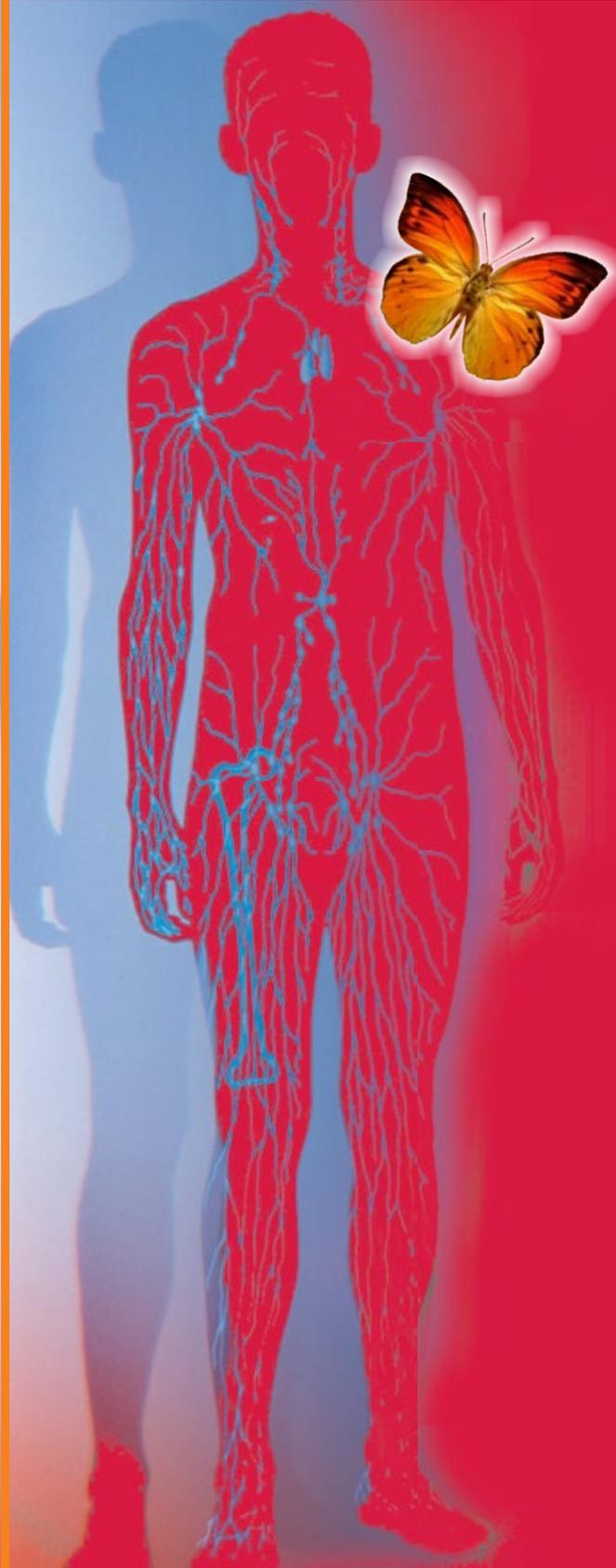


# ФАРМАКОКИНЕТИКА И ДИНАМИКА





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

### Основные направления научной деятельности

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

### ПОЛНЫЙ СПЕКТР УСЛУГ ПО ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ

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



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

**Белоусов Юрий Борисович**  
член-корр. РАН, д.м.н.,  
профессор, Москва

**Бондарева  
Ирина Борисовна**  
д.б.н., Москва

**Воронина  
Татьяна Александровна**  
заслуженный деятель науки  
РФ, д.м.н., профессор, 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**  
д.м.н., профессор, Москва

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

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

### Выпускающая группа

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

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

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

Подписано в печать 12.10.2016 г.  
ООО «МЕДИАКОЛОР», www.mediacolor.ru

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБУ «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

www.PharmacoKinetics.ru  
www.ClinVest.ru  
www.Clinical-Pharmacy.ru  
www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

### Журналы

Фармакокинетика и Фармакодинамика  
Качественная клиническая практика  
Клиническая фармация  
Фармакогенетика и Фармакогеномика

### WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru  
www.Market-Access-Solutions.ru  
www.Izdat-Oki.ru

Центр Фармакоэкономических исследований  
Market Access Solutions  
Издательство ОКИ

### ОТ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА

Жердев В.П. .... 3

### АКТУАЛЬНЫЕ ОБЗОРЫ

Пище-лекарственные взаимодействия:  
генотоксикологические аспекты  
Дурнев А.Д. .... 4

### ПОИСК НОВЫХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Скрининг кардиотропной активности в ряду  
α, ω-диарилметильных производных  
бис-(ω-аминоалкил)аминов  
Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б.,  
Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мокров Г.В.,  
Гудашева Т.А. .... 10

### ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ

Сравнительный анализ активации пострецепторных  
сигнальных путей димерными дипептидными  
миметиками разных петель NGF  
Антипова Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В.,  
Круглов С.В., Тарасюк А.В., Антипов П.И.,  
Гудашева Т.А., Середенин С.Б. .... 14

### ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Доклиническое изучение фармакокинетики  
аскорбата лития  
Пронин А.В., Громова О.А., Торшин И.Ю., Гоголева И.В.,  
Жидоморов Н.Ю., Сардарян И.С., Волков А.Ю. .... 18

### ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ

N-ацетилцистеин: фармакокинетические  
параметры и влияние на концентрацию  
эндогенных аминотиолов  
Дутов А.А., Никитин Д.А., Лукьянова Ю.Л.,  
Шемякина Н.А., Ермолина А.В., Мищенко М.Н. .... 26

### ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Влияние интраназального и внутрибрюшинного  
введений пептидов Семакса и Ноопепта  
на поведенческие характеристики мышей BALB/c  
Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. .... 31

Противосудорожное действие производного  
4-бензоил-пиридина (ГИЖ-298) на пароксизмальную  
активность в структурах мозга крыс с кобальт-  
индуцированной очаговой эпилепсией на первой стадии  
формирования эпилептической системы  
Воронина Т.А., Гайдуков И.О., Литвинова С.А.,  
Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А. .... 37

Экспериментальная оценка влияния ладастена  
и ГБ-115 на развитие толерантности  
к анальгетическому действию морфина  
Константинопольский М.А., Чернякова И.В.,  
Колук Л.Г. .... 40

### ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МЕТАБОЛИТОВ

Влияние основного метаболита афобазола М-11 на острое  
экссудативное воспаление и висцеральную боль у мышей  
Иванова Е.А., Воронина Т.А. .... 46

### ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ

Исследование хронической токсичности  
и аллергизирующих свойств инъекционной формы  
афобазола  
Алексеева С.В., Сорокина А.В., Коваленко Л.П.,  
Мирошкина И.А., Дурнев А.Д. .... 49



## Chief editor

**Zherdev Vladimir**

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

## Deputy chief editor

**Firsov Alexander**

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

## Executive secretary

**Litvin Alexander**

Ph.D., Moscow

## Editorial Board

### Belolipetskaia Vera

Ph.D., Moscow

### Belousov Yuri

Corresponding Member RAS,

Ph.D., Professor, Moscow

### Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

### Voronina Tatiana

Honored Scientist RF, 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

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 OCl»

subscription

+7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

site: www.izdat-okl.ru

### Zhuk Elena

Design and layout

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 12.10.2016

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

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

FGBI «Institute of Pharmacology named after V.V. Zakusova» RAS

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. Copyright material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

## Sites

www.PharmacoKinetica.ru

www.ClinVest.ru

www.Clinical-Pharmacy.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

## Journals

Pharmacokinetics and Pharmacodynamics

Good Clinical Practice

Clinical Pharmacy

Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

## WEB-portals

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.Izdat-OkI.ru

Center of Pharmacoeconomics Reserch

Market Access Solutions

Publisher OCl

### FROM THE EDITOR

Zherdev V.P. .... 3

### CURRENT REVIEWS

Food-drug interactions: genotoxicological aspects

Durnev A.D. .... 4

### SCREENING FOR NEW PHARMACOLOGICALLY ACTIVE COMPOUNDS

Screening of the compounds having cardiotropic activity among the  $\alpha$ ,  $\omega$ -diarilmetil derivatives of bis-( $\omega$ -aminoalkyl)amines

Kryzhanovskii S.A., Likhosherstov A.M., Tsorin I.B.,

Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Mokrov G.V.,

Gudasheva T.A. .... 10

### MECHANISM OF ACTION RESEARCH

Comparative analysis activation of post-receptor signal ways by dimeric dipeptide mimetiks of different loops of NGF

Antipova T.A., Logvinov I.O., Nikolaev S.V.,

Kruglov S.V., Tarasiuk A.V., Antipov P.I.,

Gudasheva T.A., Seredenin S.B. .... 14

### PRECLINICAL STUDIES

Preclinical study the pharmacokinetics of lithium ascorbate

Pronin A.V., Gromova O.A., Torshin I.Ju., Gogoleva I.V.,

Zhidomorov N.Ju., Sardaryan I.S., Volkov A.Ju. .... 18

### PHARMACOKINETICS STUDIES

N-acetylcysteine: pharmacokinetic parameters and the effect on the concentration of endogenous aminothiols

Dutov A.A., Nikitin D.A., Lukianova J.L.,

Shemyakina N.A., Ermolina A.V., Mishchenko M.N. .... 26

### PHARMACODYNAMICS STUDIES

Effect of intranasal and intraperitoneal administration of peptides Semax and Noopept on the behavior of BALB/c mice

Vasilieva E.V., Salimov R.M., Kovalev G.I. .... 31

Anticonvulsant effect of the derived 4-benzoylpyridine (giz-298) on paroxysmal activity in the brain structures of rats with cobalt-induced focal epilepsy in the first stage of the formation of epileptic system

Voronina T.A., Gaidukov O.I., Litvinova S.A.,

Nerobkova L.N., Gmurenko L.A. .... 37

Experimental assessment of ladasten and GB-115 effects on the antinociceptive tolerance to morphine

Konstantinopolsky M.A., Chernyakova I.V.,

Kolik L.G. .... 40

### PHARMACOLOGICAL ACTIVITY OF METABOLITES STUDIES

Effect of the main metabolite of afobazole M-11 on acute exudative inflammation and visceral pain in mice

Ivanova E.A., Voronina T.A. .... 46

### SAFETY STUDIES

Experimental study of chronic toxicity and allergenic properties of the drug afobazol

Alekseeva S.V., Sorokina A.V., Kovalenko L.P.,

Miroshkina I.A., Durnev A.D. .... 49

**Уважаемые коллеги!**

Перед вами номер журнала, который в основном посвящён созданию новых оригинальных лекарственных препаратов в различных рядах химических соединений и обладающих разными видами фармакологической активности. В последние годы в нашей стране уделяется большое внимание созданию новых лекарственных средств, имеющих преимущество перед уже известными препаратами. В этом направлении открыт ряд государственных программ, направленных, в том числе, на разработку и создание оригинальных лекарственных средств. Необходимо отметить, что разработка каждого

нового лекарственного препарата требует больших финансовых затрат, но несмотря на это, наше государство изыскивает возможности для проведения таких работ.

В настоящем номере журнала представлены практически все аспекты проведения доклинических исследований, направленных на поиск и создание новых оригинальных лекарственных средств. Это — прежде всего скрининговые работы по поиску новых соединений-лидеров из большого количества химических молекул. Основная часть представленных в настоящем номере работ посвящена изучению различных аспектов фармакологической активности уже выявленных лидеров. Представлены работы по изучению экспериментальной и клинической фармакокинетики.

Важным этапом исследований при создании нового лекарственного средства является изучение его механизма действия. В настоящем номере представлена работа, направленная на решение этой проблемы.

К сожалению, в номере нет ни одной работы, посвящённой изучению биотрансформации лекарственных средств. Этот этап является также необходимым при создании оригинального лекарственного препарата. Тем не менее, на страницах журнала представлено исследование по изучению фармакологической активности выявленных и идентифицированных ранее основных метаболитов афобазола.

И наконец, важную роль в проявлении действия лекарственного препарата играет влияние пищи, т. к. она может существенным образом изменять всасывание и метаболизм препарата. Поэтому мы сочли целесообразным включить в настоящий номер обзор, посвящённый этой важной проблеме

**Главный редактор журнала  
Жердев Владимир Павлович**

# Пище - лекарственные взаимодействия: генотоксикологические аспекты

**Дурнев А.Д.**

*Лаборатория лекарственной токсикологии  
ФГНБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва*

**Резюме.** Рассмотрена феноменология пище-лекарственных взаимодействий, фармакокинетические и другие мишени этих взаимодействий. Внимание акцентировано на возможных генотоксических нежелательных явлениях при пище-лекарственных взаимодействиях.

**Ключевые слова:** пище-лекарственные взаимодействия, мишени, генотоксические поражения

## **Food - drug interactions: genotoxicological aspects**

Durnev A.D.

Laboratory of drug toxicology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Resume.** Reviewed phenomenology of food-drug interactions, pharmacokinetic and other targets of this interaction. The attention is focused on possible genotoxic adverse events by food-drug interactions.

**Keywords:** food-drug interaction, targets, genotoxic events

Автор, ответственный за переписку:

*Дурнев Андрей Дмитриевич* – д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН, зав. лаборатории лекарственной токсикологии ФГНБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; e-mail: addurnev@mail.ru

## **Введение**

Приём лекарств для существенной доли лиц среднего и подавляющего большинства лиц старшего возраста становится обязательным на протяжении всей жизни [1]. По общепризнанным оценкам до 20% пациентов сочетают приём фармакологических средств с витаминно-минеральными комплексами, биологически активными добавками и другими парафармацевтическими и/или функциональными продуктами [2–4].

В практику прочно вошло понятие «нежелательные явления», «побочные эффекты» лекарственных средств. Они составляют четвертую по частоте причину смертности в США и являются поводом для госпитализации примерно 5% стационарных больных [4].

В ряде случаев нежелательные явления (НЯ) возникают вследствие пище-лекарственных взаимодействий. Ситуация усугубляется тем, что в пищевой промышленности наблюдается всё более расширяющееся намеренное использование физиологически активных веществ в составе продуктов повседневного спроса. Яркими примерами является их обогащение витаминами и микроэлементами или внедрение в практику функциональных продуктов. Последние прямо предназначены для воздействия на физиологические функции, т. е. выполняют задачи, сходные с таковыми для лекарств [5, 6]. В пище также могут содержаться вещества, представляющие угрозу здоровью человека, например, мутагены и канцерогены, образующиеся при термической обработке пищевого сырья [7].

В настоящей работе рассмотрены общие представления о возможностях и мишенях пище-лекарственного взаимодействия с акцентом на ситуации, приводящие к генотоксическим поражениям.

## **Фармакокинетические мишени пище - лекарственного взаимодействия**

Время наступления эффекта, его выраженность и продолжительность зависит не только от пути введения, режима дозирования и дозы, но также от особенностей поступления, распределения, метаболизма и выведения, т. е. кинетики взаимодействия соединения с организмом. Пище-лекарственное взаимодействие может происходить на любом из перечисленных этапов [8].

**Первый этап** — поступление. Пути поступления экзогенных веществ в организм многообразны. С точки зрения пище-лекарственных взаимодействий внимание привлекает энтеральное введение. Однако вероятность осуществления взаимодействия на этом этапе невелика из-за достаточно высокой химической инертности лекарств и веществ в составе пищевых продуктов.

**Второй этап** — всасывание, осуществляется в желудочно-кишечном тракте. Местом всасывания подавляющего большинства веществ является тонкий кишечник. Основными механизмами всасывания являются пассивный транспорт (диффузия, фильтрация, осмос), облегченная диффузия и активный транспорт. *Первый* характерен для ксенобиотиков, в том числе

лекарств, *второй* — для соединений, являющихся естественными метаболитами организма; сахара, аминокислоты, нуклеотидов, глицерина, жирных кислот и др. Примечательно, что такие важные нутриенты, как витамины, поступают в кровь по разным механизмам, например, аскорбиновая кислота, витамин В6, — путём диффузии, а витамин В12 — за счёт активного транспорта [9].

рН содержимого кишечника оказывает существенное влияние на процессы активного транспорта, который оптимально протекает в нейтральной среде. В свою очередь, степень наполнения кишечника существенно влияет на процессы пассивного транспорта. При высоком наполнении кишечника скорость пассивного транспорта существенно падает за счёт эффекта разбавления, одновременно повышается эвакуаторная активность кишечника, что оказывает прямое влияние на всасывание лекарственных средств. Именно это объясняет, почему большинство лекарств назначаются до приёма пищи. В свою очередь, применение пищевых сурфактантов (морская капуста, агар-агар, пшеничные отруби, лактулоза и др.), увеличивающих объём содержимого кишечника и эвакуаторную функцию, может существенно сказываться на биодоступности лекарственных средств, назначаемых одновременно с приёмом пищи.

В связи с широким применением пробиотиков и пребиотиков, важно, что они тоже могут являться факторами, нарушающими фармакокинетику лекарств. Например, хорошо известна способность ферментов лактобактерий вызывать демитилирование метамфетамина, а возможно и других лекарств или их метаболитов, удаляемых с желчью. Эта проблема тесно увязывается с изучением роли микробиоты в формировании фармакологических и токсических эффектов [10, 11].

Не только пища модифицирует всасывание лекарств, но и ряд лекарств влияют на всасывание пищевых веществ. Подобные свойства очевидны для лекарств, оказывающих слабительное действие, изменяющих кровоснабжение кишечника (обычно снижают), изменяющих проницаемость слизистой за счёт влияния на активный транспорт. Противоопухолевые препараты (например, колхицин) и антибиотики (например, неомицин) оказывают на слизистую повреждающее действие, что приводит к ухудшению всасывания необходимых организму железа, фолатов и витамина В12 [12].

В целом, вопрос о влиянии лекарств на всасывание пищевых веществ и наоборот исследован недостаточно, но даже приведённые примеры приводят к очевидному выводу: на этапе всасывания существуют механизмы, определяющие возможность взаимодействия между пищей и лекарствами. Однако в основе подавляющего большинства известных сегодня случаев пище-лекарственного взаимодействия его главной ареной является система метаболизма (см. ниже).

Заключительный этап биотрансформации ксенобиотиков и ряда пищевых веществ — выведение, преимущественно осуществляется через почки с мочой или через печень с желчью. Известно, что клиренс отдельных лекарств, например, антипирина и теофиллина [13] и продолжительность их действия может быть модифицированы под влиянием полициклических ароматических углеводородов (ПАУ), образующихся в пище при термической обработке.

### Система цитохрома Р-450 и конъюгация

Общепринято выделять в процессе метаболизма две фазы; метаболических превращений и конъюгации. Часть веществ претерпевает только конъюгацию, другие проходят обе фазы метаболизма. Общеизвестно, что ведущую роль на первой метаболической фазе играет цитохром Р-450-зависимая система микросомального окисления [12].

В настоящее время у млекопитающих охарактеризовано 17 семейств цитохрома Р-450. Их обозначают арабскими цифрами. В семейство включают изоформы, имеющие гомологию не менее 40% аминокислотной последовательности. Семейство делится на подсемейства, имеющие гомологию не менее 70% аминокислотной последовательности. Их обозначают латинской буквой. Для обозначения конкретного ферментативного белка, к уже имеющейся комбинации из цифры и буквы добавляют ещё одну цифру.

Ведущую роль в метаболизме ксенобиотиков, включая лекарства и ряд пищевых соединений, играют первые три семейства цитохромов.

Ферменты семейства СYP 3A4 метаболизируют подавляющее большинство лекарств, под влиянием СYP 1A1, СYP 1A2 и СYP 1B1 из пищевых контаминантов, таких как ПАУ или ароматические амины (АА), возникают канцерогенные и мутагенные метаболиты. Ферменты, входящие во второе семейство цитохромов, в частности, СYP 2A6, СYP 2A7, СYP 2A9 и СYP 2A13, активируют переход в активные формы пищевых генотоксикантов и канцерогенов, например, афлотоксина и диметилнитрозоамина [14, 15, 16].

Сходным образом обстоит дело со всеми низкомолекулярными химическими соединениями, обладающими тем или иным видом биологической активности, часть из них активны в неизменённой форме и по мере превращения в системе цитохрома Р-450 теряют, другие, наоборот, приобретают активность в результате метаболических превращений. Факторы, способные индуцировать или ингибировать метаболизм тех или иных соединений, как следствие, меняют их биологические эффекты. Главнейшими среди этих факторов являются: пол, возраст, этническая принадлежность, болезни, генетические полиморфизмы, средовые факторы, пищевые компоненты, лекарства и компоненты БАД [17, 18].

Классическим примером пище-лекарственного взаимодействия является влияние на эффекты ряда лекарств грейпфрутового сока (ГС). Фуранокумарины и их димеры, содержащиеся в ГС, ингибируют СYP 3A4, локализованный в клетках эпителия кишечника, что приводит к увеличению биодоступности и концентрации в плазме крови блокаторов кальциевых каналов, противотромботического средства цилостазола, противовирусного средства саквинавира, гиполипидемических средств симвастатина, аторвастатина и ловастатина, а также ряда других лекарственных средств. Важно, что ингибирование цитохрома под влиянием ГС необратимо, поэтому даже его однократное применение имеет пролонгированное, длящееся несколько дней ингибирующее действие. Достаточно приёма одного стакана ГС, чтобы увеличить биодоступность нифедипина и других блокаторов кальциевых каналов на 50%, что приводит к тахикардии и падению артериального давления [19].

Примечательно, что ингибирующий эффект ГС на СYP 3A4 существенно зависит не только от количества его потребления, но также сорта, менее выражен эффект сока красных грейпфрутов. Ингибирующие свойства по отношению к рассматриваемому изоферменту демонстрирует также сок лайма, лимона, помело и других цитрусовых [20].

В рамках описания эффектов ГС на фармакокинетику лекарств важно отметить, что под его влиянием и под влиянием потребления апельсинового сока снижаются в плазме крови концентрации противоаллергического средства фексофенадина и  $\beta$ -блокатора целипролола [15, 16]. Важно, что указанные препараты не являются субстратами цитохрома P-450. Наблюдаемый эффект связан с влиянием каких-то общих компонентов указанных соков на систему органических анион-транспортирующих полипептидов в клетках эпителия кишечника.

Приведённый пример пище-лекарственного взаимодействия далеко не исключителен, но по существу единственный, повлекший за собой рекомендацию не сочетать потребление грейпфрутового сока и приём лекарств [19].

По мнению некоторых авторов, среди фруктовых соков ещё один — гранатовый, содержащий эстрогеноподобные вещества и поэтому часто употребляемый женщинами для облегчения менопаузального синдрома, принципиально способен изменять фармакокинетику лекарств, метаболизирующихся на СYP 3A подсемействе цитохромов. Однако это предположение требует доказательства в прямых исследованиях на здоровых добровольцах [21].

В лабораторных исследованиях показано, что введение в диету брокколи и мяса, приготовленного на гриле, индуцирует изофермент СYP 1A2 и, следовательно, может влиять на эффекты лекарств, являющимися субстратами этой изоформы (<http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table/>).

Отдельно или в качестве компонента БАД широкое использование нашел зверобой продырявленный (ясменник, «St. John wort», семейство Guttiferae, *Hypericum perforatum*) — многолетнее растение, произрастающее в Евразии. В его состав входит ряд соединений с антидепрессантной активностью, которая в наибольшей степени присуща гиперфорину [22].

Показано, что зверобой, являясь индуктором цитохромов, снижает в плазме крови концентрации лекарств циклопорина, индинавира, этинилэстрадиола, метаболизирующихся СYP 3A4 (индуцируется гиперфоринном), теофиллина, метаболизирующегося СYP 1A2, и варфарина, метаболизирующегося обоими изоферментами. Это даёт достаточные основания для указания на недопустимость одновременного использования зверобой-содержащих продуктов и лекарств, метаболизирующихся с помощью СYP 3A4 и СYP 1A2 [13, 17].

Имеются указания на то, что индолы и флавоноиды, входящие в состав съедобных и лекарственных растений, способны индуцировать ферменты подсемейства СYP 1A.

Вопрос о пище-лекарственном взаимодействии на уровне второй фазы метаболизма большинством авторов не рассматривается в силу малочисленности и неоднозначности имеющихся данных. Тем не менее, имеются примеры влияния отдельных диетических факторов на активность ферментов конъюгации. Например, в условиях дефицита селена увеличивается активность глюкуронилтрансферазы и взаимосвязано конъюгирование ацетаминофена с глюкуронидами и выведение конъюгата из организма [23].

### Феноменология пище-лекарственных взаимодействий

Феноменология пище-лекарственных взаимодействий разнообразна и до настоящего времени не систематизирована. Далеко не во всех случаях удаётся отчётливо установить и проследить механизмы подобного рода взаимодействий. Тем не менее, многие события пище-лекарственного взаимодействия имеют существенную медицинскую и социальную значимость.

Например, совместное потребление красного виноградного вина и антикоагулянта варфарина, чревато повышенным риском кровотечений [24], чеснок негативно влияет на терапевтические эффекты противовирусного саквинавира [25], уменьшая его концентрацию в плазме крови, а сочетание тирамина, содержащегося в йогурте, с противотуберкулезным изониазидом грозит гипертензией [26].

В последние годы появился ряд обобщающих работ, детализирующий и расширяющий примеры взаимодействия противоопухолевых препаратов с пищевыми компонентами или компонентами БАД [27, 28].

Особого упоминания заслуживает взаимодействие между лекарствами и витаминами, и некоторыми минералами. Рассмотрение этого вопроса обуслов-

лено, с одной стороны, масштабным обогащением витаминами и микроэлементами различных продуктов питания и, с другой — ставший для части населения уже практически традиционным приём БАД или витаминных комплексов, содержащих витамины и микроэлементы в мегадозах [29]. Отдельные известные примеры взаимодействия витаминов и микроэлементов на эффекты лекарств и лекарств на содержание и эффекты витаминов суммированы в табл. 1.

В подавляющем большинстве приведённых примеров нежелательные эффекты пище-лекарственных взаимодействий манифестируют достаточно быстро, их причинно-следственная связь доступна непосредственному наблюдению и анализу. Иное дело, когда пище-лекарственные взаимодействия приводят к генотоксическим/мутагенным воздействиям, негативные эффекты которых могут быть отсрочены на годы и поколения.

### Пище-лекарственные взаимодействия и генотоксические эффекты

Согласно классическим генетическим представлениям, мутационные поражения наследственных структур человека (индуцированный мутагенез) играют ведущую роль в поддержании уровней наследственных заболеваний, врождённых уродств и онкологических новообразований, снижении общей приспособленности и адаптационных возможностей организма.

Молекулярно-генетические исследования последних лет доказывают, что помимо мутационных повреждений, большую патогенетическую роль в возникновении онкологических и сердечно-сосудистых заболеваний могут играть окислительные ДНК-повреждения (генотоксические эффекты), независимо от того реализуются ли они в последствии в мутации или восстанавливаются репарирующими системами клетки [30].

В среде обитания человека широко распространены мутагены различной природы (физические, химические, биологические) различного происхождения. А присутствие в среде большого числа комутагенов — веществ, лишённых собственного мутагенного потенциала, но усиливающих эффекты генотоксических воздействий, просто не контролируется [31].

Исходя из общих представлений о прямых, т. е. действующих в неизменённой форме, и не прямых мутагенах, требующих для проявления генотоксических эффектов метаболической активации в системе цитохрома Р-450, можно полагать, что действие не прямых пищевых и лекарственных мутагенов может быть усилено под влиянием индукторов этой системы, содержащихся в таких продуктах как брокколи, слегка поджаренное мясо, и многих лекарств (<http://medicine.iupui.edu/clinpharm/ddis/main-table/>). Например, за счёт интенсификации возникновения канцерогенных и мутагенных метаболитов ПАУ или ароматических аминов, протекающих с участием СYP 1A2. Аналогичным образом, многие лекарства,

Таблица 1

Характерные примеры взаимодействий между витаминами/или минералами и лекарственными препаратами

Пищевые вещества или минералы	Лекарственный препарат	Побочные эффекты
Витамин А	Паклитаксел	Снижение функции костного мозга
	Этретинат	Гипервитаминоз
Витамин С	Ацетазорамид	Камни в почках и мочевом тракте
	Дефероксамин	Сердечная недостаточность
	Варфарин	Повышение агрегации тромбоцитов
Витамин D	Альфакальцидол	Гиперкальциемия
Витамин Е	Варфарин	Возможно повышен риск кровотечения
Фолиевая кислота	Фенитоин	Судороги
Са	Дигоксин	Гликозидная интоксикация
Fe	Цефдинир Пеницилламин	Снижение всасывания в ЖКТ
Ca, Fe, Mg, Al, Zn и др.	Тетрациклины Хинолоны последнего поколения Натрия ризедроната гидрат Натрия аледроната гидрат	Снижение концентрации лекарственных препаратов
Фолиевая кислота	Аспирин	Повышение экскреции фолиевой кислоты из-за конкуренции между фолиевой кислотой и аспирином, дефицит фолиевой кислоты
Витамин B12 из пищи, фолиевая кислота, Fe	Фамотидин	Уменьшение всасывания каждого питательного элемента в ЖКТ из-за снижения кислотности желудочного сока, дефицит каждого питательного элемента

являющиеся индукторами семейства ферментов СУР 2А будут неизбежно активировать переход в активные генотоксические формы афлотоксина, диметилнитрозоамина и ряда других пищевых мутагенов, т. е. выступать в роли комутагенов.

Собственные результаты проведенных исследований также дали свидетельства того, что среди пищевых и лекарственных соединений присутствуют комутагены.

Например, при исследовании красителя «Sunset yellow» (E110), применяющегося при производстве безалкогольного напитка «Фанта», была установлена его способность усиливать мутагенные эффекты антимикробного средства диоксида у млекопитающих. Повреждающее действие этого лекарства опосредовано индукцией активных форм кислорода, поэтому выявленный комутагенный эффект красителя легко экстраполировать на все случаи его воздействия на мутагены-прооксиданты, которые, по современным представлениям, составляют подавляющее большинство известных мутагенов [31].

Типичным примером лекарственных комутагенов являются блокаторы кальциевых каналов, используемые для лечения артериальной гипертензии. Все исследованные соединения этого класса лекарств продемонстрировали способность усиливать цитогенетические эффекты лекарств диоксида и циклофосфамида, промышленных загрязнителей акриламида и акрилонитрила. Вероятно, сходные эффекты будут выявляться по отношению большинства прооксидантов и алкилирующих соединений, в том числе, загрязняющих пищу [32, 33, 34].

