦПГ определялся в крови на протяжении 90 минут. Кажущаяся начальная концентрация (C_0) ЦПГ в плазме крови крыс составила 25,01 нг/мл. Его период полуэлиминации ($T_{1/2\beta}$) составил 79,7 минут.

Ранее на крысах была изучена фармакокинетика соединения дипептидной структуры – ноопепта, обладающего ноотропной активностью. В результате исследования биотрансформации ноопепта были установлены химические структуры его метаболитов. Среди основных продуктов биотрансформации был обнаружен циклопролилглицин [1].

Величина периода полуэлиминации ($T_{1/2el}$) ЦПГ после в/в способа введения ноопепта крысам в дозе 5 мг/кг составила 2,65 ч (159 мин) и MRT – 2,52 ч (151,2 мин) [15]. Следовательно, $T_{1/2el}$ ЦПГ после в/в введения ноопепта значительно больше аналогичного параметра незамещенных ди- и трипептидов.

Например, период полуэлиминации пептидного соединения – анксиолитика ГБ-115 у крыс после его перорального введения в дозе 100 мг/кг составил 0,24 ч (14,4 мин) и MRT – 0,28 ч (16,8 мин) [16]. Величина $T_{1/2el}$ другого пептидного вещества – нейролептика дилепта у крыс после его перорального введения в дозе 200 мг/кг составила 0,55 ч (33,0 мин) и MRT – 0,85 ч (51,0 мин) [17].

Учитывая, что период полуэлиминации ЦПГ после его в/в введения составил около 80,0 минут, ЦПГ можно отнести к группе «долгоживущих» лекарственных веществ пептидной природы. Такие ФК-параметры, как $T_{1/2el}$ и среднее время удерживания вещества в организме (MRT – 111,2 мин) указывают на относительно долгое нахождение исследуемого вещества в системном кровотоке животных.

Таким образом, ЦПГ в сравнении с другими пептидными соединениями более длительно выводится из организма крыс как в качестве метаболита, образующегося после введения ноопепта, так и при непосредственном его введении как лекарственного вещества.

Выводы

1. Реакцией ВТКИО с тритием получен меченый тритием пептид ЦПГ с молярной радиоактивностью 54 Ки/ммоль и радиохимической чистотой более 98 %, что позволило использовать его для проведения фармакокинетических исследований на экспериментальных животных.

2. С использованием радиоактивномеченного тритием производного проведено исследование фармакокинетики [^{3}H]-ЦПГ в крови крысы при однократном внутривенном болюсном введении пептида. Показано, что изменение концентрации [^{3}H]-ЦПГ в крови (во времени) соответствует двухкамерной ФК-модели, описываемой двухэкспоненциальным уравнением. Это может быть обусловлено наличием достаточно ёмкого депо ЦПГ, характеризующегося относительно медленным накоплением и высвобождением пептида.

3. На основе модельного подхода рассчитаны значения модель-зависимых параметров (микроконстанты k_{10}, k_{12} и k_{21}) и системных фармакокинетических параметров (AUC, MRT, k_{el}, Cl_T, V_d). Они свидетельствуют об относительно низкой скорости элиминации (k_{el}) и о продолжительном времени удерживания [^{3}H]-ЦПГ в организме – 0,03 мин$^{-1}$ и 111 мин соответственно.

4. После однократного внутривенного болюсного введения в дозе 5,7 мг/кг ЦПГ в организме крыс определяется на протяжении 90 минут. Величина периода полувыведения ЦПГ из крови составила 80 минут и среднего времени удерживания вещества в организме – 111 минут.

5. Большой период полувыведения [^{3}H]-ЦПГ в β-фазе позволяет отнести его к относительно долгоживущим соединениям с пептидной структурой.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ковалёв Георгий Иванович
Автор, ответственный за переписку
e-mail: kovalev@academpharm.ru
ORCID ID: 0000-0002-8597-7018
SPIN-код: 8461-8814
д. м. н., проф., заведующий лабораторией радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Золотарев Юрий Александрович
ORCID ID: 0000-0001-8342-5888
SPIN-код: 2854-4997
д. х. н., проф., в. н. с. лаборатории изотопно-меченных физиологически активных веществ, ИМГ РАН, Москва

Дадаян Александр Каренович
ORCID ID: 0000-0002-9159-104X
к. х. н., с. н. с., лаборатории изотопно-меченных физиологически активных веществ, ИМГ РАН, Москва

Шрам Станислав Иванович
ORCID ID: 0000-0002-0331-5505
SPIN-код: 9784-7184
к. х. н., заведующий сектором нейрофармакологии, Отдела химии физиологически активных веществ, ИМГ РАН, Москва

Абдуллина Алия Анвяровна
ORCID ID: 0000-0001-7499-0885
SPIN-код: 9781-1554
м. н. с. лаборатории радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Васильева Екатерина Валерьевна
ORCID ID: 0000-0002-9178-2823
SPIN-код: 1054-4872
к. б. н., с. н. с. лаборатории радиоизотопных методов исследований, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Колыванов Геннадий Борисович
ORCID ID: 0000-0002-2571-0047
SPIN-код: 2538-8639
д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kovalev Georgy
Corresponding author
e-mail: kovalev@academpharm.ru
ORCID ID: 0000-0002-8597-7018
SPIN code: 8461-8814
Doctor of Medical Sciences, Prof., head of the laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Zolotarev Yurii
ORCID ID: 0000-0001-8342-5888
SPIN code: 2854-4997
Doctor of Chemical Sciences, Prof., leading researcher the laboratory of isotope-labeled physiologically active substances, IMG RAS, Moscow

Dadayan Alexander
ORCID ID: 0000-0002-9159-104X
Candidate of Chemical Sciences, Senior Research Officer the laboratory of isotope-labeled physiologically active substances, IMG RAS, Moscow

Shram Stanislav
ORCID ID: 0000-0002-0331-5505
SPIN code: 9784-7184
Candidate of Chemical Sciences, head of neuropharmacology sector, Department of chemistry of physiologically active substances, IMG RAS, Moscow

