

ФАРМАКО КИНЕТИКА И ДИНАМИКА



№2.2018



- Независимая научная организация в области изучения экономики программ здравоохранения
- Более 220 исследований в области оценки медицинских технологий
- Опубликовано около 210 научных работ в рецензируемых медицинских журналах
- Партнёры – 44 ведущих зарубежных и российских фармацевтических компаний

Основные направления научной деятельности

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

ПОЛНЫЙ СПЕКТР УСЛУГ ПО ЭКОНОМИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ

- фармакоэкономические исследования
- фармакоэпидемиологические исследования
- наблюдательные неинтервенционные исследования
- 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



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

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

Зам. главного редактора

Фирсов Александр Алексеевич

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

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д. б. н., Москва

Редакционная коллегия

Белолипецкая

Вера Геннадиевна

к. б. н., Москва

Бондарева

Ирина Борисовна

д. б. н., Москва

Воронина

Татьяна Александровна

заслуженный деятель науки

РФ, д. м. н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна

д. м. н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич

член-корр. РАН, д. м. н.,

профессор, Москва

Казей Василий Игоревич

к. б. н., Москва

Ковалёв Георгий Иванович

д. м. н., профессор, Москва

Кулмагамбетов

Ильяс Райханович

д. м. н., профессор, академик

НАН, Казахстан, Алматы

Мирзоян Рубен Симонович

заслуженный деятель науки

РФ, д. м. н., профессор, Москва

Насонов Александр Сергеевич

к. б. н., Москва

Раменская

Галина Владиславовна

д. ф. н., профессор, Москва

Сариев Абрек Куангалиевич

д. м. н., профессор, Москва

Соколов Андрей Владимирович

д. б. н., Москва

Спасов Александр Алексеевич

академик РАН, д. м. н.,

профессор, Волгоград

Стародубцев

Алексей Константинович

д. м. н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Александрович

член-корр. РАН, д. м. н.,

профессор, Москва

Тюрников Иван Николаевич

член-корр. РАН, д. м. н.,

профессор, Волгоград

Чистяков Виктор Владимирович

д. ф. н., профессор, Москва

Выпускающая группа

Белоусов

Дмитрий Юрьевич

Ответственный за выпуск

журнала

+7 (910) 449-22-73

e-mail: clinvest@mail.ru

Афанасьева

Елена Владимировна

Генеральный директор

ООО «Издательство ОКИ»

подписка

+7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

сайт: www.izdat-oki.ru

Демидова Яна Владимировна

Дизайн и верстка

e-mail: yan4ik_dem@mail.ru

Подписано в печать 01.10.2018 г. Тираж 400 экз.

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

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

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

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

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru

www.ClinVest.ru

www.Clinical-Pharmacy.ru

www.PharmacoGenetics-PharmacoGenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия

Качественная клиническая практика

Клиническая фармация

Фармакогенетика и Фармакогеномика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.izdat-Ok

Центр Фармакоэкономических Исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Исследование влияния фабомотизола на поведенческие нарушения у потомства крыс, подвергнутых действию табачного дыма и этанола

Соломина А.С., Шредер Е.Д., Колик Л.Г., Дурнев А.Д. 3

Влияние диклофенака натрия на уровень гистамина и серотонина при остром экссудативном воспалении у крыс

Иванова Е.А., Воронина Т.А. 12

Противоишемические свойства агониста TrkA-рецепторов миметика 4-ой петли фактора роста нервов

Пекельдина Е.С., Ионова Е.О., Мирошкина И.А., Сорокина А.В.,

Столярук В.Н., Цорин И.Б., Гудашева Т.А., Крыжановский С.А.

..... 16

Влияние габапентина и этанола на электрическую активность нейронов коры головного мозга крыс Wistar

Колик Л.Г., Кожечкин С.Н. 22

МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Поврежденность ДНК в клетках миокарда крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией: модифицирующие эффекты фабомотизола и триметазидина

Жанатаев А.К., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Чайка З.В.,

Крыжановский С.А., Дурнев А.Д. 28

Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках МСF7 человека

Торшин И.Ю., Громова О.А., Фролова Д.Е., Гришина Т.Р.,

Лапочкина Н.П. 32

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И ФАРМАКОДИНАМИКИ

Поиск взаимосвязи между анксиолитическим действием оригинального производного пирроло [1,2-А] пиазина, лиганда TSPO – ГМЛ-1 и его концентрациями в плазме крови крыс

Яркова М.А., Литвин А.А., Колыванов Г.Б., Жердев В.П.,

Середенин С.Б., Гегечкори В.И. 52

МЕТОДЫ ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

К возможности применения эхокардиографии у мелких лабораторных животных для проведения острых фармакологических тестов

Ионова Е.О., Цорин И.Б., Барчуков В.В., Столярук В.Н., Крыжановский С.А.

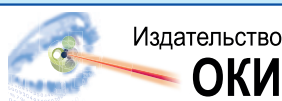
..... 59

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование острой токсичности ГМЛ-1

Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Алексеева С.В., Волкова А.В.,

Дурнев А.Д. 65



Chief editor

Zherdev Vladimir

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

Deputy chief editor

Firsov Alexander

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

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph. D., Moscow

Editotial Board

Belolipetskaia Vera

Ph. D., Moscow

Bondareva Irina

Ph. D., Moscow

Voronina Tatiana

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

Gromova Olga

Ph. D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

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

Kazey Vasily

Ph. D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph. D., Professor, Moscow

Kulmagambetov Ilyas

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

Mirzoyan Ruben

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

Nasonov Alexander

Ph. D., Moscow

Ramenskaya Galina

Ph. D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph. D., Professor, Moscow

Sokolov Andrey

Ph. D., Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph. D., Professor, Moscow

Starodubtcev Alex

Ph. D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

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

Tyurenkov Ivan

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

Chistyakov Viktor

Ph.D., Professor, Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

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

Afanasyeva Elena

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

DemidovaYana

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

Signed in print 01.10.2018 r. **Circulation** 400 copies.

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

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

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

Sites

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

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Clinical Pharmacy
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

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

Center of Pharmacoeconomics Research Market
Access Solutions
Publisher OKI

STUDIES OF PHARMACODYNAMICS

Study of fabomotizole effect on the behavioral disorders in rat
offsprings exposed to tabaco smoke and ethanol
Solomina A.S., Shreder E.D., Kolik L.G., Durnev A.D. 3

Effect of diclofenac sodium on the level of histamine and
serotonin in rats with acute exudative inflammation
Ivanova E.A., Voronina T.A. 12

Antiischemic properties of the Trka-receptor agonist, the nerve
growth factor 4-th loop mimetic
*Pekeldina E.S., Ionova E.O., Miroshkina I.A., Sorokina A.V.,
Stolyaruk V.N., Tsorin I.B., Gudacheva T.A., Kryzhanovskii S.A.* 16

The effect of combined administration of ethanol and gabapentin
on electricalnactivity of the cerebral cortex neurons in Wistar rats
Kolik L.G., Kozhechkin S.N. 22

MODE OF ACTION

Dna damage in myocardial cells of rats with experimental
alcoholic cardiomyopathy: modifying effects of fabomotizole and
trimetazidene
*Zhanataev A.K., Miroshkina I.A., Tsorin I.B., Chayka Z.V.
Kryzhanovskii S.A., Durnev A.D.* 28

Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the
differential effects of vitamin D₃ on gene
expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7
tumor cells
*Torshin I.Yu., Gromova O.A., Frolova D.E., Grishina T.R.,
Lapochkina N.P.* 32

PRECLIC PHARMACODYNAMIC AND PHARMACOKINETIC STUDIES

Search of the correlation between anxiolytic effect of original
derivative of pyrrolo [1,2-A] pyrazine TSPO-LIGAND (GML-1) and
its concentrations in the rat blood plasma
*Yarkova M.A., Litvin A.A., Kolyvanov G.B., Zherdev V.P., Seredenin S.B.,
Gegechkori V.I.* 52

PHARMACODYNAMIC STUDY METHODS

The possibility of using echocardiography in small laboratory
animals for acute pharmacological tests
*Ionova E. O., Tsorin I. B., Barchukov V. V., Stolyaruk V. N.,
Kryzhanovskii S. A.* 59

TOXICOLOGICAL STUDIES

Study of acute toxicity of the drug GML-1
Sorokina A.V., Alekseeva S.V., Miroshkina I.A., Volkova A.V., Durnev A.D.
..... 65

Исследование влияния фабомотизола на поведенческие нарушения у потомства крыс, подвергнутых действию табачного дыма или этанола

Соломина А.С., Шредер Е.Д., Колик Л.Г., Дурнев А.Д.

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

Резюме. Проведена экспериментальная оценка влияния фабомотизола на нарушения постнатального развития потомства крыс, подвергнутых во время беременности воздействию этанола или табачного дыма. Исследования выполнены на аутбредных беременным крысам, содержащимся в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Каждая экспериментальная группа включала не менее 10 особей. Этанол (4,3 мл/кг, 40 % об.) вводили перорально с 10-го по 19-й дни беременности; экспозицию табачным дымом от 4 сигарет с фильтром (13 мг смол и 1 мг никотина) проводили на протяжении всей беременности один раз в день. Фабомотизол во всех вариантах экспериментов вводили беременным крысам перорально в дозах 1 и 10 мг/кг. На 5-м дне жизни у потомства оценивали становление безусловных рефлексов и мышечного тонуса. После 60-го дня жизни те же животные были обследованы в тестах «Т-образный лабиринт» и «Экстраполяционное извлечение». Проведённые исследования продемонстрировали способность фабомотизола предупреждать или снижать нарушения постнатального развития у крыс, подвергнутых воздействию этанола или табачного дыма в период внутриутробного развития. Полученные результаты указывают на потенциальную возможность использования фабомотизола для профилактики задержки физического и умственного развития.

Ключевые слова: этанол; табачный дым; фабомотизол; постнатальное развитие; крысы

Для цитирования:

Соломина А.С., Шредер Е.Д., Колик Л.Г., Дурнев А.Д. Исследование влияния фабомотизола на поведенческие нарушения у потомства крыс, подвергнутых действию табачного дыма и этанола // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.03–11. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10008.

Influence of fabomotizole on behavioral disturbances in rat offspring exposed to cigarette smoke or ethanol

Solomina A.S., Shreder E.D., Kolik L.G., Durnev A.D.

FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Resume. Assessment of fabomotizole effects on postnatal development of newborn and adult rat offspring after maternal ethanol or cigarette smoke exposure was performed. The experiments were carried out in outbred pregnant rats housed in the vivarium of FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology». Each group included at least 10 animals. Ethanol (4.3 ml/kg, 40 % vol.) was administered per os from 10 to 19 days of pregnancy; exposure to cigarette smoke from 4 cigarettes with filter (13 mg of tar and 1 mg nicotine) was performed throughout the pregnancy once a day. Fabomotizole (1 and 10 mg/kg, daily) was administered per os in all experiments. The unconditional reflexes formation and muscle strength were evaluated on postnatal day 5. The same animals were examined in the tests «T-shaped maze» and «extrapolation disposal» to assess cognitive functions after postnatal day 60. These studies demonstrated the ability of fabomotizole to prevent or reduce postnatal abnormalities of rats exposed to ethanol or tobacco smoke in utero. The results show the potential opportunity of using fabomotizole for prevention of delay physical development, learning and memory.

Keywords: ethanol; tobacco smoke; fabomotizole; postnatal development; rats

For citations:

Solomina AS, Shreder ED, Kolik LG, Durnev AD. Influence of fabomotizole on behavioral disturbances in rat off-spring exposed to cigarette smoke or ethanol. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018; 2:03–11. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10008.

Введение

В современной литературе неоднократно обращалось внимание на медицинскую значимость сочетания лекарств с алкоголем или табаком [1–4]. Особо значимы исследования последствий их комбинированных воздействий на пре- и постнатальное развитие потомства [5, 6]. Во-первых, в связи с тем, что от 11 до 36 % женщин не отказываются от куре-

ния во время беременности [7, 8], а 35 % – продолжают употреблять спиртные напитки [9]. Во-вторых, по причине широкой распространённости самолечения при высокой заболеваемости лиц, злоупотребляющих алкоголем и табакокурением [10, 11].

В большинстве случаев в фокусе исследований оказываются негативные эффекты подобного рода комбинированных воздействий. Однако представляется, что в ряде случаев непреднамеренные ком-

бинации лекарств с алкоголем или табаком могут иметь позитивные эффекты. В спектре фармакологической активности отечественного анксиолитика фабомотизола (афобазола) выявлены антимуtagenные и антитератогенные эффекты [12], что позволяет предполагать его позитивное влияние на развитие потомства, подвергнутого внутриутробному воздействию алкоголя или табачного дыма.

Цель работы

Оценка влияния фабомотизола на физическое развитие и поведение потомства крыс, подвергнутого воздействию этанола или табачного дыма.

Материалы и методы

Исследования проведены на аутбредных беременных крысах, полученных из питомника «Филиал Столбовая» ФГБНУ НЦ биомедицинских технологий. Каждая экспериментальная группа включала не менее 10 особей.

Животных содержали в условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при свободном доступе к полнорационному комбикорму и профильтрованной водопроводной воде. Основные правила содержания и ухода за животными соответствовали национальному стандарту РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», приказу Минздрава РФ от 01.04.2016 № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и рекомендациям международных нормативов: Директиве 2010/63 EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22 сентября 2010 года, Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123) (Страсбург, 18 марта 1986 года) и Principles on Good Laboratory Practice (OECD, ENV/MC/CUEM (98)17, 1997 и 2011). Все процедуры с животными в исследованиях были рассмотрены и утверждены институтской комиссией по биомедицинской этике на предмет соответствия этическим принципам обращения с животными.

Для получения беременных животных самок крыс во второй половине дня подсаживали к самцам в отдельные клетки по схеме 2 самки — 1 самец. День обнаружения сперматозоидов в вагинальных мазках в ходе микроскопирования при увеличении $\times 10$ принимали за 1-й день беременности.

Этанол (4,3 мл/кг, 40 % об.) вводили перорально с 10-го по 19-й дни беременности [13–15]. Экспозицию табачным дымом от 4 сигарет с фильтром, содержащих 13 мг смол и 1 мг никотина, выполняли

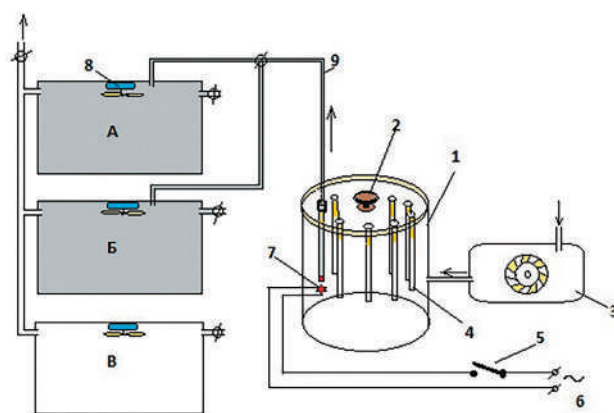


Рис. 1. Схема оригинального устройства для принудительного содержания животных в атмосфере табачного дыма

Условные обозначения: А, Б — камеры для содержания крыс в атмосфере табачного дыма; В — камера для содержания крыс в условиях атмосферного воздуха в отсутствии табачного дыма; 1 — герметичное устройство «револьверного типа» для последовательного использования сигарет; 2 — ручка для перемещения сигареты в исходную позицию для «прикуривания» (7); 3 — компрессор для подачи атмосферного воздуха в устройство и его прокачивания вместе с табачным дымом через зажжённую сигарету в камеры А и Б; 4 — сигарета; 5 — электрический выключатель для процесса «прикуривания» сигареты; 6 — электрическая сеть; 7 — спираль, нагревающаяся под действием электрического тока; 8 — вентиляторы для равномерного распределения атмосферы с табачным дымом или без него; 9 — трубка для поступления дыма в камеры

на протяжении всей беременности один раз в сутки в течение 20 мин в камерах объёмом 72 дм³ при помощи оригинальной установки (рис. 1) [16, 17]. Уровень воздействий обеспечивал отсутствие эмбриональных эффектов.

В качестве фармакологического корректора постнатальных нарушений использовали фабомотизол (2- [2- (морфолино) этилтио] -5-этоксibenзимидазола гидрохлорид) — оригинальный селективный анксиолитик, разработанный в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (Рег. № ЛС-000861 от 03.11.2005). Выбор доз фабомотизола осуществляли в соответствии с данными предыдущих исследований, в частности, по оценке его антимуtagenных и антитератогенных свойств [12]. Фармацевтическую субстанцию исследуемого препарата растворяли в воде дистиллированной для получения раствора определённой концентрации. Во всех вариантах экспериментов фабомотизол вводили беременным крысам перорально в дозах 1 и 10 мг/кг. Его давали ежедневно за 10–15 мин до введения этанола с 10-го по 19-й дни беременности или процедуры принудительного содержания в атмосфере табачного дыма

на протяжении всей беременности.