Если обратиться к табл. 2, содержащей сведения об испытании некоторых мутагенных гетероциклических аминов на канцерогенность, то можно отметить, что уровни доз, в которых они проявляют значимый канцерогенный эффект, и уровни расчётных доз, в которых они поступают в организм человека различаются. Но гипотетически, это различие доз, оставляющее иллюзию безопасности этих мутагенов/канцерогенов

для здоровья, может быть легко нивелировано за счёт комутагенного усиления повреждающих эффектов, например, под действием тех же блокаторов кальциевых каналов, широко используемых лицами среднего и старшего возраста для лечения артериальной гипертензии.

На первый взгляд, пище-лекарственное взаимодействие в области генотоксикологии — частный случай комутагенных исследований. Однако, учитывая возможные масштабы явления, следует признать, что это существенная и практически значимая проблема.

### Заключение

Известные и описанные примеры взаимодействия пищевых веществ и лекарств представляют только незначительную часть от реально существующих феноменов. Большинство из них обусловлены фармакокинетическими взаимодействиями. Можно надеяться, что по мере расширения сведений о субстратах, индукторах и ингибиторах системы цитохрома Р-450, часть потенциальных негативных эффектов пище-лекарственного взаимодействия будет выявляться ещё до клинических манифестаций, другие не пройдут мимо внимания клиницистов.

Наиболее сложное положение складывается в области изучения эффектов взаимной пище-лекарственной модификации генотоксических эффектов. Решение задачи предупреждения генотоксических нежелательных явлений, возникающих в результате пище-лекарственных взаимодействий, не представляется возможным на основе традиционных генотоксикологических подходов, поскольку объём инструментальных исследований имеет астрономические масштабы. С нашей точки зрения, нахождение приемлемых решений возможно на пути изучения фундаментальных закономерностей пище-лекарственных взаимодействий с привлечением современных методов *in silico*, что требует накопления фактологической базы в означенной области исследований.

Таблица 2

Канцерогенный эффект мутагенных гетероциклических аминов в эксперименте (обобщенные данные литературных источников)

Мутаген	Животные	Пораженный орган	Использованная доза, мг/кг	Оценочное потребление человеком, мкг/сут
PhIP	Крысы	Толстый кишечник, простата, молочные железы	2,2	До 1,8
	Мыши	Лимфоидная ткань	64,6	
AαC	Мыши	Печень, сосуды	15,8	
MeIQx	Мыши	Печень, желудок	8,4	
	Крысы	Печень, кожа	0,7	
IQ	Крысы	Печень, кожа, кишечник	0,7	
Tgr-P-1	Крысы	Печень	0,1	
	Мыши	Печень	8,8	

Литература

1. Белоусов Ю.Б., Леонова М.В., Белоусов Д.Ю., Вялков А.И. Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии, Руководство для практикующих врачей. Под общей редакцией Белоусова Ю.Б., Леоновой М.В., Москва, 2002.
2. Харьков Е.И., Давыдов Е.Л., Гринштейн Ю.И., Кисаев В.В. Особенности фармакотерапии в пожилом и старческом возрасте (Сообщение I). Сибирский мед. Журнал. 2010; 5: 131–134.
3. Donaldson M., Touger-Decker R. Vitamin and mineral supplements: friend or foe when combined with medications? J Am Dent Assoc. 2014; 145 (11): 1153–8.
4. Пальцев М.А., Кукес В.Г., Хабриев Р.У. Молекулярные механизмы нежелательных эффектов лекарственных средств, Москва, Издательский дом «Русский врач», 2005.
5. Дурнев А.Д., Оганесянц Л.А., Лисицын А.Б. Функциональные продукты питания. Хранение и переработка сельхозсырья. 2007; 9: 15–21.
6. Goto T., Kawada T. Life style diseases and functional foods. Clin Calcium. 2016; 26 (3): 453–8.
7. Дурнев А.Д. Мутагены и антимутагены в продуктах питания. Генетика. 1997; 2: 165–176.
8. Otles S., Senturk A. Food and drug interactions: A general review. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 2014; 13 (1): 89–102.
9. Тутельян В.А., Кукес В.Г., Фесенко В.П. (редакторы) Витамины и микроэлементы в клинической фармакологии, Москва, 2001.
10. Flowers S.A., Ellingrod V.L. The Microbiome in Mental Health: Potential Contribution of Gut Microbiota in Disease and Pharmacotherapy Management. Pharmacotherapy. 2015; 35 (10): 910–6.
11. Touchefeu Y., Montassier E., Nieman K., Gastinne T., Potel G., Bruley des Varannes S. et. al. Systematic review: the role of the gut microbiota in chemotherapy-or radiation-induced gastrointestinal mucositis — current evidence and potential clinical applications. Aliment Pharmacol Ther. 2014; 40 (5): 409–21.
12. Куценко С.А. Основы токсикологии. Санкт-Петербург, 2002.
13. Каркищенко Н.Н., Хоронько В.В., Сергеева С.А., Каркищенко В.Н. Фармакокинетика, Ростов-на-Дону, 2001.
14. Кобляков В.А. Цитохром Р-450: функционирование и регуляция. Биологические мембраны. 2003; 3: 265–272.
15. Meunier B., de Visser S.P., Shaik S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome p450 enzymes. Chem Rev. 2004; 104 (9): 3947–3980;
16. Fujita K. Cytochrome P450 and anticancer drugs. Curr Drug Metab. 2006; 7 (1): 23–37.
17. Кукес В.Г. Метаболизм лекарственных средств. Клинико-фармакологические аспекты. Москва, 2004.
18. Ohnishi N., Yokoyama T. Interactions between medicines and functional foods or dietary supplements. Keio J Med. 2004; 53 (3): 137–150.
19. Seden K., Dickinson L., Khoo S., Back D. Grapefruit-drug interactions. Drugs. 2010; 70 (18): 2373–407.
20. Sridharan K., Sivaramakrishnan G. Interaction of Citrus Juices with Cyclosporine: Systematic Review and Meta-Analysis. Eur J Drug Metab Pharmacokinet. 2016 Jun 9. (в печати)
21. Andrade C. Potentially significant versus clinically significant drug interactions: pomegranate juice as a case in point. J Clin Psychiatry. 2014; 75 (4): e292–3.
22. Kaehler S.T., Sinner C., Chatterjee S.S., Philippu A. Hyperforin enhances the extracellular concentrations of catecholamines, serotonin and glutamate in the rat locus coeruleus. Neurosci Lett. 1999, 262 (3): 199–202.
23. Тутельян В.А., Князев В.А., Хотимченко С.А., Голубкина Н.А., Кушлинский Н.Е., Соколов Я.А. Селен в организме человека, Москва, 2002.
24. Phang M., Lazarus S., Wood L.G., Garg M. Diet and thrombosis risk: nutrients for prevention of thrombotic disease. Semin Thromb Hemost. 2011; 37 (3): 199–208.
25. Berginc K., Kristl A. The mechanisms responsible for garlic — drug interactions and their in vivo relevance. Curr Drug Metab. 2013, 14 (1): 90–101.
26. Gillman P.K. Advances pertaining to the pharmacology and interactions of irreversible nonselective monoamine oxidase inhibitors. J Clin Psychopharmacol. 2011; 31 (1): 66–74.
27. Shang W., Lu W., Han M., Qiao J. The interactions of anticancer agents with tea catechins: current evidence from preclinical studies. Anticancer Agents Med Chem. 2014; 14 (10): 1343–50.
28. Alsanad S.M., Williamson E.M., Howard R.L. Cancer patients at risk of herb/food supplement-drug interactions: a systematic review. Phytother Res. 2014; 28 (12): 1749–55.
29. Samaras D., Samaras N., Lang P.O., Genton L., Frangos E., Pichard C. Effects of widely used drugs on micronutrients: a story rarely told. Nutrition. 2013; 29 (4): 605–10.
30. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., Середенина В.С. Генотоксические поражения и болезни. Молекулярная медицина. 2013; 3: 3–19.
31. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Комутагенез — новое направление исследований в генотоксикологии. Бюлл. эксперим. биол. и мед. 2003; 6: 604–612.
32. Нестерова Е.В., Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Влияние верапамила на кластогенный эффект акриламида в соматических клетках мышей BALB/c и C57Bl/6. Токсикологический вестник. 1998; 6: 19–22.
33. Середенин С.Б., Дурнев А.Д., Нестерова Е.В. Влияние верапамила на кластогенный эффект циклофосфана в соматических клетках мышей BALB/c и C57Bl/6. Экспер. и клиническая фармакология. 1999; 2: 51–54.
34. Nesterova E.V., Durnev A.D., Seredenin S.B. Verapamil contributes to the clastogenic effects of acrylamide, cyclo-phosphamide and dioxidine on somatic cells of BALB/c and C57Bl/6 mice. Mutat. Res. 1999; 440 (2): 171–179.

# Скрининг кардиотропной активности в ряду $\alpha$ , $\omega$ -диарилметильных производных бис-( $\omega$ -аминоалкил)аминов

Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А.

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

**Резюме.** Цель настоящего исследования – поиск в ряду  $\alpha$ ,  $\omega$ -диарилметильных производных бис-( $\omega$ -аминоалкил)аминов соединений, обладающих антиаритмической и антиишемической активностью. Скрининг в ряду этих соединений позволил выявить соединение-лидер – N1-(2,3,4-триметоксибензил)–N2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этан-диамин, которое обладает не только выраженной антиаритмической, но и противофибрилляторной активностью. Изучение антиишемического действия этого соединения на модели субэндокардиальной ишемии у крыс свидетельствует о том, что оно по своей антиишемической активности, как минимум, не уступает эталонному для этой модели антагонисту ионов кальция верапамилу.

**Ключевые слова:** скрининг, антиишемическая и антиаритмическая активности,  $\alpha$ ,  $\omega$ -диарилметильные производные бис-( $\omega$ -аминоалкил)аминов

## Screening of the compounds having cardiotropic activity among the $\alpha$ , $\omega$ -diarylmetil derivatives of bis-( $\omega$ - aminoalkyl)amines

Kryzhanovskii S.A., Likhosherstov A.M., Tsorin I.B., Stolyaruk V.N., Vititnova M.B., Mokrov G.V., Gudasheva T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** The purpose of this study – the search among the  $\alpha$ ,  $\omega$ -diarylmetil derivatives of bis-( $\omega$ -aminoalkyl)amines compounds possessing antiarrhythmic and anti-ischemic activity. The screening among these compounds revealed compound leader – N1-(2,3,4-trimethoxybenzyl)–N2-{2-[(2,3,4-trimethoxybenzyl)amino]ethyl}-1,2-ethanediamine, which not only has a pronounced antiarrhythmic but also antifibrillation activity. Study of antiischemic action of that compound on the subendocardial ischemia model in rats indicates that it is in its antiischemic activity, at least not inferior calcium ions antagonist – verapamil to the reference for this model.

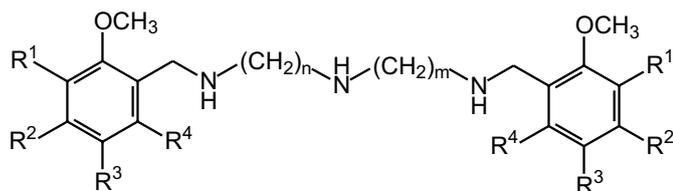
**Keywords:** screening, antiischemic and antiarrhythmic activity,  $\alpha$ ,  $\omega$ -diarylmetil derivatives of bis-( $\omega$ -aminoalkyl) amines

Автор, ответственный за переписку:

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

## Введение

Поиск новых оригинальных кардиотропных лекарственных средств, обладающих антиаритмической и антиишемической активностью, безусловно, является одной из наиболее актуальных задач, стоящих перед современной кардиофармакологией. В рамках решения этой проблемы впервые в ряду  $\alpha$ ,  $\omega$ -диарилметильных производных бис-( $\omega$ -аминоалкил)аминов был проведён поиск соединений, обладающих подобной активностью. Было сконструировано, синтезировано и изучено 8 соединений общей формулы:



где  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  могут быть двумя или тремя водородными или одной, или двумя метокси-группами,  $n$  и  $m$  могут быть одинаковыми и иметь значения 2 или 3, или быть разными и иметь значения  $n = 2$  и  $m = 3$ .

С теоретических позиций подобные соединения потенциально должны обладать свойствами р-FOX ингибиторов, т. е. блокировать в ишемизированном миокарде аномальный метаболизм свободных жирных кислот. Известно, что в условиях ишемии миокарда основным источником АТФ является анаэробный гликолиз. При этом происходит подавление аэробного синтеза АТФ, осуществляемого за счёт физиологического  $\beta$ -окисления свободных жирных кислот, в результате чего в зоне неадекватного кровообращения миокарда содержание недоокисленных свободных жирных кислот резко возрастает [9, 10]. Этот процесс получил название «метаболическое ремоделирование миокарда» [11]. В дальнейшем было показано, что именно дисбаланс между окислением глюкозы и свободных жирных кислот в ишемизированных кардиомиоцитах обуславливает формирование ишемической/постишемической дисфункции левого желудочка сердца, его ремоделирование и повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма [6], а также инициирует процессы, ответственные за апоптоз кардиомиоцитов [5]. Накопленные данные о механизмах, лежащих в основе метаболического ремоделирования

миокарда, позволили сформулировать теоретические подходы к медикаментозной цитопротекции — процессу восстановления энергетического метаболизма ишемизированных кардиомиоцитов путём подавления аномального метаболизма свободных жирных кислот [4, 7, 8], т. е. созданию и внедрению в клинику новых лекарственных средств метаболического действия для лечения ишемических сердечно-сосудистых заболеваний. Первоначально группа лекарственных средств, обладающих способностью подавлять аномальное  $\beta$ -окисление свободных жирных кислот, получила название блокаторы 3-кетоацил коэнзим А-тиолазы, поскольку именно этот механизм лежал в основе кардиопротективного действия единственного представителя этой группы — триметазида [3]. Однако после внедрения в широкую клиническую практику препарата ранолазин, в основе кардиопротективного действия которого лежит не блокада 3-кетоацил коэнзим А-тиолазы, а обратимое ингибирование НАДН<sup>+</sup>-дегидрогеназы митохондрий [2, 12], эту группу лекарственных средств — блокаторов аномального метаболизма свободных жирных кислот объединили под названием «парциальные ингибиторы окисления жирных кислот» — p-FOX ингибиторы (partial fatty acid oxidation inhibitor).

### Цель исследования

**Цель настоящего исследования** — поиск в ряду  $\alpha$ ,  $\omega$ -диарилметильных производных бис-( $\omega$ -амино-алкил)аминов биологически активных соединений, обладающих антиаритмической и антиишемической активностью.

### Материалы и методы

#### Животные

Все включённые в исследование животные были получены из ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства», филиал «Столбовая». Животные содержались в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» при контролируемом освещении (12 ч — свет/12 ч — темнота) и постоянной температуре (21–23 °С) со свободным доступом к воде и брикетированному корму в течение 10 сут до начала тестирования. Условия содержания животных соответствовало приказу МЗ РФ № 708н «Об учреждении правил лабораторной практики» от 23.08.2010 г. и этическим нормам, изложенным в Правилах лабораторной практики (GLP) Хельсинкской декларации (2000).

#### Изучение острой токсичности ( $LD_{50}$ ) изучаемых соединений

$LD_{50}$  изучаемых соединений определяли по стандартной методике на беспородных белых мышцах-самцах

массой 18–20 г. Соединения растворяли в дистиллированной воде для инъекций и вводили внутривенно (в/в) в объёме 0,1 мл/10 г массы тела. По методу Литчфилда–Вилкоксона рассчитывали  $LD_{16}$ ,  $LD_{50}$ ,  $LD_{84}$  и их 95% доверительные интервалы.

#### Изучение антиаритмической активности изучаемых соединений

Объект исследования — белые беспородные крысы-самцы. Оценку спектра антиаритмической активности изучаемых соединений проводили на аконитиновой и хлоридкальциевой моделях нарушений сердечного ритма; о противофибрилляторной активности изучаемых соединений судили по их влиянию на порог электрической фибрилляции желудочков сердца. Эксперименты проводили согласно методическим рекомендациям, подробно изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [1]. Статистическую обработку результатов проводили по методу точной вероятности Фишера (аконитиновая и хлоридкальциевая аритмия) и с использованием знаково-рангового критерия Уилкоксона (порог электрической фибрилляции).

#### Изучение антиишемической активности изучаемых соединений

Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г, наркотизированных уретаном (1300 мг/кг, в/б). Острую эндокардиальную ишемию миокарда вызывали по методу, описанному S. Yamamoto с соавт. [13]. Для этой цели животным с помощью инъектора «Линеомат» (Россия) внутривенно (в/в) со скоростью 20 мкг/кг/мин вводили неселективный агонист  $\beta$ -адренорецепторов изопроterenол. Об интенсивности ишемического повреждения судили по величине депрессии сегмента ST на ЭКГ (II стандартное отведение) через 5 мин от момента начала инфузии изопроterenолола. В качестве регистратора использовали компьютерный электрокардиограф «Полиспектр 8/EX» (Нейрософт, Россия). Животные были рандомизированы на 9 групп: 1-я — контроль ( $n = 16$ ); 2-я — соединение IIa ( $n = 7$ ); 3-я — соединение IIб ( $n = 9$ ); 4-я — соединение IIв ( $n = 7$ ); 5-я — соединение IIг ( $n = 7$ ); 6-я — соединение IIд ( $n = 7$ ); 7-я — соединение IIе ( $n = 5$ ); 8-я — соединение IIж ( $n = 6$ ) и 9-я — соединение IIз ( $n = 5$ ). Животным контрольной группы за 2 мин до начала инфузии изопроterenолола в/в вводили эквивалентный объём (0,2 мл) физиологического раствора, а животные основных групп по аналогичной схеме получали исследуемые соединения (1 мг/кг, в/в). Полученные результаты обрабатывали статистически. Нормальность распределения оценивали с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой по критерию Стьюдента с поправкой

Таблица 1

Острая токсичность изучаемых соединений

Соединения	LD <sub>16</sub> , мг/кг, в/б	LD <sub>50</sub> , мг/кг, в/б	LD <sub>84</sub> , мг/кг, в/б
Па	69,0 (67,6÷70,4)	90,9 (75,9÷108,8)	119,7 (117,3÷122,1)
Пб	114,5 (110,5÷118,6)	163,3 (134,5÷175,5)	232,0 (224,9÷241,4)
Пв	123,2 (122,7÷123,6)	138,3 (128,2÷149,2)	155,3 (154,7÷155,8)
Пг	98,6 (98,2÷99,0)	118,8 (103,0÷121,4)	126,9 (126,4÷127,4)
Пд	58,0 (46,8÷71,8)	106,8 (75,6÷150,0)	196,9 (159,0÷243,9)
Пе	33,1 (25,1÷37,6)	62,0 (43,5÷88,4)	116,2 (102,2÷132,2)
Пж	62,2 (59,5÷65,0)	87,6 (72,2÷106,3)	123,4 (118,1÷128,9)
Пз	63,2 (58,8÷68,0)	91,7 (68,1÷123,4)	132,9 (123,6÷142,9)

Бонферрони. Различия считали значимыми при  $p \leq 0,05$ , критерий двухсторонний. Полученные результаты выражали в виде среднего арифметического и его стандартной ошибки.

Результаты и обсуждение

Результаты по определению LD<sub>50</sub> изучаемых соединений представлены в табл. 1.

Как следует из полученных данных, наибольшей токсичностью обладают соединения Пж, Пе, Па и Пз — III класс токсичности, остальные относятся к IV классу токсичности, т. е. к малотоксичным веществам (табл. 1).

При изучении антиаритмической активности изучаемых соединений на модели аконитиновой аритмии (табл. 2) показано, что выраженную антиаритмическую активность на данной модели, патогномичной для антиаритмиков I класса по классификации Vaughan Williams, проявляют соединения Па, Пв и Пг.

На модели хлоридкальциевой аритмии, патогномичной для антиаритмиков IV класса по классификации Vaughan Williams, выраженную антиаритмическую активность проявляют соединения Пг, Пе и Пж (табл. 3).

При изучении особенностей влияния изучаемых соединений на порог электрической фибрилляции желудочков (табл. 4) показано, что на данной модели активны соединения Па, Пв, Пг и Пд.

Оценку антиишемической активности изучаемых соединений проводили на модели субэндокардиальной ишемии у крыс (табл. 5). Наибольшую антиишемическую активность на данной модели проявляет соединение Пг. Следует отметить, что антиишемическая активность соединения Пг сопоставима с таковой эталонного для этой модели антагониста ионов кальция верапамила. Помимо соединения Пг, определённую антиишемическую активностью проявляют и соединения Пв, Пе и Пз.

Таблица 2

Оценка антиаритмической активности изучаемых соединений на модели аконитиновой аритмии

Соединения								
Конт-роль	Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
0/11	3/6 $p=0,029$	н/а	3/6 $p=0,029$	8/8 $p<0,001$	н/а	н/а	н/а	н/а
<b>Примечание:</b> $p$ – указано по отношению к контролю; н/а – неактивен. В числителе указано количество выживших животных, в знаменателе – объём выборки.								

Таблица 3

Оценка антиаритмической активности изучаемых соединений на модели хлоридкальциевой аритмии

Соединение								
Конт-роль	Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
0/11	н/а	н/а	н/а	4/6 $p=0,008$	н/а	4/6 $p=0,008$	3/6 $p=0,036$	н/а
<b>Примечание:</b> $p$ – указано по отношению к контролю; н/а – неактивен; в числителе указано количество животных без нарушений ритма, в знаменателе – объём выборки.								

Таблица 4

Влияние изучаемых соединений на порог электрической фибрилляции желудочков сердца у крыс ( $n=6$ )

Соединение							
Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
1/5 $p=0,062$	н/а	1,5/>40 $p=0,028$	2/>40 $p=0,018$	2/15 $p=0,043$	н/а	н/а	н/а
<b>Примечание:</b> $p$ – указано по отношению к исходному уровню; н/а – неактивен; в числителе указан исходный уровень, в знаменателе – порог фибрилляции после введения вещества (показаны медианы).							

Таблица 5

Влияние изучаемых соединений на депрессию сегмента ST на ЭКГ во II стандартном отведении, вызванную изопротеренолом (20 мкг/кг/мин в/в в течение 5 мин) – антиишемическая активность

Показатель	Соединение								
	контроль	Па	Пб	Пв	Пг	Пд	Пе	Пж	Пз
Депрессия сегмента ST, мВ	0,20± ±0,02	0,11± ±0,02	0,13± ±0,05	0,09± ±0,02	0,01± ±0,01	0,15± ±0,04	0,08± ±0,02	0,17± ±0,03	0,06± ±0,02
<i>n</i>	16	7	9	7	7	6	5	6	5
<i>p</i>		0,109	0,304	0,025	0,001	0,544	0,02	0,999	0,011

**Примечание:** *n* – число животных в группе; *p* – указано по отношению к контролю.

Таким образом, в результате скрининга в ряду α, ω-диарилметильных производных бис-(ω-аминоалкил)аминов) для дальнейшего доклинического фармакологического изучения отобрано соедине-

ние-лидер — N<sup>1</sup>-(2,3,4-триметоксибензил)-N<sup>2</sup>-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этан-диамин (соединение Пг).

### Литература

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: 2013; часть 1: 385–416.
2. Aldakkak M., Camara A.K., Heisner J.S., Yang M., Stowe D.F. Ranolazine reduces Ca<sup>2+</sup> overload and oxidative stress and improves mitochondrial integrity to protect against ischemia reperfusion injury in isolated hearts. *Pharmacol Res.* 2011; 64: 4: 381–392.
3. Kantor P.F., Lucien A., Kozak R., Lopaschuk G.D. The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res.* 2000; 86: 5: 580–588.
4. Marzilli M. Recurrent and resistant angina: is the metabolic approach an appropriate answer? *Coron. Artery Dis.* 2004; 15: Suppl. 1: S23–S27.
5. Mencarelli A., Cipriani S., Renga B., D'Amore C., Palladino G., Distrutti E., Baldelli F., Fiorucci S. FXR activation improves myocardial fatty acid metabolism in a rodent model of obesity-driven cardiotoxicity. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2013; 23: 2: 94–101.
6. Snorek M., Hodyc D., Sedivy V., Durišová J., Skoumalová A., Wilhelm J., Neckář J., Kolář F., Herget J. Short-term fasting reduces the extent of myocardial infarction and incidence of reperfusion arrhythmias in rats. *Physiol. Res.* 2012; 61: 6: 567–574.

7. Stanley W.C. Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 2004; 9: Suppl. 1: S31–S45.
8. Stanley W.C. Partial fatty acid oxidation inhibitors for stable angina. *Expert Opin. Investig. Drugs.* 2002; 11: 5: 615–629.
9. Tousoulis D., Bakogiannis C., Briasoulis A., Papageorgiou N., Androulakis E., Siasos G., Latsios G., Kampoli A.M., Charakida M., Toutouzias K., Stefanadis C. Targeting myocardial metabolism for the treatment of stable angina. *Curr. Pharm. Des.* 2013; 19: 9: 1587–1592.
10. Ussher J.R., Jaswal J.S., Lopaschuk G.D. Pyridine nucleotide regulation of cardiac intermediary metabolism. *Circ. Res.* 2012; 111: 5: 628–641.
11. van Bilsen M. «Energetics» of heart failure. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1015: 238–249.
12. Wyatt K.M., Skene C., Veitch K., Hue L., McCormack J.G. The antianginal agent ranolazine is a weak inhibitor of the respiratory complex I, but with greater potency in broken or uncoupled than in coupled mitochondria. *Biochem Pharmacol.* 1995; 50: 10: 1599–1606.
13. Yamamoto S., Matsui K., Sasabe M., Ohashi N. Effect of an orally active Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor, SMP-300, on experimental angina and myocardial infarction models in rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2002; 39: 2: 234–241.

# Сравнительный анализ активации пострецепторных сигнальных путей димерными дипептидными миметиками разных петель NGF

**Антипова Т.А., Логвинов И.О., Николаев С.В., Круглов С.В., Тарасюк А.В., Антипов П.И., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.**

*Лаборатория фармакологии нейропротекции отдела фармакогенетики  
ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», г. Москва*

**Резюме.** На культуре гиппокампальных клеток линии HT-22 показано, что димерные дипептидные миметики разных петель NGF осуществляют своё действие через специфический нейротрофиновый TrkA-рецептор и относительно избирательно активируют пострецепторные сигнальные пути. Миметики 1-й (ГК-6 (10-6M)) и 3-й петли ГТС-115 ((10-6M)) вызывают активацию двух основных сигнальных каскадов – PI3/Akt и MAP/Erk, в то время как миметик 4-й петли NGF ГК-2 (10-8M) только одного – PI3/Akt-пути.

**Ключевые слова:** NGF, Trk-A, внутриклеточный сигналинг, димерные дипептидные миметики

## **Comparative analysis activation of post-receptor signal ways by dimeric dipeptide mimetiks of different loops of NGF**

Antipova T.A., Logvinov I.O., Nikolaev S.V., Kruglov S.V., Tarasiuk A.V., Antipov P.I.,  
Gudasheva T.A., Seredenin S.B.

Laboratory of Neuroprotective pharmacology Department of Pharmacogenetics  
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** On culture of hippocampal HT-22 cells line it is shown that dimeric dipeptide mimetiks of different loops of NGF realize their action via specific neurotrophic TrkA-receptor and selective activate post-receptor intracellular signal ways. Mimetiks of 1th (GK-6 (10-6M)) and the 3rd loops (GTS-115 ((10-6M)) evoke activation of two main signal cascades – PI3/Akt and MAP/Erk, while mimetic the 4th loop of NGF (GK-2 (10-8M)) only one – a PI3/Akt-way.

**Keywords:** NGF, Trk-A, intracellular signaling, dimeric dipeptide mimetiks

Автор, ответственный за переписку:

Логвинов Илья Олегович — научный сотрудник, ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (916) 799-55-33; e-mail: logvinov\_ilya@mail.ru

## **Введение**

Фактор роста нервов (NGF), один из представителей семейства нейротрофинов, со времени открытия в начале 50-х годов XX века привлекает внимание как возможное средство лечения нейродегенеративных заболеваний [1]. Однако применение NGF в клинике осложнено его малой устойчивостью в биологических жидкостях и низкой способностью проникновения через гемато-энцефалический барьер, а также серьёзными побочными эффектами, такими как существенная потеря массы тела и гипералгезия [2]. В связи с этим актуальным является поиск низкомолекулярных соединений, обладающих необходимыми для фармакотерапии эффектами NGF, но свободных от недостатков полноразмерного белка.

NGF представляет собой гомодимер, каждый протомер которого состоит из 118 аминокислотных остатков, организованных в 7 бета-тяжей, связанных между собой 4 неупорядоченными регионами, называемыми петлями. При взаимодействии NGF со специфическим TrkA рецептором происходит его димеризация, автофосфорилирование и активация ряда сигнальных путей, включая фосфатидилинози-

тол-3 киназный (PI3K/Akt) и митоген-активируемый протеинкиназный (MAP/Erk) пути. При этом первый путь связывают в основном с нейропротекцией [3], а второй — с дифференцировкой клеток и гипералгезией [4].

В НИИ фармакологии имени В. В. Закусова сформулирована гипотеза, что разные функции нейротрофина контролируются взаимодействием разных петель с одним и тем же Trk-рецептором [5]. В рамках этой гипотезы были сконструированы димерные дипептидные миметики 4-й петли NGF — ГК-2 (гексаметилендиамид бис-(N-моносукцинил-L-глутамил-L-лизина)), 1-й петли — ГК-6 (гексаметилендиамид бис-(N-аминокапроил-глицил-L-лизина)) и 3-й петли ГТС-115 (гексаметилендиамид бис-(N-гамма-оксибутирил-L-лизил-L-гистидина)), для которых в экспериментах *in vitro* было показано наличие нейропротекторного эффекта [6, 7].

Целью настоящего исследования было сравнительное изучение влияния этих дипептидных миметиков NGF на активацию TrkA-рецептора и пострецепторных внутриклеточных сигнальных путей в культуре гиппокампальных клеток линии HT-22.

## Материалы и методы

### 1. Культура гиппокампальных клеток линии HT-22

Иммортализованные клетки гиппокампа мыши линии HT-22 рассеивали на чашки Петри диаметром 4 см, обработанные поли-D-лизинном (BD Biosciences, San Jose, USA; 5 мкг/см<sup>2</sup>) с плотностью 20 тыс/см<sup>2</sup> в среде DMEM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), содержащей 5% телячьей эмбриональной сыворотки (Gibco Life Technologies, New York, USA) и 2 mM L-глутамин (ICN, Eschwege, Germany), и инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> до образования монослоя.