Abdullina Aliya
ORCID ID: 0000-0001-7499-0885
SPIN code: 9781-1554
junior researcher, laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Vasileva Ekaterina
ORCID ID: 0000-0002-9178-2823
SPIN code: 1054-4872
Candidate of Biological Sciences, Senior Research Officer laboratory of radioisotope research methods, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Kolyvanov Gennadiy
ORCID ID: 0000-0002-2571-0047
SPIN code: 2538-8639
Doctor of Biological Sciences, leading researcher the laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Жердев Владимир Павлович
ORCID ID: 0000-0003-2710-7134
SPIN-код: 2213-9592
д. м. н., проф., заведующий лабораторией фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Zherdev Vladimir
ORCID ID: 0000-0003-2710-7134
SPIN code: 2213-9592
Doctor of Medical Sciences, Prof, Head of laboratory pharmacokinetics FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Бойко С.С., Жердев В.П., Гудашева Т.А., и др. Фармакокинетика нового потенциального дипептидного ноотропного препарата ГВС-111 и его метаболитов в мозге крыс // *Химико-фармацевтический журнал*. – 2001. – № 9. – С.11–13. [Boiko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA, et al. Pharmacokinetics of the new potential dipeptide nootrope gvs-111 and related metabolites in rat brain. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*. 2001;35(9):11–13. (In Russ).] DOI: 10.1023/A:1014082406443

2. Gudasheva TA, Boyko SS, Ostrovskaya RU, et al. Identification of a novel endogenous memory facilitating cyclic dipeptide cyclo-prolylglycine in rat brain. *FEBS Letters*. 1996; 391:149–152. DOI: 10.1016/0014-5793(96)00722-3

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

4. Гудашева Т.А., Константинопольский М.А., Островская Р.У., и др. Анксиолитическая активность эндогенного ноотропного пептида циклопролилглицина в тесте приподнятого крестообразного лабиринта // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2001. – Т.131. – № 5 – С.464–466. [Gudasheva TA, Konstantinopol'skii MA, Ostrovskaya RU, et al. Anxiolytic activity of endogenous nootropic dipeptide cycloprolylglycine in elevated plus-maze test. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2001;131(5): 464–466. (In Russ).]

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

6. Гудашева Т.А., Колясникова К.Н., Антипова Т.А., и др. Нейропептид циклопролилглицин увеличивает содержание мозгового нейротрофического фактора в нейрональных клетках // *Доклады академии наук*. – 2016. – Т. 469. – №4 – С.492–495. [Gudasheva TA, Kolyasnikova KN, Antipova TA, et al. Neuropeptide cycloprolylglycine increases the levels of brain-derived neurotrophic factor in neuronal cells. *Doklady Akademii nauk*. 2016;469(4):492–495. (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565216220254

7. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / Под ред. Миронова А.Н. Часть первая. – М.: Гриф и К.; 2012. с. 944. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanii lekarstvennykh sredstv. Ed by Mironov AN. Moscow: Grif i K.; 2012. (In Russ).]

8. Национальный стандарт Российской федерации, ГОСТ Р 53434 – (2009). [Natsional'nyi standart Rossiiskoi federatsii, GOST R 53434 – (2009). (In Russ).]

9. Malavolta L, Cabra FR. Peptides: Important tools for the treatment of central nervous system disorders. *Neuropeptides*. 2011;45(5):309–316. DOI: 10.1016/j.npep.2011.03.001

10. Diao L, Meibohm B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides. *Clinical Pharmacokinetics*. 2013;52(10):855–868. DOI: 10.1007/s40262-013-0079-0

11. Zolotarev YuA, Dadayan AK, Bocharov EV, et al. New development in the tritium labelling of peptides and proteins using solid catalytic isotopic exchange with spillover-tritium. *Amino Acids*. 2003; 24(3): 325–333. DOI: 10.1007/s00726-002-0404-7

12. Золотарев Ю.А., Дадаян А.К., Долотов О.В., и др. Равномерно меченные тритием пептиды в исследованиях по их биодеградации in vivo и in vitro // *Биоорганическая химия*. – 2006. – Т. 32. – №2 – С.183–191. [Zolotarev YuA, Dadayan AK, Dolotov OV, et al. Evenly tritium-labeled peptides in study of peptide *in vivo* and *in vitro* biodegradation. Russian *Journal of Bioorganic Chemistry*. 2006;32(2):183–191. (In Russ).]

13. Zolotarev YuA, Dadayan AK, Kozik VS, et al. Solid-state isotope exchange with spillover hydrogen in organic compounds. *Chem. Rev*. 2010;110(9):5425–5446. DOI: 10.1021/cr100053w

14. Zolotarev YuA, Dadayan AK, Borisov YuA, et al. New development in the solid-state isotope exchange with spillover hydrogen in organic compounds. *J. Phys. Chem. C*. 2013; 117(33):16878–16884. DOI: 10.1021/jp4015299

15. Коротков С.А. *Экспериментальное изучение фармакокинетики и биотрансформации нового дипептидного ноотропа ноопепта. Дис. … канд. биол. наук. – М.; 2003. [Korotkov SA. Eksperimental'noe izuchenie farmakokinetiki i biotransformatsii novogo dipeptidnogo nootropa noopepta*. [dissertation] Moscow; 2003. (In Russ).] Доступно по: http://medical-diss.com/medicina/eksperimentalnoe-izuchenie-farmakokinetiki-i-biotransformatsii-novogo-dipeptidnogo-nootropa-noopepta

16. Раскин С.Ю., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., и др. Фармакокинетика дипептидного анксиолитика ГБ-115 после перорального введения у различных видов животных и человека // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2017. – №3. – С.20–25. [Raskin SYu, Kolyvanov GB, Litvin AA, et al. Pharmacokinetics of dipeptide anxiolytic GB-115 after oral administration in different animals species and humans. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2017;(3):20–25. (In Russ).]

17. Шевченко Р.В., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., и др. Особенности фармакокинетики оригинального нейролептика дилепта у животных и человека // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2014. – Т.77. – №7. – С.23–26. [Shevchenko RV, Litvin AA, Kolyvanov GB, et al. Specific features in pharmacokinetics of the original neuroleptic dilept in animals and humans. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2014; 77(7): 23–26. (In Russ).]. DOI: https://doi.org/10.30906/0869-2092-2014-77-7-23-26

Фармакокинетический анализ препаратов витамина D для перорального приёма

Торшин И.Ю.[1], Громова О.А.[1,2], Фролова Д.Е.[2], Гришина Т.Р.[2], Лапочкина Н.П.[2]

[1] – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва
[2] – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново

Абстракт. В группе здоровых добровольцев (женщины 24-53 лет, *n* = 12) получены фармакокинетические кривые уровней 25(OH)D и 1,25(OH)D в крови для двух лекарственных форм масляный раствор – препарат Вигантол (*n* = 6) и жевательные таблетки – Ультра-Д (*n* = 6). Каждый препарат принимался однократно в дозе 10000 МЕ, затем в течение 6 часов проводились заборы крови. Проведён многокамерный и бескамерный фармакокинетический анализ собранных данных. Установлено, что оба препарата характеризуются сравнимыми показателями фармакокинетики. Например, для Ультра-Д бескамерный анализ позволил оценить значения C_{max} = 28 ± 4 нг/мл, t_{max} = 50 ± 15 мин, C_{last} = 20 ± 1 нг/мл, AUC_t = 8586 ± 693 нг/мл*мин, MRT_t = 170 ± 4 мин, L_z = 0,00087 ± 0,0004 мин-1, $T_{1/2}$ = 15,5 ± 7,2 ч, C_L = 7 ± 2 мл/мин, V_d = 9,04 ± 1,24 л. При этом после приема жевательных таблеток площадь под кривой (показатель AUC_t), характеризующая биодоступность, оказалась достоверно выше. Это объясняется тем, что компоненты слюны ускоряют всасывание, так как солюбилизация молекул холекальциферола начинается уже в ротовой полости. Полученные значениями фармакокинетических параметров практически не зависели от возраста добровольцев. В то же время установлены достоверные корреляции фармакокинетических параметров с начальными уровнями 25(OH)D в крови. Многокамерный фармакокинетический анализ показал, что полученные фармакокинетические кривые с высокой степенью достоверности соответствуют многокамерной модели, включающей три компартмента: «ЖКТ», «центральное кровообращение» и «депо 25(OH)D».

Ключевые слова: холекальциферол; вигантол; Ультра Д; фармакокинетика; биосубстраты

Для цитирования:
Торшин И.Ю., Громова О.А., Фролова Д.Е., Гришина Т.Р., Лапочкина Н.П. Фармакокинетический анализ препаратов витамина D для перорального приёма // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2018;3:57–64.
DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10025.

Pharmacokinetic analysis of drugs vitamin D for oral administration

Torshin I.Yu.[1], Gromova O.A.[1,2], Frolova D.E.[2],
Grishina T.R.[2], Lapochkina N.P.[2]
[1] – Federal Research Center “Computer Science and Control“ of the Russian Academy of Sciences, Moscow
[2] – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Ivanovo State Medical Academy" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo

Abstract. In the group of healthy volunteers (women 24-53 years, *n* = 12) pharmacokinetic curves of levels 25(OH)D and 1,25(OH)D in the blood for two dosage forms of oil solution – the drug Vigantol (*n* = 6) and chewing tablets – Ultra-D (*n* = 6) were obtained. Each drug was taken once in a dose of 10,000 IU, then blood sampling was carried out for 6 hours. The multi-chamber and tubeless pharmacokinetic analysis of the collected data was carried out. It was found that both drugs are characterized by comparable indicators of pharmacokinetics. For example, for the Ultra-D tubeless analysis allowed us to estimate the values of C_{max} = 28 ± 4 ng/ml, t_{max} = 50 ± 15 min, C_{last} = 20 ± 1 ng/ml, for other uses = 8586 ± 693 ng/ml*min, MRT_t = 170 ± 4 min, L_z = 0.00087 ± 0.0004 inch min-1, $T_{1/2}$ = 15.5 ± 7.2 h, C_L = 7 ± 2 ml/min, V_d = 9.04 ± 1.24 L. Thus, after taking chewable tablets, the area under the curve (indicator for other uses) characterizing the bioavailability, was significantly higher. This is due to the fact that the components of saliva accelerate absorption, since the solubilization of molecules of cholecalciferol begins already in the oral cavity. The pharmacokinetic parameters obtained were practically independent of the age of the volunteers. At the same time, significant correlations of pharmacokinetic parameters with initial levels of 25(OH)D in blood were established. Multi-chamber pharmacokinetic analysis showed that the obtained pharmacokinetic curves with a high degree of confidence correspond to the multi-chamber model, which includes three compartments: "GI", "Central blood circulation" and "depot 25(OH)D".

Keywords: cholecalciferol; vigantol; Ultra D; pharmacokinetics; biosubstrates

For citations:
Torshin IYu, Gromova OA, Frolova DE, Grichina TR, Lapochkina NP Pharmacokinetic analysis of drugs vitamin D for oral administration. *Pharmacokinetics and pharmacodynamics.* 2018;3:57–64. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10025.

Введение

Низкая обеспеченность витамином D в любом возрасте ассоциирована с более ранним стартом и более тяжёлым течением многочисленных заболеваний, таких как остеопороз, рахит, ишемическая болезнь сердца, ожирение, сахарный диабет, деменция, повышенная заболеваемость острыми респираторными заболеваниями и туберкулёзом, опухолевые заболевания, бесплодие и др. [1].

К настоящему времени установлено существование более 50 метаболитов витамина D. Однако только два метаболита витамина D_3, а именно 25-гидроксивитамин D3 («25(OH)D3» или просто «25(OH)D») и 1,25-дигидроксивитамин D3 («1,25(OH)2D3» или «1,25(OH)2D») получили наибольшее внимание исследователей. Уровень 25(OH)D наиболее отчётливо ассоциирован с показателями здоровья [1–6], в то время как уровень 1,25(OH)2D3 в крови является в каком-то смысле «низкоинформативным» маркёром дефицита витамина D3 и слабо коррелирует с уровнем 25(OH)D. Слабость корреляции между уровнем 25(OH)D и 1,25(OH)2D3 обусловлена прежде всего тем, что 1,25(OH)2D3 является высокоактивным стероидным гормоном, и его уровень жёстко регулируется посредством физиологических систем организма [7].

Восполнение потребности в витамине D является одним из важных резервов профилактики и лечения т. н. «болезней цивилизации» [8] и, кроме того, ряда инфекционных заболеваний (прежде всего туберкулёза). Компенсация витамина D осуществляется в подавляющем большинстве случаев препаратами на основе холекальциферола, предназначенными для перорального приёма, и контролируется по уровню 25(OH)D в крови. Фармакологические формы и фармацевтические композиции используемых препаратов существенно отличаются, что делает необходимым исследование их фармакокинетики. В настоящей работе изучены два препарата: масляный раствор холекальциферола (Вигантол) и таблетированная форма холекальциферола (Ультра-Д).