При изучении постнатального развития потомства крыс, подвергнутых воздействию алкоголя или табачного дыма, были сформированы следующие группы животных: контрольная (1-я группа), модельная (2-я группа) и две группы пренатальной коррекции (3- и 4-я группы). Крысам 2-й группы с 10-го по 19-й дни беременности вводили 40 % об. этанол или с 1-го дня беременности подвергали принудительному содержанию в атмосфере табачного дыма. Животные 3- и 4-й групп перед обработкой этанолом или табачным дымом получали фабомотизол в объёме 0,5 мл / 200 г массы тела в дозах 1 и 10 мг/кг, соответственно. Контрольной группе перорально вводили воду дистиллированную в аналогичные сроки в эквивалентном объёме или содержали в камере с продуванием атмосферного воздуха в отсутствие табачного дыма.

У новорождённого потомства на 5-й день жизни оценивали становление безусловных рефлексов и мышечного тонуса. Наличие рефлекса «переворачивания на плоскости» определяли путём помещения каждого крысёнка на спину на плоской поверхности стола и фиксировали в течение 60 секунд возвращение в положение на четырёх лапах. Рефлекс «избегания края» регистрировали при помещении каждого крысёнка на край стола (при этом передние лапы касались края) и считали формирование рефлекса завершённым при отползании от края в течение 10 секунд. Мышечную силу определяли при помощи установки «Горизонтальная верёвочка», состоящей из каната толщиной 2 мм, натянутого и зафиксированного на штативе из поливинилхлорида. Каждого крысёнка поочерёдно подвешивали передними лапами на канат, регистрировали время удерживания на «Горизонтальной верёвочке» и фиксировали число крысят, способных удержаться передними лапами более 3 секунд.

В возрасте 60 дней те же животные были обследованы в тестах «Т-образный лабиринт» и «Экстраполяционное избавление».

«Т-образный лабиринт», состоящий из стартовой камеры (непищевая среда) и боковых рукавов лабиринта (пищевая среда), разделённых перегородкой, использовался для изучения условно-рефлекторной деятельности и оценки когнитивных способностей потомства крыс [18–20]. Пищедобывательный навык вырабатывали в течение 5 последовательных дней. Животные совершали по 5 пробежек в день длительностью 5 мин (300 секунд). Началу эксперимента предшествовала пищевая депривация в течение 24 ч. Когнитивная задача состояла в способности крыс в условиях свободного выбора целенаправленно находить пищевое подкрепление (результат обучения), находящееся в кормушке одного из рукавов лабиринта, в пределах фиксированного

времени опыта (скорость достижения цели). Фиксировали время достижения пищевого подкрепления и количество находений пищевого подкрепления.

Тестирование в установке «Экстраполяционное избавление» позволяет определить способность животного искать пути преодоления острой стресс-ситуации и проследить становление когнитивных функций в онтогенезе. Установка состоит из внутреннего цилиндра из прозрачного пластика, вмонтированного во внешнюю ёмкость (бак) с закреплённой на стенке лестницей. Содержимое бака заполняли водой ($t = 21 - 23^{\circ}\text{C}$) так, чтобы цилиндр погружался в воду на 2 см. Крыс помещали в цилиндр и наблюдали за их поведением на протяжении 2 мин, регистрируя латентное время до подныривания под край цилиндра и время до нахождения сетки на краю бака (время плавания) [21, 22].

Регистрация и обработка показателей условно-рефлекторной деятельности и обучения в «Т-образном лабиринте» и когнитивной деятельности в установке «Экстраполяционное избавление» проводилась с помощью программного обеспечения RealTimer (процедурный таймер) (ООО НПК «Открытая Наука», Россия).

Статистическая обработка результатов исследования осуществлялась, согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств [23]. Проверку нормальности распределения данных осуществляли с помощью критерия Шапиро–Уилкса. Статистическую оценку по показателям формирования сенсорно-моторных рефлексов и мышечного тонуса крысят контрольных и опытных групп осуществляли с применением расчёта усреднённых значений, абсолютных и относительных частот показателей в модуле «Основные статистики»; достоверность различий оценивали с использованием модуля «Вероятностный калькулятор» и t-критерия Стьюдента.

Для оценки результатов поведенческих исследований, полученных при тестировании в установках «Т-образный лабиринт» и тест «Экстраполяционное избавление», использовали непараметрические методы статистики. Расчёт медианы, нижних и верхних квартилей показателей поведенческого тестирования проводили в модуле «Основные статистики». При определении уровня статистической значимости использовали метод парных сравнений основанный на знаковых рангах Вилкоксона и критерий Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Воздействие этанола или табачного дыма приводило к значимому замедлению формирования сенсорно-двигательных рефлексов и мышечного тонуса у

Таблица 1

Влияние фабомотизола на формирование сенсорно-двигательных рефлексов и становление мышечного тонуса у потомства крыс, подвергнутых пренатальному воздействию этанола

Группа		Число обследованных крысят	Регистрируемые показатели оценки становления рефлексов		Тест «Горизонтальная веревочка»	
			«Избегание края», %	«Переворачивание на плоскости», %	Время удерживания, сек, Mean $\pm$ SEM	% крысят, удерживающихся передними лапами
Самцы	Группа 1	20	100	100■	17,54 $\pm$ 6,11	100
	Группа 2	23	86	64	4,86 $\pm$ 4,29*	55*
	Группа 3	25	100	100■	15,07 $\pm$ 8,60■	100
	Группа 4	22	100	100■	15,82 $\pm$ 4,45■	100
Самки	Группа 1	20	100■	100■	16,30 $\pm$ 7,73	100
	Группа 2	24	68*	71*	4,79 $\pm$ 4,51*	54*
	Группа 3	20	100■	100■	13,47 $\pm$ 4,20■	100
	Группа 4	23	100■	100■	15,52 $\pm$ 6,10■	100

Примечания: * – Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, ■ – по сравнению с эффектом этанола ($p < 0,05$). Группа 1 – контрольная; группа 2 – модель (этанол 40 % об.); группа 3 – модель + фабомотизол в дозе 1 мг/кг; группа 4 – модель + фабомотизол в дозе 10 мг/кг.

Таблица 2

Влияние фабомотизола на формирование сенсорно-двигательных рефлексов и становление мышечного тонуса у потомства крыс, подвергнутых пренатальному воздействию табачного дыма

Группа		Число обследованных крысят	Регистрируемые показатели оценки становления рефлексов		Тест «Горизонтальная веревочка»	
			«Избегание края», %	«Переворачивание на плоскости», %	Время удерживания, сек, Медиана (25–75 %)	% крысят, удерживающихся передними лапами
Самцы	Группа 1	22	96■	100	3,0 (2,0–5,0)■	86■
	Группа 2	9	11*	89	1,0 (0,0–2,0)*	44*
	Группа 3	17	100■	94	4,0 (3,0–6,0)■	100■
	Группа 4	19	68*■	95	2,0 (1,0–3,0)	90■
Самки	Группа 1	19	100■	100	2,0 (1,0–4,0)	95■
	Группа 2	9	56*	89	1,0 (0,0–3,0)	67*
	Группа 3	28	100■	96	3,0 (2,5–4,5)	96■
	Группа 4	26	85	92	2,0 (1,0–3,0)	93■

Примечания: * – Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой, ■ – по сравнению с эффектом табачного дыма ($p < 0,05$). Группа 1 – контрольная; группа 2 – модель (табачный дым); группа 3 – модель + фабомотизол в дозе 1 мг/кг; группа 4 – модель + фабомотизол в дозе 10 мг/кг.

потомства на 5-м дне жизни. Все регистрируемые показатели были снижены в 1,5–2 раза по сравнению с контрольной группой ($p < 0,05$). У потомства крыс, получавших во время беременности фабомотизол в дозах 1 и 10 мг/кг, регистрируемые параметры становления рефлексов и мышечной силы не отличались от контрольных значений (табл. 1, 2). Выраженных дозовых

зависимостей защитного действия не установлено, но отмечена селективность выраженности эффектов от дозы.

Обследование 60-дневных животных, полученных от крыс после воздействия этанолом, в тесте «Т-образный лабиринт» выявило наличие импульсивных реакций на новизну обстановки,

Таблица 3

Влияние фабомотизола на формирование пищедобывательного навыка у крыс, подвергнутых пренатальному воздействию этанола

Группа	Время достижения пищевого подкрепления, секунды (Медиана (25–75 %))					Число взятий пищевого подкрепления, абсолютное значение (Медиана (25–75 %))				
	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день	1 день	2 день	3 день	4 день	5 день
Самки										
Группа 1 n = 10	13,54 (9,88 ч 15,30)	5,78 ¹ (4,25 ч 8,24)	3,68 ¹ (2,21 ч 5,88)	3,58 ¹ (1,72 ч 4,27)	5,45 ¹ (4,56 ч 5,99)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)
Группа 2 n = 10	55,14* (33,12 ч 67,83)	15,98* ¹ (10,36 ч 25,75)	6,32* ¹ (4,79 ч 7,30)	4,20 ¹ (3,65 ч 6,31)	4,56 ¹ (3,15 ч 6,61)	4* (3 ч 5)	51 (5 ч 5)	51 (5 ч 5)	51 (5 ч 5)	51 (5 ч 5)
Группа 3 n = 10	46,32* (30,47 ч 59,49)	16,99* ¹ (11,49 ч 23,66)	5,00 ¹ (4,45 ч 15,59)	5,21 ¹ (4,85 ч 14,59)	2,95* ¹ (2,74 ч 3,26)	5* (3 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)
Группа 4 n = 10	20,57* (14,37 ч 22,71)	7,71* ¹ (7,51 ч 15,55)	5,33 ¹ (1,64 ч 6,91)	3,22 ¹ (2,73 ч 3,56)	2,92* ¹ (2,54 ч 3,43)	5* (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)
Самцы										
Группа 1 n = 10	18,52 (9,79 ч 29,09)	13,06 (8,25 ч 17,98)	3,51 ¹ (2,93 ч 6,33)	2,61 ¹ (2,22 ч 4,26)	4,97 ¹ (3,85 ч 5,50)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)
Группа 2 n = 10	78,51* (31,89 ч 93,97)	22,98* ¹ (15,85 ч 33,43)	9,99* ¹ (7,24 ч 15,54)	6,07 ¹ (4,20 ч 10,02)	3,38 ¹ (2,19 ч 4,54)	2* (2 ч 4)	51 (4 ч 5)	51 (4 ч 5)	51 (4 ч 5)	51 (4 ч 5)
Группа 3 n = 10	44,27* (24,58 ч 46,72)	113,08 ¹ (9,60 ч 23,04)	4,63 ¹ (3,36 ч 11,76)	3,37* ¹ (2,51 ч 4,28)	2,18* ¹ (1,69 ч 2,49)	5* (4 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)
Группа 4 n = 10	28,33* (14,66 ч 39,90)	9,91* ¹ (6,31 ч 13,04)	4,35* ¹ (3,66 ч 8,53)	2,13* ¹ (1,60 ч 2,97)	1,46* ¹ (1,35 ч 1,84)	5* (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)	5 (5 ч 5)

Примечания: * – Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой; * – по сравнению с результатами, характеризующими эффект этанола; ¹ – по сравнению с 1 днем ($p < 0,05$). Группа 1 – контрольная; группа 2 – модель (этанол 40 % об.); группа 3 – модель + фабомотизол в дозе 1 мг/кг; группа 4 – модель + фабомотизол в дозе 10 мг/кг; n – число животных в группе.

выражающихся хаотичными пробежками по площадке лабиринта, и увеличение времени достижения пищевого подкрепления в 3–4 раза (табл. 3). У пренатально алкоголизированных самок, получавших фабомотизол в дозах 1 и 10 мг/кг в период внутриутробного развития, показатель времени достижения пищевого подкрепления не отличался от контрольных значений на 3-й и 1-й день, соответственно, а у самцов уже на 2-й и 1-й день, соответственно. Характер поведенческих реакций в ответ на незнакомую среду и формирование когнитивной деятельности у животных этих групп не отличались от таковых в контрольной группе.

У 70–80 % животных, внутриутробно подвергнутых воздействию табачным дымом, обнаружена двигательная заторможенность и отказ от обучения по нахождению пищевого подкрепления (табл. 4). Фабомотизол в дозах 1 и 10 мг/кг способствовал адаптации животных в незнакомой обстановке и улучшению когнитивных способностей крыс, что выражалось в снижении времени достижения пи-

щевого подкрепления уже с 1-го дня тестирования независимо от половой принадлежности.

В тесте «Экстраполяционное извлечение» количество адекватных решений было, в среднем, в 2 раза, значительно снижено у животных, подвергнутых внутриутробному воздействию этанола или табачного дыма (табл. 5, 6). При использовании фабомотизола в диапазоне доз от 1 до 10 мг/кг наблюдалось увеличение числа крыс, принявших адекватное решение в условиях проведённого теста. Снижение латентного времени подныривания под край цилиндра на фоне введения исследуемого фармакологического корректора в дозах 1 и 10 мг/кг выявлено как у пренатально алкоголизированных крыс обоего пола, так и у экспонированных табачным дымом самок 3-й группы (фабомотизол, 1 мг/кг) и самцов 4-й группы (фабомотизол, 10 мг/кг).

Заключение

Экспериментальные результаты в целом согласуются с многочисленными эпидемиологическими и

Таблица 4

Влияние фабототизола на формирование пищедобывательного навыка у животных, подвергнутых пренатальному воздействию табачного дыма

Группа	Фактор	САМКИ (Медиана (25–75 %))					САМЦЫ (Медиана (25–75 %))				
	Дни	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Группа 1 n♂ = 12 n♀ = 10	Время	21,0 ⁵ ▪ (10,1-56,4)	10,6 ¹ ▪ (7,4-18,3)	8,9 ¹ ▪ (5,1-14,0)	5,2 ¹ ▪ (3,3-9,8)	3,9 ¹ ▪ (3,1-6,4)	43,0 ⁵ ▪ (17,7-107,7)	23,5 ¹ ▪ (8,9-63,5)	11,8 ¹ ▪ (6,5-30,9)	11,6 ¹ ▪ (5,3-22,5)	6,3 ¹ ▪ (3,6-11,4)
	Пища	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0 ⁵ ▪ (4,0-5,0)	5,0▪ (4,5-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0 ¹ ▪ (5,0-5,0)	5,0 ¹ ▪ (5,0-5,0)
Группа 2 n♂ = 12 n♀ = 10	Время	300,0 * (120,9-300,0)	300,0 * (300,0-300,0)	300,0 * (65,0-300,0)	300,0 * (300,0-300,0)	300,0 * (33,6-300,0)	300,0 * (131,8-300,0)	300,0 * (100,5-300,0)	300,0 * (42,5-300,0)	300,0 * (36,3-300,0)	169,6 * (27,9-300,0)
	Пища	0,5* (0,0-3,0)	0,0* (0,0-1,0)	0,0* (0,0-4,0)	0,0* (0,0-2,0)	1,5* (0,0-5,0)	1,5 * (0,0-3,0)	0,0 * (0,0-5,0)	2,0 * (0,0-5,0)	0,0 * (0,0-5,0)	2,5 * (0,0-5,0)
Группа 3 n♂ = 11 n♀ = 10	Время	9,05* (4,9-28,7)	7,4 ¹ ▪ (3,5-18,3)	6,5 ¹ ▪ (3,7-10,6)	5,2 ¹ ▪ (2,9-8,6)	5,0 ¹ ▪ (2,8-6,8)	30,3 ⁵ ▪ (14,6-65,4)	16,2 ¹ ▪ (6,1-29,0)	12,8 ¹ ▪ (6,3-25,8)	8,2 ¹ ▪ (4,4-21,5)	6,6 ¹ ▪ (4,1-12,9)
	Пища	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (4,5-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)
Группа 4 n♂ = 12 n♀ = 12	Время	24,9 ⁵ ▪ (13,2-61,8)	12,6 ¹ ▪ (5,5-23,9)	8,8 ¹ ▪ (5,4-17,1)	6,8 ¹ ▪ (4,2-16,4)	5,6 ¹ ▪ (3,9-11,6)	56,7 ⁵ ▪ (21,5-114,0)	26,0▪ (14,0-73,7)	24,8 (8,8-94,9)	21,9 ¹ ▪ (5,8-43,4)	12,2 ¹ ▪ (5,6-28,0)
	Пища	5,0▪ (4,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	5,0▪ (5,0-5,0)	4,5▪ (3,5-5,0)	5,0▪ (3,5-5,0)	5,0 (3,0-5,0)	5,0 (5,0-5,0)	5,0▪ (4,5-5,0)

Примечания: * – Статистически значимые различия по сравнению с контрольной группой; ▪ – по сравнению с результатами, характеризующими эффект табачного дыма; ¹ – по сравнению с 1-м днём тестирования; ⁵ – по сравнению с 5-м днём тестирования ($p < 0,05$). Группа 1 – контрольная; группа 2 – модель (табачный дым); группа 3 – модель + фабототизол в дозе 1 мг/кг; группа 4 – модель + фабототизол в дозе 10 мг/кг, n – число животных в группе, ♂ и ♀ – мужская и женская особь

Таблица 5

Влияние фабототизола на способность крыс, подвергнутых пренатальному воздействию этанола, находить адекватное решение в стресс-ситуации в тесте «Экстраполяционное избавление»

Группа	Пол	Количество животных в группе	Медиана (25–75 %)		% крыс, принявших адекватное решение
			Время в стакане (секунды)	Время плавания (секунды)	
Группа 1	Самки	10	8,00▪ (5,00 ч 12,00)	1,50 (0,00 ч 2,00)	100
	Самцы	10	13,50▪ (6,00 ч 19,00)	4,50 (2,00 ч 6,00)	100
Группа 2	Самки	10	53,50* (18,00 ч 60,50)	3,00 (1,00 ч 8,00)	70
	Самцы	10	70,50* (17,00 ч 120,00)	1,50 (0,00 ч 3,00)	60
Группа 3	Самки	10	8,50▪ (7,00 ч 15,00)	2,00 (1,00 ч 7,00)	90
	Самцы	10	6,00* (3,00 ч 8,00)	2,00 (1,00 ч 3,00)	100
Группа 4	Самки	10	11,50▪ (7,00 ч 17,00)	4,50* (2,00 ч 6,00)	100
	Самцы	10	9,00▪ (6,00 ч 15,00)	6,00▪ (5,00 ч 10,00)	90

Примечания: * – Статистически значимые различия по сравнению с контролем; ▪ – по сравнению с результатами, характеризующими эффект этанола ($p < 0,05$). Группа 1 – контрольная; группа 2 – модель (этанол 40 % об.); группа 3 – модель + фабототизол в дозе 1 мг/кг; группа 4 – модель + фабототизол в дозе 10 мг/кг.