### 2. Внесение исследуемых соединений

ГК-2 (10<sup>-8</sup>М), ГК-6 (10<sup>-6</sup>М) и ГТС-115 (10<sup>-6</sup>М) вносили в культуральную среду в виде стерильного раствора в эффективных концентрациях, установленных в экспериментах по нейропротекторному действию этих соединений на культуре гиппокампальных клеток линии HT-22. В качестве положительного контроля использовали NGF (10<sup>-9</sup>М). Клетки лизировали через 15, 30, 60 и 180 мин после внесения пептидов. Временные точки были выбраны, исходя из данных литературы по фосфорилированию Akt и Erk-киназ под действием NGF [8].

### 3. Исследование активации Trk-A-рецептора, PI3K/AKT и MAP/Erk-киназ пострецепторных путей

Содержание p-TrkA, TrkA, p-Akt1/2/3, Akt1/2/3, p-ERK1/2, ERK1/2 определяли с использованием метода Вестерн-блот анализа. Клетки соединяли с лизирующим буфером (Bio-Rad, Hercules, USA; 50 mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 1mM DTT, 1% Triton X-100) при pH = 7,5 и температуре 4 °C их лизировали в течение 5 мин на льду, затем соскребали, помещали в центрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали 10 мин при 13000 об/с и 4 °C. Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Фолина-Лоури [9]. Белки разделяли электрофорезом в 10% полиакриламидном геле (ПААГ; Bio-Rad, Hercules, USA) в присутствии додецилсульфата натрия [10]. Перенос белков с ПААГ на мембрану PVDF (Bio-Rad, Hercules, USA) осуществляли электроэлюцией в течение 45 мин. Преинкубацию Вестерн-блотов проводили в буфере TBS-T с 1% Tween-20 и 5% (масса/объем) обезжиренным молоком (Bio-Rad, Hercules, USA) в течение ночи. Затем мембраны инкубировали в присутствии мышиных моноклональных антител против фосфорилированной и нефосфорилированной формы тирозинкиназы A — p-TrkA (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) в разведении 1:1000, против кроличьих поликлональных антител к фосфорилированной и нефосфорилированной формы Akt1/2/3-киназ — p-Akt1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), против фосфорилированной (кроличьи поликлональные антитела) и нефосфорилированной (мы-

шинные моноклональные антитела) формы Erk1/2 — p-Erk1/2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) в разведении 1:1000 в течение 1 ч. Затем после отмывки в буфере TBS-T с 1% Tween-20 и 0,5% (масса/объем) обезжиренным молоком мембраны инкубировали в присутствии вторых козьих антител (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), конъюгированных с пероксидазой хрена (разведение 1:2000), в течение 1 ч. Детектирование белков осуществляли после отмывки от вторых антител в буфере TBS-T с 1% Tween-20 и 0,5% (масса/объем) обезжиренным молоком в реакции с ECL-реагентами (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA), используя гель-документирующую систему Alliance UVITEC (UK). Денситометрию полученных изображений проводили с помощью программы GIMP2.

### 4. Статистический анализ

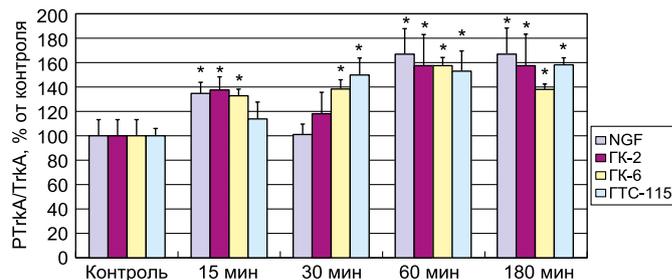
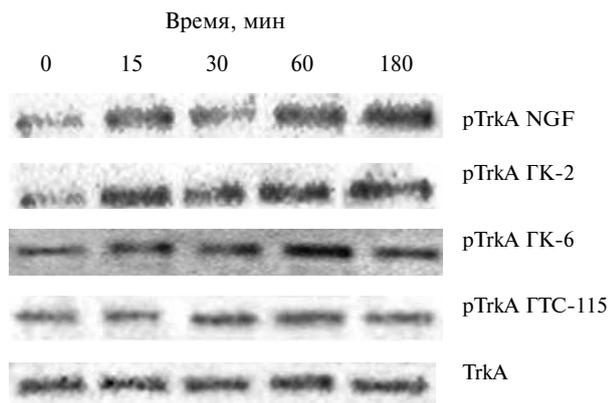
Для оценки межгрупповых различий при сравнении двух групп использовали U-критерий Манна-Уитни. Данные указаны в  $m \pm s. d.$

## Результаты и их обсуждение

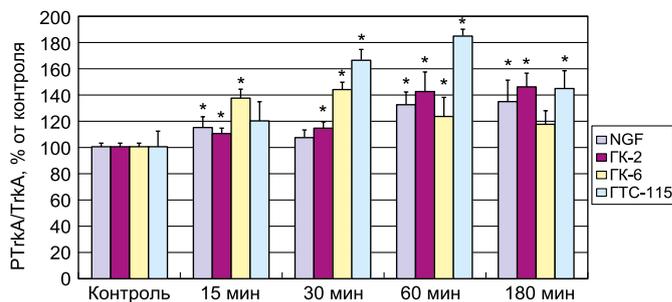
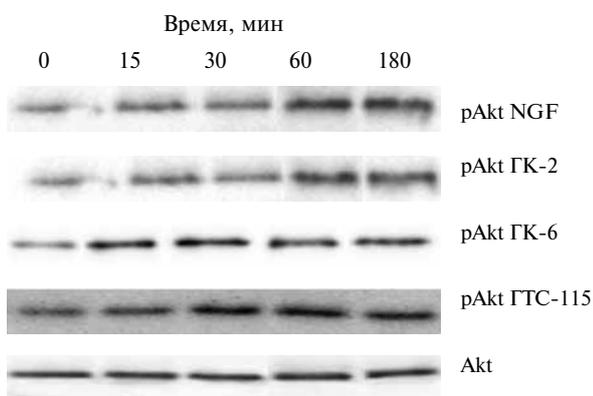
Хорошо известно, что основные биологические функции NGF — нейропротекция и дифференцирующая активность — реализуются при его взаимодействии с TrkA рецепторами и опосредованы, главным образом, PI3/Akt и MAP/Erk пострецепторными сигнальными каскадами. Изучение возможного влияния миметиков 1-й, 3-й и 4-й петель NGF ГК-6, ГК-2 и ГТС-115 на фосфорилирование TrkA, Akt и Erk-киназ проводили на гиппокампальных клетках линии HT-22 с помощью Вестерн-блот анализа с использованием антител к фосфорилированным и нефосфорилированным формам этих киназ

Было показано, что все миметики взаимодействуют с TrkA-рецептором, но при этом имеют разную картину пострецепторного сигналинга: ГК-6 и ГТС-115, подобно NGF, активируют MAP/Erk- и PI3/Akt, в то время как ГК-2 — только PI3/Akt-сигнальный путь. Как видно из рис. 1–3, достоверное увеличение фосфорилирования TrkA рецептора и Akt-киназ наблюдалось через 15, 30, 60 и 180 мин после внесения ГК-2, через 15, 30, 60 мин после внесения ГК-6, через 30, 60, 180 мин после внесения ГТС-115, а Erk-киназ под действием NGF, ГК-6 и ГТС-115 через 30 и 60 мин.

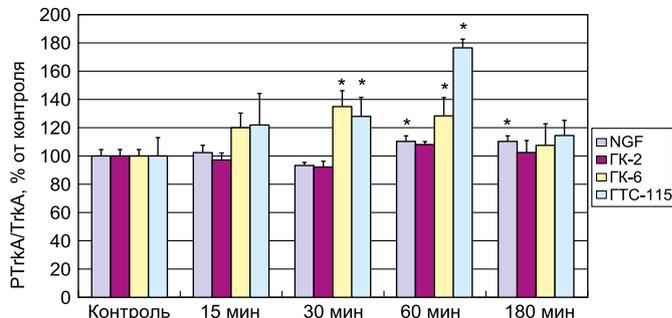
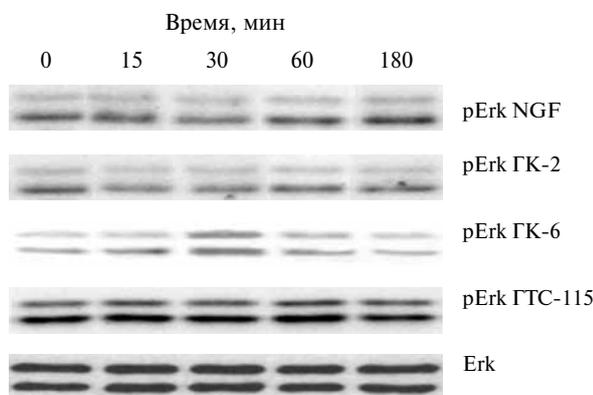
Известно, что основным сигнальным путём TrkA-рецептора обеспечивающим выживаемость нейронов является фосфатидилинозитол-3 / Akt киназный путь. Одной из мишеней, активированного NGF фосфатидилинозитол-3-киназного пути является серин/треониновая киназа Akt или протеинкиназа Б. С использованием ингибирования Akt-киназы было показано, что 80% NGF-индуцированной выживаемости симпатических нейронов обусловлено активацией этой киназы [11–13]. В нейронах Akt-киназа регулирует



**Рис. 1.** Фосфорилирование TrkA после внесения NGF, GK-2, GK-6 и ГТС-115 в культуру клеток гиппокампа мыши линии HT-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии) \* –  $p < 0,05$ , достоверность отличий от контроля по U-критерию Манна-Уитни



**Рис. 2.** Фосфорилирование Akt после внесения NGF, GK-2, GK-6 и ГТС-115 в культуру клеток гиппокампа мыши линии HT-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии) \* –  $p < 0,05$ , достоверность отличий от контроля по U-критерию Манна-Уитни



**Рис. 3.** Фосфорилирование Erk после внесения NGF, GK-2, GK-6 и ГТС-115 в культуру клеток гиппокампа мыши линии HT-22 (оригинальные вестерн-блоты и результаты их денситометрии) \* –  $p < 0,05$ , достоверность отличий от контроля по U-критерию Манна-Уитни

только их выживаемость, но не влияет ни на образование нейритов, ни на дифференцировку [3].

Второй сигнальный путь, участвующим в выживании нейронов является MAP-Erk-киназный. Известно, что активация этого сигнального пути в основном вовлечена в такие эффекты NGF, как дифференцировка, синаптическая пластичность, долговременная потенция и в один из побочных эффектов применения NGF — гипералгезию [14].

Ранее на культуре гиппокампальных клеток линии HT-22 нами было показано наличие у пептидных

миметиков разных петель NGF нейропротекторного эффекта [5, 7]. При этом миметики 1-й (GK-6) и 3-й (ГТС-115) петель обладали и дифференцирующим действием на культуре феохромоцитомы крысы линии PC12, а миметик 4-й петли GK-2 — нет. Такие разные эффекты соединений могли быть связаны с разной активацией пострецепторных путей специфического нейротрофинового TrkA-рецептора. Полученные результаты подтверждают имеющиеся данные литературы, свидетельствующие о возможности дивергенции эффектов NGF. В работе *S. Mahapatra et al.* [15] было

показано, что точечные мутации в структуре NGF приводят к изменению соотношения активации Akt и MAP-киназного путей. Так, мутантная форма NGF 7–84–103 (SS-1) при внесении в культуру клеток PC12 характеризовалась снижением активации MAP-киназного пути и усилением активации PI3/Akt-киназного (соотношение Akt/MAP 0,75/0,25). Этими авторами было выдвинуто предположение о том, что строение сигнального трансдукционного комплекса, состоящего, по меньшей мере, из 6 адапторных белков, связанных с Trk<sup>490</sup> зависит как от взаимодействий внутри самого внутриклеточного домена, так и от связывания NGF с экстраклеточным доменом. Причём тип строения этого комплекса может приводить к разделению внутриклеточных сигнальных путей. В работах *H. U. Saragovi et al.* [16] в экспериментах *in vitro* было показано, что комплекс NGF с антителами против С-конца этого белка активирует TrkA рецептор и обладает нейропротекторными свойствами, но в отличие от фактора роста нервов не вызывает дифференцировку. *S. Capsoni et al.* [17]

приводит данные о том, что у пациентов с наследственной сенсорной автономной нейропатией V типа, имеющих мутацию в гене NGFB (экзон 3) с заменой аргинина в положении R100 на триптофан, полностью отсутствует болевая чувствительность без нарушения большинства неврологических функций.

## Выводы

Полученные данные позволяют заключить, что вновь синтезированные низкомолекулярные миметки разных петель NGF проявляют свои эффекты через тирозинкиназные рецепторы и относительно избирательны в отношении активации внутриклеточных сигнальных путей, ответственных за биологические эффекты этого нейротрофина. Исследование биохимических свойств дипептидных миметиков 1-й, 4-й и 3-й петель NGF показывает, что картины активации пострецепторных путей сходны у пространственно сближенных 3-й и 1-й петли нейротрофина.

## Литература

1. *Levi-Montalcini R.* The nerve growth factor 35 years later. *Science.* 1987; 237: 1154–1162.
2. *Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L.* Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use beta beta. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 11: 239–252.
3. *Kaplan D.R., Miller F.D.* Neurotrophin signal transduction in the nervous system. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2000; 10: 3: 381–391.
4. *Obata K., Noguchi K.* MAPK activation in nociceptive neurons and pain hypersensitivity. *Life Sci.* 2004; 74: 21: 2643–2653.
5. *Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов. Доклады Академии Наук 2010; 434: 4: 549–552.
6. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А.* Дипептидные миметики нейротрофинов NGF и BDNF: Патент РФ № 2410392. Б.И. 2011, № 3.
7. *Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Сазонова Н.М., Помогайбо С.В., Шумский А.Н., Логвинов И.О., Николаев С.В., Поварнина П.Ю., Константинопольский М.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б.* Дизайн, синтез и нейропротекторные эффекты димерного дипептидного миметика 3-й петли фактора роста нервов. *Биоорганическая химия* 2016, в печати.
8. *Senger D.L., Campenot R.B.* Rapid retrograde tyrosine phosphorylation of trkA and other proteins in rat sympathetic neurons in compartmented cultures. *J. Cell Biol.* 1997; 138 (2): 411–421.
9. *Alam A.* A model for formulation of protein assay. *Anal Biochem.* 1992; 203: 1: 121–126.
10. *Towbin H., Staehelin T., Gordon J.* Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979; 76: 9: 4350–4354.
11. *Crowder R.J., Freeman R.S.* Phosphatidylinositol 3-kinase and Akt protein kinase are necessary and sufficient for the survival of nerve growth factor-dependent sympathetic neurons. *J. Neurosci.* 1998; 18: 8: 2933–2934.
12. *Virdee K., Tolkovsky A.M.* Inhibition of p42 and p44 mitogen-activated protein kinase activity by PD98059 does not suppress nerve growth factor-induced survival sympathetic neurons. *J. Neurochem.* 1996; 67: 5: 1801–1805.
13. *Virdee K., Hemmings B.A., Goemans C., Heumann R., Tolkovsky A.M.* Nerve growth factor-induced PKB/Akt activity is sustained by phosphoinositide 3-kinase dependent and independent signals in sympathetic neurons. *Brain Res.* 1999; 837: 1–2: 127–142.
14. *Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L.* Nerve growth factor: from the early discoveries to the potential clinical use beta beta. *J. Transl. Med.* 2012; 10: 239: 239–252.
15. *Mahapatra S., Mehta H., Woo S.B., Neet K.E.* Identification of critical residues within the conserved and specificity patches of nerve growth factor leading to survival or differentiation. *J. Biol. Chem.* 2009; 284 (48): 33600–33613.
16. *Saragovi H.U., Zheng W., Maliartchouk S., DiGuglielmo G.M., Mawal Y.R., Kamen A. et al.* A TrkA-selective, fast internalizing nerve growth factor-antibody complex induces trophic but not neuritogenic signals. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 34933–34940.
17. *Capsoni S., Covaceuszach S., Marinelli S., Ceci M., Bernardo A., Minghetti L. et al.* Taking pain out of NGF: a «painless» NGF mutant, linked to hereditary sensory autonomic neuropathy type V, with full neurotrophic activity. *PLoS One.* 2011; 6: 2: e17321.

# Доклиническое изучение фармакокинетики аскорбата лития

Пронин А.В.<sup>1</sup>, Громова О.А.<sup>1</sup>, Торшин И.Ю.<sup>2</sup>, Гоголева И. В.<sup>1</sup>,  
Жидоморов Н.Ю.<sup>1</sup>, Сардарян И.С.<sup>4</sup>, Волков А.Ю.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Иваново

<sup>2</sup> – ГБОУ ВПО «Московский физико-технический институт (государственный университет)», г. Москва

<sup>3</sup> – ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет»  
Минздрава России, г. Санкт-Петербург

<sup>4</sup> – ФГБОУ ВО «Российский государственный аграрный университет –  
Сельскохозяйственная академия им К.А. Тимирязева», г. Москва

**Резюме.** Исследовано воздействие аскорбата лития в дозе 1 000 мг/кг на самцах белых крыс линии Вистар. Получены фармакокинетические кривые для цельной крови и гомогенатов тканей 10 различных биосубстратов (головной мозг, лобная доля головного мозга, сердце, аорта, лёгкие, печень, почки, селезёнка, надпочечники, бедренная кость). В рамках бескамерного анализа динамики концентраций в цельной крови получены следующие значения фармакокинетических параметров аскорбата лития:  $C_{\max}=50,59$  мкг/л,  $T_{\max}=1,50$  ч,  $Cl_{\text{ast}}=33,7$  мкг/л,  $AUC_t=1\ 750$  мкг/л $\times$ ч,  $MRT_t=22,9$  ч,  $L_z=0,005$  1/ч,  $T_{1/2}=141$  ч,  $CL=0,029$  л/ч,  $VD=5,9$  л. Концентрации лития в цельной крови и в лобной доле головного мозга оставались стабильными в течение, по крайней мере, 40–45 ч после прохождения пика концентрации. Многокамерный фармакокинетический анализ показал, что стабилизация уровней лития в крови и в головном мозге поддерживается за счёт специального «депо» лития, состоящего, вероятно, из надпочечников, аорты, бедренной кости и головного мозга.

**Ключевые слова:** аскорбат лития, бескамерная модель, многокамерное моделирование, фармакокинетика, биосубстрат

## Preclinical study the pharmacokinetics of lithium ascorbate

Pronin A.V.<sup>1</sup>, Gromova O.A.<sup>1</sup>, Torshin I.J.<sup>2</sup>, Gogoleva I.V.<sup>1</sup>,  
Zhidomorov N.J.<sup>1</sup>, Sardaryan I.S.<sup>3</sup>, Volkov A.Ju.<sup>4</sup>

<sup>1</sup> – FSBI HPE «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ivanovo

<sup>2</sup> – Moscow Institute of Physics and Technology (State University), Moscow

<sup>3</sup> – FSBI HPE «St. Petersburg State Pediatric Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation

<sup>4</sup> – FSBI HE «Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy», Moscow

**Abstract.** We have studied the effects of lithium ascorbate on the Wistar male albino rats using a dose of 1 000 mg/kg. The concentration time curves for whole blood and tissue homogenates of 10 different biological substrates were derived (the brain, the frontal lobe of the brain, heart, aorta, lungs, liver, kidneys, spleen, adrenals, femoral bone). In the framework of the tubeless analysis of the concentrations in whole blood dynamics the following values of pharmacokinetic parameters of lithium ascorbate were obtained:  $C_{\max}=50,59$   $\mu\text{g}/\text{l}$ ,  $T_{\max}=1,50$  h,  $Cl_{\text{ast}}=33,7$   $\mu\text{g}/\text{l}\cdot\text{h}$ ,  $AUC_t=1\ 750$   $\mu\text{g}/\text{l}\cdot\text{h}$ ,  $MRT_t=22,9$  h,  $L_z=0,005$  1/h,  $T_{1/2}=141$  h,  $CL=0,029$  l/h,  $VD=5,9$  l. The concentration of lithium in whole blood and in the frontal lobe of the brain remained stable for at least 40..45 hours after the concentration peak. Multi-compartment pharmacokinetic analysis showed that the stabilization of the levels of lithium in the blood and in the brain is supported by a special lithium pool, reportedly consisting of adrenal glands, aorta, femur and brain.

**Keywords:** lithium ascorbate, tubeless model, multi-compartment model, pharmacokinetics, biosubstrate

Автор, ответственный за переписку:

Пронин Артем Викторович – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГБОУ ВО ИвГМА МЗ России, преподаватель ФГБОУ ВО Ивановской пожарно-спасательной академии ГПС МЧС России, 153000, Иваново, Шереметевский пр., 8; тел. +7 (4932) 41-65-25; e-mail: doctormchs1978@mail.ru

## Введение

Ион лития характеризуется нормотимическим действием. Наиболее известной фармакологической формой лития является карбонат лития, использующийся в психиатрии для терапии биполярных расстройств [1], маниакального синдрома, игромании [2] и др. Однако препараты на основе карбоната лития имеют существенные недостатки.

Во-первых, для результативного и безопасного применения этих препаратов требуется регулярно измерять концентрацию лития в крови, что влечёт за собой дополнительные инвазивные процедуры [3]. Во-вторых, для карбоната лития характерен узкий терапевтический коридор концентраций лития в плазме — 0,6–1,2 ммоль/л. Концентрации  $\text{Li}^+$  в 1,5–2,5 ммоль/л ассоциированы со слабой токсичностью, 2,5–3,5 ммоль/л — с тяжёлым отравлением,

а превышение порога в 3,5 ммоль/л может быть опасным для жизни [4]. В-третьих, для достижения искомого терапевтического эффекта в психиатрии необходимо использование значительных дозировок карбоната лития (1–3 г/сут, в остром периоде — до 9 г/сут), что ввиду высокой токсичности карбоната лития снижает привлекательность этой соли лития для назначения врачами [5].

Исходя из вышеизложенного, для повышения безопасности литиевой терапии исследуются эффекты других солей лития. В частности, аскорбат лития характеризуется низкой токсичностью (5-й класс,  $LD_{50}$ —6334 мг/кг, токсичность в 8,4 раза меньше, чем у карбоната лития) [6]. В то же время психоневрологическая эффективность аскорбата лития достигается при более низких дозировках (в 10–20 раз меньше суточной дозы карбоната лития) [7]. Установлены анксиолитический, антидепрессивный [8], нейропротекторный [9] и мнестический эффекты аскорбата лития [10].

В настоящей работе было проведено комплексное экспериментальное исследование фармакокинетики аскорбата лития в дозе 1000 мкг/кг. Полученные результаты позволяют утверждать, что препарат, созданный на основе аскорбата лития, будет достигать искомого терапевтического эффекта на существенно более низких дозировках, чем карбонат лития.

### Материалы и методы

Эксперимент был проведён в соответствии с действующим Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [11].

В качестве модельного объекта были использованы самцы белых крыс линии Вистар массой 200–250 г ( $n = 54$ , 9 групп по 6 животных в каждой). Животных содержали в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP) и приказом МЗ и СР РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» при естественном освещении и температуре воздуха около 20–22 °С в пластиковых клетках группами по 6 крыс в каждой, при свободном доступе к пище (стандартный брикетированный корм) и воде, при нормальном 12-часовом световом режиме. Во избежание влияния суточных ритмов на поведенческие параметры животных все эксперименты проводились в период между 9 и 14 часами; исследование проводилось в рамках диссертационного исследования в соответствии с решением этического комитета ИвГМА от 24 марта 2016 г.

### Приготовление растворов

Зондирование проводилось раствором аскорбата лития, 1 мл которого содержал 250 мкг элементного лития. Для получения дозы 1000 мкг/кг животному массой 250 г необходимо получить 250 мкг элемент-

ного лития, т. е. 1 мл раствора. Необходимый объём раствора рассчитывался исходя из массы животного. Для приготовления раствора использовался порошок дигидрата аскорбата лития. Молекулярная масса безводного аскорбата лития — 178 г/моль, дигидрата аскорбата лития — 214 г/моль. В дигидрате аскорбата лития, литий и аскорбат-анион представлены в молярном соотношении 1:1, а в массовом соотношении 1:71,33. Таким образом, 250 мкг элементного лития содержится в  $250 \times 71,33 = 17,84$  мг дигидрата аскорбата лития.

### Проведение эксперимента

Проводилось зондирование раствором аскорбата лития в дозе 1000 мкг/кг (в расчёте на элементный литий). Выбор данной дозировки обусловлен тем, что эффекты органических форм лития достоверны уже при дозах в 30–100 мкг/кг (при приёме в течение 1–3 мес) [12]. Для исследования фармакокинетики и распределения лития в тканях было решено использовать однократное введение 10-кратной дозы от 100 мкг/кг, т. е. 1000 мкг/кг. Так как  $LD_{50}$  аскорбата лития составляет 6334 мг/кг [6], то доза в 1000 мкг/кг элементного лития достаточно далека от остро-токсичной. Пробы крови и органы отбирали после эвтаназии животных с помощью цервикальной дислокации в 9 временных точках: 0 мин, 45 мин, 1 ч, 1,5 ч, 3 ч, 6 ч, 12 ч, 24 ч, 48 ч. Методом масс-спектрометрии определялись уровни лития в 11 различных биосубстратах: цельная кровь, головной мозг, лобная доля головного мозга, сердце, аорта, лёгкие, печень, почки, селезёнка, надпочечники, бедренная кость.

### Определение уровней аскорбата лития

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

68 элементов периодической системы Д.И. Менделеева (в т. ч. лития) в различных биосубстратах.

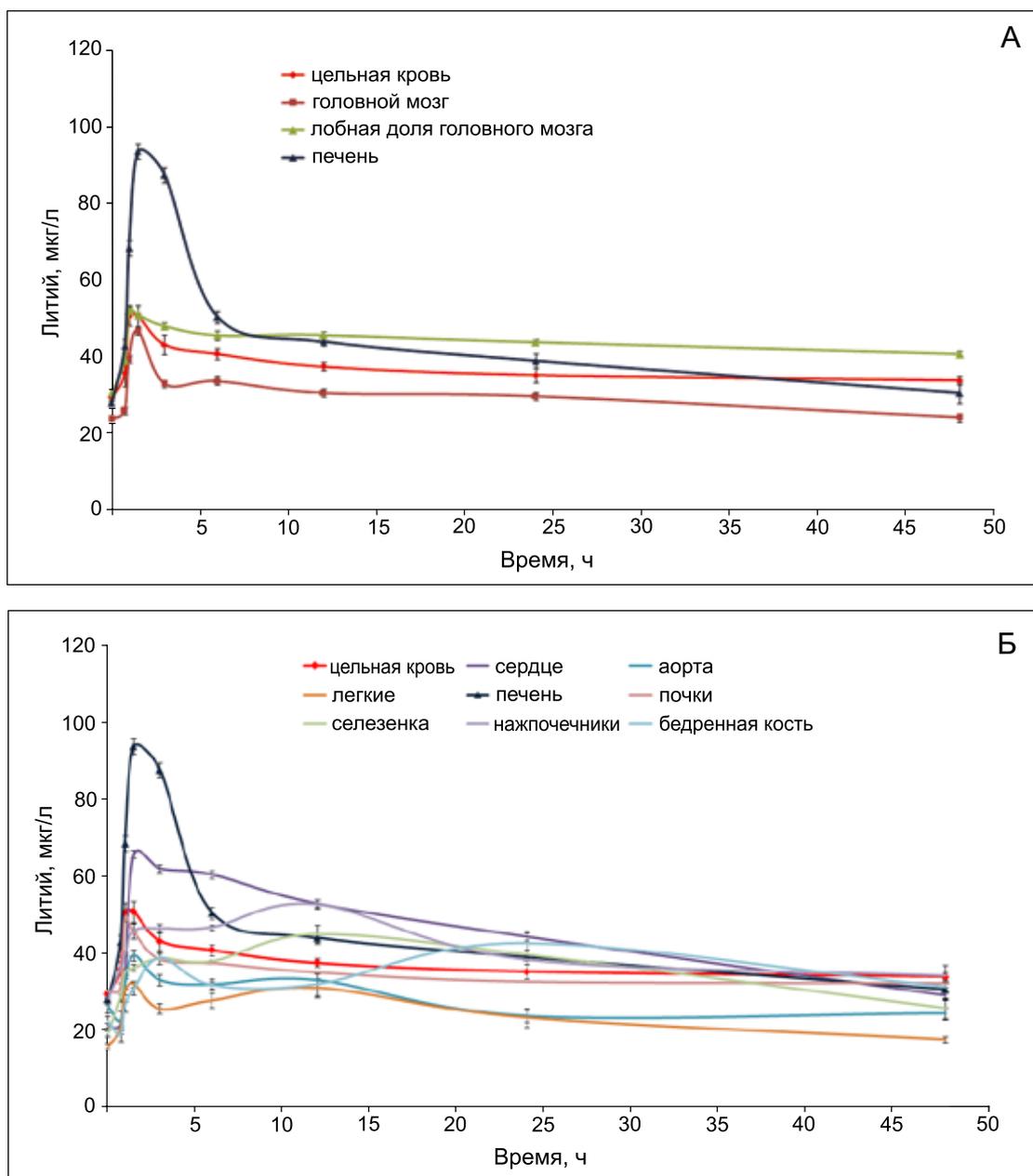
### Фармакокинетический анализ

В ходе настоящего анализа были использованы методы многокамерного и бескамерного фармакокинетического анализа. Многокамерный анализ проводился посредством пакета SimBiology в составе программного комплекса MATLAB-2016 [13], а бескамерный анализ — с использованием электронных таблиц Excel, дополненных модулями программного пакета PKSolver [14].

### Результаты и обсуждение

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

ФК-кривые, полученные для различных биосубстратов, существенно отличаются по характеру и степени изменения концентраций лития во времени. Оценка «расстояния» между данными кривыми как среднеквадратичного отклонения кривых друг от друга позволило произвести кластеризацию ФК-кривых с использованием метода анализа метрических сгущений [15].