Материалы и методы

Выборка обследуемых. В исследовании приняли участие 12 здоровых добровольцев (женщины 24-53 лет), принимавшие один из двух препаратов: Вигантол (n = 6) и Ультра-Д (n = 6). Каждый препарат принимался однократно в дозе 10 000 МЕ (250 мкг холекальциферола) утром, на голодный желудок, затем в течение 6 часов проводились заборы крови.

Биохимический анализ крови. Кровь забиралась из локтевой вены, каждому добровольцу устанавливался катетер для забора крови на всё время проведения исследования. Курение и приём пищи запрещался до окончания исследования. Биохимическое определение уровней 25(OH)D и 1,25(OH)D проводилось по стандартным методикам [9] методом хемилюминесцентного иммуноферментного анализа на микрочастицах (ARCHITECT i1000sr, Abbott Core Laboratory, США). Фармакокинетические кривые получены для точек 0, 10, 30, 60, 180 и 360 мин.

Фармакокинетический анализ. Использованы методы бескамерного и многокамерного фармакокинетического анализа. Многокамерный анализ проводился посредством пакета SimBiology в составе программного комплекса MATLAB-2016 [10], а бескамерный анализ – с использованием электронных таблиц Excel, дополненных модулями программного пакета PKSolver [11].

Результаты и обсуждение

Подчеркнём специфические трудности фармакокинетического анализа витамина D, обусловленные особенностями биохимии витамина. Во-первых, витамин D (холекальциферол) и его биологически активные формы 25(OH)D и 1,25(OH)D являются эндогенными молекулами. Без использования изотопных меток измеряемый уровень 25(OH)D и 1,25(OH)D обусловлен не только введенным препаратом, но и эндогенным уровнем витамина D. Поэтому для выделения «сигнала», ассоциированного с приёмом витамина D, необходимы оценки статистической значимости различий в значениях концентраций, измеряемых в различные моменты времени.

Во-вторых, добровольцы характеризуются существенным разбросом в начальных значениях уровня 25(OH)D (в настоящем исследовании от 10 до 90 нг/мл) и 1,25(OH)D (от 8 до 33 пг/мл), что создаёт определённые трудности при проведении фармакокинетического анализа. Столь существенный разброс начальных концентраций 25(OH)D и 1,25(OH)D обусловлен состоянием здоровья (дефицит витамина D коморбиден многочисленным хроническим патологиям [1]), особенностями метаболизма витамина D и стероидов в организме обследуемого. Поэтому полученные в настоящем исследовании фармакокинетические кривые (ФК-кривые) были нормализованы и приведены к фиксированному начальному уровню: 20 нг/мл для 25(OH)D и 20 пг/мл для 1,25(OH)D. Данные значения соответствуют средним значениям по выборке россиянок.

В результате проведённых измерений получены нормализованные фармакокинетические кривые (ФК-кривые, т. е. зависимости концентраций от времени) для содержания 25(OH)D и 1,25(OH)D в крови (рис. 1).

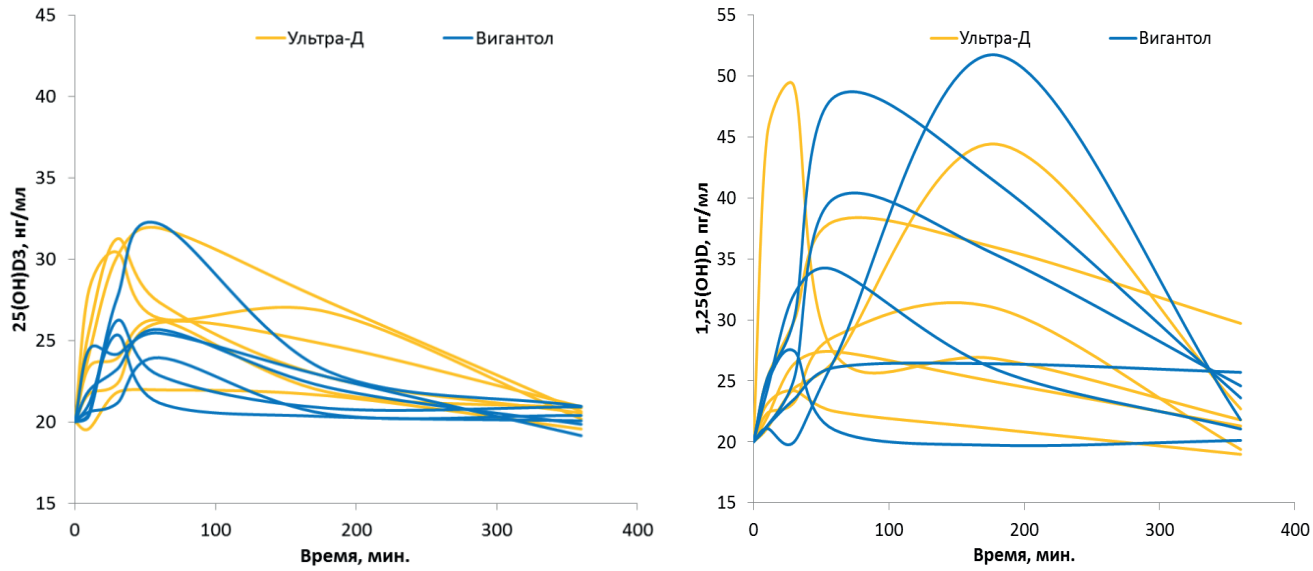


Рис. 1. Фармакокинетические кривые индивидуальных добровольцев, полученные после однократного приёма препаратов витамина D в дозе 10000 МЕ