Таблица 6

Влияние фаботизола на способность крыс, подвергнутых пренатальному воздействию табачного дыма, находить адекватное решение в стресс ситуации в тесте «Экстраполяционное извлечение»

Группа	Пол	Количество животных в группе	Медиана (25–75 %)		% крыс, принявших адекватное решение
			Время в стакане (секунды)	Время плавания (секунды)	
Группа 1	Самки	12	8,5* (4,5–12,0)	12,5 (10,0–15,0)	100
	Самцы	10	8,5* (6,0–17,0)	14,0 (9,0–24,0)	100*
Группа 2	Самки	12	23,0* (15,0–83,5)	22,0 (6,5–26,5)	70
	Самцы	10	69,5* (14,0–120,0)	5,5 (0,0–20,0)	50*
Группа 3	Самки	11	14,0* (5,0–21,0)	16,0 (9,0–25,0)	100
	Самцы	10	16,0 (8,0–37,0)	21,5 (11,0–40,0)	100*
Группа 4	Самки	12	44,5* (12,0–50,5)	32,0 (10,5–53,0)	90
	Самцы	12	12,0* (8,5–24,5)	20,0 (10,0–28,5)	90

Примечания: * – Статистически значимые различия по сравнению с контролем; * – по сравнению с результатами, характеризующими эффект табачного дыма ($p < 0,05$). Группа 1 – контрольная; группа 2 – модель (табачный дым); группа 3 – модель + фаботизол в дозе 1 мг/кг; группа 4 – модель + фаботизол в дозе 10 мг/кг.

клиническими наблюдениями, указывающими на негативные влияния курения или потребления алкоголя во время беременности на последующее физическое развитие потомства и его адаптационные, интеллектуальные и когнитивные способности.

Выявленные протекторные эффекты фаботизола, по всей видимости, обуславливаются цитопротекторными, нейропротекторными и антиоксидантными свойствами, которые были подробно описаны ранее и реализуются через взаимодействие с сигма-1, MT1 и MT3 рецепторами [24]. Они проявляются при применении фаботизола в дозах 1

и 10 мг/кг, что совпадает с диапазоном дозировок, в которых лекарственный препарат проявляет ангиолитическую активность в эксперименте и не сильно отличаются от максимальных дозировок (70 мг/сут.), рекомендованных в клинике [24, 25].

Таким образом, фаботизол (афобазол) перспективен для дальнейшего исследования в качестве средства, предупреждающего задержки физического и умственного развития потомства, повергнутого воздействию негативных внешних факторов в период внутриутробного развития.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Соломина Анна Сергеевна
Автор, ответственный за переписку
e-mail: solomina@academpharm.ru
ORCID ID: 0000-0001-7048-4993
SPIN-код: 7475-9613
с. н. с., к. б. н., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Solomina Anna
Corresponding author
e-mail: solomina@academpharm.ru
ORCID ID: 0000-0001-7048-4993
SPIN code: 7475-9613
Senior Research Officer, Candidate of Biological Sciences, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Шредер Екатерина Дмитриевна

SPIN-код: 2028-4258

н. с., к. б. н., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Shreder Ekaterina

SPIN code: 2028-4258

Research Officer, Candidate of Biological Sciences, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Колик Лариса Геннадьевна

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

SPIN-код: 9126-6922

д. б. н., профессор РАН, зав. лабораторией фармакологической регуляции состояний зависимости, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolik Larissa

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

SPIN code: 9126-6922

Doctor of Biological Sciences, Professor of RAS, head of the laboratory of pharmacological regulation of dependence States, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

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

Durnev Andrei

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member, RAS, head of the laboratory of drug toxicology, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Дурнев А.Д. Пищелекарственные взаимодействия: гено-токсикологические аспекты // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. — 2016. — №2. — С.4–9. [Durnev A.D. Fooddrug interactions: genotoxicological aspects. *Farmakogenetika i farmakogenomika*. 2016; 2:4–9. (In Russ).]
2. Лемина Е.Ю., Чурюканов В.В. Лекарственные средства и курение табака: проблемы взаимодействия // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2018. — Т.81. — №1. — С.40–43. [Lemina EYu, Churyukanov VV. Drugs and Tobacco Smoking: Interaction Problems. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2018;81(1):40–43. (In Russ).]
3. *Этиловый алкоголь: (Фармакокинетика, взаимодействие с лекарствами, гепатотоксичность)* / Н.П. Скакун, А.С. Саратиков, А.Н. Олейник, А.И. Венгеровский. Томск: Изд-во Том. ун-та; 1985. [Ethyl alcohol: (Farmakokinetika vzaimodeistvie s lekarstvami gepatotoksichnost). NP. Skakun, AS. Saratikov, AN. Oleinik, AI. Vengerovskii. Tomsk: Izd-vo Tom un-ta; 1985. (In Russ).]
4. Li H, Shi Q. Drugs and Diseases Interacting with Cigarette Smoking in US Prescription Drug Labelling. *Clin Pharma-cokinet*. 2015; 54(5):493–501. DOI: 10.1007/s40262-015-0246-6
5. Hall BJ, Cauley M, Burke DA et al. Cognitive and Behavioral Impairments Evoked by Low-Level Exposure to To-bacco Smoke Components: Comparison with Nicotine Alone. *Toxicol Sci*. 2016;151(2):236–44. DOI: 10.1093/toxsci/kfw042
6. Rouzer SK, Cole JM, Johnson JM et al. Moderate Maternal Alcohol Exposure on Gestational Day 12 Impacts Anxie-ty-Like Behavior in Offspring. *Front Behav Neurosci*. 2017;11:183. DOI: 10.3389/fnbeh. 2017.00183
7. Доклад ВОЗ «Расширение возможностей женщин — борьба с маркетингом табачной продукции в Европейском регионе ВОЗ» [Электронный ресурс]. Европейское региональное бюро ВОЗ, Копенгаген; 2010. [Empower women — Combating tobacco industry marketing in the WHO European Region [Internet]. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen; 2010. (In Russ).] Доступно по: <http://whodc.mednet.ru/ru/osnovnye-publikaczii/borba-s-tabakom/1942.html>. Ссылка активна на 27.09.2018.
8. Доклад ВОЗ о глобальной табачной эпидемии [Электронный ресурс]. ВОЗ Женева; 2009. [WHO Tobacco Free Initiative Noncommunicable Diseases and Mental Health [Internet]. WHO Geneva; 2009. (In Russ).] Доступно по: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44229/9789244563915_rus.pdf?sequence=7 Ссылка активна на 27.09.2018.
9. Kristjanson AF, Wilsnack SC, Zvartau E, et al. Alcohol use in pregnant and nonpregnant Russian women. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31(2):299–307.
10. Зими́на Л.А., Боева А.В. Характеристика некоторых факторов, влияющих на здоровье молодежи // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. — 2016. — № 1-3. — С.347–351. [Zimina LA, Boeva AV. Some factor's impact on the youth health. *International journal of applied and fundamental research*. 2016;1-3:347–351. (In Russ).] URL: <https://applied-research.ru/ru/article/view?id=8508> (дата обращения: 28.09.2018).
11. Оконенко Л.Б., Антропова Г.А., Егорова Е.С., и др. Безрецептурный отпуск и самолечение // *Вестник РУДН, серия Медицина*. — 2009. — №4. — С.42–46. [Okonenko LB, Antropova GA, Egorova ES., et al. Over-the-counter drugs and self-medication. *Vestnik RUDN, seriya Medicina*. 2009;4:42–46. (In Russ).]
12. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., и др. Анти-мутагенные и антитератогенные свойства афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2009. — Т.72. — №1. — С.46–51. [Durnev AD, Zhanataev AK, Shreder OV, et al. Antimutagenic and antiteratogenic properties of afobazole. *Ekspieriment'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009;72(1):46–51. (In Russ).] DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2009-72-1-46-51>
13. Пальчик А.Б., Федорова Л.А., Легонькова С.В. *Фетальный алкогольный синдром: методические рекомендации*. СПб.: Петербургская Государственная Педиатрическая Медицинская Академия; 2006. [Pal'chik AB, Fedorova LA, Legon'kova SV. *Fetal'nyj alkohol'nyj sindrom: metodicheskie rekomendacii*. Saint-Petersburg: Peterburgskaya Gosudarstvennaya Peditricheskaya Medicinskaya Akademiya; 2006. (In Russ).]
14. Kietzman HW, Everson JL, Sulik KK, et al. The teratogenic effects of prenatal ethanol exposure are exacerbated by Sonic Hedgehog or GLI2 haploinsufficiency in the mouse. *PLoS One*. 2014 Feb 19;9(2):e89448. DOI: 10.1371/journal.pone.0089448
15. May PA, Tabachnick BG, Gossage JP, et al. Maternal factors predicting cognitive and behavioral characteristics of children with fetal alcohol spectrum disorders. *J Dev Behav Pediatr*. 2013 Jun;34(5):314–25. DOI: 10.1097/DBP.0b013e3182905587
16. Nelson E, Jodscheit K, Guo Y. Maternal passive smoking

during pregnancy and fetal developmental toxicity. Part1: gross morphological effects. *Hum Exp Toxicol*. 1999 Apr;18(4):252–256. DOI: 10.1191/096032799678840002

17. Nelson E, Goubet-Wiemers C, Guo Y, et al. Maternal passive smoking during pregnancy and foetal developmental toxicity. Part 2: histological changes. *Hum Exp Toxicol*. 1999 Apr;18(4):257–64. DOI: 10.1191/096032799678840011

18. Moustgaard A, Hau J. Induction of habits in rats by a forced-choice procedure in T-maze and the effect of pretest free exploration. *Behav Processes*. 2009;82(1):104–107. DOI: 10.1016/j.beproc.2009.04.011

19. Oliveira L, Graeff FG, Pereira SR, et al. Correlations among central serotonergic parameters and age-related emotional and cognitive changes assessed through the elevated T-maze and the Morris water maze. *Age (Dordr)*. 2010;32(2):187–96. DOI: 10.1007/s11357-009-9123-2

20. Wenk GL. Assessment of spatial memory using the T maze. *Curr Protoc Neurosci*. 2001 May;Chapter 8:Unit 8.5B. DOI: 10.1002/0471142301.ns0805bs04

21. Сравнительная психология и зоопсихология / ред. Г.В. Калыгина. СПб.: Питер, 2004. [*Sravnitel'naya psihologiya i zoopsihologiya* / Ed by GV Kalyagina. Saint-Petersburg: Piter; 2004 (In Russ).]

22. Савченко Н.М. Нормализация адаптивной реакции извлечения у крыс веществами с ноотропной активностью /

Н.М. Савченко, Р.У. Островская, Ю.В. Буров // Бюлл. эксперим. биол. и медицины. — 1988. — № 8. — С.170–172. [Savchenko NM. *Normalizaciya adaptivnoj reakcii izbavleniya u krys veshchestvami s nootropnoj aktivnost'yu* / NM Savchenko, RU Ostrovskaya, YuV Burov. *Byull. ehksperim. biol. i mediciny*. 1988;8:170–172. (In Russ).]

23. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. В двух частях. —М.: Гриф и К, 2012. Ч.1. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. V dvuh chastyah. Moscow: Grif i K, 2012. Chast' 1. (In Russ).]

24. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2009. — Т.72. — №1. — С.3–11. [Seredenin SB, Voronin MV. Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2009;72(1):3–11. (In Russ).]. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2009-72-1-3-11>

25. Разумная Ф.Г., Камилов Ф.Х., Капулер О.М. и др. К фармакологии афобазола // *Фундаментальные исследования*. — 2014. — №7 (ч. 4).— С.848–855. [Razumnaja FG, Kamilov FH, Kapuler OM, et al. To pharmacology of afobazole. *Fundamental research*. 2014;7(4):848–855. (In Russ).]. URL: <http://fundamentalresearch.ru/ru/article/view?id=34994> (дата обращения: 28.09.2018).

Влияние диклофенака натрия на уровень гистамина и серотонина при остром экссудативном воспалении

Иванова Е.А., Воронина Т.А.

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

Резюме. *Актуальность.* Диклофенак рассматривают в качестве общепризнанного эталона препарата сравнения при изучении терапевтического потенциала и безопасности нестероидных противовоспалительных средств. Механизм действия диклофенака обусловлен ингибированием двух изоферментов циклооксигеназы: циклооксигеназы-1 и циклооксигеназы-2. Однако в литературе отсутствуют данные о влиянии препарата на уровень клеточных медиаторов воспаления гистамина и серотонина. *Цель* экспериментального исследования – оценить уровень гистамина и серотонина при остром экссудативном воспалении у крыс и изучить влияние диклофенака натрия на их концентрацию. *Материалы и методы.* Исследование выполнено на самцах белых аутбредных крыс. В качестве модели острого экссудативного воспаления использовали модель уксусного перитонита, который вызывали внутрибрюшинным введением 1 % раствора уксусной кислоты. Концентрацию гистамина и серотонина в плазме крови и перитонеальном экссудате определяли флуориметрическим методом. *Результаты.* Через 3 ч после индукции воспаления в плазме крови крыс отмечено повышение уровня гистамина в 1,9 раза ($p < 0,05$) и серотонина в 3 раза ($p < 0,05$). Диклофенак натрия, вводимый перорально в дозе 6,3 мг/кг за один час до индукции воспаления, значительно уменьшал концентрацию гистамина и не влиял на концентрацию серотонина в плазме крови и не вызывал значимых изменений концентраций изучаемых медиаторов воспаления в экссудате экспериментальных животных. *Заключение.* Способность диклофенака натрия снижать повышенный при экспериментальном перитоните уровень гистамина в плазме крови может являться одним из компонентов механизма уменьшения сосудистой проницаемости и отёчности под действием препарата.

Ключевые слова: диклофенак натрия; гистамин; серотонин; уксусный перитонит; крысы

Для цитирования:

Иванова Е.А., Воронина Т.А. Влияние диклофенака натрия на уровень гистамина и серотонина при остром экссудативном воспалении у крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.12–15. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10009.

Effect of diclofenac sodium on the level of histamine and serotonin in acute exudative inflammation

Ivanova E.A., Voronina T.A.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Problem statement.* Diclofenac is considered a well-recognised reference drug in the study of the therapeutic effects and safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs. Diclofenac works by inhibiting cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2. However, no data about the effect of the drug on the level of histamine and serotonin, cellular mediators of inflammation, are available in the literature. *The aim* of this experimental study is to evaluate the level of histamine and serotonin in rats with acute exudative inflammation and to study the effect of diclofenac sodium on their concentration. *Materials and methods.* The study was performed in male outbred white rats. Peritonitis induced by intraperitoneal injection of 1 % acetic acid was used as a model of acute exudative inflammation. The concentration of histamine and serotonin in blood plasma and peritoneal exudate was determined by fluorometry. *Results.* Three hours after the acetic acid injection, the concentration of histamine in the plasma of rats was elevated by a factor of 1.9 ($p < 0.05$), and the concentration of serotonin was increased threefold ($p < 0.05$). A single oral dose of 6.3 mg/kg Diclofenac sodium was administered one hour before the onset of inflammation. The test drug significantly reduced histamine levels in the plasma of rats with acute exudative inflammation but had no effect on serotonin levels. Diclofenac sodium did not change the concentration of the inflammatory mediators in the exudate of animals with the experimental pathology. *Conclusion.* The ability of diclofenac sodium to reduce elevated histamine levels in the plasma of rats with experimental peritonitis may be one of the components of the mechanism by which this drug reduces vascular permeability and swelling.

Keywords: diclofenac sodium; histamine; serotonin; acetic acid-induced peritonitis; rats

For citations:

Ivanova E.A., Voronina T.A. Effect of diclofenac sodium on the level of histamine and serotonin in rats with acute exudative inflammation. *Farmakogenetika i farmakogenomika*. 2018;2:12–15. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10009.