**Рис. 1.** Фармакокинетические кривые содержания аскорбата лития.

**Примечание:** А — гомогенаты тканей цельной крови, головного мозга, лобной доли головного мозга и печени; Б — гомогенаты тканей цельной крови, лёгких, селезёнки, сердца, печени, надпочечников, аорты, почек, бедренной кости

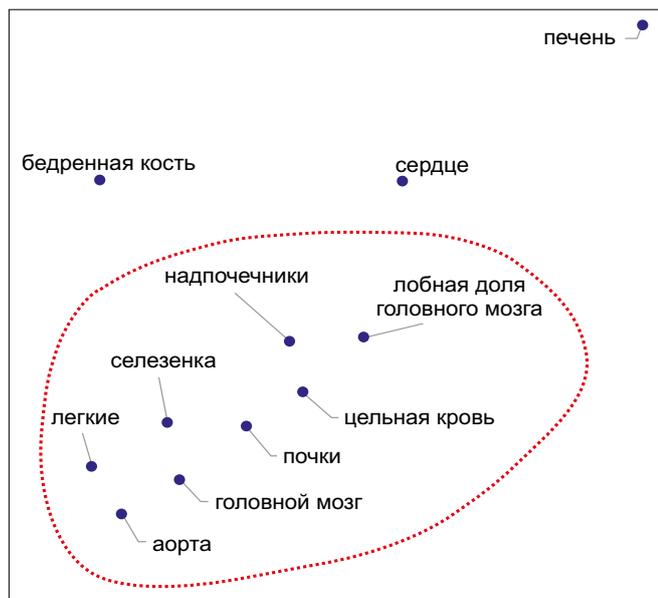


Рис. 2. Результаты кластеризации ФК-кривых для различных биосубстратов

В результате кластеризации было установлено, что все ФК-кривые, за исключением ФК-кривых для печени, сердца и бедренной кости образуют единственный кластер. Данные приведены на рис. 2.

Визуальный анализ ФК-кривых показывает, что в течение 1–2 ч после зондирования аскорбатом лития происходит интенсивное накопление лития во всех исследованных тканях. Максимальные пиковые концентрации лития ( $C_{max}$ ) отмечены именно в гомогенатах тканей печени и сердца, а минимальные — в гомогенатах лёгких и аорты.

Важно отметить, что концентрации лития в цельной крови и в лобной доле головного мозга оставались весьма стабильными в течение, по крайней мере,

40–45 ч после прохождения пика концентрации. Данное наблюдение может указывать, во-первых, на преимущественное накопление лития в цельной крови и в лобных долях при использовании аскорбата лития и, во-вторых, на поддержание концентраций лития в этих органах за счёт некоторого «депо» лития.

ФК-кривые аскорбата лития для 6 из 11 исследованных биосубстратов имели только один пик ( $T_{max}$  в районе 1–1,5 ч) с последующим медленным снижением концентрации лития (печень, головной мозг, лобная доля, цельная кровь, сердце, почки), происходящим, вероятно, вследствие выведения лития. Для 5 из 11 биосубстратов (надпочечники, селезёнка, аорта, бедренная кость, лёгкие) ФК-кривые характеризовались присутствием второго, пологого пика концентраций лития, наблюдаемого через 10–20 ч после начала эксперимента (в случае бедренной кости — через 20–30 ч, см. рис. 1). Можно предположить, что именно эти органы (надпочечники, селезёнка, аорта, бедренная кость) и также головной мозг и образуют своего рода «депо» лития, которое способствует поддержанию стабильных концентраций лития в цельной крови и в головном мозге. Существование такого «депо» лития подтверждается результатами проведённого нами многокамерного фармакокинетического анализа.

### Многокамерный фармакокинетический анализ аскорбата лития

Для многокамерного ФК-анализа была использована ФК-кривая для содержания лития в цельной крови, указанная на рис. 3, т. к. анализ содержания препаратов в крови — основа фармакокинетического анализа. Данная кривая характеризуется выраженным пиком концентраций лития через 1–1,5 ч после зонди-

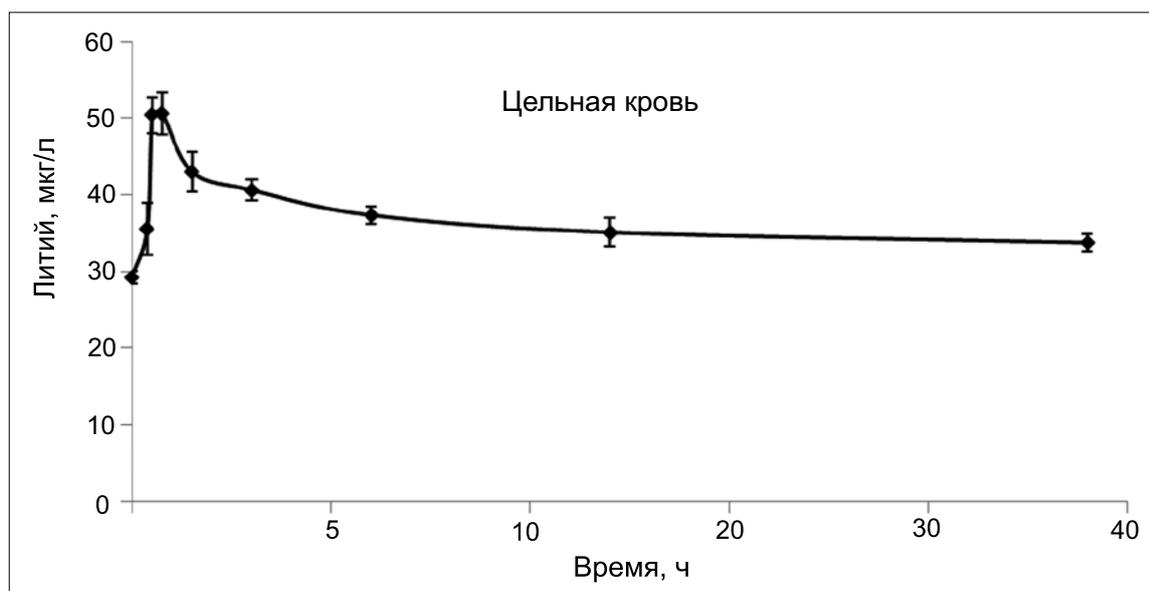


Рис. 3. Фармакокинетика уровня аскорбата лития в цельной крови. Усреднённая ФК-кривая

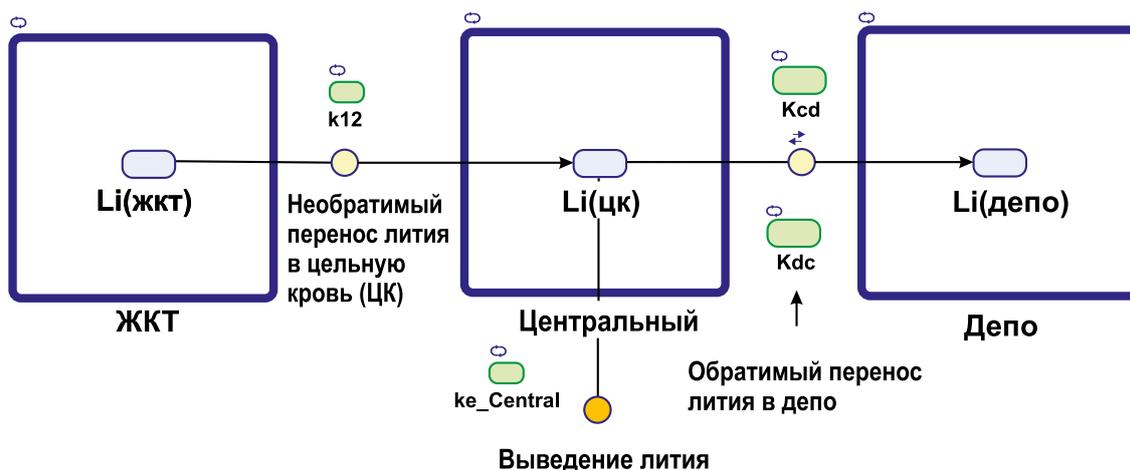


Рис. 4. Трёхкамерная модель фармакокинетики аскорбата лития, полученная в результате многокамерного фармакокинетического моделирования в среде MATLAB

рования и довольно пологим участком, указывающим на медленное выведение лития из крови.

Для получения наиболее адекватной многокамерной модели были исследованы одно-, двух-, трёх- и четырёх-камерные модели в различных конфигурациях. В результате моделирования было установлено, что самой простой моделью, наиболее точно описывающей исследуемую ФК-кривую (рис. 3) является трёхкамерная модель, включающая ЖКТ (1-й компартмент), цельную кровь (центральный, 2-й компартмент) и депо лития (3-й компартмент), причём элиминация лития осуществляется из центрального компартмента, а не из депо (рис. 4).

Качество исследованных многокамерных моделей характеризовалось значениями стандартного отклонения концентраций между теоретической и экспериментально полученной ФК-кривыми, а также коэффициентом корреляции между теоретическими и экспериментальными значениями концентраций лития в цельной крови (рис. 5). Для полученной трёхкамерной модели, представленной на рис. 4, значение среднеквадратичного отклонения концентраций составило  $a = 3,4$  мкг/л (при коэффициенте корреляции, равном 0,92), что указывает на приемлемое качество полученной модели.

Полученная модель является оптимальной по качеству и сложности. Более простые многокамерные ФК-модели характеризовались гораздо более низким качеством. Более сложные модели не приводили к существенному повышению качества модели.

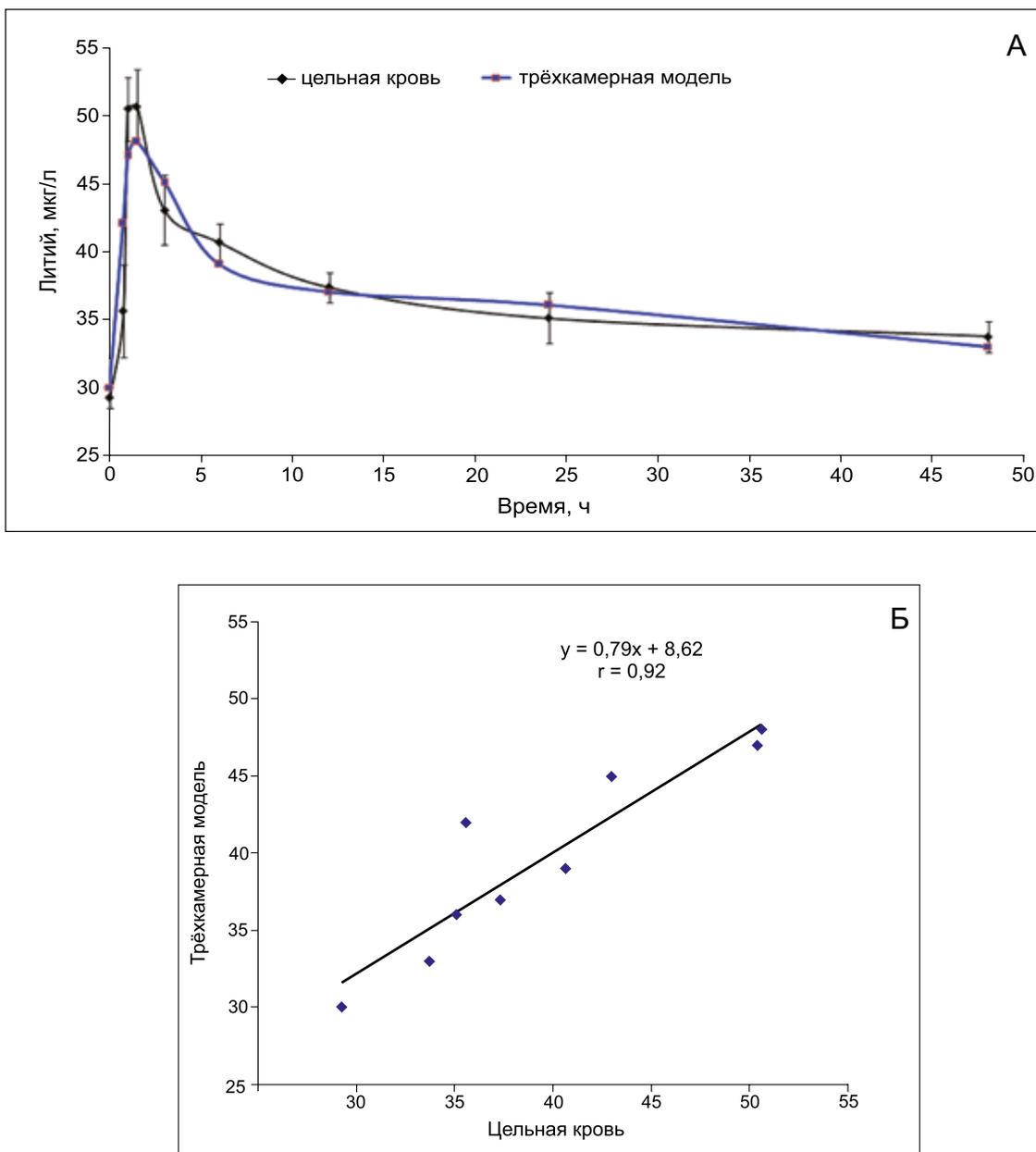
Например, удаление компартмента «депо» из модели на рис. 4 приводило к существенному повышению среднеквадратичного отклонения концентраций ( $a = 10$  мкг/л), также как и удаление компартмента «ЖКТ» ( $a = 15$  мкг/л). Моделирование процесса элиминации только из депо также резко снижало качество модели ( $a = 5,6$  мкг/л), в то время как моделирование элиминации и из депо, и из центрального компартмента не улучшало качество модели ( $a = 3,5$  мкг/л). Включение в модель процесса обмена между депо и ЖКТ также снижало качество модели ( $a = 4,5$  мкг/л).

Таким образом, трёхкамерная модель фармакокинетики аскорбата лития, в которой раствор соли переходит из ЖКТ в центральный компартмент (цельную кровь), затем — в депо, а элиминация происходит только из центрального компартмента (рис. 4) является наиболее адекватной из исследованных многокамерных моделей. ФК моделирование позволило получить количественные оценки соответствующих констант скорости и объёмов компартментов (табл. 1).

Таблица 1

Параметры полученной трёхкамерной модели фармакокинетики аскорбата лития. Среднеквадратичное отклонение концентраций — 3,4 мкг/л, коэффициент корреляции — 0,92

Параметр	Ед.	Значение	Расшифровка
V(GI)	у.е.	1,00	Объём компартмента «ЖКТ»
V(C)	у.е.	4,40	Объём центрального компартмента
V(D)	у.е.	1,81	Объём компартмента «депо»
k12	1/ч	0,67	Константа переноса из ЖКТ в цельную кровь
ke_Central	1/ч	0,0068	Константа элиминации из цельной крови
Kcd	1/ч	0,41	Константа переноса из цельной крови в депо
Kdc	1/ч	0,27	Константа переноса из депо в цельную кровь

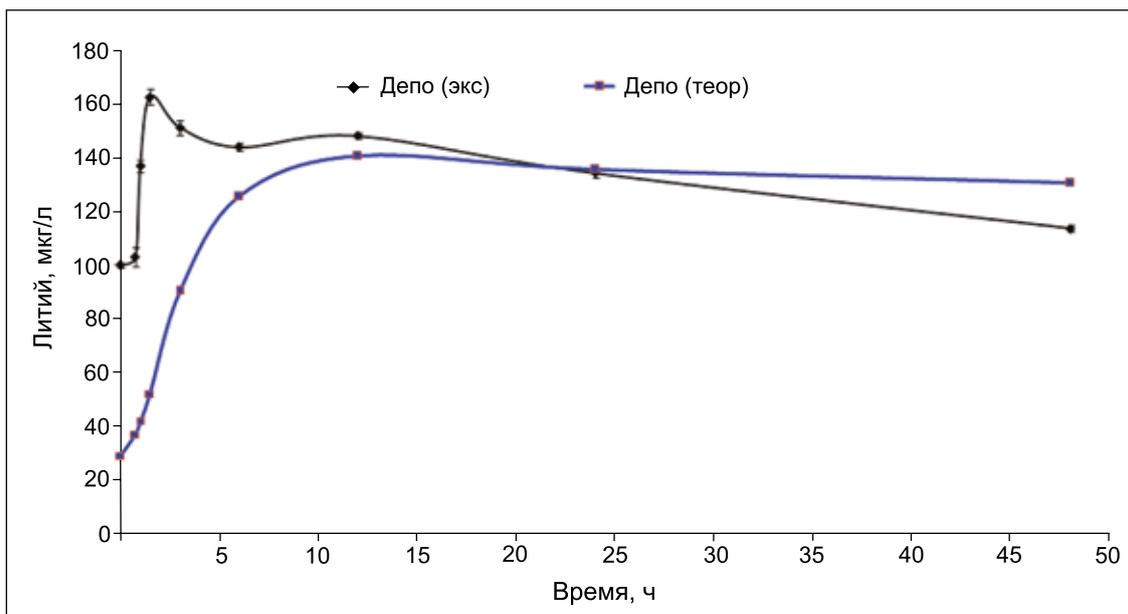


**Рис. 5.** Показатели качества трёхкамерной ФК-модели.

**Примечание:** А — Экспериментально полученные точки ФК-кривой («цельная кровь») и теоретическая ФК-кривая («трёхкамерная модель»); Б — Корреляция между теоретическими и экспериментальными значениями концентраций лития. Среднеквадратичное отклонение концентраций составило,  $a = 3,4$  мкг/л. Коэффициент корреляции  $r = 0,92$

Таким образом, моделирование показало, что объём депо составляет примерно половину от объёма центрального компартамента (т. е. цельной крови, см. табл. 1). Аскорбат лития достаточно быстро переносится из ЖКТ в кровь ( $k_{12} = 0,67$  1/ч) и весьма медленно удаляется из цельной крови (что соответствует малому значению константы  $k_{e\_Central} = 0,0068$  1/ч). Скорость обмена лития между кровью и депо сравнима со скоростью переноса из ЖКТ в кровь, причём перенос лития из цельной крови в депо ( $K_{cd} = 0,41$  1/ч) осуществляется несколько быстрее, чем обратный процесс переноса лития из депо в цельную кровь ( $K_{dc} = 0,27$  1/ч).

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



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

### Бескамерный фармакокинетический анализ аскорбата лития

Бескамерный анализ позволяет охарактеризовать такие повсеместно используемые ФК параметры препарата как максимальная концентрация лития в биосубстрате —  $C_{max}$ , время достижения максимальной концентрации —  $T_{max}$ , последняя измеренная концентрация лития —  $C_{last}$ , площадь под кривой —  $AUC_t$ , среднее время удержания —  $MRT_t$ , наклон участка финального выведения —  $L_z$ , период полувыведения —  $T_{1/2}$ , клиренс —  $CL$ , объём распределения —  $VD$ . Параметры бескамерной модели были

рассчитаны для всех исследованных биосубстратов на основании соответствующих ФК-кривых (табл. 2).

Полученные в рамках бескамерного анализа значения ФК параметров аскорбата лития подтверждают сделанные выше выводы. Во-первых, время достижения максимума ( $T_{max}$ ) составило 1–1,5 ч для большинства биосубстратов (за исключением селезёнки, надпочечников и бедренной кости, в которых  $T_{max} = 12–24$  ч).

Во-вторых, наиболее стабильно литий накапливается именно в лобной доле ( $C_{last} = 40,5$  мкг/л — самое высокое значение концентрации через 48 ч среди исследованных биосубстратов). Этот вывод подтверждает и значение площади под кривой: значение  $AUC_t$  для

Таблица 2

Значения фармакокинетические параметры бескамерной модели аскорбата лития при введении в дозе 1 000 мкг/л

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

лобной доли составило 2094 мкг/л×ч, в то время как, например, для печени (в который были отмечены наиболее высокие пиковые концентрации лития) — 2031 мкг/л×ч. Литий эффективно накапливался также в сердце (AUCt = 2 123 мкг/л×ч) и в надпочечниках (AUCt = 1 969 мкг/л×ч).

В-третьих, низкое значение наклона участка финального выведения (Lz) и высокое значение периода полувыведения ( $T_{1/2}$ ) были характерны для всех биосубстратов, особенно для цельной крови (Lz = 0,005 1/ч,  $T_{1/2}$  = 141 ч), головного мозга, в т. ч. лобной доли (Lz = 0,007 1/ч,  $T_{1/2}$  = 210 ч), почек (Lz = 0,004 1/ч,  $T_{1/2}$  = 179 ч) и бедренной кости (Lz = 0,0021/ч,  $T_{1/2}$  = 451 ч). Накопление лития в лобной доле и в кости подтверждается наиболее низкими значениями клиренса именно для этих биосубстратов (лобная доля — CL = 0,017 л/ч; бедренная кость — CL = 0,011 л/ч). Таким образом, аскорбат лития способствует поддержанию стабильных концентраций иона лития в цельной крови и в головном мозге, что важно для осуществления профилактического и терапевтического потенциала лития.

## Литература

1. Chang C.M., Wu C.S., Huang Y.W., Chau Y.L., Tsai H.J. Utilization of Psychopharmacological Treatment Among Patients With Newly Diagnosed Bipolar Disorder From 2001 to 2010. *J Clin Psychopharmacol.* 2016; 36 (1): 32–44.
2. Pallanti S., Quercioli L., Sood E., Hollander E. Lithium and valproate treatment of pathological gambling: a randomized single-blind study. *J Clin Psychiatry.* 2002; 63 (7): 559–564.
3. Baumgartner A., Pinna G., Hiedra L., Gaio U., Hessenius C., Campos-Barros A. et al. Effects of lithium and carbamazepine on thyroid hormone metabolism in rat brain. *Neuropsychopharmacol.* 1997; 16 (1): 25–41.
4. El-Balkhi S., Megarbane B., Poupon J., Baud F.J., Galliot-Guilley M. Lithium poisoning: is determination of the red blood cell lithium concentration useful? *Clin Toxicol (Phila).* 2009; 47 (1): 8–13.
5. Kandil E., Dackiw A.P., Alabbas H., Abdullah O., Tufaro A.P., Tufano R.P. A profile of patients with hyperparathyroidism undergoing lithium therapy for affective psychiatric disorders. *Head Neck.* 2011; 33 (7): 925–7.
6. Остренко К.С., Сардарян И.С. Определение острой токсичности аскорбата лития при пероральном введении у крыс линии Вистар. Международная заочная научно-практическая конференция «Вопросы образования и науки», Россия, Тамбов, 31 декабря 2015 г. ISSN2411–7609.
7. Остренко К.С., Расташанский В.В. Влияние различных доз композиции аскорбата лития, пиридоксина гидрохлорида и тиамин мононитрата на нервно-психическое возбуждение и адаптивную активность у крыс. *Scienceandworld.* 2016; 1 (29): II: 104–105, ISSN2308–4804.

## Основные выводы

Многокамерный фармакокинетический анализ показал, что стабилизация уровней лития в крови и в головном мозге поддерживается за счёт специального «депо» лития, состоящего, вероятно, из надпочечников, селезёнка, аорты, лёгких и бедренной кости. Концентрации лития в цельной крови и в лобной доле головного мозга оставались весьма стабильными в течение, по крайней мере, 40–45 ч после прохождения пика концентрации. Полученные в рамках бескамерного анализа значения ФК параметров аскорбата лития подтверждают сделанные выше выводы и показывают, что аскорбат лития способствует поддержанию стабильных концентраций иона лития в крови и в головном мозге, что важно для осуществления профилактического и терапевтического потенциала лития.

## Источник финансирования

Работа выполнена в рамках диссертационного исследования.

8. Остренко К.С., Колоскова Е.М. Антидепрессивный эффект аскорбата лития в экспериментальной модели стресса у крыс. *Вестник науки и образования.* 2016; 1 (13): 19–21, ISSN2312–8089.
9. Демидов В.И., Остренко К.В., Жидоморов Н.Ю., Громова О.А., Торшин И.Ю., Кривоногов В.А. и соавт. Эффективность аскорбата лития для профилактики и лечения хронической алкогольной интоксикации и алкогольной демиелинизации. *Ж. Неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* Готовится к выходу, 2016.
10. «Способ улучшения памяти аскорбатом лития» заявка 2016114064 на патент РФ.
11. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под редакцией А.Н. Миронова. М.: Гриф и К, 2012; 988.
12. Гоголева И.В. Влияние органических солей лития, магния, селена на элементный гомеостаз головного мозга на фоне экспериментальной хронической двусторонней окклюзии общих сонных артерий. Дисс... к. м. н. по ВАК 14.00.25, 2009, ИвГМА, 119.
13. Ferreira, A.J.M. (2009). MATLAB Codes for Finite Element Analysis. Springer. ISBN978–1–4020–9199–5. <http://www.mathworks.com/products/simbiology/>
14. 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.
15. Torshin I.Y., Rudakov K.V. On Metric Spaces Arising During Formalization of Problems of Recognition and Classification. Part 2: Density Properties. *Pattern Recognition and Image Analysis,* 2016; 26: 3: 483–496, ISSN1054–6618.

# N-ацетилцистеин: фармакокинетические параметры и влияние на концентрацию эндогенных аминотиолов

Дутов А.А.<sup>1</sup>, Никитин Д.А.<sup>2</sup>, Лукьянова Ю.Л.<sup>3</sup>, Шемякина Н.А.<sup>1</sup>,  
Ермолина А.В.<sup>4</sup>, Мищенко М.Н.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – ФГБОУ ВО Читинская государственная медицинская академия, Чита

<sup>2</sup> – ФГБОУ ВПО Забайкальский государственный университет, Чита

<sup>3</sup> – ГУЗ Городская клиническая больница № 1, Забайкальский край, Чита

<sup>4</sup> – НУЗ «Дорожная клиническая больница на ст. Чита-2 ОАО «РЖД», Забайкальский край, Чита

**Резюме.** Исследовали фармакокинетические параметры N-ацетилцистеина при однократном пероральном и в/в введении у здоровых добровольцев. Период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) в пределах 2 ч, максимальная концентрация в крови ( $C_{max}$ ) через 1 ч после введения была более чем в 10 раз выше при в/в введении по сравнению с пероральным. Также изучено влияние курсового в/в введения N-ацетилцистеина (1 200 мг/сут в течение одной недели) на концентрацию эндогенных аминотиолов у пациентов с заболеваниями, сопровождающимися оксидативным стрессом (ишемический инсульт и сосудистые осложнения сахарного диабета). На примере ишемического инсульта показано, что концентрация цистеина в плазме возросла в 1,6 раза, а уровень гомоцистеина не менялся, как и соотношение восстановленного и окисленного цистеина (CysSH/CysSSCys). Содержание общего и свободного глутатиона в эритроцитах достоверно не менялось, зато значительно возрос коэффициент GSH/GSSG, характеризующий антиоксидантный потенциал клеток. Таким образом, включение в схемы терапии N-ацетилцистеина указанных заболеваний сопровождается более благоприятным клиническим исходом за счёт значительного увеличения антиоксидантного потенциала клеток и тканей.

**Ключевые слова:** N-ацетилцистеин, фармакокинетика, цистеин, глутатион, оксидативный стресс, ишемический инсульт, осложнения сахарного диабета

## N-acetylcysteine: pharmacokinetic parameters and the effect on the concentration of endogenous ainothiols

Dutov A.A.<sup>1</sup>, Nikitin D.A.<sup>2</sup>, Lukianova J.L.<sup>3</sup>, Shemyakina N.A.<sup>1</sup>, Ermolina A.V.<sup>4</sup>, Mishchenko M.N.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> – FSEI HE State Medical Academy, Chita

<sup>2</sup> – FSEI HPE Zabaikalsky State University, Chita

<sup>3</sup> – SII City Clinical Hospital № 1, Zabaikalsky kray, Chita

<sup>4</sup> – PHI Road Clinical Hospital. Chita-2, «Russian Railways», Zabaikalsky kray, Chita

**Abstract.** We studied the pharmacokinetic parameters of N-acetylcysteine at a single oral and intravenous administration of healthy volunteers. Elimination half-life ( $t_{1/2}$ ) within 2 hours and the maximum concentration in blood ( $C_{max}$ ) after 1 hour after administration was more than 10 times higher when intravenous on a comparison with oral administration. Effect of exchange rate on intravenous administration of N-acetylcysteine (1 200 mg/day for one week) the concentration of endogenous ainothiols in patients with diseases that are accompanied by oxidative stress (ischemic stroke and vascular complications of diabetes mellitus) are also studied. In ischemic stroke example it shows that the concentration of cysteine in plasma was increased by 1,6 times, and homocysteine levels did not change, as the ratio of reduced and oxidized cysteine (CysSH / CysSSCys). The content of total and free glutathione in red blood cells was not significantly changed, but significantly increased GSH / GSSG ratio, characterizing the antioxidant capacity of cells. We conclude that the inclusion in the scheme of N-acetylcysteine therapy of these diseases, accompanied by a more favorable clinical outcome due to a significant increase in antioxidant capacity of cells and tissues.

**Keywords:** N-acetylcysteine, pharmacokinetics, cysteine, glutathione, oxidative stress, ischemic stroke, diabetes complications

Автор, ответственный за переписку:

Дутов Алексей Александрович — старший научный сотрудник НИИ молекулярной медицины при Читинской Медицинской Академии, д.м.н. (фармакология, клиническая фармакология), врач высшей категории (клиническая лабораторная диагностика), 672000, Чита, ул. Горького, 39а, лаборатория ВЭЖХ; тел. +7 (914) 455-81-59; e-mail: dutovaa@yandex.ru

## Введение

N-ацетилцистеин известен в основном как муколитическое средство. Кроме того, его используют при интоксикации ацетаминофеном, он оказывает цитопротекторное действие при химиотерапии онкологических заболеваний и предупреждает развитие

нефропатии в результате использования рентгеноконтрастных средств [1]. Сульфгидрильная группа (SH) N-ацетилцистеина ответственна за его метаболическую активность, ацетильная группа делает молекулу более устойчивой к окислению и деструкции пищеварительными ферментами [2]. N-ацетилцистеин чаще рассматривают как пролекарство глутатиона [3],

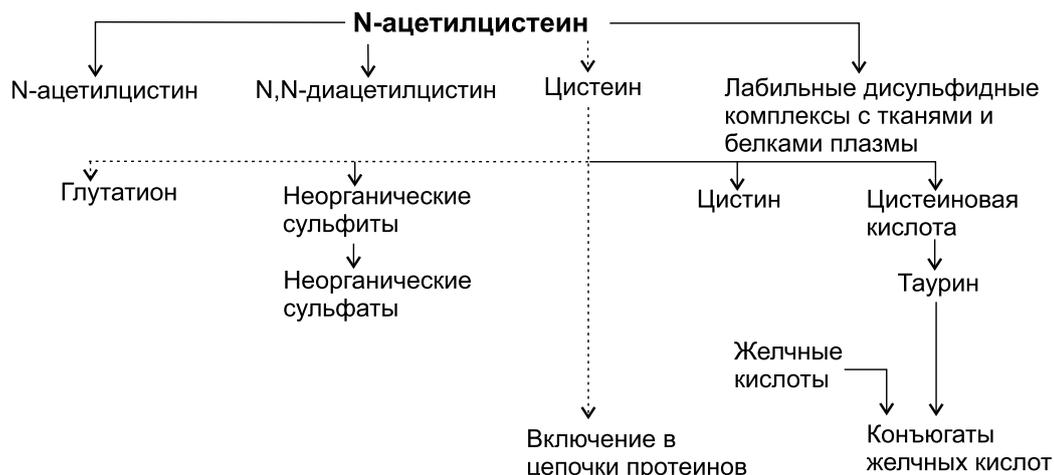


Рис. 1. Предполагаемые метаболические пути N-ацетилцистеина [4]

который в клетках и/или в плазме деацетируется, превращаясь в L-цистеин (рис. 1), который в свою очередь идёт на построение глутатиона [2, 4].