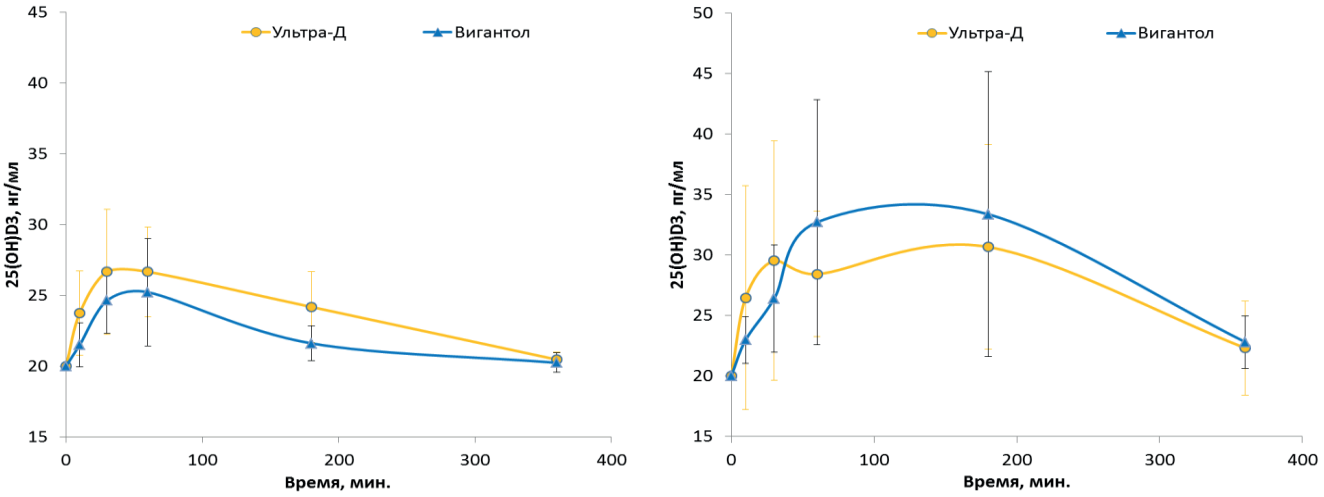


Рис. 2. Усреднённые фармакокинетические кривые ($n = 6$ для каждой кривой, однократный приём препаратов витамина D в дозе 10000 МЕ)

На основании нормализованных ФК-кривых для индивидуальных добровольцев (рис. 1) были получены усреднённые ФК-кривые, необходимые для проведения дальнейшего анализа (рис. 2), и оценена статистическая значимость различий в значениях концентраций, измеряемых в различные моменты времени. В случае усреднённой ФК-кривой для 25(OH)D достоверные отличия для всех препаратов наблюдались для t = 10 мин ($P < 0,03$), t = 60 мин ($P < 0,04$) и t = 360 мин ($P < 0,05$). Такого рода достоверных различий не было найдено для усреднённых кривых для уровня 1,25(OH)D.

Таким образом, на усреднённых ФК-кривых для 25(OH)D достоверно идентифицируются пики концентрации, ассоциированные с приёмом соответствующих препаратов витамина D. Следовательно, данные кривые могут использоваться для расчёта фармакокинетических параметров.

Бескамерный фармакокинетический анализ

Бескамерный анализ позволяет охарактеризовать такие повсеместно используемые ФК-параметры препарата, как площадь под кривой, клиренс, период полувыведения, время и максимальное зна-

Таблица 1

Изученные фармакокинетические параметры бескамерной модели исследованных препаратов витамина D

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

чение достигаемой концентрации tmax, Cmax, объём распределения и др. (табл. 1). Параметры бескамерной модели были рассчитаны для ФК-кривых индивидуальных добровольцев, затем было проведено усреднение параметров с целью получения значений, соответствующих усреднённым ФК-кривым, и стандартных отклонений полученных значений параметров (табл. 2).

Полученные в рамках бескамерного анализа оценки значений ФК параметров показывают, что препараты Вигантол и Ультра-Д характеризовались схожими показателями фармакокинетики (см. табл. 2). За исключением площади под кривой (AUC_t) не было найдено достоверных различий между значениями параметров для двух исследованных групп добровольцев. Например, для Ультра-Д бескамерный анализ позволил оценить значения $C_{max} = 28 \pm 4$ нг/мл, $t_{max} = 50 \pm 15$ мин, $C_{last} = 20 \pm 1$ нг/мл, $AUC_t = 8586 \pm 693$ нг/мл*мин, $MRT_t = 170 \pm 4$ мин, $L_z = 0{,}00087 \pm 0{,}0004$ мин-1, $T_{1/2} = 15{,}5 \pm 7{,}2$ ч, $C_L = 7 \pm 2$ мл/мин, $V_d = 9{,}04 \pm 1{,}24$ л. Сравнительно высокие значения периода полувыведения ($T_{1/2}$, 14.7...28 ч) указывают на то, что для поддержания действующих концентраций 25(OH)D может быть достаточно приёма витамина D один раз в день. Достаточно высокое значение объёма распределения (8...9 л при объёме крови в 4...5 л) указывает на существование своего рода «депо» витамина D в тканях организма. Отметим, что полученные значения фармакокинетических параметров практически не зависели от возраста добровольцев.

Ультра-Д и Вигантол характеризовались схожими значениями параметров C_{max}, t_{max}, C_{last}, MRT_t, L_z, C_L, V_d. В то же время площадь под кривой (показатель AUC_t) была достоверно выше для Ультра-Д по сравнению с Вигантолом (рис. 3). Как известно, показатель AUC_t является косвенной характеристикой биодоступности препаратов, поэтому данный результат позволяет говорить о более высокой биодоступности холекальциферола при приёме таблеток Ультра-Д по сравнению с приёмом маслянного раствора Вигантола внутрь.

Таблица 2

Оценки значений фармакокинетических параметров для бескамерной модели препаратов витамина D (однократная доза 10000 МЕ)

Препарат	C_{max}, нг/мл	t_{max}, мин	C_{last}, нг/мл	AUC_t, нг/мл*мин	MRT_t, мин	L_z, мин-1	$T_{1/2}$, ч	C_L, мл/мин	V_d, л
Ультра-Д	28 ± 4	50 ± 15	20 ± 1	8586 ± 693*	170 ± 4	0,00087 ± 0,0004	15,5 ± 7,2	7 ± 2	9,04 ± 1,24
Вигантол	26 ± 3	50 ± 15	20 ± 1	7988 ± 489	172 ± 4	0,00068 ± 0,0005	28,2 ± 23,2	6 ± 3	9,9 ± 1,4

Примечания: * – достоверное отличие от Вигантола ($p = 0{,}059$).