Введение

Диклофенак является «золотым стандартом» эффективности нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) – ингибиторов циклооксигеназы (ЦОГ), и его рассматривают в качестве общепризнанного эталона препарата сравнения при изучении тера-

певтического потенциала и безопасности лекарств этой фармакотерапевтической группы [1, 2]. Результаты многочисленных рандомизированных контролируемых исследований показали, что ни один из существующих НПВС не превосходит по лечебному действию диклофенак [1]. Механизм действия диклофенака обусловлен ингибированием двух изоферментов ЦОГ: ЦОГ-1

и ЦОГ-2 [1, 2]. Кроме того, у препарата зафиксирована способность снижать уровень интерлейкина-1 β у пациентов с остеоартрозом коленного сустава, у которых концентрация этого интерлейкина в крови была повышена [3]. В экспериментальных исследованиях показано, что диклофенак уменьшает уровень продукта перекисного окисления липидов малонового диальдегида в плазме крови крыс с отёком лапы, вызванным подкожным введением 1 % раствора каррагенана [4], и в перитонеальном экссудате мышей с гликогеновым перитонитом [5] и снижает стимулированную хемоаттрактантами адгезию и индуцированную каррагенаном миграцию лейкоцитов [6]. Однако на сегодняшний день остаётся не изученным влияние препарата на уровень клеточных медиаторов воспаления гистамина и серотонина в качестве компонента его механизма действия. Гистамин и серотонин — биогенные амины, которые выделяются в процессе дегрануляции тучных клеток при воспалении. Оба биогенных амина увеличивают проницаемость сосудистой стенки и циркуляцию лейкоцитов [7, 8]. Серотонин усиливает агрегацию тромбоцитов и при остром воспалении способствует скоплению нейтрофилов в тканях [7, 9]. Оба биогенных амина являются медиаторами ранней фазы воспаления, обуславливая развитие отёчности, что используется для моделирования гистаминового и серотонинового отёков лап у крыс [10–12].

Целью настоящего экспериментального исследования является оценка уровня клеточных медиаторов воспаления гистамина и серотонина при остром экссудативном воспалении у крыс — укусном перитоните и изучение влияния НПВС диклофенака натрия на их концентрацию.

Материалы и методы

Исследования выполнены на самцах белых аутбредных крыс массой 180–200 г, полученных из питомника Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБМТ» ФМБА России (Московская область). Крысы содержались в стандартных условиях вивария при свободном доступе к корму и воде при 12-часовом световом режиме. Содержание животных осуществлялось в соответствии с нормативным документом СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Организация и проведение работы выполнялись в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» от 18 марта 1986 г. (Страсбург).

Экспериментальные животные были разделены на следующие группы, по 6 животных в каждой. 1. Контрольные животные — интактные крысы. 2. Крысы с укусным перитонитом. 3. Крысы с укусным перитонитом, которым за 1 ч до индукции воспаления перорально вводили диклофенак натрия в дозе 6,3 мг/кг. Выбор дозы и способа введения диклофенака натрия обусловлены тем, что ранее было установлено, что изучаемый препарат при таком режиме введения оказывает выраженное противовоспалительное действие, подавляя экссудативную реакцию у крыс с отёком лапы на 40 % [13].

Перитонит у крыс вызывали внутрибрюшинным введением 1 % раствора уксусной кислоты (в физиологическом растворе) из расчёта 1 мл раствора на 100 г массы тела [14]. Через 3 ч в срок, рекомендуемый действующими «Методическими рекомендациями по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств» для оценки выраженности экссудации после введения раствора уксусной кислоты [14], крыс подвергали эвтаназии методом декапитации и собирали кровь. В пробирку с кровью добавляли раствор ЭДТА для предотвращения свёртывания крови и затем кровь подвергали центрифугированию для получения плазмы. Кроме того, у животных с укусным перитонитом собирали экссудат из брюшной полости.

Определение содержания гистамина и серотонина в плазме крови и перитонеальном экссудате проводилось методом, основанным на измерении флуоресценции продуктов конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом, серотонина с нингидрином по методике Прошиной Л.Я. [15, 16]. Концентрация гистамина и серотонина выражалась в мкг/мл.

Статистическую обработку проводили в программе «Биостатистика» с помощью критерия Манна–Уитни. Результаты представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего. Различия между группами считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В настоящем исследовании установлено, что у крыс с укусным перитонитом через 3 ч после индукции воспаления в плазме крови, повышалась концентрация гистамина и серотонина, соответственно, в 1,9 и в 3 раза по сравнению с группой интактных животных (табл. 1). Гистамин увеличивает сосудистую проницаемость и гидростатическое давление, способствует скоплению аллогенов в очаге воспаления, а под влиянием аллогенов при укусном перитоните у грызунов развивается висцеральная болевая реакция, которая проявляется характерными изгибами тела — «корчами». Известно, что при перитоните активизируются

Таблица 1

Влияние диклофенака натрия при пероральном введении на концентрацию гистамина и серотонина в плазме крови крыс с укусным перитонитом

Группа	Концентрация биогенных аминов, мкг/мл	
	Гистамин	Серотонин
Контроль, интактные животные	0,076 ± 0,008	0,100 ± 0,020
Укусный перитонит, 1 % раствор уксусной кислоты внутрибрюшинно	0,141 ± 0,020*	0,300 ± 0,040*
Диклофенак натрия, 6,3 мг/кг перорально + 1 % раствор уксусной кислоты внутрибрюшинно	0,093 ± 0,001#	0,300 ± 0,060*

Примечания: * — достоверно относительно группы «Контроль, интактные животные», $p < 0,05$; # — достоверно относительно группы «Укусный перитонит, 1 % раствор уксусной кислоты внутрибрюшинно», $p < 0,05$.

Таблица 2

Влияние диклофенака натрия при пероральном введении на концентрацию гистамина и серотонина в перитонеальном экссудате крыс с укусным перитонитом

Группа	Концентрация биогенных аминов, мкг/мл	
	Гистамин	Серотонин
Укусный перитонит, 1 % раствор уксусной кислоты внутрибрюшинно	0,087 ± 0,001	0,021 ± 0,005
Диклофенак натрия, 6,3 мг/кг перорально + 1 % раствор уксусной кислоты внутрибрюшинно	0,083 ± 0,004	0,019 ± 0,003

нейтрофильный и макрофагальный компоненты естественной неспецифической защиты организма [17], и, вероятно, повышение уровня серотонина при укусном перитоните у крыс способствует этому за счёт воздействия на нейтрофильный компонент.

Диклофенак натрия достоверно снижал концентрацию гистамина в плазме крови крыс с укусным перитонитом на 34,0 % по сравнению с уровнем этого биогенного амина в плазме крови животных с экспериментальной моделью воспаления, не получавших препарат (табл. 1). При этом диклофенак натрия не оказывал влияния на концентрацию серотонина в плазме крови и перитонеальном экссудате и гистамина в перитонеальном экссудате крыс с укусным перитонитом через 3 ч после индукции воспаления (табл. 2).

Заключение

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в плазме крови крыс с экспериментальным перитонитом через 3 ч после индукции воспаления внутрибрюшинным введением 1 % раствора уксусной кислоты наблюдается повышение концентрации гистамина в 1,9 раза и серотонина в 3 раза по сравнению с группой интактных животных. Диклофенак натрия при однократном пероральном введении крысам в дозе 6,3 мг/кг достоверно снижает повышенный при воспалении уровень гистамина в плазме крови животных с укусным перитонитом, но не оказывает влияния на концентрацию серотонина. Способность диклофенака натрия снижать повышенный при экспериментальном перитоните уровень клеточного медиатора воспаления гистамина в плазме крови может являться одним из компонентов механизма уменьшения сосудистой проницаемости и отёчности под действием препарата.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Иванова Елена Анатольевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: iwanowaea@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-4961-2051

SPIN-код: 5005-0337

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

Воронина Татьяна Александровна

SPIN-код: 5766-3452

д. м. н., профессор, заведующая лабораторией психофармакологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова», Москва

Ivanova Elena

Corresponding author

e-mail: iwanowaea@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-4961-2051

SPIN code: 5005-0337

Senior Research Officer FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Voronina Tatyana

SPIN code: 5766-3452

Doctor of Medical Sciences, Professor, Head of the Laboratory of Psychopharmacology, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Каратеев А.Е., Яхно Н.Н., Лазебник Л.Б., и др. *Применение нестероидных противовоспалительных препаратов*. Клинические рекомендации. — М.: ООО «ИМА-ПРЕСС»; 2009. [Karateev AE, Yahno NN, Lazebnik LB, et al. *Primenenie nesteroidnykh protivovospalitel'nykh preparatov*. Klinicheskie rekomendacii. Moscow: ООО «ИМА-ПРЕСС»; 2009. (In Russ).]
2. Насонова В.А. Вольтарен (диклофенак натрия) в ревматологии в начале XXI века // *ПМЖ*. — 2004. — №12(6). — С.392–395. [Nasonova VA. Voltaren® (diclofenac sodium) in rheumatology at the beginning of the 21st century. *RMJ*. 2004;12(6):392–395. (In Russ).]
3. Gonzalez E, de la Cruz C, de Nicolas R, et al. Long-term effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the production of cytokines and other inflammatory mediators by blood cells of patients with osteoarthritis. *Agents Actions*. 1994;41(3-4):171–178.
4. Abbas SS, Schaalan MF, Bahgat AK, et al. Possible potentiation by certain antioxidants of the anti-inflammatory effects of diclofenac in rats. *ScientificWorldJournal*. 2014 Mar 12;2014:731462. DOI: 10.1155/2014/731462
5. Матюшкин А.И., Иванова Е.А., Золотов Н.Н., Воронина Т.А. *Влияние гимантана и диклофенака натрия на уровень продуктов перекисного окисления липидов в воспалительном выпоте у мышей с экспериментальным перитонитом*. Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П. Павлова, 18–22 сентября 2017; — Воронеж: Издательство «ИСТОКИ»; 2017. [Matyushkin AI, Ivanova EA, Zolotov NN, Voronina TA. *Vliyanie gimantana i diklofenaka natriya na uroven' produktov perekisnogo okisleniya lipidov v vospalitel'nom vypote u myshey s ehksperimental'nyim peritonitom*. Materialy XXIII s'ezda fiziologicheskogo obshchestva im. I.P. Pavlova, 18–22 September 2017; Voronezh: Izdatel'stvo «ISTOKI»; 2017. (In Russ).]
6. Martinez LL, Aparecida De Oliveira M, Fortes ZB. Influence of verapamil and diclofenac on leukocyte migration in rats. *Hypertension*. 1999 Oct;34(4 Pt 2):997–1001.
7. Парийская Е.Н., Ерофеев Н.П. *Физиология эндокринной системы*. — СПб.: СпецЛит; 2013. [Parijskaya EN, Erofeev NP. *Fiziologiya ehndokrinnoj sistemy*. Saint-Petersburg: SpecLit; 2013. (In Russ).]
8. Сологуб Т.В., Романцова М.Г., Кремень Н.В., и др. *Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты)*. Учебное пособие для врачей. — М.: Академия Естествознания; 2008. [Sologub TV, Romancova MG, Kremen' NV, et al. *Svobodnoradikal'nye processy i vospalenie (patogeneticheskie, klinicheskie i terapevticheskie aspekty)*. Uchebnoe posobie dlya vrachej. Moscow: Akademiya Estestvoznaniya; 2008. (In Russ).]
9. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, et al. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood*. 2013 Feb 7;121(6):1008–15. DOI: 10.1182/blood-2012-06-437392
10. Arya S, Kumar VL. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of Calotropis procera against different mediators of inflammation. *Mediators Inflamm*. 2005 Aug 31;2005(4):228–32.
11. Gupta M, Mazumder UK, Gomathi P, et al. Antiinflammatory evaluation of leaves of Plumeria acuminata. *BMC Complement Altern Med*. 2006 Nov 2;6:36. DOI: 10.1186/1472-6882-6-36
12. Yong YK, Sulaiman N, Hakim MN, et al. Suppressions of serotonin-induced increased vascular permeability and leukocyte infiltration by Bixa orellana leaf extract. *Biomed Res Int*. 2013;2013:463145. DOI: 10.1155/2013/463145
13. Никитченко Е.А., Федоров В.Н., Красников С.В., Обухова Т.А. Изучение фармакологических свойств производных адамантилбензоиламинокислоты // *Фармация*. — 2007. — №8. — С.37–38. [Nikitchenko EA, Fedorov VN, Krasnikov SV, Obukhova TA. Investigation of the pharmacological properties of adamantylbenzoylamino acid derivatives. *Pharmacy*. 2007;8:37–38. (In Russ).]
14. Шварц Г.Я., Сюбаев Р.Д. Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. А.Н. Миронова. — М.: Гриф и К; 2012. — С.746–758. [Schwartz GYa, Syubaev RD. Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniyu nesteroidnykh protivovospalitel'nykh lekarstvennykh sredstv. Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Part one. / Ed by AN Mironova. Moscow: Grif i K; 2012. p. 746–758. (In Russ).]
15. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина; 1987. [Laboratornye metody issledovaniya v klinike: Spravochnik / Ed by V.V. Menshikov. Moscow: Medicina; 1987. (In Russ).]
16. Мешерякова С.А., Герасимова Ц.И. Определение серотонина и гистамина в одной пробе // *Лабораторное дело*. — 1974. — Т.11. — С.670–672. [Meshcheryakova SA, Gerasimova CI. Opredelenie serotoninina i gistamina v odnoj probe. *Laboratornoe delo*. 1974;11:670–672. (In Russ).]
17. Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., и др. Исследование противовоспалительных свойств глипролинов на экспериментальной модели острого перитонита у крыс // *Цитокины и воспаление*. — 2008. — Т.7, №2. — С.28–32. [Bakaeva ZV, Samonina GE, Umarova BA, et al. A study of anti-inflammatory properties of glyprolines using experimental model of the acute peritonitis in rats. *Cytokines and inflammation*. 2008;7(2):28–32. (In Russ).]

Противоишемические свойства агониста TrkA-рецепторов миметика 4-ой петли фактора роста нервов

Пекельдина Е.С., Ионова Е.О., Мирошкина И.А., Сорокина А.В.,
Столярук В.Н., Цорин И.Б., Гудашева Т.А., Крыжановский С.А.

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

Резюме. *Актуальность.* Одной из актуальных проблем, стоящих перед современной медицинской наукой, является изучение механизмов и поиск эффективных способов активации неоваскуляризации тканей. Возможным подходом к решению этой проблемы является использование агонистов TrkA-рецепторов для активации ангиогенеза и, как следствие этого, улучшение васкуляризации ишемизированных тканей. *Целью* данного исследования явилось изучение ангиогенной и противоишемической активности агониста TrkA-рецепторов дипептидного миметика 4-ой петли фактора роста нервов соединения GK-2. *Методы.* Эксперименты проводили на моделях ишемии задней конечности и инфаркта миокарда у крыс. Соединение GK-2 (1 мг/кг) вводили внутривентриально на протяжении 14 дней. Оценку изучаемых эффектов проводили с использованием световой микроскопии и двухмерной эхокардиографии. *Результаты.* На модели ишемии задней конечности крыс показано, что GK-2 (1 мг/кг, в/б) значительно усиливает васкуляризацию ишемизированной икроножной мышцы. Индекс васкуляризации ишемизированной ткани у животных, получавших соединение GK-2, был практически в 2 раза выше, чем в контроле – 27794 (25218 ± 5941) и 14725 (9030 ± 19630), соответственно ($p < 0,001$). По данным световой микроскопии изучаемое вещество уменьшает интенсивность повреждения ткани. В условиях экспериментального инфаркта миокарда соединение GK-2 уменьшает интенсивность патологического ремоделирования левого желудочка сердца. *Заключение.* Можно полагать, что антиишемический эффект GK-2 связан с усилением васкуляризации поражённой ткани, т. е. со стимуляцией ангиогенеза.

Ключевые слова: фактор роста нервов; соединение GK-2; TrkA-рецепторы; инфаркт миокарда; ишемия задних конечностей; ангиогенез; антиишемическая активность

Для цитирования:

Пекельдина Е.С., Ионова Е.О., Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Столярук В.Н., Цорин И.Б., Гудашева Т.А., Крыжановский С.А. Противоишемические свойства агониста TrkA-рецепторов миметика 4-ой петли фактора роста нервов // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.16–21. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10010.

Antischematic properties of the TrkA-receptor agonist, the nerve growth factor 4th loop mimetic

Pekeldina E.S., Ionova E.O., Mirochkina I.A., Sorokina A.V., Stolyaruk V.N.,
Tsorin I.B., Gudacheva T.A., Kryzhanovskii S.A.

FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Relevance.* One of the actual problems facing modern medical science is the study of mechanisms and the search for effective ways to activate tissue neovascularization. A possible approach to the decision of this problem is the use of TrkA receptor agonists to activate angiogenesis and, as a consequence, improve the vascularization of ischemic tissues. *The aim* of this investigation was to study the angiogenic and antischematic activity of the TrkA receptor agonist the nerve growth factor 4th loop dipeptide mimetic the GK-2 compound. *Methods.* Experiments were performed on models of hind limb ischemia and myocardial infarction in rats. The compound GK-2 (1 mg/kg) was administered intraperitoneally for 14 days. Effects were evaluated using light microscopy and two-dimensional echocardiography. *Results.* In the model of the hindlimb ischemia in rats, it was shown that GK-2 (1 mg/kg, i.p.) significantly enhances the vascularization of the ischemic sural muscle. The vascularization index of ischemic tissue in animals treated with GK-2 was almost 2 times higher than in control – 27794 (25218 ± 35941) and 14725 (9030 ± 19630), respectively ($p < 0.001$). According to light microscopy, the studied compound reduces the intensity of tissue damage. Under conditions of experimental myocardial infarction, the GK-2 compound reduces the pathological remodeling intensity of the heart left ventricle. *Conclusion.* It can be assumed that the antischematic effect of GK-2 is associated with increased vascularization of the affected tissue, i.e. with the stimulation of angiogenesis.

Keywords: nerve growth factor; GK-2 compound; TrkA receptors; myocardial infarction; hind limb ischaemia; angiogenesis; antischematic activity

For citations:

Pekeldina ES, Ionova EO, Mirochkina IA, Sorokina AV, Stolyaruk VN, Tsorin IB, Gudacheva TA, Kryzhanovskii SA. Antischematic properties of the TrkA-receptor agonist, the nerve growth factor 4th loop mimetic. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:16–21. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10010.

Введение

Фактор роста нервов (nerve growth factor — NGF) относится к семейству регуляторных белков — нейротрофинов, принимающих участие в регуляции процессов пролиферации, дифференциации и миелинизации, а также поддержании функциональной активности центральных и периферических нейронов. Помимо этого, нейротрофины, и, в частности NGF, играют важную роль в образовании синапсов и регуляции синаптической пластичности [1, 2]. Исторически NGF и его предшественник proNGF рассматривались как одни из основных регуляторов нейрональной функции. Однако в настоящее время накоплен большой экспериментальный материал, свидетельствующий о том, что биологическая роль NGF существенно шире и обусловлена его способностью регулировать процессы выживания клетки, апоптоза, клеточной пролиферации, воспаления, ангиогенеза и ремоделирования тканей [3]. В частности, показано, что NGF является одним из ключевых эндогенных регуляторов ангиогенеза и, помимо ЦНС, синтезируется и экскретируется эндотелиальными и гладкомышечными клетками сосудов, а на их клеточной мембране представлены специфичные для NGF TrkA-рецепторы [4, 5], посредством взаимодействия с которыми NGF реализует свои ангиогенные эффекты.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» в течение многих лет проводятся фундаментальные исследования по созданию и фармакологическому изучению биологически активных замещённых низкомолекулярных миметиков NGF. В результате этих исследований было синтезировано дипептидное соединение ГК-2, являющееся агонистом TrkA-рецепторов [6, 7]. Ранее нами в экспериментах *in vitro*, выполненных на культуре эндотелиальных клеток человека HUVEC, было показано, что соединение ГК-2 стимулирует первичную стадию ангиогенеза — тубулогенез, т. е. стимулирует рост и ветвление сосудов посредством активации TrkA-рецепторов [8]. Логично предположить, что, обладая такими свойствами, соединение ГК-2 может оказаться эффективным при лечении больных с различными ишемическими состояниями, так как, стимулируя ангиогенез, оно может улучшать перфузию ишемизированных тканей с помощью усиления естественных, но недостаточных в критических ситуациях, процессов неоваскуляризации тканей. Такой подход к терапии известен и носит название «терапевтический ангиогенез» или «биологическое шунтирование» [9, 10]. «Терапевтический ангиогенез» может использоваться для лечения практически любых ишемических состояний, но наиболее целесообразен у пациентов, у которых невозможно проведение хирургического лечения.

Цель исследования

Целью данного исследования явилось изучение противоишемических свойств дипептидного миметика 4-ой петли NGF — соединения ГК-2 на моделях ишемии задней конечности и инфаркта миокарда у крыс.

Материалы и методы

Животные

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 180–200 г, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБНУ «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утвержденными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Изучение влияния соединения ГК-2 на ишемическое повреждение икроножной мышцы

Животных рандомизировали на 2 группы: контрольную ($n = 18$) и основную ($n = 17$). Ишемию задних конечностей у анестезированных крыс (тиопентал натрия, 50 мг/кг, в/б) вызывали путём одномоментной резекции участка бедренной артерии, после чего рану послойно ушивали. Соединение ГК-2 (1 мг/кг) вводили внутривентрально в течение 14 дней от момента резекции бедренной артерии. Первую инъекцию осуществляли через 1 ч после окончания операции. Контрольным животным по аналогичной схеме внутривентрально вводили 0,3 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Через сутки после последней инъекции животных забивали и извлекали икроножную мышцу из ишемизированной конечности. Для оценки интенсивности некробиотических процессов, протекающих в ишемизированной икроножной мышце, использовали световую микроскопию, для чего мышцу фиксировали в 10 % нейтральном растворе формалина, при помощи замора-

живающего микроотома изготавливали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилин-эозином по стандартной методике. Для визуализации капилляров использовали синьку Эванса. Для каждого поля зрения рассчитывали суммарную длину сосудов и их количество в мм². О степени васкуляризации судили по величине индекса васкуляризации, за который принимали произведение длины капилляров и их количества в 1 мм² ишемизированной ткани. Полученную величину выражали в условных единицах — у. е.

Статистическую значимость изменений, вызываемых соединением ГК-2, определяли с помощью критерия Манна–Уитни. Результаты выражали в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Изучение влияния вещества ГК-2 на ремоделирование сердца в условиях 14-суточного экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ)

Эксперименты проводили на модели инфаркта миокарда у крыс, который воспроизводили по Селье [11]. Животных рандомизировали на две группы: 1-я ($n = 13$) — контроль, 2-я ($n = 10$) — животные, получавшие соединение ГК-2 (1 мг/кг/сут., в/б) ежедневно в течение 14 дней, первая инъекция через 60 мин после окончания оперативного вмешательства. Животные контрольной группы по аналогичной схеме получали 0,3 мл стерильного изотонического раствора натрия хлорида.

Через 7 и 14 дней после воспроизведения ЭИМ у животных с помощью эхокардиографии оценивали геометрию и сократительную функцию сердца. Измерения производили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический (КСР) и конечно-диастолический (КДР) размеры левого желудочка сердца, затем по методу Teichholz рассчитывали такие показатели насосной функции сердца, как фракция выброса (ФВ) и фракция укорочения (ФУ). Измерения проводили, как минимум, по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения производили в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [12]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц).

Статистическая обработка полученных данных. Нормальность распределения полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка; гомогенность дисперсий с помощью критерия Левена. Так как распределение данных не отличалось от нормального, а дисперсии выборок были равны, то для

определения значимости различий между выборками использовали t-критерия Стьюдента. Полученные данные выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

Анализ результатов, полученных в экспериментах на модели ишемии задних конечностей у крыс, показал, что у животных, получавших соединение ГК-2, суммарная длина капиллярного русла статистически значимо больше ($p = 0,003$), чем у контрольных животных: 19531 ($16085 \div 24511$) и 14456 ($10901 \div 17404$) мкм/мм², соответственно. Количество сосудов в 1 мм² ишемизированной ткани у животных, получавших соединение ГК-2, также было статистически значимо больше ($p < 0,001$), чем в контроле: 70 ($70 \div 78$) и 53 ($50 \div 57$), соответственно. Математический анализ полученных результатов свидетельствует о том, что интенсивность васкуляризации ишемизированной ткани у животных, получавших соединение ГК-2, практически в 2 раза выше, чем в контроле — индекс васкуляризации 27794 ($25218 \div 35941$) и 14725 ($9030 \div 19630$), соответственно ($p < 0,001$). Полученные данные позволяют говорить о наличии у соединения ГК-2 ангиогенной/антиишемической активности, что подтверждается и результатами световой микроскопии. У контрольных животных основу ткани составляет некробиотически изменённая мышца с участками восковидного некроза. Саркоплазма ярко окрашена, гомогенна, поперечная исчерченность отсутствует (рис. 1А). Отмечается большое количество воспалительных инфильтратов. Ядра поперечнополосатых мышц мелкие, гиперхромные или отсутствуют. Сосуды полнокровны, околососудистый отёк хорошо выражен, капилляры извитые, мелкие, тонкие, плохо различимы. Таким образом, в результате удаления участка бедренной артерии в икроножной мышце развиваются выраженные некротические и некробиотические изменения, сопровождающиеся воспалительной реакцией и расстройством кровообращения. У животных, получавших соединение ГК-2, микроскопическая картина икроножной мышцы существенно отличается от таковой в контроле — интенсивность альтеративных процессов в мышце этих крыс менее выражена, количество и размер участков восковидного некроза значимо меньше, чем у контрольных крыс. Площадь воспалительных инфильтратов незначительна. У леченых животных, в отличие от контрольных, эндотелий сосудов чётко выражен. Поперечная исчерченность скелетной мускулатуры сохранена. Капиллярная сеть хорошо различима, капилляры идут прямо и располагаются вдоль мышечных волокон (рис. 1Б).

Таким образом, агонист TrkA — соединение ГК-2 в

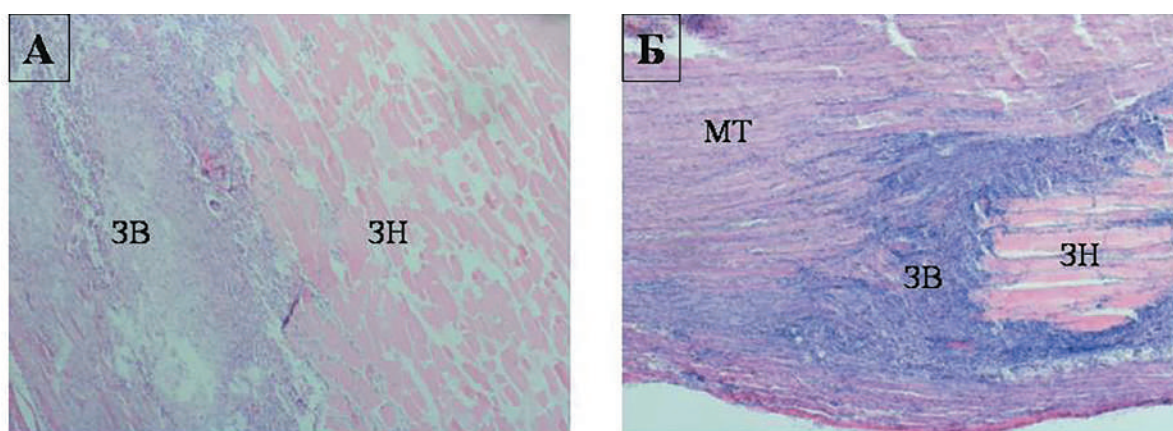


Рис. 1. Морфологическая картина икроножной мышцы крысы. Данные световой микроскопии. Увеличение 4×10 : А – контроль, Б – ГК-2 (1 мг/кг/сут., в/б, 14 дней)

Примечания: ЗВ – зона воспаления, ЗН – зона некроза; МТ – мышечная ткань.

условиях экспериментальной ишемии нижней конечности у крыс проявляет выраженную ангиогенную и противоишемическую активность. Можно полагать, что антиишемический эффект данного вещества связан с его способностью стимулировать неоангиогенез в повреждённой икроножной мышце.

В следующей серии экспериментов, выполненной на модели острой ишемии миокарда у крыс, воспроизведённой по методу Селье [11], при помощи эхокардиографии в динамике оценивали влияние соединения ГК-2 на интенсивность раннего постинфарктного ремоделирования левого желудочка сердца.

Анализ полученных данных показал, что у животных контрольной группы наблюдалась динамическая дилатация полостей левого желудочка сердца (табли-

ца). Так, например, в период с 7-го по 14-й день от момента коронарной окклюзии КСР левого желудочка сердца увеличился на $+0,52 \pm 0,16$ мм, соответственно, $3,67 \pm 0,23$ и $3,16 \pm 0,18$ мм, тогда как у животных, получавших соединение ГК-2, этот показатель практически не изменился и составлял, соответственно, $3,57 \pm 0,15$ и $3,54 \pm 0,16$ мм ($+0,03 \pm 0,13$ мм, $p \approx 0,0037$ по отношению к контрольной серии экспериментов). Аналогичная динамика отмечена и в отношении КДР (соответственно $+0,76 \pm 0,20$ и $+0,03 \pm 0,17$ мм, $p \approx 0,012$).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что соединение ГК-2 на модели острого инфаркта миокарда у крыс препятствует развитию постинфарктного ремоделирования левого желудочка сердца и, как следствие этого, последующему развитию

Таблица

Изменения показателей кардиогемодинамики крыс под влиянием соединения ГК-2 в условиях 2-недельного экспериментального инфаркта миокарда (ЭИМ)

Показатель	Группа	Время после воспроизведения ЭИМ		Изменения с 1-й до конца 2-й недели
		1 неделя	2 неделя	
КСР, мм	Контроль, $n = 13$	$3,16 \pm 0,18$	$3,67 \pm 0,23$	$+0,52 \pm 0,16$
	ГК-2, $n = 10$	$3,54 \pm 0,16$	$3,57 \pm 0,15$	$+0,03 \pm 0,13$ $p \approx 0,037$
КДР, мм	Контроль, $n = 13$	$4,41 \pm 0,22$	$5,18 \pm 0,28$	$+0,76 \pm 0,20$
	ГК-2, $n = 10$	$4,82 \pm 0,18$	$4,86 \pm 0,19$	$+0,03 \pm 0,17$ $p \approx 0,012$
ФУ, %	Контроль, $n = 13$	$28,4 \pm 2,0$	$28,8 \pm 2,1$	$+0,4 \pm 2,6$
	ГК-2, $n = 10$	$26,6 \pm 1,5$	$26,1 \pm 2,0$	$-0,4 \pm 1,1$ $p \approx 0,796$
ФВ, %	Контроль, $n = 13$	$60,7 \pm 3,0$	$60,9 \pm 2,9$	$+0,2 \pm 3,5$
	ГК-2, $n = 10$	$58,2 \pm 2,4$	$57,1 \pm 3,3$	$-1,1 \pm 1,9$ $p \approx 0,764$

Примечания: указаны средние арифметические значения и их стандартные ошибки; p – по отношению к контролю.

хронической сердечной недостаточности. Механизм, лежащий в основе этого феномена, в настоящее время не известен, однако есть все основания полагать, что он может быть обусловлен способностью соединения стимулировать образование капилляров в периинфарктной зоне и тем самым в той или иной мере устранять дефицит кровоснабжения сердечной мышцы.

Заключение

Таким образом, соединение ГК-2, являющееся дипептидным миметиком 4-й петли NGF и также как и прототип NGF реализующее свои ангиогенные эффекты посредством стимуляции TrkA-рецепторов,

расположенных на клеточной мембране эндотелиальных и гладкомышечных клеток сосудов, в модельных экспериментах, воспроизводящих ишемию задней конечности и инфаркт миокарда у крыс, оказывает значимое противоишемическое действие. Учитывая тот факт, что соединение ГК-2 стимулирует рост и ветвление кровеносных сосудов, можно полагать, что его антиишемическое действие является следствием его ангиогенной активности. Полученные данные позволяют говорить о перспективности дальнейшего доклинического изучения соединения ГК-2 в плане создания оригинального инновационного лекарственного средства, способного восстанавливать кровоснабжение ишемизированных тканей.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

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

Kryzhanovskii Sergey

Corresponding author

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, head of the laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Пекельдина Евгения Сергеевна

SPIN-код: 3225-9216

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

Pekeldina Evgeniya

SPIN code: 3225-9216

Research Officer, head of the laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Ионова Екатерина Олеговна

ORCID ID: 0000-0003-0154-722X

SPIN-код: 5042-1952

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

Ionova Ekaterina

ORCID ID: 0000-0003-0154-722X

SPIN code: 5042-1952

Junior researcher, laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Мирошкина Ирина Александровна

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-код: 4697-7938

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

Mirochkina Irina

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research Officer, laboratory of drug toxicology, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Сорокина Александра Валериановна

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

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

Sorokina Aleksandra

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

Candidate of Biological Sciences, leading researcher, laboratory of drug toxicology, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Столярук Валерий Николаевич

ORCID ID: 0000-0002-4779-427X

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

Цорин Иосиф Борисович

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

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

Гудашева Татьяна Александровна

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN-код: 4970-0006

д. б. н., руководитель отдела, отдел химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Stolyaruk Valeriy

ORCID ID: 0000-0002-4779-427X

Candidate of Medical Sciences, senior researcher, laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Tsorin Iosif

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Doctor of Biological Sciences, leading researcher, laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Gudacheva Tatiana