Глутатион ( $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinylglycine, GSH), эндогенный трипептид, защищает клетки от свободных радикалов и химически активных молекул пероксидов, тем самым образуя одну из мощных систем антиоксидантной защиты [3, 5, 6].

Проведено большое количество исследований по фармакокинетике ацетилцистеина, результаты отличаются значительной вариабельностью. Так, один из важнейших показателей — период полувыведения ( $t_{1/2}$ ) составляет: 1,95 ч [7], 2,27 ч [8],  $2,7 \pm 0,3$  ч [9],  $3,7 \pm 0,8$  ч [1],  $3,68 \pm 1,84$  ч [10]. В некоторых источниках приводят ещё большие цифры: 5,5 ч — у взрослых и 11 ч — у новорожденных ([www.slideshare.net/trennette/n-acetylcysteine](http://www.slideshare.net/trennette/n-acetylcysteine)).

С учётом этих обстоятельств, мы провели серию экспериментов для уточнения фармакокинетических параметров N-ацетилцистеина, а также оценили уровни эндогенных аминокислот (цистеин, гомоцистеин, восстановленный глутатион) после приёма N-ацетилцистеина.

### Методы исследования

Исследования авторы (3 из 7) проводили на себе, а также на здоровых добровольцах после подписания информированного согласия. Кровь отбирали в вакуумные пробирки с ЭДТА, плазму использовали для анализа аминокислот и N-ацетилцистеина, эритроциты отмывали физиологическим раствором и затем отбирали для анализа глутатиона. Содержание аминокислот определяли до приёма N-ацетилцистеина (Sandoz®), а затем через 1, 2 и 4 ч после приёма 600 и 1 200 мг препарата. В клинических испытаниях с информированного согласия пациентов и одобрения локального Этического комитета Академии использовали в/в введение N-ацетилцистеина (флуимуцил, Zambon®,

Италия) в дозе 1 200 мг один раз в сутки, в течение одной недели пациентам с ишемическим инсультом и осложнениями сахарного диабета. Определение аминокислот в плазме и глутатиона в эритроцитах проводили по ранее разработанным методам методом ВЭЖХ [11].

### Результаты и обсуждение

#### Фармакокинетические параметры

Расчёт фармакокинетических параметров N-ацетилцистеина осуществляли с помощью программы ClinPharmCalc собственной разработки (модель без всасывания) (табл. 1), созданной на основе математических формул из известного руководства [12].

Таким образом, среднее значение  $t_{1/2}$  составляет менее 2 ч. Максимальная концентрация ( $C_{max}$ ) N-ацетилцистеина через 1 ч после его приёма в дозах

Таблица 1

Фармакокинетические параметры N-ацетилцистеина после его перорального приёма

Испытуемые и доза	Kel, ч <sup>-1</sup>	$t_{1/2}$ , ч	AUC, мкг×ч/мл	Vd, л	MRT, ч	Cl, мл/мин
Н, 600 мг (R=0,971)	0,408	1,70	9,43	26,0	2,45	10,6
Л, 600 мг (R=0,978)	0,589	1,18	8,48	20,0	1,70	11,8
Е, 600 мг (R=0,971)	0,292	2,37	4,04	84,8	3,43	24,8
М, 600 мг (R=0,971)	0,442	1,57	3,93	57,2	2,26	25,4
Б, 600 мг (R=0,971)	0,418	1,66	3,63	65,9	2,39	27,6
С, 1200 мг (R=0,971)	0,447	1,55	8,74	25,6	2,24	11,5
Д, 1200 мг (R=0,971)	0,345	2,01	5,56	52,1	2,90	18,0
Среднее	0,420	1,72	6,26	47,4	2,48	18,5

600 и 1 200 мг *per os* составила 1,8 мкг/мл и 2,7 мкг/мл, соответственно. Поскольку при приёме *per os* биодоступность N-ацетилцистеина низкая и не превышает 10% за счёт пресистемного метаболизма [7, 8, 13],

Таблица 2

Фармакокинетические параметры N-ацетилцистеина после его в/в введения

Испытуемые и доза	Kel, ч <sup>-1</sup>	t <sub>1/2</sub> , ч	AUC, мкг×ч/мл	Vd, л	MRT, ч	Cl, мл/мин
Г, 600 мг (R=0,978)	0,259	2,67	154,7	2,49	3,86	0,65
Я, 1 200 мг (R=1,000)	0,478	1,45	85,5	2,45	2,09	1,17

исследовали фармакокинетические параметры после в/в введения N-ацетилцистеина (табл. 2).

Среднее значение t<sub>1/2</sub> также было в пределах 2 ч, что в основном соответствует данным литературы и не зависит от способа введения. Максимальная концентрация (C<sub>max</sub>) N-ацетилцистеина через 1 ч после его в/в введения в дозах 600 и 1 200 мг составила 30 и 25 мкг/мл, соответственно. Концентрация N-ацетилцистеина в крови при в/в введении более чем в 10 раз выше по сравнению с приёмом *per os*.

**Влияние на концентрацию аминокислот в плазме и глутатиона в эритроцитах**

*Пероральное введение.* Измерение уровня аминокислот в плазме после однократного приёма 600 и 1 200 мг N-ацетилцистеина *per os* здоровыми добровольцами, не выявило достоверных изменений концентраций цистеина, глутатиона и гомоцистеина в плазме спустя 1, 2 и 4 ч. Данные литературы по этому поводу неоднозначны. Так, при однократном приёме 600 мг N-ацетилцистеина *per os*, через 1 ч концентрация цистеина в плазме возрастала почти в 2 раза [14]. По другим источникам, уровни общего цистеина и общего глутатиона плазмы не возрастают после приёма 30 мг/кг N-ацетилцистеина *per os* здоровыми добровольцами [15], хотя приём N-ацетилцистеина *per os* в меньших дозах (10 мг/кг) может сопровождаться возрастанием концентрации как самого N-ацетилцистеина, что вполне естественно, так и цистеина

[4, 14]. У здоровых добровольцев концентрация цистеина в плазме возрастала на 1-й и 5-й дни после перорального приёма 600 мг препарата трижды в день, тогда как у пациентов с хроническими обструктивными заболеваниями лёгких, это повышение наблюдалось только на 5-й день [16].

Поскольку N-ацетилцистеин является предшественником внутриклеточного глутатиона (см. рис. 1), представлялось интересным оценить уровень последнего в эритроцитах после однократного приёма

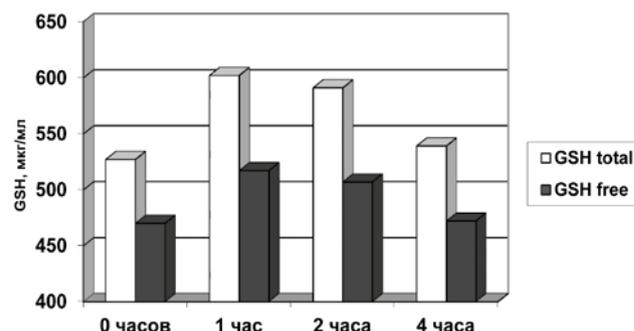


Рис. 2. Изменение концентрации общего (GSH total) и свободного (GSH free) глутатиона в эритроцитах в разное время после приёма N-ацетилцистеина. Достоверное повышение выявлено через 1 и 2 ч (расчёты с использованием критерия Уилкоксона для зависимых групп)

600 (n = 5) и 1 200 мг (n = 2) N-ацетилцистеина *per os* теми же добровольцами (рис. 2).

Таким образом, однократный приём N-ацетилцистеина в дозах 600 и 1 200 мг не оказывает влияния на концентрацию аминокислот в плазме и вызывает кратковременное повышение концентрации глутатиона в эритроцитах, которая через 4 ч возвращается к исходному уровню.

*Внутривенное введение.* На следующем этапе исследовали влияние курсового в/в введения N-ацетилцистеина в дозе 1 200 мг/сут в течение 1 недели на концентрацию аминокислот у пациентов с ишемическим инсультом и сосудистыми осложнениями сахарного диабета.

В плазме преобладающим аминокислотом является цистеин (Cys). Существует свободный (free) и общий (total) цистеин (свободный + восстановленный

Таблица 3

Концентрации общего и свободного цистеина в плазме (мкг/мл) у больных с ишемическим инсультом при разных вариантах фармакотерапии

Заболевание	Лечение	Cys total	Cys free	CysSH/CysSSCys
Острый период ишемического инсульта (n = 34)	До начала лечения	23,7±3,8	15,7±4,1	1,6±0,4
Ишемический инсульт, 7–10 дни (n = 34)	После курсового введения NAC	38,6±5,7	25,3±5,2	1,9±0,3
Ишемический инсульт, 7–10 дни (n = 26)	Стандартное лечение, без NAC	27±4,9	21,8±4,7	4,2±1,3

Концентрации общего и свободного глутатиона в эритроцитах (мкг/мл) у больных с ишемическим инсультом при разных вариантах фармакотерапии

Заболевание	Лечение	GSH total	GSH free	GSH/GSSG
Острый период ишемического инсульта, 1-й день ( $n = 34$ )	До начала лечения	$547 \pm 13,7$	$458 \pm 12,9$	5,2
Ишемический инсульт, 7-й день, ( $n = 34$ )	Стандартное лечение, без NAC	$547 \pm 11,8$	$453 \pm 15,1$	4,8
Ишемический инсульт, 7-й день, ( $n = 34$ )	После курсового введения NAC	$556 \pm 9,9$	$538 \pm 8,7$	30,5

из дисульфидов). Коэффициент CysSH/CysSSCys, т. е. соотношение восстановленного и окисленного цистеина, может служить индикатором антиоксидантной способности плазмы [17]. Такое курсовое в/в введение N-ацетилцистеина пациентам с ишемическим инсультом и сосудистыми осложнениями сахарного диабета, получающих обычное лечение, выявило достоверное повышение уровня цистеина — преобладающего аминотиола плазмы. Это хорошо видно на примере ишемического инсульта, когда концентрация цистеина возрастала в 1,6 раза (табл. 3).

В то же время коэффициент CysSH/CysSSCys практически не изменялся. При стандартном лечении уровень цистеина плазмы не менялся, а коэффициент CysSH/CysSSCys достоверно возрастал. Другой аминотиол плазмы — гомоцистеин — на фоне терапии N-ацетилцистеином достоверно не менялся. Аналогичные результаты получены у пациентов с сосудистыми осложнениями диабета. Ограниченные литературные источники свидетельствуют, что при курсовом применении N-ацетилцистеина — 600 мг/сут в течение 15 дней — обнаруживается снижение уровня гомоцистеина, но не цистеина и глутатиона, как у здоровых испытуемых, так и у пациентов с почечной недостаточностью [1]. Однозначно интерпретировать полученные данные пока не представляется возможным. Вероятно, это связано с тем, что в присутствии N-ацетилцистеина, образующийся из него цистеин, более активно проникает в клетку, участвуя в процессе биосинтеза глутатиона. В пользу этого предположения могут свидетельствовать данные по содержанию глутатиона в эритроцитах (табл. 4).

Содержание общего и свободного глутатиона в эритроцитах достоверно не менялось, зато значительно возрастал коэффициент GSH/GSSG, т. е. соотношение восстановленного и окисленного глута-

тиона за счёт увеличения восстановленного глутатиона (GSH). Именно GSH обеспечивает антиоксидантную защиту клеток и тканей [2, 5, 6, 17]. Ишемический инсульт и сосудистые осложнения сахарного диабета сопровождаются развитием оксидативного стресса разной интенсивности, хотя в обзорных работах [5, 6] приводятся сведения, в основном касающиеся ВИЧ, онкологических заболеваний, паркинсонизма, заболеваний печени, муковисцедоза и возрастной патологии. Тем не менее, есть сведения, что глутатион вовлекается в патогенез сахарного диабета [18, 19] и экспериментальные приводятся данные о нейропротекторных свойствах глутатиона и его менее полярных производных при церебральной ишемии [20, 21]. По нашим данным, коэффициент GSH/GSSG под влиянием терапии N-ацетилцистеином возрастал с 4,8 до 30,5 при ишемическом инсульте, с 10,2 до 34,2 — при диабетической ретинопатии и с 6,0 до 20,0 — при диабетической ангиопатии сосудов нижних конечностей. Это сопровождалось клиническим улучшением: при ишемическом инсульте более быстро и качественно регрессировали моторный дефицит и речевые нарушения, при диабетической ретинопатии повысилась острота зрения, а по результатам оптической когерентной томографии макулярный отёк уменьшился у 4 из 6 пациентов, у больных с диабетической ангиопатией сосудов нижних конечностей, 2-я фаза раневого процесса характеризовалась более ранним появлением грануляций.

Таким образом, включение в схемы терапии N-ацетилцистеина при ишемическом инсульте и сосудистых осложнениях сахарного диабета, сопровождалось более благоприятным клиническим исходом за счёт значительного увеличения антиоксидантного потенциала клеток и тканей.

## Литература

1. Nolin T.D., Ouseph R., Himmelfarb J., McMenamin M.E. and Ward R.A. Multiple-Dose Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of N-Acetylcysteine in Patients with End-Stage Renal Disease. Clin J Am. Soc Nephrol. 2010; 5: 1588–1594.
2. Kelly G.S. Clinical Applications of N-acetylcysteine. Alt Med Rev. 1998; 3 (2): 114–127.

3. Cacciatore I., Cornacchia C., Pinnen F., Mollica A and Di Stefano A. Prodrug Approach for Increasing Cellular Glutathione Levels (review). Molecules. 2010; 15: 1242–1264.
4. De Caro L., Ghizzi A., Costa R., Longo A., Ventresca Lodola E. Pharmacokinetics and bioavailability of oral acetylcysteine in healthy volunteers. Arzneimittel Forsch Drug Res. 1989; 39: 382–386.
5. Wu G., Fang Y-Z., Yang S., Lupton J.R. and Turner N.D. Glutathione Metabolism and Its Implications for Health (review). J. Nutr. 2004; 134: 489–492.

6. Townsend D.M., Tew K.D., Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2003; 57: 145–155.
7. Olsson B., Johansson M., Gabrielsson J., Bolme P. Pharmacokinetics and bioavailability of reduced and oxidized N-acetylcysteine. *Eur J Clin Pharmacol*. 1988; 34 (1): 77–82.
8. Borgstrom L., Kagedal B., Paulsen O. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1986; 31 (2): 217–222.
9. Jones A.L., Jarvie D.R., Simpson D., Hayes P.C. and Prescott L.F. Pharmacokinetics of N-acetylcysteine are altered in patients with chronic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1997; 11: 787–791.
10. Hong S-Y, Gil H-W, Yang J-O, Lee E-Y, Kim H-K, Kim S-H et al. Effect of High-Dose Intravenous N-acetylcysteine on the Concentration of Plasma Sulfur-Containing Amino Acids. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2005; 20: 217–223.
11. Дутов А.А. Биомедицинская хроматография. М.: Гэотар-медиа, 2016; 312.
12. Сергуенко В.И., Джеллифф Р., Бондарева И.Б. Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение. М.: Издательство РАМН, 2003; 208.
13. Holdiness M.R. Clinical pharmacokinetics of N-acetylcysteine. *Clin Pharmacokinet*. 1991; 20 (2): 123–134.
14. Tsikas D., Sandmann J., Ikit M., Fauler J., Stichtenoth D.O., Frölich J.C. Analysis of cysteine and N-acetylcysteine in human plasma by high-performance liquid chromatography at the basal state and after oral administration of N-acetylcysteine. *Journal of Chromatography B*. 1988; 708: 55–60.
15. Burgunder J.M., Varriale A., and Lauterburg B.H. Effect of N-acetylcysteine on plasma cysteine and glutathione following paracetamol administration. *Eur J Clin Pharmacol*. 1989; 36: 127–131.
16. Bridgeman M.E., Marsden M., Selby C., Morrison D., MacNee W. Effect of N-acetyl cysteine on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid, and lung tissue. *Thorax*. 1994; 49: 670–675.
17. Jones D.P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol*. 2002; 348: 93–112.
18. Lomaestro, B.M., Malone M. Glutathione in health and disease: pharmacotherapeutic issues. *Annals Pharmacother*. 1995; 29: 1263–1273.
19. Samiec P.S., Drews-Botsch C., Flagg E.W., Kurtz J.C., Sternberg P., Reed R.L., Jones D.P. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med*. 1998; 24: 699–704.
20. Anderson M.E., Nilsson M., Eriksson P.S., Sims N.R. Glutathione monoethyl ester provides neuroprotection in a rat model of stroke. *Neurosci Lett*. 2004; 354: 163–165.
21. Anderson M.E., Nilsson M., Sims N.R. Glutathione monoethyl ester prevent mitochondrial glutathione depletion during focal cerebral ischemia. *Neurochem Int*. 2004; 44: 153–159.

# Влияние интраназального и внутрибрюшинного введений пептидов семакса и ноопепта на поведенческие характеристики мышей BALB/c

*Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И.*

*Лаборатория радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва*

**Резюме.** При помощи теста «закрытый крестообразный лабиринт» проведено сравнение влияния внутрибрюшинного и интраназального путей введения пептидов ноопепта (1 мкг/кг/день в течение 5 дней) или семакса (0,6 мкг/кг/день в течение 5 дней), проявляющих ноотропные и анксиолитические свойства, на поведение мышей линии BALB/c, характеризующихся сниженной исследовательской активностью и повышенной тревожностью. И семакс, и ноопепт при обоих путях введения проявляют ноотропную и анксиолитическую активность, но в случае внутрибрюшинного введения оба пептида ярче демонстрируют противотревожное свойство, а при интраназальном – предпочтительнее улучшают исследовательскую активность. Различие эффектов этих пептидов на параметры поведения мышей под влиянием различных введений можно объяснить различиями фармакокинетики, биотрансформации и динамики формирования анксиолитической и ноотропной активности препаратов.

**Ключевые слова:** ноопепт, семакс, мыши, BALB/c, ноотропное действие, тревожность, закрытый крестообразный лабиринт

## Effect of intranasal and intraperitoneal administration of peptides semax and noopept on the behavior of BALB/c mice

Vasilieva E.V., Salimov R.M., Kovalev G.I.

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

**Abstract.** Effects of intraperitoneal and intranasal administration of peptides noopept (1 mcg/kg/day for 5 days) and semax (0,6 mcg/kg/day for 5 days), known to produce nootropic and anxiolytic actions were tested in BALB/c mice (the line is characterized by lowered exploratory efficacy and elevated anxiety) by the use closed exploratory cross maze. Both semax and noopept using both routes of administration produced nootropic and anti-anxiety activity. In case of intraperitoneal administration of both peptides the anti-anxiety effect was more prominent, while after intranasal treatment the elevation of exploratory behavior was better seen. The discrepancy between the mice behavior after different routes of the peptides can be attributed to differences in pharmacokinetics, biotransformation and dynamic anxiolytic and nootropic activity of the drugs.

**Keywords:** noopept, semax, mice, BALB/c, nootropic activity, anxiety, exploratory cross maze

Автор, ответственный за переписку:

*Васильева Екатерина Валерьевна* – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории радиоизотопных методов исследований ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495) 601-20-51

## Введение

Семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) и ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) относятся к ноотропным средствам пептидной природы, проявляющим также нейропротективные и анксиолитические свойства. Несмотря на общность фармакологических эффектов, эти препараты имеют различия в фармакокинетике и фармакодинамике, проявляют специфические для каждого свойства. Следует также отметить, что семакс в клинике назначается в виде назальных капель, а ноопепт — в виде таблеток.

Ранее в нашей лаборатории было установлено, что инбредные мыши линии BALB/c характеризуются в сравнении с особями инбредной линии C57BL/6 меньшей эффективностью исследовательского поведения, большей тревожностью и двигательной активностью в условиях незнакомой обстановки крестообразного лабиринта, поэтому именно они были выбраны в данной работе как модель когнитивного дефицита и/или состояния повышенной тревожности

и двигательной активности [1]. Кроме того, нами было выявлено, что семакс и ноопепт при внутрибрюшинном введении вызывают у мышей BALB/c не только повышение эффективности исследовательского поведения (ноотропный компонент), но и снижают тревожность (анксиолитический компонент) [2, 3].

В связи с вышесказанным целью настоящего исследования стало сравнение ноотропных и анксиолитических эффектов пептидов семакса и ноопепта при внутрибрюшинном и интраназальном путях введения на мышах BALB/c.

## Материалы и методы

Исследования проводили на самцах мышей линий BALB/c массой 25–30 г, которых содержали в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в стандартных условиях со свободным доступом к воде и корму *ad libitum*, по 15 особей в клетке в течение 1-й недели до начала эксперимента, на стандартной диете при 12-часовом световом режиме. Животным

посредством внутривенных и интраназальных инъекций в течение 5 дней (субхроническое введение) один раз в сутки вводили физиологический раствор (контрольная группа — NaCl, 0,9%), либо препараты, растворённые в физ. растворе (опытные группы).

В эксперименте использовали следующие дозы препаратов: семакс — 0,6 мг/кг/день (Отдел химии физиологически активных веществ Института молекулярной генетики РАН), ноопепт — 1 мг/кг/день (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»). Препараты применяли в дозах, эквивалентных по антиамнестическому эффекту в тесте условной реакции пассивного избегания (УРПИ) и в экспериментах по микродиализу [4].

Для оценки характера влияния исследуемых ноотропных веществ на спонтанную ориентацию, тревожность, двигательную активность — реакцию на новизну обстановки, как часть высших интегративных процессов, использовали тест закрытого крестообразного лабиринта (ЗКЛ). Данный метод является неинвазивным и основан на врождённой способности каждого животного к различной степени эффективности исследовательского поведения в новой обстановке. Закрытый крестообразный лабиринт состоял из 4 пластмассовых закрытых пустых отсеков, соединённых с центральным отсеком с помощью входных отверстий. Мышь помещали в центральный отсек лабиринта и в полуавтоматическом режиме с помощью программы Behaviour регистрировали последовательность и продолжительность её переходов из одного рукава в другой. Последующий анализ данных позволял выделить ряд показателей эффективности исследовательского поведения, тревожности и двигательной активности [5].

Показатели величины 1-го цикла патрулирования ( $F_{PtrN}$ ) и числа циклов патрулирования ( $PatrN$ ) используются для оценки ноотропного действия веществ [6, 7]: чем больше число заходов требуется мыши, чтобы посетить все 4 боковых рукава (совершить один цикл патрулирования), тем менее «систематично» и менее эффективно исследование лабиринта. Число циклов патрулирования, совершённых за время эксперимента, ещё один показатель эффективности исследовательского поведения. Чем больше циклов патрулирования, тем более «систематично» и более эффективно исследование лабиринта животным.

Латентный период ( $F_{ChTm}$ ) и продолжительность 1-го визита в боковой отсек ( $F_{GITm}$ ) — показатели, которые отражают уровень тревожности животного в новой обстановке и могут рассматриваться как показатель баланса между любопытством и тревогой животного в новой обстановке [8–10], и быть использованы для оценки транквилизирующего (анксиолитического) эффекта веществ [11]. Эти показатели отрицательно коррелируют с продолжительностью пребывания животного в открытых рукавах в общепризнанном тесте открытого приподнятого лабиринта, что позволяет

использовать избирательное изменение этих показателей в качестве индикатора тревожности [12, 13].

Общее время, проведённое животным в центральном и боковых отсеках лабиринта ( $T_{ChTm}$  и  $T_{GITm}$ ) — это показатели, которые отражают уровень двигательной активности, а также характеризуют интенсивность обследования новой среды и могут быть использованы для оценки стимулирующего (тимолептического) или наоборот седативного эффекта веществ [9, 14].

Статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью программы Statistica 6.0. с привлечением методов параметрической и непараметрической статистики (*t*-тест Стьюдента, тест Манна–Уитни, критерий Колмогорова–Смирнова, тест Вальда–Вольфовица). На графиках представлены средние значения с учётом стандартной ошибки среднего ( $mean \pm S.E.M$ ).

## Результаты и обсуждение

Регуляторные пептиды относятся к универсальным эндогенным биорегуляторам функций клеток в организме человека, важную роль среди них играют нейропептиды — регуляторы функций нервной системы. Каждый регуляторный пептид имеет спектр биологической активности, который определяется его взаимодействием с клеткой-мишенью, а также свойством индуцировать высвобождение ряда других пептидов, являющихся индукторами высвобождения следующей группы пептидов и т. д., вследствие чего первичные эффекты того или иного пептида пролонгируются и развиваются в организме [15].

Семакс — лекарственный препарат, являющийся регуляторным пептидом, обладающий ноотропным, нейропротекторным, антиоксидантным и антигипоксическим действиями [16]. Представляет собой модифицированный фрагмент белкового адренокортикотропного гормона (АКТГ), содержащий семь аминокислотных остатков, поэтому и действует на организм, как его собственный нейропептид [17]. Помимо всех перечисленных свойств обладает также анксиолитическим эффектом [2, 18].

Ноопепт — лекарственный препарат, обладающий ноотропным и нейропротективным действием, проявляющий выраженную мнестическую и антиамнестическую активность в значительно меньших дозах по сравнению с другими ноотропами (в 1000 раз меньших, чем для пирацетама), являющийся малотоксичным соединением и не имеющий побочных эффектов [19]. В отличие от применяющихся пептидов в структуру ноопепта входят всего 2 аминокислоты. Ноопепт улучшает способность к обучению, память, действуя на все фазы процессинга: начальную обработку информации, консолидацию, извлечение. Ноотропный эффект препарата связан с образованием циклопролилглицина, аналогичного по структуре

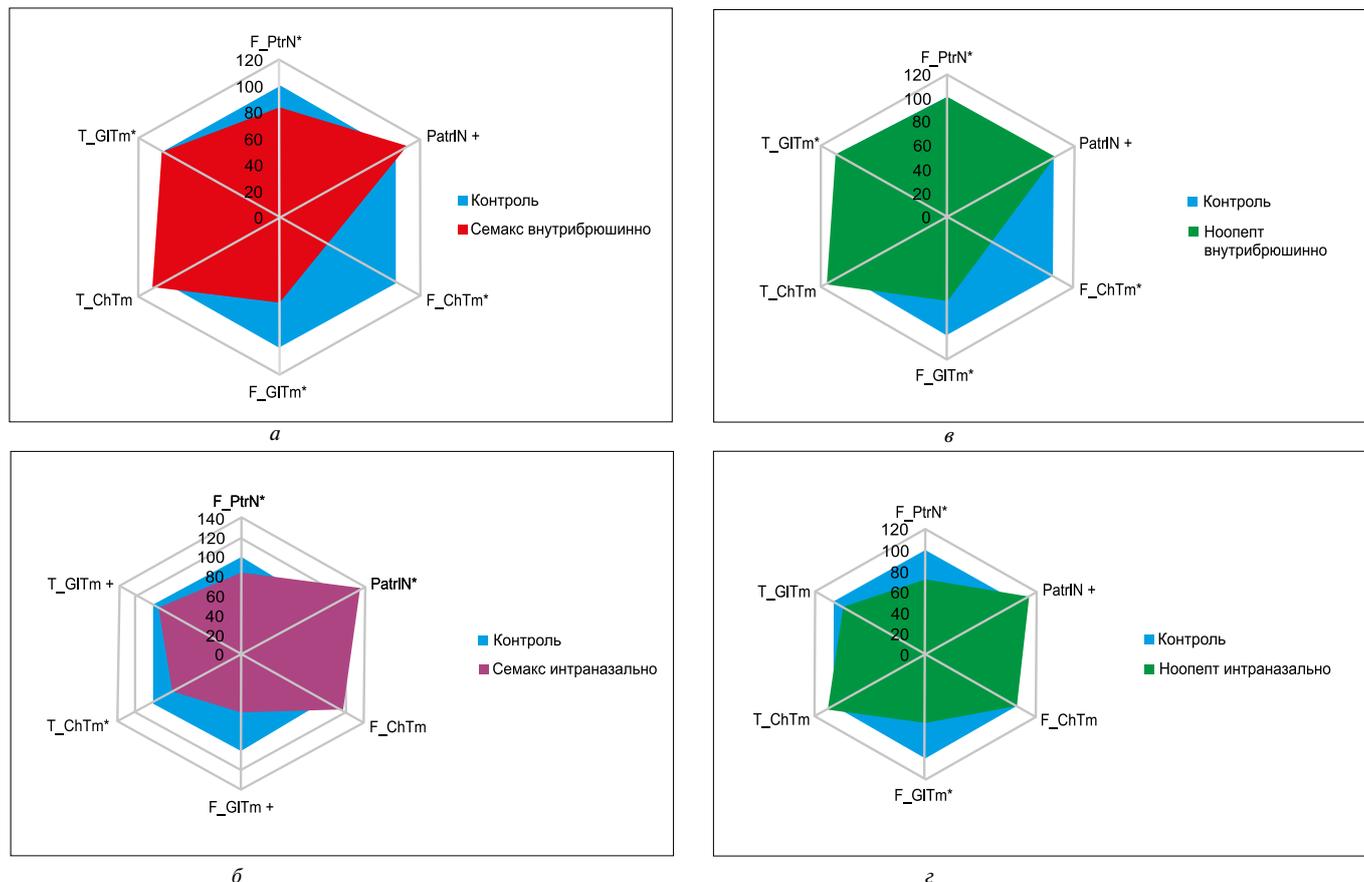
эндогенному циклическому дипептиду, обладающему антиамнестической активностью, а также с наличием холинопозитивного действия [19, 20, 21].