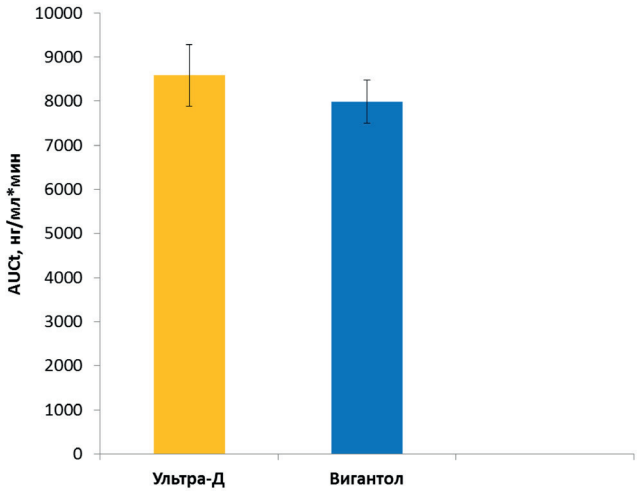


Рис. 3. Площадь под кривой (показатель AUC_t) была достоверно выше для Ультра-Д по сравнению с Вигантолом ($P < 0,05$)

Более высокая биодоступность холекальциферола из Ультра-Д может быть обусловлена тем, что всасывание холекальциферола из жевательной таблетки начинается уже в ротовой полости, причём компоненты слюны ускоряют солюбилизацию молекул холекальциферола. В результате в желудок поступает частично солюбилизированный холекальциферол. Одним из интересных результатов настоящего исследования является установление достоверных корреляций между начальными уровнями 25(OH)D в образцах крови индивидуальных добровольцев и значениями фармакокинетических параметров, рассчитанными на основании ФК-кривых индивидуальных добровольцев. Начальные (базовые) уровни 25(OH)D составили 27 ± 20 нг/мл. При этом у 9 из 12 обследованных (75 %) отмечена недостаточность витамина D (25(OH)D < 30 нг/мл), а у 6 из 12 обследованных (50 %) – выраженный дефицит витамина D (25(OH)D < 20 нг/мл).

Напомним, что в ходе фармакокинетического анализа начальные (базовые) уровни 25(OH)D были нормализованы на типичное для популяции россиянок значение (20 нг/мл). Следовательно, базовый уровень 25(OH)D не использовался при вычислении значений фармакокинетических параметров, перечисленных в табл. 1. Тем не менее, была установлена достоверная корреляция ($P < 0,05$ по тесту Стьюдента) между начальным уровнем 25(OH)D и значениями Cmax (коэффициент корреляции r = 0,60), C_{last} (r = -0,47), AUC_t (r = 0,41), MRT_t (r = -0,66), L_z (r = 0,65), $T_{1/2}$ (r = -0,29), C_L (r = 0,55) и V_d (r = -0,48). Данный результат указывает на существенное влияние обеспеченности витамином D (которая характеризуется уровнем 25(OH)D) на фармакокинетику препаратов витамина D.

Результаты многокамерного фармакокинетического анализа

Для многокамерного ФК-анализа были использованы усреднённые ФК-кривые для содержания 25(OH)D в крови, характеризовавшиеся достоверным пиком концентраций через 50...75 мин после приёма препаратов и относительно пологим участком, указывающим на постепенное выведение

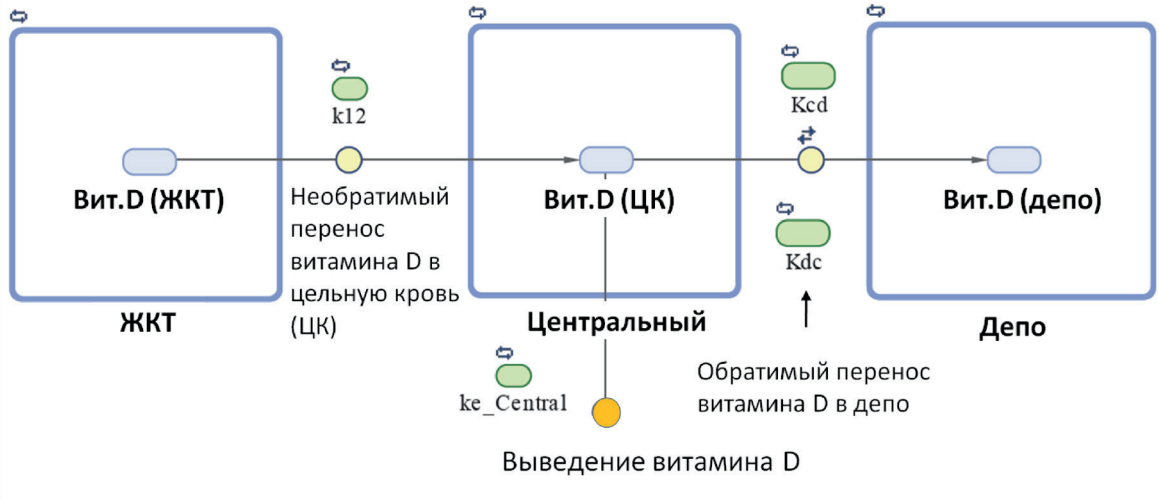


Рис. 4. Трёхкамерная модель фармакокинетики исследованных препаратов витамина D, полученная в результате многокамерного фармакокинетического моделирования в среде MATLAB

Примечания: Приведены условные обозначения соответствующих констант (k12, Kcd, Kdc, Ke_central), использующиеся в тексте статьи.

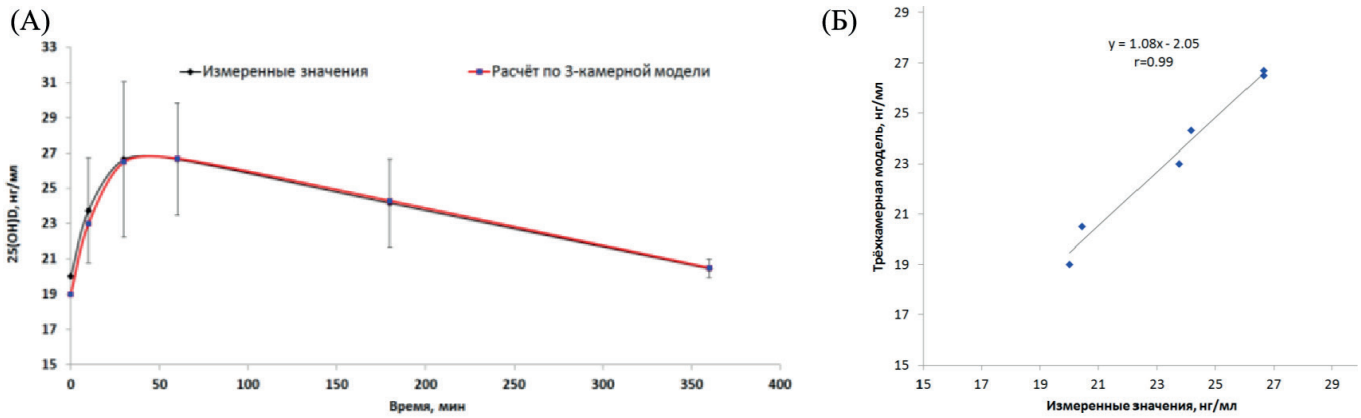


Рис. 5. Показатели качества трёхкамерной ФК-модели

Примечания: (А) Измеренные значения концентраций для точек ФК-кривой и теоретическая ФК-кривая. Среднеквадратичное отклонение концентраций составило a = 0,7 нг/мл. (Б) Корреляция между теоретическими и измеренными значениями концентраций. Коэффициент корреляции r = 0,99.