ORCID ID: 0000-0002-5185-4474

SPIN code: 4970-0006

Doctor of Biological Sciences, head of Department, Department of drug chemistry, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Poo MM. Neurotrophins as synaptic modulators. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jan;2(1):24–32. DOI: 10.1038/35049004
2. Bradshaw RA, Pundavela J, Biarc J, et al. NGF and proNGF: Regulation of neuronal and neoplastic responses through receptor signaling. *Adv Biol Regul.* 2015 May;58:16–27. DOI: 10.1016/j.jbior.2014.11.003
3. Schenck K, Schreurs O, Hayashi K, Helgeland K. The role of nerve growth factor (NGF) and its precursor forms in oral wound healing. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 11;18(2). pii: E386. DOI: 10.3390/ijms18020386
4. Saygili E, Kluttig R, Rana OR, et al. Age-related regional differences in cardiac nerve growth factor expression. *Age (Dordr).* 2012 Jun;34(3):659–67. DOI: 10.1007/s11357-011-9262-0
5. Retamales-Ortega R, Orystica L, Vera C, et al. Role of nerve growth factor (NGF) and miRNAs in epithelial ovarian cancer. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 26;18(3). pii: E507. DOI: 10.3390/ijms18030507
6. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Константинопольский М.А., и др. Оригинальный дипептидный миметик фактора роста нервов ГК-2 избирательно активирует пострецепторные пути TrkA, не вызывая побочных действий полноразмерного нейротрофина // *ДАН.* — 2014. — Т. 456. — №2. — С.231–235. [Gudasheva TA, Antipova TA, Konstantinopolsky MA, et al. Nerve growth factor novel dipeptide mimetic GK-2 selectively activates TrkA postreceptor signaling pathways and does not cause adverse effects of native neurotrophin. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2014;456(2):231–235. (In Russ).] DOI: 10.7868/S0869565214140254
7. Гудашева Т.А., Антипова Т.А., Середенин С.Б. Новые низкомолекулярные миметики фактора роста нервов // *ДАН.* — 2010. — Т.434. — №4. — С.549–552. [Gudasheva TA, Antipova TA, Seredenin SB. Novel low-molecular-weight mimetics of the nerve growth factor. *Doklady Biochemistry and Biophysics.* 2010;434(4):549–552. (In Russ).]
8. Крыжановский С.А., Антипова Т.А., Цорин И.Б., и др. Ангиогенные эффекты димерного дипептидного миметика четвертой петли фактора роста нервов // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* — 2016. — Т.161. — №4. — С.503–507. [Kryzhanovskii SA, Antipova TA, Tsorin IB, et al. Angiogenic effects of dimeric dipeptide mimetic of loop 4 of nerve growth factor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* 2016;161(4):503–507. (In Russ).]
9. Парфенова Е.В., Ткачук В.А. Терапевтический ангиогенез: достижения, проблемы, перспективы // *Кардиологический вестник.* — 2007. — Т.2. — №2. — С.5–15. [Parfenova EV, Tkachuk VA. Therapeutic angiogenesis: advances, problems, prospects. *Cardiological bulletin.* 2007;2(2):5–15. (In Russ).]
10. Ko SH, Bandyk DF. Therapeutic angiogenesis for critical limb ischemia. *Semin Vasc Surg.* 2014 Mar;27(1):23–31. DOI: 10.1053/j.semvasc.2014.10.001
11. Selye AI, Bajusz E, Grasso S, Mendell B. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology.* 1960 Oct;11:398–407. DOI: 10.1177/000331976001100505
12. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ. Recommendations for chamber quantification: A report from the American Society of Echocardiography's guidelines and standards committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *Journal of the American Society of Echocardiography.* 2005;18:1440–1463. DOI: 10.1016/j.echo.2005.10.005

Влияние габапентина и этанола на электрическую активность нейронов коры головного мозга крыс Wistar

Колик Л.Г., Кожечкин С.Н.

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

Резюме. *Актуальность.* Поиск средств для лечения алкоголизма сегодня сосредоточен вокруг веществ с противосудорожным действием, которые не только купируют судорожный синдром, но также способствуют продлению периода ремиссии при отмене алкоголя. Несмотря на успешный опыт применения при терапии алкоголизма структурного аналога тормозного медиатора ГАМК габапентина, отсутствуют убедительные доказательства взаимодействия препарата с ГАМК-ергической системой мозга, и большинство результатов получены в опытах *in vitro*. *Цель.* Изучение механизма центрального действия габапентина и его взаимодействия с этанолом с помощью электрофизиологических методов в опытах *in vivo*. *Методы.* С помощью микроэлектродной техники исследовано влияние габапентина на электрическую активность нейронов фронтальной коры мозга крыс-самцов линии Wistar. *Результаты.* Габапентин при системном введении в дозах 25–100 мг/кг, в/б, дозозависимо уменьшал частоту потенциалов действия (ПД) нейронов, не изменяя амплитуды и формы ПД нейронов. При микроионофоретическом подведении препарат уменьшал частоту ПД у 15 из 23 нейронов ($p < 0,05$), а также увеличивал ГАМК-индуцированное торможение импульсной электрической активности нейронов фронтальной коры. При одновременном электрофоретическом подведении к мембране нейронов габапентина и этанола показано отсутствие влияния препарата на величину ответов возбуждающего типа на этанол, однако ответы тормозящего типа, вызываемые этанолом, увеличивались ($p < 0,05$) у всех 45 исследованных клеток. *Заключение.* Полученные данные позволяют предположить, что габапентин оказывает аллостерическое влияние на постсинаптические ГАМК-рецепторы и увеличивает индуцированное этанолом торможение нейронов фронтальной коры головного мозга.

Ключевые слова: габапентин; ГАМК; этанол; нейроны; кора головного мозга; микроэлектрофорез; крысы Wistar

Для цитирования:

Колик Л.Г., Кожечкин С.Н. Влияние габапентина и этанола на электрическую активность нейронов коры головного мозга крыс Wistar // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.22–27. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10011.

The effect of combined administration of ethanol and gabapentin on electrical activity of the cerebral cortex neurons in Wistar rats

Kolik L.G., Kozhechkin S.N.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Background.* Today the search for drugs for alcoholism treatment is concentrated around substances with anticonvulsant action, which not only stop convulsive syndrome, but also contribute to the extension of the remission period during alcohol withdrawal. Despite the successful experience in the alcoholism treatment with structural analog GABA gabapentin, there is no convincing evidence of gabapentin interaction with GABA-ergic system in the brain, moreover, most results were obtained *in vitro*. *The aim* of the present work was to study mechanism of gabapentin action on CNS and its interaction with ethanol using electrophysiological methods *in vivo*. *Methods.* The effect of gabapentin on electrical activity of neurons in the frontal cortex of rats was studied with the microelectrode technique in adult male Wistar rats. *Results.* Gabapentin after systemic administration, 25–100 mg/kg, i.p., dose-dependent reduced the frequency of action potentials (AP) of neurons, without changing amplitude and shape of AP of neurons. When assessing changes in the frequency of extracellular exhaust AP at microiontophoretically summing gabapentin it is established that the drug reduced the frequency of AP in 15 of 23 neurons ($p < 0.05$), and increased GABA-induced inhibition of pulsed electrical activity of neurons in the frontal cortex. Gabapentin didn't affect the magnitude of exiting responses on ethanol supplied to neurons, however, increased ($p < 0.05$) inhibitory responses caused by ethanol in all 45 of the cells studied. *Conclusion.* The obtained data suggest that gabapentin has an allosteric effect on postsynaptic GABA receptors and increases ethanol-induced inhibition of neurons of the frontal cortex.

Keywords: gabapentine; ethanol; GABA; neurons; frontal cortex; microiontophoresis; Wistar rats

For citations:

Kolik LG, Kozhechkin SN. The effect of combined administration of ethanol and gabapentin on electrical activity of the cerebral cortex neurons in Wistar rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:22–27. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10011.

Введение

В настоящее время поиск средств для лечения алкоголизма сосредоточен вокруг веществ, обладающих противосудорожным действием, которые не только купируют судорожный синдром при отмене алкоголя, но также сокращают число рецидивов и способствуют продлению периода ремиссии у больных хроническим алкоголизмом. Однако бензодиазепиновые препараты, относящиеся к стандартным средствам для лечения алкогольной абстиненции, имеют ряд ограничений, связанных с их применением в амбулаторной практике, поскольку вызывают формирование лекарственной зависимости, ослабляют когнитивные функции, потенцируют действие алкоголя, что может приводить к угнетению дыхания и нарушению сознания, и обладают способностью увеличивать влечение к психоактивным веществам [1–3].

Габапентин (ГП, «Нейронтин», «Конвалис»), разрешённый FDA в США к использованию с 1994 г. в качестве лекарственного средства для купирования боли разного генеза, а также для лечения лекарственно-резистентной эпилепсии, относится к малотоксичным препаратам, хорошо переносим больными и не имеет серьёзных побочных эффектов [4]. ГП является аналогом основного тормозного медиатора ЦНС гамма-аминомасляной кислоты (ГАМК), один из С-атомов которой включён в структуру циклогексана, чем объясняется высокая биодоступность ГП и его проницаемость через гемато-энцефалический барьер (рис. 1). Полагают, что механизм действия ГП связан с положительной модуляцией ГАМК-ергической активности отчасти за счёт взаимодействия с потенциал-зависимыми Ca^{2+} каналами [4].

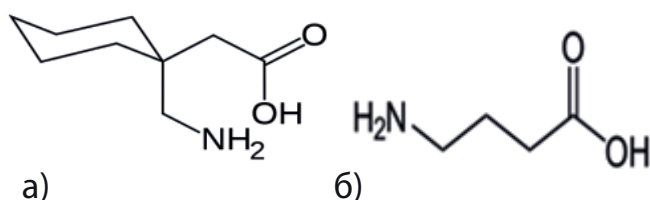


Рис. 1. Габапентин (а) и ГАМК (б)

В последнее время появляется всё больше работ, свидетельствующих об успешном применении ГП в фармакотерапии алкоголизма [5–7]. Согласно клиническим исследованиям, ГП нормализует структуру сна и положительно влияет на аффективные расстройства, возникающие после отмены алкоголя [6], при 28-дневном курсовом введении значительно сокращает среднесуточное потребление алкоголя и увели-

чивает период воздержания от него [7]. В ходе 12-недельного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования показана эффективность ГП при лечении алкогольной зависимости, что выражалось в ослаблении бессонницы, дисфории и влечения к алкоголю в условиях абстиненции [8].

В экспериментах на животных с использованием различных моделей алкоголизации показано, что ГП уменьшает потребление алкоголя у крыс с выработанной алкогольной зависимостью, предотвращает и уменьшает анксиогенные и конвульсивные последствия его отмены [9].

Однако механизм центрального действия ГП до конца не ясен, отсутствуют убедительные доказательства взаимодействия ГП с ГАМК-рецепторами нейронов и другими звеньями ГАМК-ергической системы мозга, несмотря на отдельные указания на взаимодействие ГП с ГАМК-рецепторами А- и В-типов [10, 11], большинство представленных результатов получены в опытах *in vitro*. Цель настоящей работы изучение механизма центрального действия ГП и его взаимодействия с этанолом с помощью электрофизиологических методов в опытах *in vivo*.

Материалы и методы

В опытах использовано 20 взрослых крыс-самцов линии Wistar, массой 210–250 г. (Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»). Крыс содержали по 8 особей в клетке (435 × 275 × 155 мм, площадь 720 см²) в стандартных условиях вивария ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при регулируемом световом режиме 12 ч/12 ч (свет/темнота) и постоянной температуре (21–23 °С) со свободным доступом к воде и гранулированному корму (ГОСТ Р 50258-92) в течение 10 сут. до начала тестирования в соответствии с приказом МЗ РФ № 199н от 23.08.2010 «Об учреждении Правил лабораторной практики». Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Под галотановым наркозом проводили трепанацию черепа, обнажали кору головного мозга и переводили животное на искусственное дыхание (миорелаксант диплафина дихлорид, 20 мг/кг, в/в). Спонтанную электрическую активность нейронов фронтальной коры головного мозга отводили внеклеточно через центральный ствол 5-канального стеклянного микроэлектрода, заполненный 1М р-ром NaCl. Другие стволы использовали для микроэлектрофоретического подведения веществ и заполняли водными растворами этанола (5,0–7,0 М, pH = 4,5) и габапентин (0,03 М,

pH = 4,5). Один из стволов использовали для стандартной компенсации токовых артефактов. Оценивали изменение частоты потенциалов действия нейронов после их цифро-аналогового преобразования.

Габапентин (Sigma, субстанция) вводили в дозах 25, 50 и 100 мг/кг внутривентрикулярно. Выбор доз препарата для исследований основан на данных литературы, свидетельствующих о способности препарата ослаблять алкогольную мотивацию [9].

Полученные данные обрабатывали методами обычной вариационной статистики с определением достоверности различий параметров, используя критерий Стьюдента или непараметрический критерий Манна–Уитни. Число использованных в каждой серии экспериментов животных и исследованных нейронов, а также более детальное описание схемы экспериментов приводятся в следующих разделах.

Результаты

1. Изменение частоты спонтанной активности нейронов фронтальной коры головного мозга после внутривентрикулярного введения габапентина

ГП в дозе 25 мг/кг уменьшал частоту ПД 3 нейронов у 3 крыс. Частоту ПД 3 других нейронов (3 крысы) агент не изменял. Величина уменьшения частоты ПД составляла в среднем 18 % от её уровня до инъекции агента ($p > 0,05$).

ГП в дозе 50 мг/кг уменьшал частоту ПД 5 нейронов у 6 крыс в среднем на 35 % от исходного уровня ($p < 0,05$).

ГП в дозе 100 мг/кг уменьшал частоту ПД 6 нейронов у 6 крыс в среднем на 41 % от контрольного уровня ($p < 0,05$). Латентный период максимального эффекта ГП составлял 25–40 мин, торможение нейрональной активности продолжалось в течение всего времени наблюдения (максимально 280 мин) (рис. 2). Амплитуда и форма ПД нейронов не изменялись после инъекции ГП во всех дозах.

2. Изменение частоты внеклеточно отводимых по-

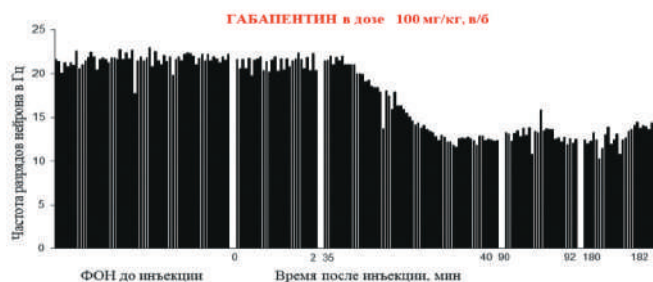


Рис. 2. Влияние габапентина в дозе 100 мг/кг при однократном системном введении на частоту потенциалов действия нейронов коры головного мозга у крыс

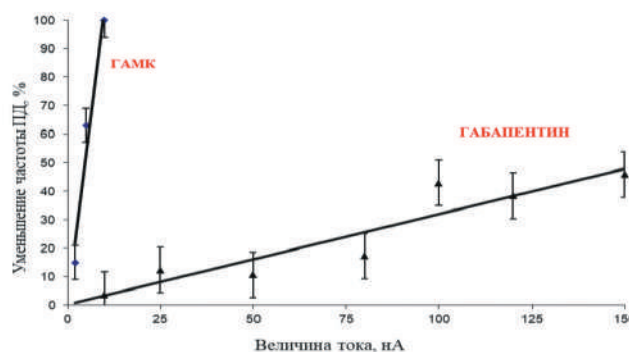


Рис. 3. Изменение частоты внеклеточно отводимых потенциалов действия при микроионофоретическом подведении ГАМК и габапентина к нейронам фронтальной коры головного мозга крыс

тенциалов действия при микроионофоретическом подведении габапентина (кривая «доза–эффект»)

Исследовано 23 нейрона у 5 крыс. ГП, подведённый в небольших количествах с помощью тока до 75–80 нА, не вызывал достоверного изменения частоты ПД нейронов ($p > 0,05$). При токах от 100 до 150 нА агент достоверно уменьшал частоту ПД у 15 нейронов в дозозависимой манере ($p < 0,05$). Активность 8 нейронов не изменилась при аппликации ГП. У 10 клеток депрессирующий эффект ГП возрастал практически линейно при увеличении концентрации агента, т. е. силы изгоняющего тока (рис. 3).

Максимальный тормозящий эффект ГП при токе 150 нА составлял 60 % от исходной частоты (8 нейронов). У большинства клеток торможение было менее 50 %. Полного блока генерации ПД не наблюдали ни в одном случае.

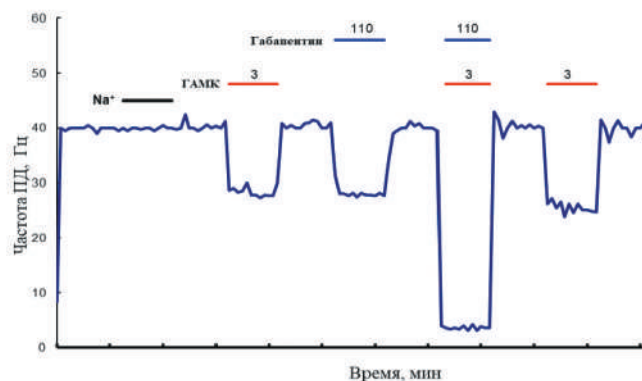


Рис. 4. Влияние габапентина на вызываемое ГАМК торможение импульсной электрической активности нейронов фронтальной коры головного мозга у крысы

Примечания: цифрами на графике обозначена сила изгоняющего тока в нА. Источник: Колик Л.Г. и Кожевник С.Н., 2018.