**СЕМАКС.** В настоящем исследовании при внутрибрюшинном введении семакса параметр F\_PtrN уменьшился на 16% по сравнению с контрольными значениями ( $F\_PtrN_{\text{семакс}} = 4,79 \pm 0,19$ ), PatrN увеличился на 10% ( $PatrN_{\text{семакс}} = 2,07 \pm 0,07$ ), F\_ChTm уменьшился на 57% ( $F\_ChTm_{\text{семакс}} = 5,27 \pm 0,64$ ), F\_GITm снизился на 35% ( $F\_GITm_{\text{семакс}} = 5,90 \pm 0,51$ ). При интраназальном введении семакса изменения по сравнению с контролем были следующими: F\_PtrN уменьшился на 15% ( $F\_PtrN_{\text{семакс}} = 7,81 \pm 0,43$ ), PatrN увеличился на 36% ( $PatrN_{\text{семакс}} = 1,50 \pm 0,09$ ), F\_GITm уменьшился на 40% ( $F\_GITm_{\text{семакс}} = 14,10 \pm 2,93$ ), T\_ChTm уменьшился на 22% ( $T\_ChTm_{\text{семакс}} = 54,87 \pm 2,15$ ), T\_GITm уменьшился на 5% ( $T\_GITm_{\text{семакс}} = 88,82 \pm 2,86$ ). Следовательно, при внутрибрюшинном введении семакса улучшается исследовательская активность мышей и понижается тревожность, но в свою очередь при интраназальном введении в большей степени возрастает эффективность исследовательского поведения по сравнению с внутрибрюшинным ( $p < 0,05$ , *t*-тест Стьюдента), в меньшей степени проявляется анксиолитический эффект препарата ( $p < 0,05$ , *t*-тест Стьюдента), а также увеличивается двигательная активность.

**НООПЕПТ.** В случае внутрибрюшинного введения ноопепта PatrN увеличился на 2% по сравнению с контрольными значениями ( $PatrN_{\text{ноопепт}} = 1,92 \pm 0,08$ ), F\_ChTm уменьшился на 47% ( $F\_ChTm_{\text{ноопепт}} = 5,73 \pm 1,33$ ), F\_GITm снизился на 28% ( $F\_GITm_{\text{ноопепт}} = 6,50 \pm 1,15$ ). При назальном введении ноопепта величина F\_PtrN уменьшилась на 29% ( $F\_PtrN_{\text{ноопепт}} = 5,00 \pm 0,21$ ), а F\_GITm – а 34% ( $F\_GITm_{\text{ноопепт}} = 11,03 \pm 1,27$ ). Таким образом, у ноопепта при внутрибрюшинном введении улучшается исследовательская активность мышей и понижается тревожность, тогда как при интраназальном введении сильнее возрастает эффективность исследовательского поведения ( $p < 0,05$ , *t*-тест Стьюдента) и слабее выражаются анксиолитические свойства ( $p < 0,05$ , *t*-тест Стьюдента) по сравнению с внутрибрюшинным.

Результаты поведенческого тестирования в ЗКЛ мышей BALB/c после внутрибрюшинного и интраназального введений семакса в дозе 0,6 мг/кг/день и ноопепта в дозе 1 мг/кг/день представлены на рис. 1. На верхних панелях (а, в) расположены результаты внутрибрюшинного введения, на нижних (б, г) — интраназального.

Таким образом, на основании сопоставления полученных результатов можно выделить общие свойства пептидов семакса и ноопепта при разных путях введения.



**Рис. 1.** Влияние внутрибрюшинного (а, в) и интраназального (б, г) введения семакса (а, б) и ноопепта (в, г) на поведенческие характеристики, связанные с исследовательской активностью мышей BALB/c в тесте «закрытый крестообразный лабиринт». **Примечание:** \*, + — статистически значимые отличия от контроля по *t*-тесту Стьюдента и непараметрическим критериям, соответственно

ния: при внутрибрюшинном введении оба препарата сильнее проявляют свои анксиолитические свойства, а при интраназальном — ноотропные.

Внутрибрюшинный путь введения лекарственных средств по скорости воздействия приближается к внутривенному, но в клинических условиях он используется редко. Висцеральный листок брюшины, богатый кровеносными сосудами, выделяет в полость серозную жидкость, а париетальный листок, за счёт лимфатических сосудов, её всасывает. Предполагается, что лекарственное вещество, введённое внутрибрюшинно, попадает в лимфатическую систему, протоки которой впадают в грудные вены большого круга кровообращения, последние в свою очередь переходят в систему верхней полой вены, заканчивающую свой путь в правом предсердии [22, 23].

При интраназальном введении веществ значительная их часть всасывается в кровь, меньшая — при помощи периневрального транспорта по чувствительным нервам попадает непосредственно в мозг через нейроны обонятельного тракта и далее распространяется по структурам головного мозга при помощи механизмов, не связанных с кровотоком, при этом отсутствует пресистемный метаболизм в желудочно-кишечном тракте и печени, быстрее достигается терапевтический эффект, то есть присутствует возможность прямого поступления лекарств непосредственно в мозг. Механизмы, участвующие в доставке веществ из носовой полости в мозг, изучены недостаточно, но известно несколько путей: внутриклеточный аксональный транспорт по обонятельному нерву, по поддерживающим эпителиальным клеткам, экстранейрональный транспорт вдоль обонятельного нерва [33]. Используемым пептидам, вероятно,

более присущ экстранейрональный транспорт вдоль обонятельного нерва, посредством которого короткие пептидные молекулы могут попадать напрямую в нервную ткань по межклеточному пространству через щелевые контакты между поддерживающими клетками и обонятельными нейронами [24, 25].

Полученную разницу в соотношении ноотропного и анксиолитического компонентов при внутрибрюшинном и интраназальном введении ноопепта и семакса можно интерпретировать с нескольких точек зрения.

При разных путях введения у препаратов может наблюдаться различная биотрансформация, следовательно, образующиеся метаболиты могут проявлять неодинаковые фармакологические эффекты.

Семакс (Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro) распадается в сыворотке крови крыс под воздействием аминоклотаза и ангиотензин-преобразующего фермента [26]. Первым отщепляется метионин в положении 1, оставляя гексапептид (Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro), затем глутамин в положении 2 (His-Phe-Pro-Gly-Pro). Эти фрагменты являются стабильными нейропептидами, самостоятельно модулирующими холинергическую нейротрансдукцию и генерацию оксида азота [16, 27]. Кроме того, под влиянием аминоклотаза семакс может метаболизироваться в тетрапептид Met-Glu-His-Phe и трипептид Pro-Gly-Pro, оказывающие влияние на функциональную активность нервной клетки [28, 29]. Дальнейший распад всех пептидов продолжается до отдельных аминокислот, которые как абсолютно естественные для организма включаются в обменные процессы [26].

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина), абсорбируясь в желудочно-кишечном тракте, в неизменённом виде поступает в системный

Таблица 1

Сводная таблица поведенческих эффектов семакса и ноопепта в тесте «закрытый крестообразный лабиринт» при внутрибрюшинном и интраназальном введениях мышам BALB/c

Препарат, путь введения	Поведение					
	Исследовательская активность		Тревожность		Двигательная активность	
	F_PtrN	PatrIN	F_ChTm	F_GITm	T_ChTm	T_GITm
Семакс внутрибрюшинно	+		-		0	
	↓ 16%	↑ 10%	↓ 57%	↓ 35%	0	0
Семакс интраназально	+		-		+	
	↓ 15%	↑ 36%	0	↓ 40%	↓ 22%	↓ 5%
Ноопепт внутрибрюшинно	+		-		0	
	0	↑ 2%	↓ 53%	↓ 28%	0	0
Ноопепт интраназально	+		-		0	
	↓ 29%	0	0	↓ 34%	0	0

**Примечание:** +, - и 0 — соответственно усиление, ослабление и отсутствие эффекта в сравнении с контролем; ↑, ↓ — повышение или понижение значения параметра.

кровоток, проникает через гематоэнцефалический барьер, определяется в мозге в больших концентрациях, чем в крови. Пептид частично сохраняется в неизменённом виде, частично метаболизируется с образованием фенилуксусной кислоты, фенилацетилпролина и циклопролилглицина (цПГ). Последний, являясь основным метаболитом ноопепта, обладает структурным сходством с эндогенным нейропептидом [30]. Неизменённый ноопепт обнаруживается в малых количествах в сыворотке, поскольку он быстро метаболизируется в течение 25 мин после перорального приёма. Кроме того, цПГ сам по себе имеет ноотропный потенциал при введении в форме инъекций, хотя в меньшей степени, чем ноопепт [31]. В настоящее время считается, что ноопепт действует в качестве пролекарства для цПГ, и именно в этой форме цПГ проявляет большую активность. Однако существуют данные, что при приёме ноопепта в виде инъекций и перорально (в дозе 0,5 мг/кг и 10 мг/кг соответственно) наблюдаются антиамнестические эффекты, которые усиливаются при субхроническом введении в течение 9 дней, тогда как при инъекциях цПГ усиления эффекта не наблюдается [32]. Эффекты ноопепта и цПГ не идентичны, и это может быть связано с тем, что-либо ноопепт в отличие от цПГ, обладает накопительным действием, либо действие последнего усиливается под влиянием других метаболитов.

Другой причиной различия эффектов после внутрибрюшинного и интраназального введения пептидов может быть первичное поступление в разные области мозга. Внутрибрюшинное введение сравнимо с внутривенным, при котором небольшие пептиды проникают в мозг через гематоэнцефалический барьер и с общим кровотоком достигают разных отделов мозга [33, 34]. Выявлено, что вещества, попадающие в мозг по обонятельному нерву, преимущественно распределяются в ростральные отделы мозга, включая обонятельные луковицы, фронтальную кору, гиппокамп, миндалину [33, 35, 36].

### Литература

1. Васильева Е.В., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. Влияние ноотропных средств на поведение мышей BALB/c и C57BL/6 в крестообразном лабиринте. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2012; 75:7: 32–37.
2. Васильева, Е.В. Нейрохимическое изучение участия метаболитных и АМРА-рецепторов глутамата в механизме формирования эффектов ноотропных средств [Диссертация]. Москва: НИИ фармакологии имени В.В. Закусова; 2013.
3. Ковалёв Г.И., Кондрахин, Е.А., Салимов, Р.М., Незнамов, Г.Г. Динамика поведенческих и нейрорецепторных эффектов при остром и многократном введении ноопепта мышам C57BL/6 и BALB/c. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2014; 77: 12: 49–55.
4. Ковалёв Г.И. Изучение роли межмедиаторных взаимодействий в механизме формирования эффектов ноотропных средств [Диссертация]. Москва: НИИ фармакологии имени В.В. Закусова; 1993.

В наших экспериментах более выраженное ноотропное действие семакса и ноопепта при интраназальном введении свидетельствует о том, что пептиды посредством экстранейронального пути через обонятельный эпителий попадают в большей степени в области мозга, связанные с процессами памяти и обучения, а при внутрибрюшинном введении преимущественно в структуры мозга, ответственные за эмоциональный статус (передний мозг и лимбические области), вследствие чего преобладает анксиолитический эффект.

Схожее влияние на поведение мышей BALB/c ранее наблюдалось при сопоставлении внутрибрюшинного и интраназального введения селанка, также относящегося к классу регуляторных пептидов [37]. Эту разницу в соотношении ноотропного и анксиолитического компонентов пептидных препаратов в зависимости от пути введения можно использовать для достижения необходимого терапевтического эффекта.

### Выводы

1. Пептиды семакс (0,6 мг/кг) и ноопепт (1 мг/кг) при внутрибрюшинном и интраназальном введениях усиливают исследовательскую активность и понижают тревожность мышей BALB/c в условиях теста «закрытый крестообразный лабиринт».
2. Ноотропный эффект семакса и ноопепта сильнее проявляется при их интраназальном введении по сравнению с внутрибрюшинным (семакс: 36% — при и/н против 16% — при в/б, ноопепт: 29% — при и/н против 2% — при в/б).
3. Анксиолитическая активность семакса и ноопепта в большей степени наблюдается при внутрибрюшинном введении в сравнении с интраназальным (семакс: 57% — при в/б против 40% — при и/н, ноопепт: 53% — при в/б против 34% — при и/н).
4. Полученные результаты позволяют предположить, что интраназальное введение ноопепта может изменить фармакологический профиль ноопепта в сторону увеличения ноотропного компонента.

5. Salimov R.M. Behavioral patterns related to alcohol use in rodents: a factor analysis. Alcohol. 1999; 17: 157–162.
6. Салимов Р.М. Оценка упорядоченности пути в процессе исследовательского поведения у мышей. Журнал ВНД. 1988; 38: 3: 569–571.
7. Salimov R.M., Markina N.V., Perepelkina O.V., Poletava I.I. Exploratory behavior of F2 crosses of mouse lines selected for different brain weight: a multivariate analysis. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2004; 28: 3: 583–589.
8. Belzung C., Le Pape G. Comparison of different behavioral test situation in psychopharmacology for measurement of anxiety. Physiol. Behav. 1994; 56: 623–628.
9. Salimov R.M., McBride W.J., McKenzie D.L., Lumeng L., Li T.K. Ethanol consumption by adolescent alcohol-preferring P rats on subsequent behavioral performance in the cross-maze and slip funnel tests. Alcohol. 1996; 13: 297–300.
10. Salimov R.M. Behavioral patterns related to alcohol use in rodents: a factor analysis. Alcohol. 1999; 17: 157–162.

11. Салимов Р.М., Маркина Н.В., Перепелкина О.В., Полетаева И.И., Майский О.В. Быстрая толерантность к этанолу и добровольное потребление больших доз алкоголя у мышей, селектированных по весу мозга. Журнал ВНД. 2003; 53: 1: 100–106.
12. Маркина Н.В., Попова Н.В., Салимов Р.М., Салимова Н.Б., Савчук Н.Б., Полетаева И.И. Сравнение уровня тревожности и стресс-реактивности мышей, селектированных на большой и малый вес мозга. Журнал ВНД. 1999; 4: 5: 789–798.
13. Salimov R., Salimova N., Shvets L., Shvets N. Effect of chronic piracetam on age-related changes of cross-maze exploration in mice. Pharmacol. Biochem. Behav. 1995; 52: 637–640.
14. Salimov R.M., Salimova N., Shvets L.N., Maisky A.L. Haloperidol administered subchronically reduces the alcohol-deprivation effect in mice. Alcohol. 2000; 20: 61–68.
15. Соллертинская Т.Н., Шорохов М.В., Мясоедов Н.Ф., Андреева Л.А. Пептидные биорегуляторы семакс и селанк в компенсации нарушенных когнитивных функций и межполушарной асимметрии у приматов. Ассиметрия. 2014; 4: 53–65.
16. Ашмарин И.П., Незавибатьков Н.Н., Мясоедов Н.Ф., Каменский А.А. Ноотропный аналог адренорекотропина 4–10 — Семакс (15-летний опыт разработки и изучения). Журнал высшей нервной деятельности. 1997; 47: 419–425.
17. Долотов О.В., Золотарев Ю.А., Дорохова Е.М., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф. Связывание аналогов АСТН-(4–10)-гептапептида семакс плазматическими мембранами базальных ядер переднего мозга крысы и его биодеградация. Биоорг. хим. 2004; 30: 3: 241–246.
18. Левицкая Н.Г., Глазова Н.Ю., Себенцова Е.А., Манченко Д.М., Виленский Д.А., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Исследование спектра физиологической активности аналога АКТН4–10 гептапептида Семакс. Нейрохимия. 2008; 25: 1–2: 111–118.
19. Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б. Оригинальный ноотропный и нейропротективный препарат ноопепт. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002; 65: 5: 66–72.
20. Мирзоев Т.Х. Фармакодинамическая характеристика препарата ноопепт (ГВС-111). Автореферат дисс. на соиск. уч. ст. канд. мед. наук. Москва: 2001.
21. Амелин А.В., Илюхина А.Ю., Шмонин А.А. Ноопепт в лечении умеренных когнитивных нарушений у пациентов с ишемическим инсультом. Журнал неврологии и психиатрии. 2010; 11: 44–46.
22. Drake Richard L., Wayne Vogl A., Mitchell Adam W.M. Grays Anatomy for Students. 2nd Edition, Abdominal Viscera; 2009.
23. Gaines Das R, North D. Implications of experimental technique for analysis and interpretation of data from animal experiments: outliers and increased variability resulting from failure of intraperitoneal injection procedures. Lab Anim. 2007; 41: 312–320.
24. Hanson L. R., Frey H.F. Intranasal delivery bypasses the blood-brain barrier to target therapeutic agents to the central nervous system and treat neurodegenerative disease. BMC Neuroscience. 2008; 9: S3–S5.
25. Illum L. Transport of drugs from nasal cavity to the central nervous system. Eur. J. Pharm.Sci. 2000; 11: 1–18.
26. Potaman V.N., Antonova L.V., Dubynin V.A., Zaitzev D.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F., Nezavibatko V.N. Entry of the synthetic ACTH (4–10) analogue into the rat brain following intravenous injection. Neurosci. Lett. 1991; 127: 1: 133–138.
27. Ashmarin, I.P., Kamensky, A.A., Myasoedov, N.F., Skvortsova, V.I. Regulatory Peptides 2000; 89: 51.
28. Storozhevykh T.P., Tukhatova G.R., Senilova Y.E., Pinelis V.G., Andreeva L.A., Myasoedov N.F. Effects of semax and its Pro-Gly-Pro fragment on calcium homeostasis of neurons and their survival under conditions of glutamate toxicity. Bull Exp Biol Med. 2007; 143: 5: 601–604.
29. Dmitrieva V.G., Povarova O.V., Skvortsova V.I., Limborska S.A., Myasoedov N.F., Dergunova L.V. Semax and Pro-Gly-Pro activate the transcription of neurotrophins and their receptor genes after cerebral ischemia. Cell Mol Neurobiol. 2010; 30: 1: 71–79.
30. Бойко С.С., Жердев В.П., Дворянинов А.А., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Воронина Т.А., Розанцев Г.Г., Середенин С.Б. Фармакокинетика дипептидного аналога пирacetama с ноотропной активностью ГВС-111 и его основных метаболитов. Экспериментальная и клиническая фармакология. 1997; 60: 101–104.
31. Ostrovskaya R.U., Mirsoev T.K., Romanova G.A., Gudasheva T.A., Kravchenko E.V., Trofimov C.C., Voronina T.A., Seredenin S.B. Proline-containing dipeptide GVS-111 retains nootropic activity after oral administration. Bull Exp Biol Med. 2001; 132: 4: 959–962.
32. Ostrovskaya R.U., Romanova G.A., Barskov I.V., Shanina E.V., Gudasheva T.A., Victorov I.V., Voronina T.A., Seredenin S.B. Memory restoring and neuroprotective effects of the proline-containing dipeptide, GVS-111, in a photochemical stroke model. Behav Pharmacol. 1999; 10: 5: 549–553.
33. Манченко Д.М., Глазова Н.Ю., Левицкая Н.Г., Андреева Л.А., Каменский А.А., Мясоедов Н.Ф. Ноотропные и анальгетические эффекты Семакса при различных способах введения. Российский физиологический журнал им.И.М. Сеченова 2010; 96:10: 1014–1023.
34. Potaman V.N., Antonova L.V., Dubynin V.A., Zaitzev D.A., Kamensky A.A., Myasoedov N.F., Nezavibatko V.N. Entry of the synthetic ACT (4–10) analogue into the rat brain following intravenous injection. Neurosci. Lett. 1991; 127: 1: 133–138.
35. Chen X.Q., Fawcett J.R., Rahman Y.E., Ala T.A., Frey W.H. Delivery of nerve growth factor to the brain via the olfactory pathway. J. Alzheimers Dis. 1998; 1: 1: 35–44.
36. Hanson L.R., Frey W.H. Strategies for intranasal delivery of therapeutics for the prevention and treatment of neuroAIDS. J. Neuroimmune Pharm. 2007; 2: 81–86.
37. Васильева Е.В., Кондрахин Е.А., Салимов Р.М., Ковалёв Г.И. Сравнение фармакологических эффектов гептапептида селанк при внутрибрюшинном и назальном введении мышам BALB/C и C57BL/6. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2016.

# Противосудорожное действие производного 4-бензоил-пиридина (ГИЖ-298) на пароксизмальную активность в структурах мозга крыс с кобальт-индуцированной очаговой эпилепсией на первой стадии формирования эпилептической системы

**Воронина Т.А., Гайдуков И.О., Литвинова С.А., Неробкова Л.Н., Жмуренко Л.А.**

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

**Резюме.** Целью исследования явилось изучение влияния производного 4-бензоил пиридина – соединения ГИЖ-298 на электроэнцефалографические проявления судорожной активности в структурах мозга крыс с кобальт-индуцированной очаговой эпилепсией на первой стадии формирования эпилептической системы. Методика исследования. Использовалась методика создания (путём аппликации кобальта на кору мозга крыс) хронического эпилептогенного очага, генерирующего пароксизмальную активность в различных структурах мозга: ипси- и контрлатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе. Результаты исследования. Установлено, что соединение ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг (внутрибрюшинно, однократно) на первой стадии развития эпилептической системы устраняет электроэнцефалографические проявления судорожной активности во всех исследуемых структурах мозга, с наибольшей эффективностью в ипсилатеральной коре и гипоталамусе, статистически достоверно уменьшая как число, так и длительность судорожных разрядов.

**Ключевые слова:** ГИЖ-298, эпилепсия, структуры мозга, пароксизмальная активность, судороги, ЭЭГ

## Anticonvulsant effect of the derived 4-benzoylpyridine (giz-298) on paroxysmal activity in the brain structures of rats with cobalt-induced focal epilepsy in the first stage of the formation of epileptic system

Voronina T.A., Gaidukov O.I., Litvinova S.A., Nerobkova L.N., Gmurenko L.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** The aim of the study was to investigate the influence of a derivative of 4-benzoyl pyridine connection, GIZ-298 on electroencephalographic manifestations convulsive activity in the brain structures of rats with cobalt-induced focal epilepsy in the first stage of the formation of epileptic system. Methodology of the study. We used the technique of creation (by an application of cobalt to the brain of rats) chronic epileptogenic focus, generating paroxysmal activity in different brain structures: the ipsi- and contralateral cortex, hippocampus and hypothalamus. The results of the study. Established that injection of GIZ-298 at a dose of 60 mg/kg (intraperitoneally, once) on the first stage of development of the system eliminates epileptic EEG manifestations of seizure activity in all the investigated structures of the brain, with the greatest efficiency in the ipsilateral cortex and the hypothalamus, significantly reducing both the number and duration of seizure discharges.

**Keywords:** GIZ-298, epilepsy, brain structure, paroxysmal activity, the seizures, EEG

Автор, ответственный за переписку:

*Воронина Татьяна Александровна* — зав. лабораторией психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495) 601-24-14; e-mail: voroninata38@gmail.com

## Введение

Поиск противоэпилептических препаратов остаётся актуальной задачей фармакологии. В связи с этим, в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» был разработан ряд соединений производных 4-бензоил пиридина с потенциальной противосудорожной активностью, среди которых, по результатам скрининговых исследований, наибольшей активностью и наименьшей токсичностью обладало производное 4-бензоилпиридина, (ГИЖ-298) [3].

**Целью исследования** явилось изучение влияния производного 4-бензоил пиридина — соединения

ГИЖ-298 на электроэнцефалографические проявления пароксизмальной активности в структурах мозга крыс с кобальт-индуцированной очаговой эпилепсией на первой стадии формирования эпилептической системы.

## Материалы и методы

Эксперименты выполнены на самцах аутбредных половозрелых белых крыс массой 220–250 г, полученных из питомника «Столбовая» (Московская область). Животные содержались в соответствии с правилами лабораторной практики при проведении доклини-

ческих исследований в РФ (ГОСТ 351.000.3—96 и Р 51000.4—2011), приказ МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении Правил лабораторной практики». Эксперименты проводились с соблюдением этических правил гуманного обращения с животными, утверждёнными этической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова».

Исследования проведены с использованием методики создания хронического эпилептогенного очага, вызванного аппликацией кобальта, которая моделирует парциальные (фокальные) вторично-генерализованные судороги в хроническом эксперименте [1, 4] и рекомендована «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств, ФБГУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России» [2]. Согласно методике, на первом этапе наркотизированным (хлоралгидрат 300 мг/кг, в/б) крысам с помощью стереотаксиса, согласно соответствующим координатам [5] в структуры мозга (двигательная зона коры левого и правого полушарий, дорзальный отдел гиппокампа и латеральные ядра гипоталамуса) вживлялись хронические электроды. Индифферентный электрод помещался в носовой кости черепа. Электроды крепились на поверхности черепа зубным висфат-цементом протакрилом. Запись электрограмм (ЭЭГ) производилась монополярным способом в условиях свободного передвижения животного по экспериментальной камере. Для того, чтобы избежать артефактов от движения штырьков, использовались специальные пружинные контакты. Отводящие провода помещались в общий «экран», который заземлялся.

Для регистрации биопотенциалов мозга использовался 21-канальный аппаратно-программный комплекс «Нейро-КМ» (Россия), с установленными фильтрами на 32 Гц и постоянной времени 0,3, работающий на базе IBM-PC. Компьютерный анализ ЭЭГ осуществлялся с помощью программы «Brainsys». Программный комплекс выполнял следующие функции: ввод в компьютер многоканальной ЭЭГ и её визуальное редактирование, включающее фильтрацию с использованием полосового фильтра в интервале частот от 32 до 1,5 Гц; выделение артефактов и их устранение из анализируемого отрезка ЭЭГ.

Эпилептогенный очаг создавался аппликацией порошка металлического кобальта на поверхность двигательной области коры левого полушария мозга крыс. С этой целью в кости черепа просверливалось трепанационное отверстие, в которое вводилась стеклянная канюля с порошком кобальта (диаметр канюли соответствовал диаметру отверстия и не превышал 1 мм). Канюля опускалась на поверхность коры (твёрдая мозговая оболочка предварительно вскрывалась тонкой инъекционной иглой). Изучение динамики изменения биоэлектрической активности мозга крыс проводилось на первой и второй стадиях развития эпилептической системы.

Оценивалась способность соединения ГИЖ-298 ослаблять эпилептическую активность (ЭПА) в первичных и вторичных эпилептических очагах в ипсилатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе, с выявлением доминирующей для проявления эпилептической активности структур мозга на первой (через 48 ч после создания очага) стадии формирования эпилептической системы.

Соединение ГИЖ-298 вводили после 20-минутной фоновой (контрольная судорожная активность) записи ЭЭГ и затем продолжали регистрировать ЭЭГ на фоне соединения в течение 1,5 ч. В электрограммах каждой из структур ЭЭГ анализировали в периоды от 3 до 5 мин и определяли среднее число пароксизмальных разрядов за 1 мин и длительность пароксизмальных разрядов за 1 мин.

## Результаты и обсуждение

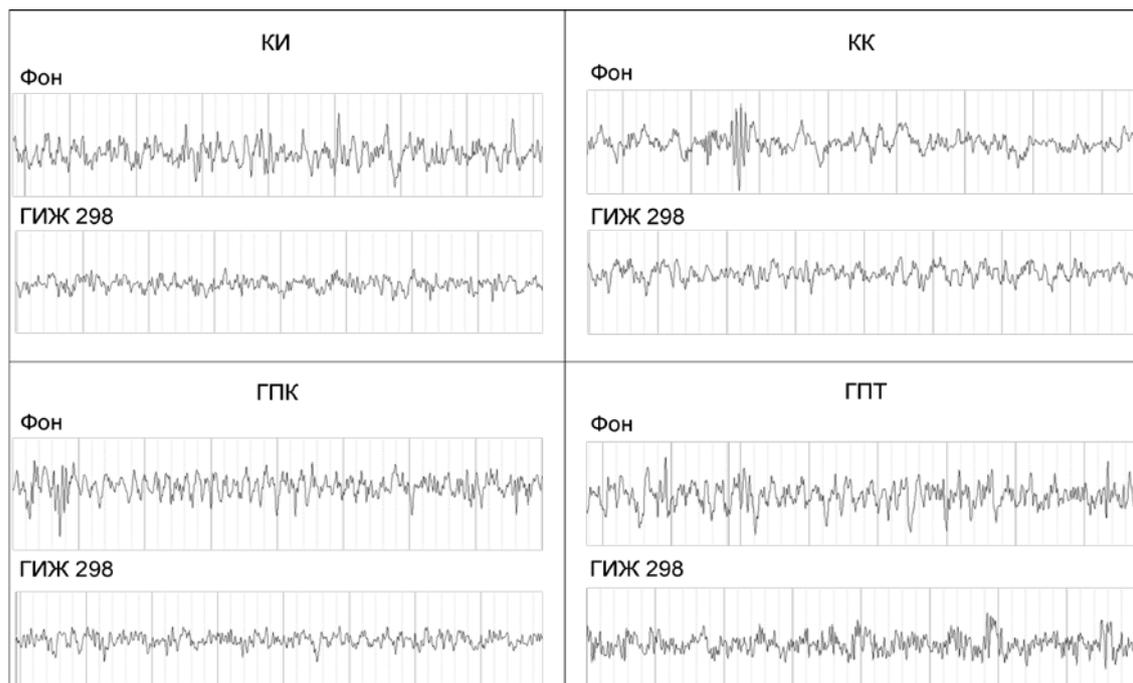
Установлено, что на первой стадии формирования эпилептической системы (через 48 ч после создания эпилептического очага) соединение ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг (внутрибрюшинно, однократно) оказывает выраженное противосудорожное действие.

Под влиянием соединения в коре, гиппокампе и гипоталамусе устраняются судорожные проявления, уменьшаются амплитуды ЭЭГ активности, нормализуется динамика основных ритмов и восстанавливается структура ЭЭГ (рис. 1). Наиболее ярко нормализация ЭЭГ под влиянием соединения ГИЖ-298 наблюдается в ипсилатеральной коре и в гипоталамусе (рис. 1).

Соединение ГИЖ-298 существенно и статистически достоверно снижает число судорожных разрядов во всех исследованных структурах: ипсилатеральной коре, контралатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе (табл. 1). Так, в ипсилатеральной коре среднее число разрядов за 1 мин снижается в 1,6 раза по сравнению с контролем, в контралатеральной коре — в 1,4 раза, в гиппокампе — в 1,3 раза и в гипоталамусе — в 1,6 раза по сравнению с контролем. При этом, наибольшая выраженность эффекта (уменьшение разрядов в 1,6 раза по сравнению с контролем) наблюдалась в ипсилатеральной коре и гипоталамусе (табл. 1).

Наряду с сокращением числа разрядов в структурах мозга, соединение ГИЖ-298 статистически достоверно уменьшает длительность разрядов за минуту в ипсилатеральной коре (в 1,4 раза), в и гипоталамусе (в 1,7 раза) (табл. 1). В гиппокампе и контралатеральной коре уменьшение длительности разрядов за минуту после введения соединения ГИЖ-298 происходит на уровне тенденции (табл. 1).