витамина D из крови (см. рис. 2). Для получения наиболее адекватной многокамерной модели были исследованы одно-, двух-, трёх- и четырёхкамерные модели в различных конфигурациях. В результате моделирования было установлено, что самой простой моделью, максимально точно описывающей исследуемую ФК-кривую (см. рис. 2) является трёхкамерная модель (рис. 4), включающая ЖКТ (1-й компартмент), кровь (центральный, 2-й компартмент) и депо (3-й компартмент). Проведённое моделирование показало, что постепенная элиминация витамина D осуществляется именно из центрального компартмента, а не из депо.

Качество исследованных многокамерных моделей характеризовалось значениями стандартного отклонения концентраций между теоретической и измеренной фармакокинетическими кривыми, а также коэффициентом корреляции между теоретическими и измеренными значениями концентраций 25(OH)D в крови (рис. 5). Для полученной трёхкамерной модели, представленной на рис. 4, значение среднеквадратичного отклонения концентраций составило a = 0,7 нг/мл (при коэффициенте корреляции, равном r = 0,99), что указывает на весьма высокое качество предлагаемой 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 = 3 нг/мл), так же, как и удаление компартмента «ЖКТ» (ср. кв. откл. a = 5 нг/мл). 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).

Таким образом, трёхкамерная модель фармакокинетики витамина D, в которой витамин переходит из ЖКТ в центральный компартмент (кровь), затем в депо, а элиминация происходит только из центрального компартмента (см. рис. 4) в «нулевой»

Таблица 3

Параметры полученной трёхкамерной модели для фармакокинетики препарата Ультра-Д

Параметр	Расшифровка	Ед.	Значение
V(GI)	Объём компартмента «ЖКТ»	у.е.	1,00
V(C)	Объём центрального компартмента	у.е.	562
V(D)	Объём компартмента «депо»	у.е.	1283
k12	Константа переноса из ЖКТ в кровь	мин$^{-1}$	4,66
ke_Central	Константа элиминации из крови	мин$^{-1}$	1,00
Kcd	Константа переноса из крови в депо	мин$^{-1}$	130
Kdc	Константа переноса из депо в кровь	мин$^{-1}$	7,44

компартмент (т. е. мочу) является наиболее адекватной из исследованных многокамерных моделей. ФК-моделирование позволило получить количественные оценки соответствующих констант скорости и объёмов компартментов. Полученные оценки констант скорости были схожи для всех трёх препаратов витамина D; в табл. 3 приведены значения для Ультра-Д.

Результаты многокамерного ФК-анализа позволяют выявить ряд интересных особенностей фармакокинетики исследуемых препаратов витамина D. Обращает на себя внимание весьма малый объём компартмента «ЖКТ» (V(GI) = 1 у.е.), гораздо больший объём центрального компартмента (V(C) = 562 у.е.) и ещё больший объём компартмента депо (V(D) = 1283 у.е.). Из ЖКТ витамин D (в виде холекальциферола) поступает в кровь уже в виде 25(OH)D сравнительно медленно (k12 = 4,66 мин$^{-1}$), что обусловлено необходимостью биотрансформации холекальциферола в 25(OH)D, происходящей в печени. При этом печень является, по всей видимости, также и депо витамина D (КНИГА-Д), причём перенос 25(OH)D из крови в депо происходит весьма быстро (Kcd = 130 мин$^{-1}$). Печень является депо, которое отдаёт 25(OH)D гораздо медленнее (Kdc = 7,44 мин$^{-1}$), чем всасывает (Kcd = 130 мин$^{-1}$), а из центрального компартмента 25(OH)D элиминируется ещё медленнее (ke_Central = 1 мин$^{-1}$), что и обусловливает достаточно пологий характер участка кривой, соответствующего выведению (элиминации) витамина D (см. рис. 2).

Заключение

В группе женщин (n = 12, 24-53 лет) анализировались особенности фармакокинетики двух различных фармацевтических форм витамина D: масляный раствор (Вигантол) и жевательные таблетки (Ультра-Д). Начальный (базовый) уровень 25(OH)D составил 27 ± 20 нг/мл. При этом у 12 из 18 обследованных (75 %) отмечена недостаточность витамина D (25(OH)D < 30 нг/мл), а у 6 из 12 обследованных (50 %) – выраженный дефицит витамина D (25(OH)D < 20 нг/мл). Препараты применялись согласно соответствующим инструкциям, каждый препарат принимался однократно, внутрь, в дозе 10 000 МЕ холекальциферола, в 8 часов утра натощак. Несмотря на очевидные различия в фармацевтических формах, оба изученных препарата характеризовались сравнимыми значениями фармакокинетических показателей C_{max}, t_{max}, C_{last}, AUC_t, MRT_t, L_z, $T_{1/2}$, C_L, V_d, полученных в ходе бескамерного анализа и кинетических констант k12, ke_Central, Kcd и Kdc, полученных в результате многокамерного анализа. При этом после приёма жевательных таблеток площадь под кривой (показатель AUC_t), характеризующая биодоступность, оказалась достоверно выше. Это объясняется тем, что компоненты слюны ускоряют всасывание, так как солюбилизация молекул холекальциферола начинается уже в ротовой полости. Полученные значения фармакокинетических параметров практически не зависели от возраста добровольцев и в то же время показали выраженную корреляцию с начальным (базовым) уровнем 25(OH)D в крови. Полученные результаты указывают на возможность принимать любой из исследованных препаратов витамина D один раз в сутки (что обеспечивает достаточно стабильные концентрации 25(OH)D, а также способствует повышению комплаентности пациенток к приёму витамина D).
18-07-00944 18-07-01022

Работа выполнена при поддержке грантов 18-07-00944, 18-07-01022 РФФИ, определение уровней 25(OH)D и 1,25(OH)D в крови проведено в научно-лабораторном комплексе Chromolab.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Громова Ольга Алексеевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN-код: 6317-9833
д. м. н, профессор, в. н. с., научный руководитель Института Фармакоинформатики, ФИЦ ИУ РАН, Москва