3. Влияние габапентина на вызываемое ГАМК торможение импульсной электрической активности нейронов

Поскольку ГАМК при микроэлектрофоретическом подведении вызывает сильное торможение импульсной активности нейронов, уменьшая частоту ПД (рис. 3), в следующем фрагменте исследования подобраны для ГАМК изгоняющие токи такой силы, чтобы её тормозящий эффект составлял не более 50 % от величины исходной спонтанной активности нейронов. Исследовали 24 нейрона фронтальной коры. У большинства нейронов (16 клеток) наблюдали увеличение под влиянием ГП тормозящих ответов на ГАМК. Конечный тормозящий ответ (уменьшение частоты спайков) при одновременном подведении агентов превышал сумму унитарных ответов на ГАМК и ГП, подведённых раздельно. Увеличение суммарных тормозных ответов обычно составляло 20–40 % от арифметической суммы унитарных ответов на ГАМК и ГП. Потенцирования ГАМК эффекта, т. е. резкого возрастания их в два и более раз не наблюдали. Типичный пример экспериментов этой серии представлен на рис. 4. У остальных 8 нейронов наблюдали аддитивный эффект, т. е. арифметическое сложение унитарных тормозных ответов ГАМК и ГП.

4. Взаимодействие габапентина и этанола при одновременном электрофоретическом подведении агентов к мембране нейронов

Этанол при электроосмотическом подведении к нервным клеткам коры головного мозга может вызывать два противоположных эффекта. При аппликации в малых количествах (изгоняющие токи менее 30 нА) этанол вызывает увеличение частоты ПД многих корковых нейронов. При подведении с помощью токов более 30 нА этанол вызывает уменьшение частоты ПД. Нередко оба эффекта можно наблюдать на одном и том же нейроне.

Исследовано 37 нейронов с возбуждающим типом ответа на этанол и 45 нейронов с ответом тормозящего типа. Установлено, что возбуждающие ответы нейронов на этанол не изменялись ($p > 0,05$) под влиянием ГП у всех исследованных нейронов (рис. 5), хотя у некоторых из них наблюдалась тенденция к депрессии нейрональной активности.

Ответы тормозящего типа, вызываемые этанолом, увеличивались ($p < 0,05$) на фоне ГП у всех 45 исследованных клеток (рис. 6а). Во всех случаях наблюдали арифметическое сложение величин унитарных тормозных ответов нейронов на агенты (аддитивное взаимодействие). Увеличенные ответы на этанол можно было наблюдать ещё через 90 мин после прекращения аппликации ГП как последствие последнего (рис. 6б).

Обсуждение

В настоящей работе с помощью метода микроионофореза изучен характер влияния ГП на чувствительность постсинаптической мембраны нейронов фронтальной коры головного мозга к одному из основных медиаторов ЦНС – ГАМК. В научной литературе имеются немногочисленные и весьма противоречивые данные о влиянии ГП на медиаторные системы ЦНС. Первые исследователи начале 90 годов не обнаружили влияния ГП на ГАМК-ергическую нейротрансмиссию [12].

Однако в последствии *Roberto M., et al.* (2008) обнаружили взаимодействие ГП с ГАМК-рецепторами, хотя во многих работах обзорного типа подчеркива-

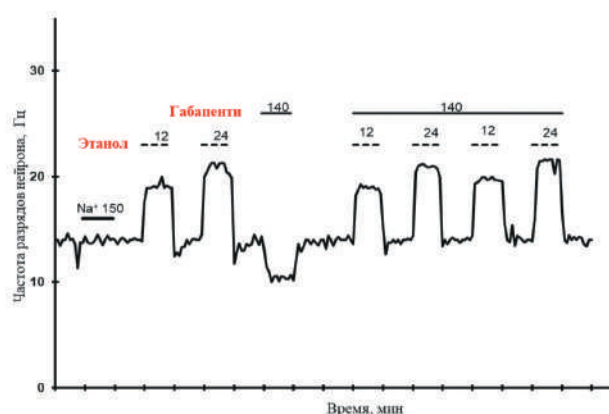


Рис. 5. Габапентин не влияет на индуцированные этанолом возбуждающие ответы нейронов при микроионофоретическом подведении

Примечания: цифрами на графике обозначена сила изгоняющего тока в нА.

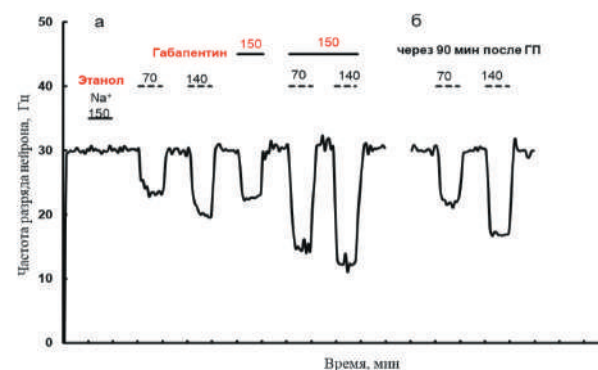


Рис. 6. Габапентин увеличивает индуцированное этанолом торможение нейронов при микроионофоретическом подведении

Примечания: цифрами на графике обозначена сила изгоняющего тока в нА.

ется недостаточная изученность механизма действия ГП [9]. В первой серии опытов была проведена оценка влияния ГП на электрическую активность нейронов при системном введении. Установлено, что препарат достоверно уменьшал частоту импульсной электрической активности нейронов фронтальной коры головного мозга у крыс. Наблюдавшийся эффект развивался медленно, был неглубоким и продолжался несколько часов после инъекции ГП.

Во второй серии опытов ГП при микроионофоретическом подведении к отдельным нервным клеткам центрально-депрессивное действие препарата подтвердилось на клеточно-мембранном уровне. На рис. 3 представлена кривая зависимости тормозного эффекта ГП от дозы при подведении непосредственно к мембране нервной клетки. Очевидно, что угнетающий эффект ГП существенно меньше депрессии, вызываемой тормозным медиатором ГАМК, производным которого является ГП. Кривая доза–эффект для ГП сильно приближена к оси абсцисс и сдвинута вправо относительно кривой ГАМК, что косвенно свидетельствует о различных нейрональных мишенях ГП и ГАМК.

Значимым результатом проведенного исследования явилось возрастание тормозящего действия ГАМК на активность нейронов фронтальной коры головного мозга под влиянием ГП. Этот эффект нельзя назвать потенцированием действия ГАМК, так как «потенцирование» предполагает резкое увеличение эффекта нейротрансмиттера в 2–3 и более раз, тогда как увеличение тормозящего эффекта ГАМК под влияние ГП было сравнительно небольшим и не достигало такой степени. Следовательно, можно говорить лишь о модуляции депрессирующего эффекта ГАМК и об аллостерическом влиянии ГП на постсинаптические ГАМК-рецепторы. Следует отметить, что ни у одного из ранее изученных нами «антиаддитивных» агентов, включая аналогов ГАМК (акампросата, топирамата) не отмечалось подобного влияния на ГАМК-ответы, большинство веществ демонстрировали аддитивный эффект с ГАМК.

Далее показан характер взаимодействия ГП с этанолом при микроионофоретическом подведении препарата к нейронам коры головного мозга у крыс. Возбуждение нейронов этанолом, подведенным к клеткам электроосмотически в «малых дозах» (изгоняющие токи менее 30 нА) не уменьшалось на фоне аппликации ГП, несмотря на то, что последний вызывал торможение клеточной активности, что является отличительной особенностью ГП среди большинства лекарственных средств, применяемых для лечения алкоголизма и исследованных нами ранее. Сходство у ГП отмечается лишь с акампросатом, который также не влияет на возбуждение, вызываемое этанолом [13].

Ранее мы предположили, что возбуждающий от-

вет нейронов на этанол является электрографическим маркером, соответствующим поведенческим эффектам алкоголя в малых дозах. Если наша гипотеза верна, то отсутствие влияния ГП на этаноловое возбуждение указывает на возможную неэффективность ГП в предотвращении развития первичной алкогольной мотивации и компульсивного влечения во время формирования алкогольной зависимости, что подтверждается данными клинических исследований, согласно которым ГП не уменьшает или слабо влияет на компульсивное влечение пациентов к алкоголю и на частоту алкогольных эксцессов [14].

Показано, что ГП при микроионофоретическом подведении увеличивал торможение нейронов, вызываемое этанолом, подведенным электроосмотически в «больших дозах» (изгоняющие токи более 30 нА). Взаимодействие ГП и этанола имело аддитивный характер, что свидетельствует о разных мишенях агентов в ЦНС, поскольку в случае взаимодействия ГП и этанола с одним и тем же рецептором можно было бы ожидать или ослабления результирующего тормозного ответа клетки, или его возрастания по типу потенцирования. Усиление под влиянием ГП этанол-индуцированного торможения дополнительно свидетельствует о центрально-депрессивном эффекте ГП, который, по-видимому, лежит в основе антиаддитивных свойств препарата. Выявленный характер взаимодействия ГП с этанолом во многом имеет сходство с действием налтрексона [15] и топирамата [16], показанное нами ранее, что позволяет отнести ГП к веществам центрально-депрессивного типа действия. Полученные данные согласуются с ЭЭГ-исследованиями *Pietrzak B, et al.* (2006), выполненными на кроликах, где было показано усиление под действием ГП угнетающего эффекта этанола на ЦНС в области гиппокампа и фронтальной коры [17].

Опираясь на данные литературы и собственные экспериментальные исследования, можно сделать вывод о рациональности использования ГП для профилактики алкоголизма, особенно в период ремиссии, поскольку препарат устраняет бессонницу и дисфорию, часто возникающие при отмене алкоголя [8, 18]. Кроме того, имеются данные о высокой эффективности ГП при совместном применении с антагонистом опиатных рецепторов налтрексоном — современным средством выбора при фармакотерапии алкоголизма и других наркоманий [19].

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Участие авторов. Колик Л.Г. — постановка задачи, написание текста, редактирование, финальное утверждение; Кожечкин С.Н. — разработка модели, анализ и интерпретация результатов, написание текста.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Колик Лариса Геннадьевна**Автор, ответственный за переписку**

e-mail: lgkolik@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

д. б. н., профессор РАН, руководитель лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Кожечкин Сергей Николаевич

к. м. н., в. н. с., лаборатории фармакологической регуляции состояний зависимости ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kolik Larisa**Corresponding author**

e-mail: lgkolik@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9847-8058

Doctor of Biological Sciences, Professor of RAS, head Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Kozhechkin Sergey

Candidate of Medical Sciences leading researcher Laboratory of Pharmacological Regulation of Alcohol and Drug Addiction FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Ciraulo DA, Sands BF, Shader RI. Critical review of liability for benzodiazepine abuse among alcoholics. *Am J Psychiatry*. 1988;145(12):1501–6. DOI: 10.1176/ajp.145.12.1501
2. Malcolm R, Myrick H, Roberts J, et al. The effects of carbamazepine and lorazepam on single versus multiple previous alcohol withdrawals in an outpatient randomized trial. *J Gen Intern Med*. 2002;17(5):349–55.
3. Poulos CX, Zack M. Low-dose diazepam primes motivation for alcohol and alcohol-related semantic networks in problem drinkers. *Behav Pharmacol*. 2004;15(7):503–12.
4. Fornasari D. Pharmacotherapy for Neuropathic Pain: A Review. *Pain Ther*. 2017; 6 Suppl 1:25–33. DOI: 10.1007/s40122-017-0091-4
5. Mason BJ, Quello S, Shadan F. Gabapentin for the treatment of alcohol use disorder. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(1):113–124. DOI: 10.1080/13543784.2018.1417383
6. Leung JG, Hall-Flavin D, Nelson S, et al. The role of gabapentin in the management of alcohol withdrawal and dependence. *Ann Pharmacother*. 2015;49(8):897–906. DOI: 10.1177/1060028015585849
7. Furieri FA, Nakamura-Palacios EM. Gabapentin reduces alcohol consumption and craving: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Clin Psychiatry*. 2007;68(11):1691–700.
8. Mason BJ, Quello S, Goodell V, et al. Gabapentin treatment for alcohol dependence: a randomized clinical trial. *JAMA Intern Med*. 2014;174(1):70–7. DOI: 10.1001/jamainternmed.2013.11950
9. Roberto M, Gilpin NW, O'Dell LE, et al. Cellular and behavioral interactions of gabapentin with alcohol dependence. *J Neurosci*. 2008;28(22):5762–71. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0575-08.2008.
10. Lanneau C, Green A, Hirst WD, et al. Gabapentin is not a GABAB receptor agonist. *Neuropharmacology*. 2001; 41(8):965–75.
11. Stefani A, Spadoni F, Giacomini P, et al. The effects of gabapentin on different ligand- and voltage-gated currents in isolated cortical neurons. *Epilepsy Res*. 2001;43(3):239–48.
12. Rock DM, Kelly KM, Macdonald RL. Gabapentin actions on ligand- and voltage-gated responses in cultured rodent neurons. *Epilepsy Res*. 1993;16(2):89–98.
13. Кожечкин С.Н., Медникова Ю.С., Колик Л.Г. Электрофизиологическое исследование влияния акампросата на нейроны фронтальной коры большого мозга крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2013. – Т.76. – №6. – С.3–6. [Kozhechkin SN, Mednikova YuS, Kolik LG. Elektrofizilogicheskoe issledovanie vliyaniya akamprosata na neirony frontal'noi kory bol'shogo mozga krys. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2013;76(1):3–6. (In Russ).]
14. Bisaga A, Evans SM. The acute effects of gabapentin in combination with alcohol in heavy drinkers. *Drug Alcohol Depend*. 2006;83(1):25–32.
15. Кожечкин С.Н., Колик Л.Г., Медникова Ю.С. Влияние налтрексона на импульсную электрическую активность нейронов коры головного мозга крыс и его взаимодействие с этанолом // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. – 2013. – Т.155. – №5. – С.590–594. [Kozhechkin SN, Kolik LG, Mednikova YuS. Effects of naltrexone on firing activity of rat cortex neurons and its interactions with ethanol. *Bull. Exp. Biol. Med*. 2013;155(5):639–642. (In Russ).]. DOI: 10.1007/s10517-013-2214-1
16. Кожечкин С.Н., Медникова Ю.С., Колик Л.Г. Электрофизиологическое исследование влияния топирамата на нейроны коры головного мозга крыс // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. – 2014. – Т.77. – №8. – С.3–6. [Kozhechkin SN, Mednikova YuS, Kolik LG. Elektrofizilogicheskoe issledovanie vliyaniya topiramata na neirony kory golovnogogo mozga krys. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2014;77(8):3–6. (In Russ).]
17. Pietrzak B, Czarnecka E. The effect of combined administration of ethanol and gabapentin on rabbit electroencephalographic activity. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2006;99(5):383–90. DOI: 10.1111/j.1742-7843.2006.pto_518.x
18. Mason BJ, Quello S, Shadan F. Gabapentin for the treatment of alcohol use disorder. *Expert Opin Investig Drugs*. 2018;27(1):113–124. DOI: 10.1080/13543784.2018.1417383
19. Anton RF, Myrick H, Wright TM, et al. Gabapentin combined with naltrexone for the treatment of alcohol dependence. *Am J Psychiatry*. 2011;168(7):709–17. DOI: 10.1176/appi.ajp.2011.10101436

Повреждённость ДНК в клетках миокарда крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией: модифицирующие эффекты фабомотизола и триметазидина

Жанатаев А.К., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Чайка З.В.,
Крыжановский С.А., Дурнев А.Д.

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

Резюме. *Актуальность.* Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) – специфический вид дилатационной кардиомиопатии, возникающей при чрезмерном и длительном потреблении алкоголя. До настоящего времени не разработаны эффективные схемы её терапии, что связано, прежде всего, с отсутствием знаний о тонких механизмах её патогенеза. Индукция окислительного стресса, ведущего к повреждению ДНК и активации внутриклеточных сигнальных каскадов клеточной гибели, рассматривается как основной механизм этиопатогенеза алкогольной кардиомиопатии. *Цель* настоящего исследования – на разработанной ранее трансляционной модели АКМП у крыс оценить повреждённость ДНК и апоптоз клеток миокарда и влияние на эти показатели кардиопротективных средств. *Методы.* АКМП у крыс моделировали путём 24-недельной алкоголизации (10 % этанол как единственный источник воды; ежедневная доза этанола 5,0–6,5 г/кг). Триметазидин (20 или 30 мг/кг), фабомотизол (15 мг/кг) или их комбинацию (20 + 15 мг/кг) вводили внутривентрикулярно в течение последующих 4 недель абстиненции. Оценка повреждённости ДНК клеток миокарда проводили методом ДНК-комет в щелочной и нейтральной версиях. Уровень апоптоза на парафиновых срезах определяли методом TUNEL. *Результаты.* Установлено, что сформировавшаяся АКМП в период абстиненции не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК и апоптозом клеток миокарда. Выявлено снижение уровня кардиомиоцитов с высокой степенью фрагментации ДНК, детектируемых в виде атипичных ДНК-комет и являющихся, предположительно, клетками на стадии аутофагической фрагментации хроматина. Введение животным на фоне алкогольной абстиненции кардиопротекторов фабомотизола и триметазидина или их комбинации приводит к восстановлению уровней клеток с фрагментированной ДНК до значений контроля. *Заключение.* Полученные данные позволяют рассматривать появление кардиомиоцитов с фрагментированной ДНК как важный механизм регуляции и поддержания гомеостаза миокарда при АКМП.