Таким образом, соединение ГИЖ-298 оказывает выраженный противосудорожный эффект на модели очаговой (фокальной) эпилепсии, индуцированной кобальтом у крыс. На первой стадии формирования эпилептической системы соединение ГИЖ-298



**Рис. 1.** Электрограммы структур мозга крыс с кобальтовой эпилепсией до (фон) и после введения ГИЖ-298 в дозе 60 мг/кг (однократно, внутривенно) на первой стадии формирования эпилептической системы  
**Примечание:** КИ — ипсилатеральная кора; КК — контралатеральная кора; ГПК — гиппокамп; ГПТ — гипоталамус. Фон — запись ЭЭГ судорожной активности до введения соединения ГИЖ-298

Таблица 1

**Влияние соединения ГИЖ-298 на судорожную активность в электрограммах структур мозга крыс с кобальт-индуцированным эпилептогенным очагом на 1-й стадии формирования эпилептической системы**

Структуры мозга	Контроль (фон)		Соединение ГИЖ-298 (60 мг/кг, в/в)	
	число разрядов за минуту	продолжительность разрядов ЭпА (в секунду за минуту)	число разрядов ЭпА за минуту	продолжительность разрядов ЭпА (в секунду за минуту)
Кора ипсилатеральная	16,7±0,6	3±0,1	10,7±1,1*	2,2±0,1*
Кора контралатеральная	15,2±1,1	2,4±0,4	11,3±1,1*	1,9±0,3
Гиппокамп ипсилатеральный	18,4±1,0	2,5±0,2	14,1±1,0*	2±0,1
Гипоталамус ипсилатеральный	16,2±1,7	2,1±0,3	10,2±1,8*	1,25±0,2*

**Примечание:** \* — отличие от фоновых показателей, при  $p \leq 0,05$ .

статистически достоверно уменьшает как число эпилептических разрядов в ипсилатеральной коре, контралатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе и снижает продолжительность разрядов в ипсилатеральной коре и гипоталамусе. Полученные данные свидетельствуют о том, что электрофизиологический

механизм противосудорожного действия соединения ГИЖ-298 на стадии развития эпилептической системы определяется его влиянием на первичные очаги эпилептической активности в ипсилатеральной коре и гипоталамусе.

### Литература

1. Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Маркина Н.В., Митрофанов А.А. Влияние карбамазепина на структурно-функциональные связи в развитии эпилептической системы. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002; 2: 7–10.  
 2. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические указания по изучению противосудорожной активности фармакологических веществ. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств, М.: изд ФБГУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России. 2012, 1 (14): 235–250.

3. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Неробкова Л.Н., Гайдуков И.О., Гудашева Т.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. Производные О-(2-Р-оксимов 4-бензоил) пиридинов, обладающие противосудорожной и противогипоксической активностью как средства лечения эпилепсии и пароксизмальных состояний. Заявка на патент № 2016100425 от. 12.01.2016.  
 4. Bregman F., Le Saux S., Trotter L., Chauvel P., Maurin Y. Chronic Cobalt-induced Epilepsy. J. Neural Transmission. 1985; 63: 109–118.  
 5. Bures J., Petran M., Zachar J. Electrophysiological methods in biological research, Prague, 1960: 534.

# Экспериментальная оценка влияния ладастена и ГБ-115 на развитие толерантности к анальгетическому действию морфина

Константинопольский М.А., Чернякова И.В., Колик Л.Г.

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

**Резюме.** Изучено влияние пептидного анксиолитика ГБ-115 и психостимулятора с анксиолитическим действием ладастена на формирование толерантности к опиатам на белых крысах-самцах. Развитие толерантности оценивали по выраженности анальгетического эффекта морфина (2,0 мг/кг/5 дней, 2 раза в день) при его внутрибрюшинном (в/б) введении в иммерсионном тесте «отдергивание хвоста». Показано, что ладастен (50,0 мг/кг, в/б) *per se* при однократном и субхроническом введении не влиял на пороги болевой реакции и не препятствовал формированию толерантности к морфину на 5-й день эксперимента. Напротив, ГБ-115 (0,1 мг/кг, в/б) *per se* при однократном и субхроническом введении статистически значимо повышал болевые пороги у крыс и препятствовал развитию толерантности к анальгетическому эффекту морфина.

**Ключевые слова:** ладастен, ГБ-115, толерантность к морфину, анальгезия, крысы

## Experimental assessment of ladasten and GB-115 effects on the antinociceptive tolerance to morphine

Konstantinopolsky M.A., Chernyakova I.V., Kolik L.G.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** The development of morphine-induced antinociceptive tolerance limits its therapeutic efficacy in pain management. Effects of non-benzodiazepine anxiolytics ladasten and GB-115 on the development of antinociceptive tolerance to morphine were studied in albino male rats. The tolerance was induced by daily sub-chronic administration of morphine (2,0 mg/kg, i.p., twice daily for 5 days) and assessed in immersion tail-flick test on days 1 and 5. Concomitant sub-chronic administration of dipeptide anxiolytic GB-115 (0,1 mg/kg/5 days, i.p.), developed on the base of endogenous tetrapeptide cholecystokinin (CCK), followed by morphine (2,0 mg/kg), reversed the antinociceptive tolerance to morphine on day 5. GB-115 *per se* at the same anxiolytic dose demonstrated a short-term analgesic activity on days 1 and 5. In contrast, 2-aminoadamantane derivative Ladasten (50,0 mg/kg/5 days, i.p.) with psychostimulant and anxiolytic activity, failed to do so. Ladasten at dose employed in the study, did not exert any effects on pain threshold on days 1 and 5. Our results suggest that in this well-characterized model of acute somatic pain, the development of tolerance to the antinociceptive effect of systemic morphine can be prevented by co-administration with GB-115.

**Keywords:** ladasten, GB-115, tolerance to morphine, antinociception, rats

Автор, ответственный за переписку:

Константинопольский Марк Александрович – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8; тел. +7 (495) 601-22-43; e-mail: makonstant.24@mail.ru

## Введение

В настоящее время для купирования болевых синдромов продолжают использовать наркотические анальгетики, однако формирование толерантности к анальгетическому действию опиатов является одной из причин, ограничивающих их клиническое применение. В фармакотерапии больных, наряду с устранением болевой симптоматики, широко применяют психотропные препараты, поскольку около 10–30% пациентов с хроническими болевыми синдромами находятся в состоянии психологического дистресса, для преодоления которого назначают быстро действующие бензодиазепиновые (БД) транквилизаторы (диазепам, лоразепам, оксазепам) [1]. С другой стороны, во всем мире наблюдается экстенсивный рост числа больных с опиатной зависимостью, принимающих одновременно препараты БД ряда [2, 3], что значительно увеличивает риск внезапной смерти от пере-

дозировки опиатами [4, 5]. Отмеченное взаимодействие лекарственных препаратов может определяться фармакокинетическим и/или фармакодинамическим взаимодействием. Так, клиренс морфина зависит от активности УДФ-глюкуронилтрансферазы (УДФ-ГТ), преимущественно фермента УДФ-ГТ2В7, который метаболизирует морфин до морфин-3-глюкуронида (без анальгетического действия) и морфин-6-глюкуронида (с выраженным анальгетическим действием) [6]. Препараты, угнетающие УДФ-ГТ, способны влиять на фармакокинетику морфина и его глюкуронидов, приводя к изменению анальгетической активности и повышению риска возникновения побочных эффектов. Диазепам, лоразепам и оксазепам ингибируют УДФ-ГТ, при этом лоразепам и оксазепам сами являются субстратами для УДФ-ГТ2В7 [6], что не исключает возможность фармакокинетического взаимодействия морфина и БД. По данным экспериментальных исследований, диазепам в анксиолитических

дозах снижает развитие толерантности к морфину [7], и данный эффект устраняется при предварительной блокаде ГАМКА-рецепторов бикикуллином [8], что свидетельствует о вовлеченности ГАМК-ергической системы в механизм формирования «привыкания» к морфину. Таким образом, разработка новых безопасных препаратов с анксиолитическим действием и их возможное применение в качестве адъювантов при фармакотерапии наркотическими анальгетиками является актуальным направлением в экспериментальной фармакологии.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» синтезированы и фармакологически изучены новые анксиолитики, не являющиеся лигандами ГАМКА-рецепторов — антиастеническое средство с анксиолитическим компонентом ладастен и пептидный анксиолитик ГБ-115. Клиническая эффективность ладастена и отсутствие у него «синдрома отмены» были доказаны у больных с неврастенией [9]. Синтезированный на основе структуры эндогенного регуляторного нейропептида холецистокинина-4 (ХЦК-4) ГБ-115 как антагонист ХЦК-рецепторов продемонстрировал высокую анксиолитическую активность у животных с повышенным уровнем тревожности, а также отсутствие толерантности и формирования «синдрома отмены» при продолжительном использовании [10, 11]. Однако данные о фармакодинамическом взаимодействии ладастена и ГБ-115 с наркотическими анальгетиками при субхроническом введении в настоящее время отсутствуют.

**Цель работы** — изучить влияние ладастена и ГБ-115 на формирование толерантности к анальгетическому действию морфина у крыс.

### Методы исследования

Экспериментальное исследование было выполнено на 80 беспородных белых крысах-самцах массой 240–280 г (питомник «Столбовая»). Животных содержали в условиях вивария в стандартных пластиковых клетках размером 35 × 55 × 20 см по 10 особей при свободном доступе к стандартному корму и воде и естественной освещенности в течение недели до начала эксперимента в соответствии с приказом МЗ РФ № 708н от 23.08.2010 «Об учреждении Правил лабораторной практики». С целью снижения уровня стресса в ходе эксперимента в течение 3–4 дней до начала тестирования с каждым животным выполняли процедуру «хэндлинга» продолжительностью 2–3 мин.

В эксперименте использовали наркотический анальгетик морфина гидрохлорид (субстанция, 2,0 мг/кг, 2 раза в сутки, 5 суток) и антиастеническое средство ладастен (N-(2-адамантил)-N-(пара-бромфенил) амин, субстанция, 50,0 мг/кг) в виде водного раствора, пептидный анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенил-гексаноил-глицил-L-триптофана, субстанция, 0,1 мг/кг) в виде водно-твиновой суспензии и воду для инъекций

в качестве контроля. Все вещества вводили внутривенно из расчета 0,1 мл/100 г массы животных. Выбор доз изучаемых препаратов основан на данных литературы и ранее полученных результатах [11–14].

Для оценки влияния исследуемых веществ на болевые пороги у крыс использовали иммерсионный тест «отдергивание хвоста» (tail flick), описанный ранее [12]. Установка для регистрации болевых порогов представляла собой плексигласовый контейнер с водой, температура которой в ходе эксперимента поддерживалась на уровне  $55,0 \pm 0,2$  °С. В контейнер погружали индивидуальные пробирки объемом 10–15 мл, заполненные водой той же температуры. При измерении латентного периода реакции «отдергивания хвоста» дистальную треть хвоста крысы погружали в пробирку с подогретой водой и с помощью секундомера регистрировали время реакции. Максимальное время реакции составляло 30 с. Исходные средние показатели болевых порогов для каждого животного определяли на основании 4 измерений с интервалом в 10 мин, среднее значение для каждого животного принимали за 100%. Морфина гидрохлорид вводили через 60 мин после инъекций ладастена и через 30 мин после введения ГБ-115. Анальгетический эффект регистрировали в 1-е и 5-е сут. эксперимента однократно (в секундах) через 30, 45 и 60 мин после введения изучаемых препаратов и выражали в процентах относительно исходного уровня болевой чувствительности (100%). Разность между значениями болевых порогов в 1-й и 5-й дни эксперимента, выраженная в % для каждой группы животных, представляла собой изменение толерантности во времени. Сравнение соответствующих показателей для группы «морфин» (активный контроль) и каждой из опытных групп показывала наличие или отсутствие толерантности по данному эффекту в сравнении с группой «морфин». Статистическую обработку результатов проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и *t*-test для независимых групп и тест Вилкоксона для зависимых групп.

### Результаты и обсуждение

#### *Влияние ладастена на развитие толерантности к морфину*

Ладастен в эффективной дозе 50 мг/кг *per se* не проявлял антиноцицептивной активности как при однократном, так и при субхроническом введении, и не влиял на индуцированную морфином анальгезию в 1-й день, при этом уровни порогов для групп «морфин» и «ладастен+морфин» практически совпадали к 45-й минуте (241 и 245%, соответственно, рис. 1 А-В). На 5-й день эксперимента наблюдалось развитие толерантности к морфину при тестировании через 30 мин после введения анальгетика. Через 45 и 60 мин после введения эффект морфина сохранялся, но был заметно снижен относительно 1-го дня:

на 45-й мин — 241% в 1-й день и 168% в 5-й день (снижение на 73%,  $p < 0,05$ ); на 60-й мин — 225% в 1-й день и 158% в 5-й день (снижение на 67%,  $p > 0,05$ , рис. 1 Б-В). При сочетанном введении с морфином ладастен усиливал развитие толерантности к морфину только в узком временном интервале — через 45 мин после введения анальгетика (падение на 113%,  $p < 0,01$ ) при сопоставлении латентных периодов реакции 1-го и 5-го дней эксперимента. При сочетанном введении ладастена с морфином на 30-й и 60-й мин усиления толерантности не отмечалось ( $p > 0,05$ ). Следует отметить, что отличия в выраженности эффектов между группами «морфин» и «ладастен + морфин» не были статистически значимы на 5-й день на временном интервале 30–60 мин (рис. 1А-В). Ладастен статистически недостоверно усиливал развитие толерантности к морфину на 45-й и 60-й мин (падение на 36 и 26%, соответственно,  $p > 0,05$ ) (рис. 1Б-В).

#### **Влияние ГБ-115 на развитие толерантности к морфину**

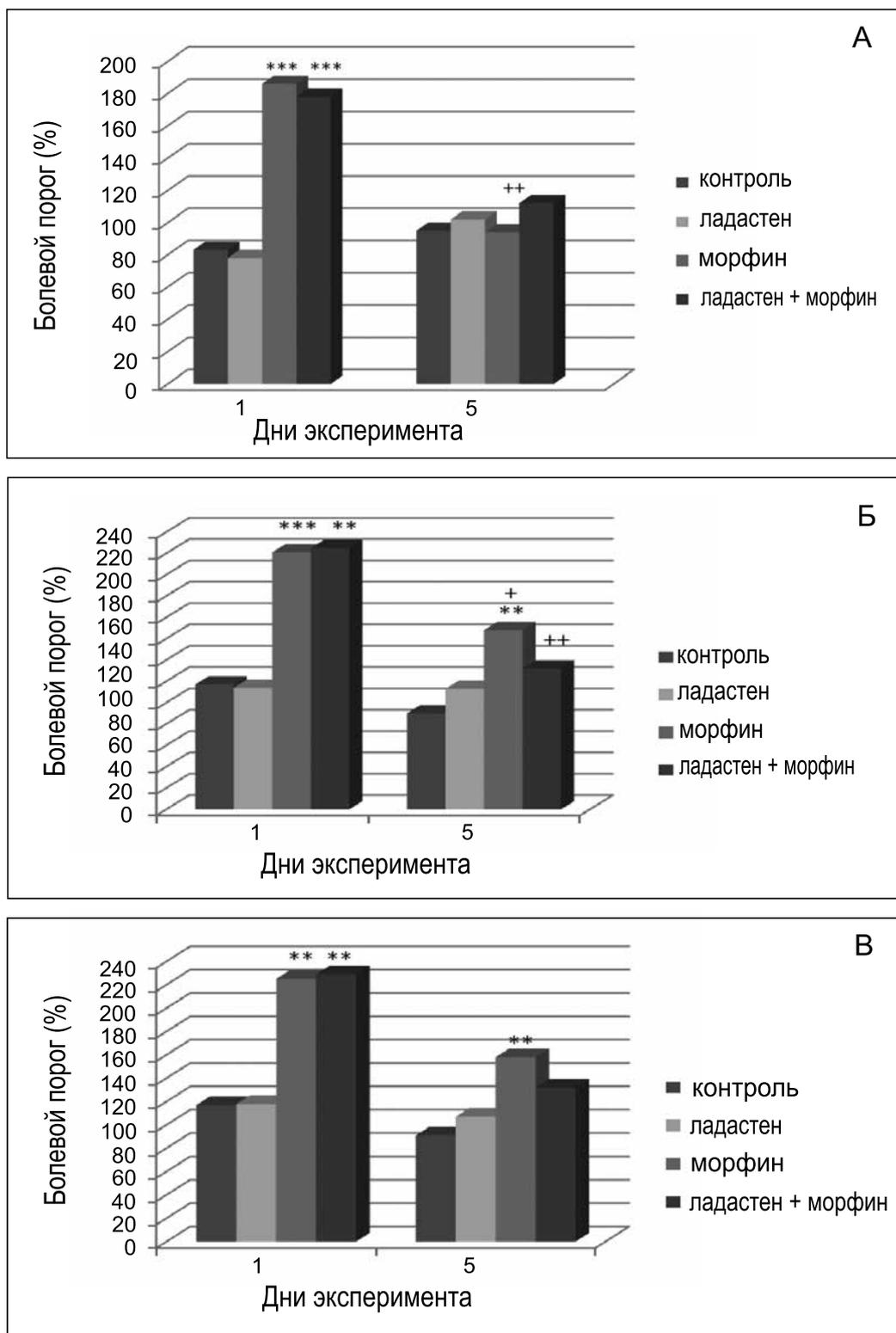
ГБ-115 в анксиолитической дозе 0,1 мг/кг *per se* демонстрировал кратковременную анальгетическую активность, которая проявлялась только через 30 мин после введения как при однократном, так и при субхроническом введении (рис. 2А), что выражалось в увеличении латентного периода реакции на 38% ( $p < 0,05$ ) в сравнении с контрольной группой в 1-й день и на 31% ( $p < 0,05$ ) на 5-й день. Через 45 и 60 мин после введения данный эффект отсутствовал (рис. 2Б-В). Морфин вызывал увеличение болевых порогов в 1-й день до 134, 162 и 155%, соответственно, через 30, 45 и 60 мин после его введения ( $p < 0,05$ ; рис. 2А-В). Эффект толерантности к морфину хорошо заметен на 5-й день эксперимента, когда значения порогов болевой реакции у животных не отличались от контрольных значений: через 30 мин (контроль — 79%, морфин — 68%,), через 45 мин (контроль — 87%, морфин — 111%,  $p > 0,05$ ) и 60 мин (контроль — 89%, морфин — 117%,  $p > 0,05$ ) после введения морфина (рис. 2А-В).

В 1-й день при совместном применении ГБ-115 с морфином (группа «ГБ-115+морфин») через 30 мин после введения последнего отмечалось увеличение болевых порогов на 23% ( $p > 0,05$ ) по сравнению с действием морфина (рис. 2А). Через 45 и 60 мин после введения морфина ГБ-115 при предварительном введении не влиял на значения ноцицептивной реакции у крыс (рис. 2Б-В). На 5-й день при совместном применении ГБ-115 с морфином при тестировании через 30 и 45 мин после введения опиата регистрировали статистически значимое увеличение болевых порогов на 49% и 22%, соответственно, по сравнению с группой «морфин» и контрольной группой ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,05$ ; рис. 2А-Б), на 60-й мин отмечалось статистически значимое увеличение латентного периода реакции только по сравнению с контрольной группой (на 39%,  $p < 0,05$ ; рис. 2В), что указывает на способность ГБ-115

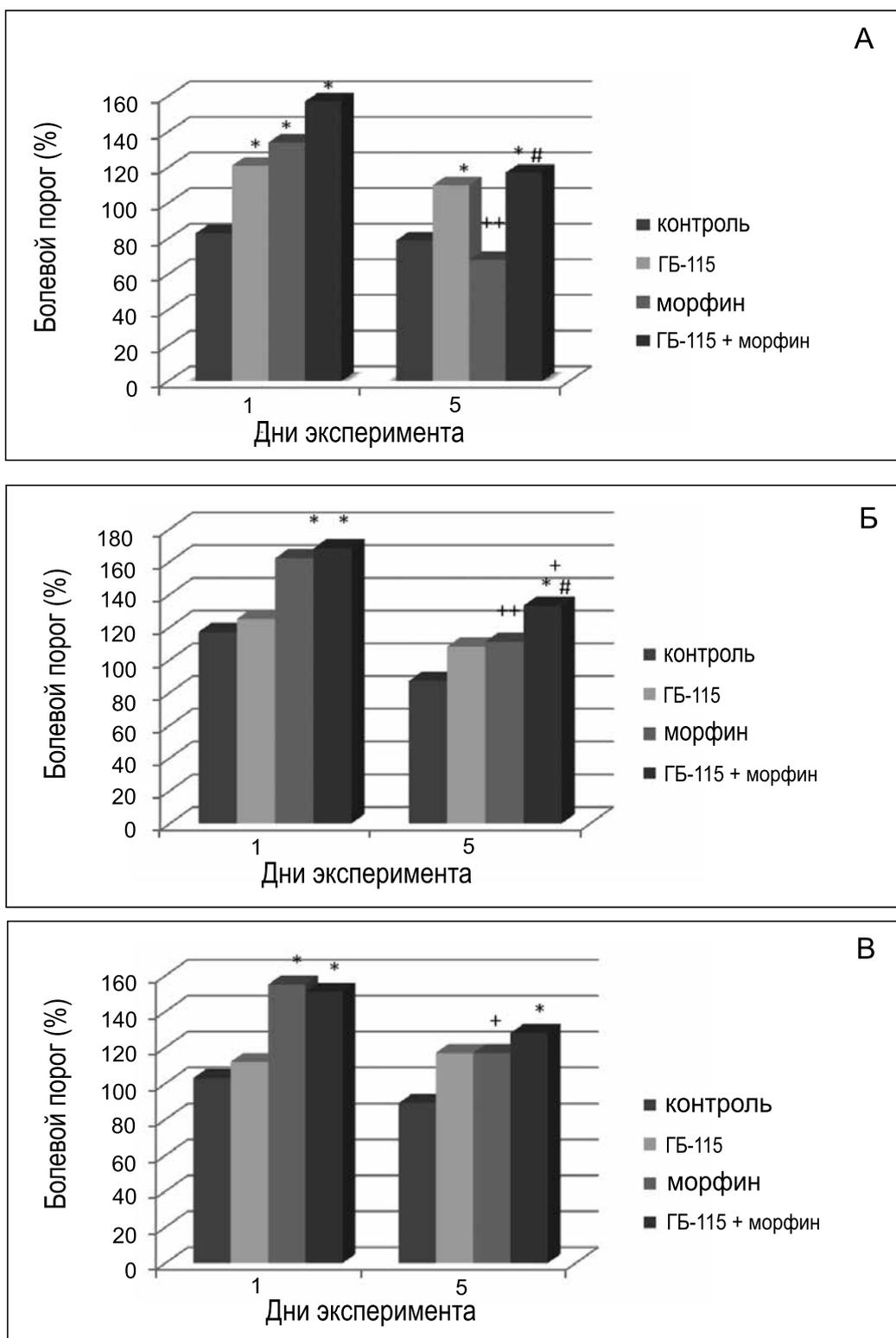
при субхроническом системном введении препятствовать формированию толерантности к анальгетическому действию морфина.

В настоящей работе впервые проведено исследование лекарственного взаимодействия ладастена, применяемого в клинической практике для фармакотерапии больных с невралгией с наркотическим анальгетиком при субхроническом введении. В иммерсионном тесте при термическом раздражении ноцицепторов на спинальном уровне показано, что ладастен, лишенный самостоятельной анальгетической активности, не оказывал влияния на эффекты морфина при однократном введении и не препятствовал формированию толерантности к опиату. Поскольку основной компонент центрального нейротропного действия ладастена обусловлен дофамин-позитивной активностью [13, 14], полученные данные согласуются с известным фармакологическим профилем ладастена, не связанным непосредственно с механизмами формирования толерантности к морфину, один из которых опосредован изменением функциональной активности опиоидной системы, а именно интернализацией и десенситизацией опиоидных рецепторов, а другой — активацией NMDA-рецепторов [15]. Выявленное отсутствие взаимодействия ладастена с морфином отличается от свойств амантадина, другого производного 2-аминоадамантина, который значительно снижал использование фентанила и морфина в пред- и постоперационный период [16], что, по-видимому, объясняется антагонистическими свойствами амантадина по отношению к NMDA-рецепторам. В. Vujak-Giżycka et al. (2012) поддерживают концепцию фармакодинамического взаимодействия лекарственных препаратов, исключая влияние амантадина на метаболизм морфина [16].

В отличие от ладастена дипептид ГБ-115 с анксиолитическим действием продемонстрировал кратковременную анальгетическую активность *per se* и препятствовал развитию толерантности к анальгетическому эффекту морфина. Настоящее исследование согласуется с ранее полученными результатами об отсутствии выраженного влияния ГБ-115 при однократном введении в диапазоне анксиолитических доз на морфин-индуцированную анальгезию в тесте «tail-flick» у мышей [17] и соответствует представлениям о его первичных фармакологических мишенях, одной из которых является ХЦК1-рецептор [10, 18]. Участие нейропептида ХЦК как физиологического антагониста эндогенных опиоидов в формировании толерантности к анальгетическому действию морфина доказано при местном введении опиата в прилежащее ядро [19]. В работе J. Y. Xie et al., выполненной с помощью микродиализа, показано, что морфин при субхроническом введении вызывает 5-кратное увеличение базального содержания ХЦК в ростральном вентромедиальном отделе продолговатого мозга [20], следовательно, усиление эндогенной активности ХЦК в ЦНС во время



**Рис. 1.** Влияние ладастена на развитие толерантности к анальгетическому действию морфина у крыс в иммерсионном тесте: А – 30 мин, Б – 45 мин, В – 60 мин после введения анальгетика.  
**Примечание:** \*\* –  $p < 0,01$ ; \*\*\* –  $p < 0,005$  в сравнении с контрольной группой; + –  $p < 0,05$ ; ++ –  $p < 0,01$  в сравнении с показателями той же группы в 1-й день; в каждой группе по 10 животных, данные представлены как средние значения для групп в %



**Рис. 2.** Влияние ГБ-115 на развитие толерантности к анальгетическому действию морфина у крыс в иммерсионном тесте: А — 30 мин, Б — 45 мин, В — 60 мин после введения анальгетика.  
**Примечание:** \* —  $p < 0,05$  в сравнении с контрольной группой; # —  $p < 0,05$  в сравнении с группой «морфин»; + —  $p < 0,05$ ; ++ —  $p < 0,01$  в сравнении с показателями той же группы в 1-й день эксперимента; в каждой группе по 10 животных, данные представлены как средние значения для групп

продолжительного использования морфина может ослаблять спинальную ноцицепцию за счёт активации нисходящих эфферентных путей в сторону снижения болевой чувствительности. Эффективность антагонистов центральных ХЦК-рецепторов в отношении развития и проявления «привыкания» к морфину описана во многих работах [19–21], что позволяет рассматривать блокаду ХЦК-рецепторов как одну из стратегий снижения эскалации доз наркотических анальгетиков при купировании хронических болевых синдромов.

Таким образом, результаты исследования, с одной стороны, расширяют представления о возможном лекарственном взаимодействии антиастенического средства ладастена при субхроническом введении с наркотическим анальгетиком, с другой — открывают новые перспективы для дальнейшего изучения

в рамках клинических испытаний пептидного анксиолитика ГБ-115, сочетающего анксиолитические, анальгетические и антиаддиктивные свойства.

## Выводы

1. Ладастен в дозе 50,0 мг/кг *per se* при системном однократном и субхроническом введении не влияет на пороги болевой реакции у крыс и не препятствует формированию толерантности к морфину в иммерсионном тесте.

2. ГБ-115 в дозе 0,1 мг/кг *per se* при системном однократном и субхроническом введении кратковременно повышает болевые пороги у крыс и препятствует развитию толерантности к анальгетическому эффекту морфина.

## Литература

1. Uchitomi Y., Mikami I., Nagai K. et al. Depression and psychological distress in patients during the year after curative resection of non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2003; 21: 69–77.
2. Brands B., Blake J., Marsh D.C. et al. The impact of benzodiazepine use on methadone maintenance treatment outcomes. *J Addict Dis.* 2008; 27: 37–48.
3. Griffiths R.R., Wolf B. Relative abuse liability of different benzodiazepines in drug abusers. *J Clin Psychopharmacol.* 1990; 40: 237–243.
4. Lai S.H., Yao Y.J., Lo D.S.T. A survey of buprenorphine related deaths in Singapore. *Forensic Sci Int.* 2006; 162: 80–86.
5. Jones A.W., Holmgren A., Ahlner J.J. Blood methadone concentrations in living and deceased persons: variations over time, subject demographics, and relevance of coingested drugs. *Anal Toxicol.* 2012; 36: 1: 12–8.
6. Hara Y., Nakajima M., Miyamoto K., Yokoi T. Morphine glucuronosyltransferase activity in human liver microsomes is inhibited by a variety of drugs that are co-administered with morphine. *Drug Metab. Pharmacokinet.* 2007; 22: 2: 103–12.
7. Sribanditmongkol P., Sheu M.J., Tejwani G.A. Inhibition of morphine tolerance and dependence by diazepam and its relation to the CNS Met-enkephalin levels. *Brain Res.* 1994; 645: 1–2: 1–12.
8. Hull L.C., Gabra B.H., Bailey C.P. et al. Reversal of Morphine Analgesic Tolerance by Ethanol in the Mouse. *J Pharmacol Exp Ther.* 2013; 345: 512–519.
9. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Телешова Е.С. и др. Новый препарат со стимулирующими и анксиолитическими свойствами ладастен при лечении невралгии (результаты сравнительного клинического исследования с плацебо). *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова.* 2009; 109: 5: 20–26.
10. Колик Л.Г., Гудашева Т.А., Середенин С.Б. Об участии холецистокининовой системы в реализации анксиолитических эффектов дипептида ГБ-115. *Бюлл. Экспер. Биол. и мед.* 2012; 153: 6: 828–832.
11. Колик Л.Г., Гарибова Т.Л., Литвинова С.А. и др. Отсутствие толерантности и синдрома отмены у нового L-триптофансодержащего дипептидного анксиолитика ГБ-115. *Вестник РАМН.* 2011; 7: 37–42.
12. Константинопольский М.А., Чернякова И.В., Кудрин В.С., Клодт П.М., Колик Л.Г., Гудашева Т.А. Дипептидный аналог нейротензина NT(8–13) дилепт повышает болевой порог и снижает выраженность синдрома отмены морфина у крыс. *Эксп. и клин. Фармакол.* 2013; 76: 10: 6–11.
13. Морозов И.С., Пухова Г.С., Авдилов Н.А. и др. Механизмы нейротропного действия бромантана. *Эксп. и клин.фармакол.* 1999; 62: 1: 11–14.
14. Замин И.А., Абаимов Д.А., Бudyгин Е.А., Золотарев Ю.А., Ковалев Г.И. Участие дофамин- и серотонинергических систем мозга в реализации психофармакологических эффектов ладастена и сиднокарба. *Экспер. и клин. фармакол.* 2010; 73: 2: 2–5.
15. Freye E., Latasch L. Development of opioid tolerance — molecular mechanisms and clinical consequences. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2003 Jan; 38 (1): 14–26.
16. Bujak-Giżycka B., Kačka K., Suski M. et al. Beneficial effect of amantadine on postoperative pain reduction and consumption of morphine in patients subjected to elective spine surgery. *Pain Med.* 2012; 13: 3: 459–65.
17. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. Влияние соединения ГБ-115 на индуцированную морфином анальгезию. *Бюлл.Экспер. биол. и мед.* 2007; 143: 6: 645–647.
18. Kolik L.G., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Dipeptide anxiolytic GB-115: new receptor targets. *European Neuropsychopharmacology.* 2011; 21: S2: S146.
19. Xiong W., Yu L.C. Involvement of endogenous cholecystokinin in tolerance to morphine antinociception in the nucleus accumbens of rats. *Behav Brain Res.* 2006; 173: 1: 116–21.
20. Xie J.Y., Herman D.S., Stiller C.O. et al. Cholecystokinin in the rostral ventromedial medullamediates opioid-induced hyperalgesia and antinociceptive tolerance. *J Neurosci.* 2005; 25: 2: 409–16.
21. Agnes R.S., Ying J., Kövér K.E. et al. Structure-activity relationships of bifunctional cyclic disulfide peptides based on overlapping pharmacophores at opioid and cholecystokinin receptors. *Peptides.* 2008; 29: 8: 1413–23.