Gromova Olga
Corresponding author
e-mail: unesco.gromova@gmail.com
ORCID ID: 0000-0002-7663-710X
SPIN code: 6317-9833
DM, professor, Institute of pharmacoinformatics FRC CSC RAS, Moscow

Торшин Иван Юрьевич
ORCID ID: 0000-0002-2659-7998
SPIN-код: 1375-1114
к. ф.-м. н., к. х. н., с. н. с. ФИЦ ИУ РАН, Москва

Фролова Дарья Евгеньевна
ORCID ID: 0000-0002-1912-4607
SPIN-код: 6668-6245
ассистент кафедры онкологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Гришина Татьяна Романовна
ORCID ID: 0000-0002-1665-1188
SPIN-код: 1241-0701
д. м. н., профессор, зав. кафедрой фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Лапочкина Нина Павловна
ORCID ID: 0000-0001-6722-2810
д. м. н., профессор, зав. кафедрой онкологии ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Torshin Ivan
ORCID ID: 0000-0002-2659-7998
SPIN code: 1375-1114
Candidate of Physico-mathematical Sciences, Candidate of Chemical Sciences, Senior Researcher Officer FRC CSC RAS, Moscow

Frolova Daria
ORCID ID: 0000-0002-1912-4607
SPIN code: 6668-6245
assistant of Oncology Department, FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Grishina Tatiana
ORCID ID: 0000-0002-1665-1188
SPIN code: 1241-0701
DM, professor, Head of Department of pharmacology, FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Lapochkina Nina
ORCID ID: 0000-0001-6722-2810
DM, professor, Head of Department of Oncology, FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Литература / References

1. Громова О.А., Торшин И.Ю. *Витамин D. Смена парадигмы* / под ред. акад. РАН Е.И. Гусева, проф. И.Н. Захаровой. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2017. –576 с.: ISBN 978-5-9704-4058-2. [Gromova OA, Torshin IYu. *Vitamin D. Smena paradigmy* / pod red akad. RAN EI Guseva, prof. IN Zaharovoj. Moscow. GEHOTAR-Media. 2017. (In Russ).]

2. Торшин И.Ю., Лиманова О.А., Сардарян И.С., и др. Обеспеченность витамином D детей и подростков 7-14 лет и взаимосвязь дефицита витамина D с нарушениями здоровья детей: анализ крупномасштабной выборки пациентов посредством интеллектуального анализа данных // *Педиатрия*. Журнал им. Г.Н. Сперанского. – 2015. –Т. 94. №2. –С.175–184. [Torshin IYu, Limanov OA, Sardaryan IS, et al. Provision of vitamin D in children and adolescents aged 7 to 14 years and the relationship of deficiency of vitamin D with violations of children's health: the analysis of a large-scale sample of patients by means of data mining. *Pediatriya*. 2015;94(2):175–184. (In Russ).]

3. Лиманова О.А., Торшин И.Ю., Сардарян И.С., др. Обеспеченность микронутриентами и женское здоровье: интеллектуальный анализ клинико-эпидемиологических данных // *Вопросы гинекологии, акушерства и перинатологии*. –2014. –Т.13. № 2. –С. 5–15. [Limanova OA, Torshin IYu, Sardaryan IS, et al. Micronutrient provision and women"s health: intellectual analysis of clinicoepidemiological data. *Voprosy ginekologii akusherstva i perinatologii*. 2014;13(2):5–15. (In Russ).]

4. Громова О.А., Торшин И.Ю., Пронин А.В. Особенности фармакологии водорастворимой формы витамина D на основе мицелл // *Фарматека*. –2015. –№ 1 (294). –С.28–35. [Gromova OA, Torshin IYu, Pronin AV. Osobennosti farmakologii vodorastvorimoj formy vitamina D na osnove micell. *Farmateka*. 2015;1(294):28-35. (In Russ).] https://pharmateca.ru/ru/archive/article/30707

5. Громова О.А., Торшин И.Ю., Фролова Д.Е. и др. Витамин D и эстрогензависимые опухоли // *Гинекология*. –2018. –Т.20. –№1 –С.23–30. [Gromova OA, Torshin IYu, Frolova DE, et al. Vitamin D and estrogen-dependent tumors. *Gynecology*. 2018;20(1):23-30. (In Russ).] DOI: 10.26442/2079-5696_20.1.23-30

6. Громова О.А., Торшин И.Ю., Захарова И.Н., Малявская С.И. Роль витамина D в регуляции иммунитета, профилактике и лечении инфекционных заболеваний у детей // *Медицинский совет*. –2017. –№19 –С.52-60. [Gromova OA, Torshin IYu, Zakharova IN, Malyavskaya SI. Role of vitamin D in regulation of immunity, prevention and therapy of infectious pediatric diseases. *Medicinskij sovet*. 2017;19:52-60. (In Russ).] DOI: 10.21518/2079-701X-2017-19-52-60

7. 7. Громова О.А., Торшин И.Ю., Томилова И.К., Гилельс А.В. Метаболиты витамина D: роль в диагностике и терапии витамин D-зависимой патологии // *Практическая медицина*. –2017. –№ 5 (106). –С.4-10. УДК 577.161.22 [Gromova OA, Torshin IY., Tomilova IK, Gilels AV. Vitamin D metabolites: their role in the diagnosis and therapy of vitamin D-dependent pathology. *Practical medicine*. 2017;5(106):4-10. (In Russ).]

8. Громова О.А., Торшин И.Ю. *Магний и «болезни цивилизации»*. –М.: ГЭОТАР-Медиа; 2018. ISBN 978-5-9704-4527-3 [Gromova OA, Torshin IYu. *Magnij i "bolezni civilizacii"*. Moscow: GEOTAR-Media; 2018. (In Russ).]

9. *Клиническое руководство Тица по лабораторным тестам* / Алан Г. Б. Ву.; пер. с англ. В.В. Меньшикова; ред. пер. Т.И. Лукичева. –4-е изд. Москва: Лабора, 2013. ISBN 978-5-903284-12-2 [*Tietz clinical guide to laboratory tests*. Alan HBWu.; per. s angl. V.V. Men'shikova; red. per. T.I. Lukicheva. 4th ed. Moscow: Labora; 2013. (In Russ).]

10. Ferreira, A.J.M. (2009). MATLAB Codes for Finite Element Analysis. Springer. ISBN 978-1-4020-9199-5. http://www.mathworks.com/products/simbiology/

11. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Xie S. PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed*. 2010 Sep;99(3):306-14. DOI: 10.1016/j.cmpb.2010.01.007

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

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