# Влияние основного метаболита афобазола М-11 на острое экссудативное воспаление и висцеральную боль у мышей

*Иванова Е.А., Воронина Т.А.*

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

**Резюме.** На модели перитонита у мышей, вызванного внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты, установлено, что основной метаболит афобазола М-11 при введении внутрь в дозах 1, 5 и 10 мг/кг снижает выраженность экссудативной стадии воспаления, однако в дозах 20 и 40 мг/кг М-11 не оказывает противовоспалительного действия. По противовоспалительному эффекту М-11 в дозах 1, 5 и 10 мг/кг уступает диклофенаку натрия в дозе 10 мг/кг. При оценке влияния М-11 на сопровождающую развитие воспалительной реакции висцеральную боль обнаружено, что основной метаболит афобазола М-11 не проявляет противоболевого действия.

**Ключевые слова:** основной метаболит афобазола М-11, острое экссудативное воспаление, острая висцеральная боль, мыши

## Effect of the main metabolite of afobazole M-11 on acute exudative inflammation and visceral pain in mice

Ivanova E.A., Voronina T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** In the model of peritonitis in mice induced by intraperitoneal injection of acetic acid the main metabolite of afobazole M-11 at doses of 1, 5 and 10 mg/kg per os reduces the intensity of the exudative stage of inflammation, but at doses of 20 and 40 mg/kg it exhibits no anti-inflammatory activity. The anti-inflammatory activity of M-11 at doses of 1, 5 and 10 mg/kg is less pronounced compared with diclofenac sodium 10 mg/kg. Evaluation of the influence of M-11 on visceral pain induced by inflammation demonstrated that the main metabolite of afobazole does not exhibit analgesic activity.

**Keywords:** the main metabolite of afobazole M-11, the acute exudative inflammation, the acute visceral pain, mice

Автор, ответственный за переписку:

*Иванова Елена Анатольевна* — старший научный сотрудник, ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, 8; тел. +7 (495) 601-24-14; e-mail: iwanowaea@yandex.ru

## Введение

М-11 — окисленный по морфолиновому кольцу основной метаболит афобазола [1], является лигандом МТ-3 подтипа мелатониновых рецепторов [2]. Экспериментально показано, что М-11, как и афобазол, проявляет цитопротекторные свойства на модели зависимых от хинон-редуктазы клеточных повреждений костного мозга [3]. Эффективность М-11 и афобазола на данной модели обусловлена их влиянием на МТ3-рецепторы, которые идентичны регуляторному участку фермента хинон-редуктазы-2, участвующего в процессах детоксикации высокорективных хинонов и предохраняющего клетки от воздействия свободных радикалов [4]. Известно, что образование повреждающих клеточные мембраны реактивных форм кислорода усиливается при воспалительных процессах [5], а некоторые соединения, обладающие антиоксидантными цитопротекторными свойствами, способны проявлять также и противовоспалительное действие [6, 7].

**Целью данного исследования** является оценка влияния основного метаболита афобазола М-11 на острое экссудативное воспаление и сопровождающую его развитие висцеральную боль в эксперименте на мышах.

## Материалы и методы

Эксперименты проводились на половозрелых аутобредных мышах-самцах массой 28–31 г, полученных из питомника «Столбовая», в весенне-летний период. В течение двух недель до начала эксперимента животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при 12-часовом световом режиме. Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» от 06.04.1973 г., № 1045–73. Организация и проведение работы выполнялись в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздравсоцразвития РФ № 708н от 23 августа 2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» и «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях от 18 марта 1986 г. (Страсбург).

Влияние основного метаболита афобазола М-11 на периферическое воспаление изучалось в сравнении с диклофенаком натрия на модели острой экссудативной реакции у мышей — перитоните, который вызывали внутрибрюшинным введением 1% раствора

уксусной кислоты из расчёта 1 мл на 100 г массы тела животного [8]. Через 3 часа мышей подвергали эктаназии методом цервикальной дислокации, вскрывали брюшную полость, собирали экссудат и измеряли его массу. О наличии у изучаемых соединений противовоспалительного действия судили по снижению средней массы экссудата относительно контрольной группы.

Висцеральная боль также оценивалась после внутрибрюшинного введения мышам 1% раствора уксусной кислоты, который вызывает химическое болевое раздражение, проявляющееся специфическими болевыми движениями животных — корчами [8]. В течение 15 мин после введения раствора уксусной кислоты для каждого животного подсчитывалось количество корчей. О наличии у изучаемых соединений противоболевого действия судили по снижению количества корчей относительно контрольной группы. В качестве дополнительного критерия, позволяющего оценить болевую чувствительность у животных, регистрировался латентный период наступления корчей после введения им раствора уксусной кислоты.

Исследуемые вещества вводили внутрь за час до инъекции раствора уксусной кислоты: мышам контрольной группы вводили физиологический раствор, мышам группы препарата сравнения — диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг, животным опытных групп — основной метаболит афобазола М-11 в дозах 1, 5, 10, 20 и 40 мг/кг.

Статистическую обработку проводили с помощью программы Statistica 8.0. В каждой экспериментальной группе было от 6 до 16 животных. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро—Уилка, гомогенность дисперсий групп — с помощью критерия Левена. При нормальном распределении и выполнении теста на гомогенность дисперсий Левена для дальнейшей обработки использовали

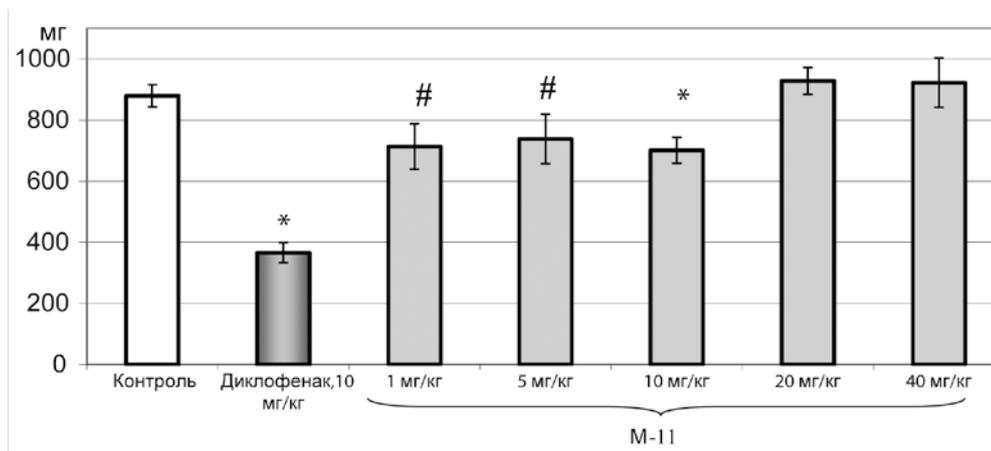
параметрический критерий Ньюмана—Кейлса, при ненормальном распределении или невыполнении теста на гомогенность дисперсий дальнейшую статистическую обработку проводили с помощью метода непараметрической статистики — критерия Манна—Уитни. Результаты в диаграмме на рисунке представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего — Mean  $\pm$  SEM, в таблицах — как среднее  $\pm$  ошибка среднего (стандартное отклонение) — Mean  $\pm$  SEM (SD) и медиана, 25%  $\div$  75% процентили — Mediana, 25%  $\div$  75%. Различия между группами считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и обсуждение

Введение 1% раствора уксусной кислоты (внутрибрюшинно) вызывало у мышей контрольной группы развитие выраженного экссудативного воспаления в брюшной полости, что выражалось в образовании в среднем 879,6 мг экссудата (рис. 1).

Основной метаболит афобазола М-11 в дозах 1 и 5 мг/кг уменьшал образование перитонеального экссудата у мышей соответственно на 18,9 и 16,1% относительно значения контрольной группы, однако это снижение имело характер тенденции ( $p \leq 0,1$ ). В дозе 10 мг/кг М-11 проявлял достоверное противовоспалительное действие, уменьшая среднюю массу экссудата по сравнению с показателем контрольных животных на 20,3%. Однако дальнейшее повышение дозы М-11 до 20 и 40 мг/кг не приводило к увеличению антиэкссудативной активности соединения: в этих дозах М-11 не влиял на образование экссудата в брюшной полости мышей с уксуснокислым перитонитом (рис. 1).

Препарат сравнения диклофенак натрия в дозе 10 мг/кг проявил выраженное противовоспалительное действие, достоверно снизив массу перитонеального экссудата на 58,4% по сравнению с контрольной



**Рис. 1.** Влияние основного метаболита афобазола М-11 и диклофенака натрия при введении внутрь на выраженность экссудативной стадии воспаления у мышей с перитонитом, вызванным внутрибрюшинным введением раствора уксусной кислоты. **Примечание:** по оси абсцисс — группы животных, получавшие М-11, диклофенак натрия, физиологический раствор (контроль); по оси ординат — масса собранного из брюшной полости экссудата, \* —  $p \leq 0,02$  по сравнению с контрольной группой, критерий Ньюмана—Кейлса; # —  $p \leq 0,1$  по сравнению с контрольной группой, критерий Ньюмана—Кейлса, в группах нормальное распределение, тест на гомогенность дисперсий Левена выполняется; данные представлены как Mean  $\pm$  SEM

Таблица 1

Влияние основного метаболита афобазола М-11 и диклофенака натрия на выраженность висцеральной боли у мышей\*\*

Группа	Количество корчей, ед.		Латентный период, с.	
	Mean±SEM (SD)	Mediana, 25%÷75%	Mean±SEM (SD)	Mediana, 25%÷75%
Контроль	74,62±3,2 (16,5)	72,50 65,0÷81,0	216,00±10,6 (54,3)	200,00 184,0÷244,0
Диклофенак, 10 мг/кг, внутрь	31,36±4,6* (17,4)	30,50* 17,0÷44,0	284,17±35,0* (85,7)	259,00* 227,0÷290,0
М-11, 1 мг/кг, внутрь	78,40±10,1 (31,95)	87,50 48,0÷95,0	221,25±13,6 (27,2)	212,50 202,5÷240,0
М-11, 5 мг/кг, внутрь	95,30±7,1* (22,4)	90,00* 80,0÷110,0	202,5±12,5 (39,7)	195,00 170,0÷235,0
М-11, 10 мг/кг, внутрь	85,33±5,2* (18,0)	89,00* 79,5÷99,0	208,5±10,9 (37,7)	205,50 193,0÷224,5
М-11, 20 мг/кг, внутрь	66,38±6,4 (18,1)	68,50 58,5÷80,5	245,89±17,7 (50,0)	232,50 212,5÷263,5
М-11, 40 мг/кг, внутрь	77,00±11,5 (28,2)	74,00 51,00÷96,00	198,67±6,3 (15,38)	197,50 187,0÷210,0

**Примечание:** \* —  $p \leq 0,05$  по сравнению с контролем, критерий Манна-Уитни; \*\* — в таблице данные представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего (стандартное отклонение) — Mean±SEM (SD) и медиана, 25%÷75% перцентили — Mediana, 25%÷75%.

группой (см. рис. 1). При этом масса экссудата у мышей, получавших диклофенак натрия, была также достоверно ниже массы экссудата у животных, получавших основной метаболит афобазола М-11 во всех изучаемых дозах.

Внутрибрюшинное введение животным раствора уксусной кислоты приводило к появлению у них выраженной боли, проявлявшейся в специфических реакциях — корчах, количество которых в контрольной группе в среднем составляло 74,6 за 15 мин наблюдения (табл. 1). Основной метаболит афобазола М-11 во всех изучаемых дозах не обнаружил противоболевого действия. Более того, в дозах 5 и 10 мг/кг он достоверно усиливал выраженность висцерального болевого раздражения животных, увеличивая среднее количество корчей соответственно на 27,7 и 14,4% относительно контрольной группы. Вместе с тем, М-11 достоверно не изменял латентный период начала корчей. Полученные результаты согласуются с ранее полученными

данными о способности афобазола в дозах 1 и 10 мг/кг ослаблять анальгетическое действие морфина [9].

Препарат сравнения диклофенак натрия вызывал достоверное снижение выраженности висцеральной болевой реакции (количества корчей) на 58,0% и повышал латентный период начала корчей на 31,6% ( $p \leq 0,05$ ) относительно контрольной группы (табл. 1).

### Выводы

1. Основным метаболит афобазола М-11 в дозах 1, 5 и 10 мг/кг при введении внутрь мышам снижает выраженность экссудативной стадии воспаления, оказывая в дозе 10 мг/кг достоверный эффект по сравнению с контролем. По эффективности М-11 в дозе 10 мг/кг уступает препарату сравнения диклофенаку натрия в дозе 10 мг/кг.

2. М-11 в дозах от 1 до 40 мг/кг (при введении внутрь) не проявляет противоболевого действия на модели острой висцеральной боли у мышей.

### Литература

1. Бастрыгин Д.В. Экспериментальное изучение биотрансформации и фармакокинетики основного метаболита афобазола — соединения М-11 [диссертация], М.: 2012.
2. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия Афобазола. Эксперимент и клин. фармакология. 2009; 72 (1): 3–11.
3. Кадников И.А., Воронин М.В., Середенин С.Б. Цитопротекторное действие афобазола и его основного метаболита М-11. Бюл. Экспер. биол. 2015; 1: 52–55.
4. Nosjean O., Ferro M., Coge F., Beauverger P., Henlin J.M. Lefoulon F. et al. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. J. Biol. Chem. 2000; 275 (40): 31311–7.
5. Steele M., Stuchbury G., Münch G. The molecular basis of the prevention of Alzheimer's disease through healthy nutrition. Exp. Gerontol. 2007; 42: 28–36.

6. Jiang Q. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant and anti-inflammatory activities and the role in disease prevention and therapy. Free Radic. Biol. Med. 2014; 72: 76–90.

7. Miljković D., Blaževski J., Petković F., Djedović N., Momčilović M., Stanisavljević S. et al. A comparative analysis of multiple sclerosis-relevant anti-inflammatory properties of ethyl pyruvate and dimethyl fumarate. J. Immunol. 2015; 194 (6): 2493–503.

8. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. В книге: «Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств». Часть 1. М.: Гриф и К, 2012; 746–58.

9. Колик Л.Г., Жуков В.Н., Середенин С.Б. Влияние афобазола на антиноцицептивные свойства морфина. Эксперим. и клин. фармакол. 2009; 72 (1): 22–3.

# Исследование хронической токсичности и алергизирующих свойств инъекционной формы афобазола

Алексеева С.В., Сорокина А.В., Коваленко Л.П., Мирошкина И.А., Дурнев А.Д.

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

**Резюме.** Проведено изучение хронической токсичности инъекционной формы афобазола при ежедневном внутривенном введении в течение 2 недель самкам и самцам крыс в дозах 0,1; 1; 5 и 50 мг/кг, самкам и самцам кроликов в дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг. Развернутое клинико-лабораторное исследование не выявило токсических эффектов препарата в дозах 0,1–5 мг/кг. Афобазол при в/в введении в дозах 10 мг/кг у кроликов и 50 мг/кг у крыс вызывал кратковременные клонические судороги и нарушение координации движения, а также в той же дозировке увеличивал сегмент PQ у самок крыс. Афобазол в дозах 10 и 50 мг/кг повышал уровень глюкозы и общего белка у лабораторных животных и понижал содержание мочевины в сыворотке крови у крыс. Исследование алергизирующих свойств афобазола показало, что афобазол в дозах 5 и 50 мг/кг не вызывает алергических реакций немедленного и замедленного типа и псевдоалергических реакций. Незначительное усиление алергической реакции на чужеродный белок при введении афобазола указывает на возможность индивидуальной чувствительности у лиц с белковой сенсибилизацией.

**Ключевые слова:** афобазол, хроническая токсичность, алергизирующие свойства, реакция воспаления на конканавалин А, мыши, крысы, кролики

## Experimental study of chronic toxicity and allergenic properties of the drug afobazol

Alekseeva S.V., Sorokina A.V., Miroshkina I.A., Kovalenko L.P., Durnev A.D.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

**Abstract.** The study of chronic toxicity injection form afobazol with daily intravenous administration for 2 weeks old female and male rats in doses of 0,1; 1; 5 and 50 mg/kg, female and male rabbits at doses of 0,1; 1 and 10 mg/kg. A detailed clinical and laboratory examination did not reveal any toxic effects of the drug in doses of 0,1 – 5 mg/kg. Afobazol when administered intravenously in doses of 10 mg/kg for rabbits and 50 mg/kg in rats induced clonic convulsions, and intermittent loss of coordination of movement, and at the same dosage segment PQ increased in female rats. Afobazol 10 and 50 mg/kg increased levels of glucose and total protein in laboratory animals and decreased the content of urea in blood serum of rats. Investigation showed allergenic properties afobazol in doses of 5 and 50 mg/kg did not cause allergic reactions of immediate and delayed type reactions and pseudoallergic. The slight increase in allergic reactions to foreign protein when administered afobazol indicates the possibility of individual sensitivity in people with protein sensitization.

**Keywords:** afobazol, chronic toxicity, allergenic properties, inflammation reaction to Con A, mice, rats, rabbits

Автор, ответственный за переписку:

Алексеева Светлана Витальевна — ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова», 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8

## Введение

Афобазол — 5-этокси-2-[2-(морфолино)этилтио]бензимидазола дигидрохлорид — новый отечественный препарат в таблетированной форме, обладающий селективными анксиолитическими и нейропротекторными свойствами, разработан в ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» (Гос. регистрация № 000861) (рис. 1).

В ходе дополнительных доклинических исследований были установлены нейропротекторные свойства

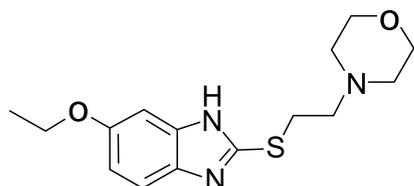


Рис. 1. Структурная формула афобазола

афобазола [1]. Данное наблюдение определило целесообразность разработки инъекционной лекарственной формы афобазола, нацеленной на лечение различных форм острого нарушения мозгового кровообращения с дальнейшей коррекцией неврологического дефекта, профилактикой и лечением неврологических и соматических осложнений. Необходимым этапом этой работы явилась доклиническая оценка безопасности инъекционной лекарственной формы афобазола.

## Цель исследования

Оценка хронической токсичности афобазола, а также его алергизирующих свойств.

## Материалы и методы

В работе использована инъекционная форма афобазола — раствор для инъекций 10 мг/мл.

Хроническую токсичность афобазола оценивали на самцах и самках беспородных белых крыс массой 180–200 г и кроликах породы шиншилла массой 1,5–2 кг.

Аллергизирующие свойства афобазола исследованы в экспериментах на морских свинках альбиносах массой 250–300 г, противовоспалительные эффекты на мышцах СВА массой 18–20 г.

Все животные были получены из сертифицированных питомников и содержались в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» при свободном доступе к воде и корму.

1% раствор афобазола вводили крысам внутривенно в боковую хвостовую вену 1 раз в сутки в течение двух недель в дозе, соответствующей терапевтической — 5 мг/кг и превышающей её в десять раз — 50 мг/кг. Учитывая индивидуальную чувствительность кроликов к производным 2-меркаптобензимидазола, для данного вида животных был сделан перерасчёт доз по поверхности тела. Препарат вводили 1 раз в сутки в краевую ушную вену в течение двух недель в дозе 1 мг/кг и 10 мг/кг.

При оценке аллергенности препарат использовали в дозах 5 и 50 мг/кг по стандартным схемам иммунизации.

Объём и продолжительность исследования, набор использованных методов, регистрируемых параметров и другие условия проведения исследования регламентировались соответствующим Руководством [3]. В экспериментах использовали современное лабораторное оборудование, прошедшее соответствующую поверку; электрокардиограф ЭК 1Т-03М, гемонализатор (Лаборскель), установка «Открытое поле», прибор КФК-2МП и др.

Все анализы выполнялись до начала эксперимента и через 2 нед, не позже 24 ч после последнего введения препарата, за исключением «отставленной» группы, в которой измерения выполняли через две недели после последнего введения препарата.

Всех животных опытных и контрольных групп подвергали патологоанатомическому вскрытию

с последующей оценкой микроскопической картины важнейших внутренних органов.

Изучение аллергизирующих свойств афобазола проводили согласно методическим рекомендациям [4].

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10. Результаты выражали в виде средней арифметической и её средней ошибки, проверку данных на нормальность распределения выборок определяли по критерию Шапиро–Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью непарного *t*-критерию Стьюдента.

## Результаты и обсуждение

Проведено изучение хронической токсичности инъекционной формы афобазола при ежедневном внутривенном введении в течение 2 недель самкам и самцам крыс в дозах 0,1; 1; 5 и 50 мг/кг, самкам и самцам кроликов в дозах 0,1; 1 и 10 мг/кг. Развёрнутое клиничко-лабораторное исследование не выявило токсических эффектов препарата в дозах 0,1–5 мг/кг.

Афобазол при внутривенном введении в дозах 10 мг/кг у кроликов и 50 мг/кг у крыс вызывал кратковременные клонические судороги и нарушение координации движения. Афобазол увеличивал сегмент PQ в ЭКГ у самок, получавших препарат в дозе 50 мг/кг, что позволили предположить замедление атриовентрикулярного проведения (табл. 1).

Афобазол не оказывал существенного повреждающего действия на систему крови и не вызывал значимых изменений биохимических показателей сыворотки крови исследованных животных, за исключением статистически достоверного повышения уровня глюкозы, который снижался в «отставленной группе», общего белка в максимальных дозах, и понижения содержания мочевины у крыс в дозе 50 мг/кг (табл. 2). Афобазол не вызывал значительных изменений физико-химических свойств мочи.

При изучении аллергизирующих свойств инъекционной формы афобазола было установлено, что его

Таблица 1

Влияние афобазола при внутривенном введении в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг на интервалы ЭКГ у самок крыс по сравнению с контролем

Группа	RR, с	PQ, с	QRS, с	QT, с	ЧСС, уд/мин
Контроль ♀	0,11 0,10–0,12	0,02 0,02–0,03	0,01 0,01–0,01	0,07 0,06–0,07	545,4 500,0–600,0
5 мг/кг ♀	0,12 0,12–0,14	0,03 0,03–0,03	0,01 0,01–0,02	0,08 0,07–0,08	500,0 428,6–500,0
50 мг/кг ♀	0,12 0,12–0,13	0,04* 0,04–0,05	0,02 0,01–0,02	0,06 0,06–0,07	500,0 461,5–500,0
«Отставленная группа ♀	0,12 0,12–0,13	0,03 0,02–0,03	0,01 0,01–0,01	0,08 0,07–0,08	500,0 461,5–500,0

Примечание: *n* = 12 — число животных в группе; данные представлены в виде медиан групп и 25% и 75% квартилей; \* — *p* ≤ 0,05 — по отношению к контролю.

Таблица 2

Влияние афобазола на биохимические показатели крови крыс, получавших препарат в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг по сравнению с контролем

Показатели		Контроль	5,0 мг/кг	50,0 мг/кг	50,0 мг/кг «отставленная группа»
Глюкоза, ммоль/л	♀	6,57±0,75	7,47±0,58	10,04±1,06*	7,13±0,44
	♂	7,01±0,58	8,35±0,68	9,78±0,63*	6,22±0,49
Общий белок, г/л	♀	64,71±3,38	71,27±1,13	95,25±4,65*	79,09±2,71*
	♂	61,11±3,09	69,54±3,60	116,4±15,62*	82,17±3,38*
Аланин-амино трансфераза, мкмоль/л	♀	0,57±0,08	0,27±0,06*	0,46±0,07	0,52±0,07
	♂	0,62±0,03	0,39±0,05*	0,67±0,09	0,59±0,03
Аспартаминамо трансфераза, мкмоль/л	♀	0,64±0,07	0,92±0,09*	0,69±0,08	0,47±0,08
	♂	0,74±0,05	0,87±0,05	0,79±0,07	0,74±0,04
Креатинин, мкмоль/л	♀	106,41±13,49	93,09±15,37	84,80±15,13	94,20±8,90
	♂	118,04±9,76	65,53±15,06*	94,42±6,63	67,39±10,24*
Мочевина, ммоль/л	♀	5,86±0,52	4,64±0,19*	4,42±0,26*	5,48±0,54
	♂	6,08±0,68	3,06±1,06*	3,76±0,34*	5,42±0,53

**Примечание:**  $n = 12$  — количество животных в группе; \* —  $p < 0,05$  достоверность различий по сравнению с контрольной группой по непарному  $t$ -критерию Стьюдента.

введение в дозе 5 мг/кг приводило к незначительному усилению реакции общей анафилаксии у животных опытной группы на белок куриного яйца (БКЯ), введение в дозе 50 мг/кг подавляло реакцию общей анафилаксии. Дополнительная оценка анафилатогенной активности афобазола при его 3-кратной иммунизации препаратом в дозе 5 мг/кг по стандартной схеме не выявила развития анафилактоидной реакций после введения разрешающей дозы препарата.

При иммунизации морских свинок афобазолом в дозах 5 и 50 мг/кг в смеси с полным адьювантом Фрейнда аллергических реакций замедленного типа не обнаружено.

Установлено, что афобазол в исследуемых дозах при однократном внутривенном введении мышам линии СВА вызывает выраженное подавление реакции воспаления на конканавалин А, что свидетельствует о наличии у афобазола противовоспалительной активности, характерной для производных 2-меркаптобензимидазола (табл. 3).

Таким образом, 2-недельное изучение хронической токсичности инъекционной формы афобазола при внутривенном введении не выявило токсических эффектов в терапевтических дозах 0,1 и 1 мг/кг у крыс и у кроликов (как наиболее восприимчивого к производным 2-меркаптобензимидазола вида) в дозе 0,1 мг/кг. Афобазол при внутривенном введении в дозах 10 и 50 мг/кг вызывает кратковременные клонические судороги и нарушение координации движения, увеличивает сегмент PQ у самок крыс, повышает уровень

Таблица 3

Влияние инъекционной формы афобазола на реакцию воспаления на Кон А

Доза афобазола	Число животных в группе	Индекс реакции
Контроль	10	15,9±2,5
Афобазол 5 мг/кг	10	2,1±0,7* $p < 0,001$
Афобазол 50 мг/кг	10	4,7±1,8* $p < 0,01$

**Примечание:** \* —  $p < 0,001$  достоверность различий по сравнению с контрольной группой по непарному  $t$ -критерию Стьюдента; \*\* —  $p < 0,01$  достоверность различий по сравнению с контрольной группой по непарному  $t$ -критерию Стьюдента.

глюкозы и общего белка у лабораторных животных, и понижает содержание мочевины в сыворотке крови у крыс.

Исследование аллергизирующих свойств афобазола показало, что афобазол в дозах 5 и 50 мг/кг не вызывает аллергических реакций немедленного и замедленного типа и псевдоаллергических реакций. Незначительное усиление аллергической реакции на чужеродный белок при введении афобазола указывает на возможность индивидуальной чувствительности у лиц с белковой сенсибилизацией.

## Литература

1. *Середин С.Б., Крайнева В.А.* Нейропротекторные свойства афобазола при экспериментальном моделировании геморрагического инсульта. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009; 72: 1: 24–28.
2. *Грушевская Л.Н., Авдюнина Н.И., Милкина С.Е.* и др. Разработка методик анализа инъекционной лекарственной формы афобазола. Химико-фармацевтический журнал. 2010; 44: 7: 49.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией Р.У. Хабриева, М.: Медицина, 2005; 827.
4. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Методические рекомендации по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств. М.: 2012; 51–63.
5. *Хлопушина Т.Г., Кринская А.В., Коваленко Л.П.* и др. Влияние зиксорина на фармакокинетику антипирина у интактных и сенсibilизированных морских свинок — Бюл. exper. биол. 1991; 7: 67–69.
6. Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных // Совет международных медицинских организаций. М.: 2000.
7. *Kimber I., Kerkvliet N.I., Taylor S.L. et al.* Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization-Toxicol. Sci. 1999; 48: 157–162.
8. Аллергология и иммунология: национальное руководство / Под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. М.: ГЭОТАР- Медиа, 2009; 656.
9. Клинические рекомендации. Аллергология / Под ред. Р.М. Хаитова, Н.И. Ильиной. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006; 240.
10. *Паттерсон Р., Грэммер Л.К., Гринбергер П.А.* Аллергические болезни: диагностика и лечение / Перевод с англ. / Под ред. акад. РАМН А.Г. Чучалина (гл. ред.), И.С. Гушина (отв. ред.). М.: ГЭОТАР-Медиа, 2000; 768.



# Издательство ОКИ

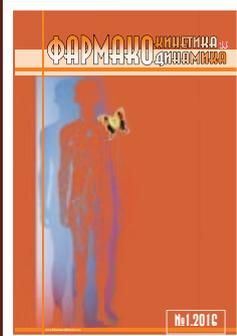
ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей,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

Сайт издательства: [www.izdat-oki.ru](http://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](http://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](http://www.pharmacokinetica.ru)



Журнал «**Фармакогенетика и фармакогеномика**» публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, клинко-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](http://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](http://www.antibiotics-chemotherapy.ru)

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