Ключевые слова: алкогольная кардиомиопатия; ДНК-кометы; апоптоз; фабомотизол; триметазидин

Для цитирования:

Жанатаев А.К., Мирошкина И.А., Цорин И.Б., Чайка З.В., Крыжановский С.А., Дурнев А.Д. Повреждённость ДНК в клетках миокарда крыс с экспериментальной алкогольной кардиомиопатией: модифицирующие эффекты фабомотизола и триметазидина // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.28–34. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10012.

DNA damage in myocardial cells of rats with experimental alcoholic cardiomyopathy: modifying effects of fabomotizole and trimetazidine

Zhanataev A.K., Miroshkina I.A., Tsorin I.B., Chayka Z.V., Kryzhanovskii S.A., Durnev A.D.

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Relevance.* Alcoholic cardiomyopathy (ACM) is a specific heart muscle disease found in individuals with a history of long-term heavy alcohol consumption. Their underlying mechanisms are poorly known, leading to a lack of effective therapy. Related with oxidative stress DNA damage and cell death play an essential role in the development of alcoholic cardiomyopathy. *The aim* of present study - using previously developed translation model to evaluate the levels of DNA damage and apoptosis in the myocardium of rats with ACM and modulating effect of cardioprotective drugs. *Methods.* ACM was established by forced alcoholization of rats (10 % ethanol solution as the only source of drinking water for 24 weeks; mean daily ethanol consumption was 5.0–6.5 g/kg). Trimetazidine (20 or 30 mg/kg), fabomotizole (15 mg/kg) or their combination (20 + 15 mg/kg) were injected ip, daily during following 4 weeks of abstinence. DNA damage was evaluated using alkaline and neutral comet assay. Apoptosis was assessed by TUNEL assay in paraffin-embedded sections. *Results.* No DNA damage or apoptosis of the myocardial cells was observed in rats with alcoholic cardiomyopathy at the abstinence period. A decrease in the level of cardiomyocytes with a high degree of DNA fragmentation, referred to as “hedgehog” DNA comets and that are presumably cells at the stage of autophagic fragmentation of chromatin, was revealed. Treatment of rats at the abstinence period with cardioprotective drugs trimetazidine and fabomotizole or their combination raised “hedgehog” DNA comets level up to control value. *Conclusion.* Our findings allows considering the appearance of cardiomyocytes with highly fragmented DNA as an important mechanism for regulating and maintaining myocardial homeostasis in ACM.

Keywords: alcoholic cardiomyopathy; DNA damage; comet assay; apoptosis; fabomotizole; trimetazidine

For citations:

Zhanataev AK, Miroshkina IA, Tsorin IB, Chayka ZV, Kryzhanovskii SA, Durnev AD. DNA damage in myocardial cells of rats with experimental alcoholic cardiomyopathy: modifying effects of fabomotizole and trimetazidine. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:28–34. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10012.

Введение

Алкогольная кардиомиопатия (АКМП) — специфический вид дилатационной кардиомиопатии, возникающей вследствие токсического поражения сердечной мышцы при чрезмерном и длительном потреблении алкоголя [1]. Несмотря на распространённость заболевания, до настоящего времени не разработаны эффективные схемы её терапии, что связано, прежде всего, с отсутствием соответствующих трансляционных моделей, позволяющих изучить тонкие механизмы патогенеза АКМП и разработать патогномоничные средства терапии [1, 2]. Новые возможности исследований появились с внедрением новой инновационной трансляционной экспериментальной модели, достаточно полно воспроизводящей клиническую картину АКМП [3].

Возможные механизмы кардиомиопатогенного действия включают действие этанола и его метаболита ацетальдегида на транспорт и связывание кальция, функцию митохондрий, метаболизм липидов, синтез белка кардиомиоцитами, активность миофибрилярной АТФ-азы и т. д. [2, 4]. Патологическим следствием указанных процессов является индукция окислительного стресса и активация внутриклеточных сигнальных каскадов, вовлечённых в клеточную гибель, одним из звеньев которых и, соответственно, биомаркёром, может служить повреждённость ДНК [4, 5].

Ранее было показано, что агонист сигма-1 рецептора, анксиолитик, цитопротектор и антимуtagen фабомотизол (афобазол) и р-Fox ингибитор, кардиопротектор триметазидин уменьшают ремоделирование правого и левого желудочков сердца и увеличивают его сократительную функцию в условиях сформировавшейся АКМП в трансляционной модели у крыс [6]. Целью настоящего исследования явилась изучение повреждённости ДНК в клетках миокарда крыс со сформировавшейся АКМП с оценкой влияния на регистрируемые показатели фабомотизола, триметазидина и их комбинаций.

Материалы и методы

Опыты проводили на беспородных белых крысах-самцах начальной массой 180–200 г, которые содержались в виварии в соответствии с приказом МЗ РФ № 267 от 09.06.2003 г. «Об учреждении правил лабораторной практики» с представлением брикетированного корма *ad libitum* при регулируемом 12/12 световом режиме. На первом этапе животных рандомизировали на две группы: интактные крысы, получавшие обычный рацион питания и животные, которые в принудительном порядке подвергались алкоголизации с

использованием в качестве единственного источника жидкости 10 % водного раствора этанола в течение 24 недель — периода, необходимого для формирования у них дилатационной алкогольной кардиомиопатии. На протяжении всего исследования еженедельно регистрировали количество потребляемого этанола (г/кг). Для дальнейших экспериментов были отобраны крысы, активно потребляющие физиологически значимое количество 10 % раствора этанола, составляющего в пересчёте на чистый 5,0–6,5 г/кг в сутки. Через 24 нед. животным прекращали доступ к алкоголю, переводили на обычный рацион питания и рандомизировали их на 4 группы: алкоголизованный контроль; триметазидин (20 или 30 мг/кг/сут., в/б, 28 дней); фабомотизол (15 мг/кг/сут., в/б, 28 дней); триметазидин (20 мг/кг/сут., в/б, ежедневно на протяжении 28 дней) + фабомотизол (10 мг/кг/сут., в/б, 28 дней). Животные группы алкоголизованного контроля по аналогичной схеме получали инъекции 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Через сутки после последней инъекции исследуемых препаратов и эхокардиографической верификации кардиомиопатии животных умерщвляли и выделяли сердца.

Метод ДНК-комет проводили в щелочной и нейтральной версиях в соответствии с рекомендациями [7, 8]. Сердечную мышцу измельчали препаративными ножницами, дважды отмывали в 3 мл охлаждённого до 4 °C фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащего 20 мМ EDTA-Na₂ и 10 % ДМСО (pH 7,5), переносили в стеклянные пробирки с 3 мл того же буфера и раздавливали стеклянной палочкой. Пробирки выдерживали 5 мин для осаждения крупных фрагментов, после чего 1,5 мл верхнего слоя переносили в новую пробирку. Суспензии клеток в объёме 60 мкл вносили в пробирки с 240 мкл 0,9 % раствора легкоплавкой агарозы (темпл. плав. < 420 °C) в ФСБ, подогретым до 410 °C (микротермостат «Термит», Россия) и ресуспендировали. Затем 60 мкл раствора агарозы с клетками наносили на предварительно покрытые 1 % универсальной агарозой предметные стекла, покрывали покровным стеклом и помещали на лёд. Покровные стекла осторожно удаляли, микропрепараты помещали в стеклянную кювету (тип Шиффендекер), заливали предварительно охлаждённым до 4 °C лизирующим буфером (10 мМ Tris-HCl [pH 10], 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂, 1 % Triton X-100, 10 % ДМСО) и инкубировали не менее 1 ч.

В щелочной версии метода после окончания лизиса микропрепараты переносили в камеру для электрофореза (SubCell GT, “Bio-Rad”) с раствором 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂, pH > 13) и инкубировали в течение 20 мин для реализации щелочно-лабильных сайтов и щелочной денатурации ДНК. Далее проводили электрофорез в течение 20 мин при напряжённо-

сти поля 1V/cm и силе тока ~ 300 mA. В нейтральной версии метода микропрепараты переносили в камеру для электрофореза с буфером 90 mM Tris-borate, 2 mM EDTA- Na_2 (pH 7,5) и проводили электрофорез в течение 10 мин при напряжённости поля 1 V/cm. В обоих случаях по окончании электрофореза микропрепараты переносили в стеклянную кювету и фиксировали в 70 % растворе этилового спирта в течение 15 мин. После фиксации микропрепараты высушивали и хранили до анализа при комнатной температуре.

Микропрепараты окрашивали флуоресцирующим красителем SYBR Green I (1:10000 в TE-буфере с 50 % глицерином, pH 8,5) в течение 20 мин. Анализ проводили на эпифлуоресцентном микроскопе Микмед-2 12Т («Ломо», Россия), совмещённом с цифровой камерой высокого разрешения (VEC-335, «ЭВС», Россия), при увеличении $\times 200$. Изображения ДНК-комет анализировали с использованием программного обеспечения CASP 1.2.2. В качестве показателя повреждённости ДНК использовали процентное содержание ДНК в хвосте ДНК-комет (% ДНК в хвосте). В отдельную категорию выделяли клетки с показателем % ДНК в хвосте > 75 %, т. н. атипичные ДНК-кометы (*ghost cells*) – клетки с высокой степенью фрагментации ДНК (рис. 1). Подсчитывали их процентное содержание к общему числу проанализированных клеток. Статистическую обработку проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений с использованием критерия Даннета (% ДНК в хвосте) и критерия χ^2 (% атипичных ДНК-комет).

Оценку апоптоза на парафиновых срезах миокарда проводили методом мечения терминальной трансферазой (TUNEL). Выделенные из грудных клеток сердца

крыс фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина. После окончания фиксации и стандартной проводки препараты сердец заливали в парафиновые блоки. Готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм, которые помещали на стекла с полилизинным покрытием и проводили стандартную процедуру депарафинирования [9]. Демаскирование проводили нагреванием срезов в 200 мл 0,01 M цитратного буфера (pH 6), содержащего 0,1 % Triton X-100, в микроволновой печи в течение 45 с при мощности излучения 1000 ватт. По окончании препараты охлаждались добавлением 80 мл дистиллированной воды и дважды отмывались в фосфатно-солевом буфере (pH 7,4) и однократно дистиллированной водой. На каждый препарат наносили 50 мкл реакционной смеси, включающей 1,5 ед. терминальной трансферазы TdT (NEB), 0,25 mM хлорида кобальта и 10 мкмоль TAMRA-dUTP (ДНК-синтез) в 1X реакционном буфере для TdT. Препараты накрывали покровным стеклом и помещали во влажную камеру и инкубировали 1 ч при 37 °C. Далее препараты дважды отмывались дистиллированной водой. Ядра кардиомиоцитов контрастировали красителем SYBR Green I. Микроскопирование проводили на микроскопе AxioImager M2 (Carl Zeiss) с фильтрами для FITC (SYBR Green I) и родамина (TAMRA). Совмещённые по обоим каналам цифровые изображения (merge) получали с помощью камеры AxioCam Mrm в программной среде AxioVision (рис. 2). Анализировали 10 полей зрения на каждом препарате при увеличении $\times 1000$. Количественный анализ интенсивности апоптоза проводили методом расчёта индекса апоптоза, представляющего собой отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему числу кардиомиоцитов. Статистическую обработку проводили с помощью критерия χ^2 .

Результаты и обсуждение

В табл. 1 представлены результаты оценки в щелочной версии метода ДНК-комет повреждённости ДНК клеток миокарда крыс со сформировавшейся АКМП на фоне 28-дневной абстиненции и влияние на наблюдаемые эффекты афобазола и триметазида.

Уровень повреждений ДНК у крыс с АКМП не отличался статистически значимо от показателя для интактных животных. Не выявлено также значимых отличий в оцениваемом показателе для животных, получавших на фоне абстиненции фабомотизол в дозе 15 мг/кг или триметазидин в дозе 20 мг/кг.

Выявлено статистически значимое снижение уровня атипичных ДНК-комет в группе алкоголизованных крыс по сравнению с животными интактного контроля (2,7 против 7,6 %). У животных, получавших фабомотизол, данный показатель оказался статистически значимо выше по сравнению с группой алкоголизованных крыс и не отличался от значения для интактного кон-

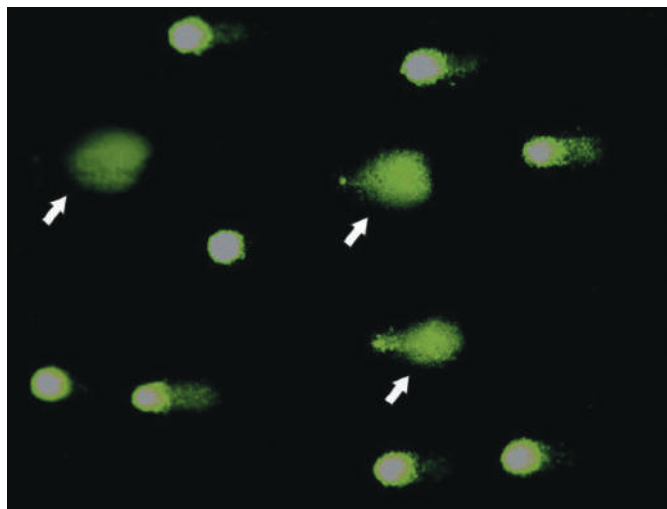


Рис. 1. Цифровое изображение с препарата ДНК-комет миокарда крысы (ув. $\times 200$; окраска SYBR Green I). Стрелками указаны атипичные ДНК-кометы

Таблица 1

Поврежденность ДНК клеток миокарда крыс с АКМП и влияние на наблюдаемые эффекты триметазидина и фабомотизола. Щелочная версия метода ДНК-комет

Экспериментальная группа	Доза препарата (мг/кг/сут.)	n*	% ДНК в хвосте (M ± m)	Атипичных ДНК-комет (%)
Интakтный контроль	-	6	36,9 ± 5,3	7,6
Алкоголизация	-	6	29,3 ± 4,9 ($p_k = 0,595$)	2,7 ($p_k < 0,001$)
Алкоголизация + триметазидин	20	6	35,7 ± 4,4 ($p_a = 0,703$)	3,8 ($p_a = 0,340$)
Алкоголизация + фабомотизол	15	6	32,5 ± 5,7 ($p_a = 0,945$)	8,4 ($p_k > 0,05$); ($p_a < 0,001$)

Примечания: * — количество животных в группе; p_k — по отношению к интактному контролю; p_a — по отношению группе алкоголизации.

троля. Для животных, получавших триметазидин, также выявлено снижение содержания атипичных ДНК-комет по сравнению с интактным контролем, однако различия оказались статистически незначимы.

Таким образом, установлено, что у крыс сформировавшаяся АКМП не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК клеток миокарда. Вместе с тем, в результате исследований выявлен феномен, заключающийся в снижении у алкоголизованных крыс уровня клеток с высокой степенью фрагментации ДНК по сравнению с интактными животными. При этом у животных, получавших на фоне абстиненции фабомотизол, данный показатель оказался на уровне значения интактного контроля.

На сегодняшний день не существует единого мнения о происхождении атипичных ДНК-комет [10]. Считается, что ДНК-кометы с высокой степенью фрагментации ДНК, т. н. «ghost cells» или «hedgehogs» формируют клетки, находящиеся на стадии апоптоза или пред-апоптотической гибели, что подтверждалось данными о корреляционной зависимости уровней таких клеток с показателем апоптоза, оцениваемого классическими методами (TUNEL, FACS) [11]. В то же время такие ДНК-кометы выявляются и для клеток, гибнущих вследствие цитотоксического воздействия [10, 12].

Предполагая возможный вклад процессов клеточной гибели в наблюдаемые эффекты были повторены эксперименты с оценкой повреждений ДНК в нейтральной версии метода ДНК-комет с параллельной оценкой уровней апоптоза. Нейтральная версия метода позволяет оценить исключительно двунитевые разрывы в ДНК, характерные при фрагментации хро-

матина в ходе реализации программы апоптоза. Полученные данные представлены в табл. 2.

Как и в экспериментах с щелочной версией метода уровень поврежденности ДНК в миокарде крыс с АКМП статистически значимо не отличался от показателя для интактного контроля. При этом у интактных крыс значение поврежденности ДНК, оцениваемое по показателю % ДНК в хвосте, оказалось значимо ниже, по сравнению с аналогичным показателем, получаемым при щелочной версии метода — $12,0 \pm 3,9$ против $36,9 \pm 5,3$ %. Полученные данные свидетельствуют о том, что повреждения ДНК в миокарде крыс в условиях физиологической нормы представлены в большей степени одонитевыми разрывами и/или щелочно-лабильными сайтами. Не выявлено отличий в оцениваемом показателе для животных, получавших триметазидин (30 мг/кг) и комбинацию фабомотизол (10 мг/кг) + триметазидин (20 мг/кг) на фоне абстиненции.

Таблица 2

Поврежденность ДНК клеток миокарда крыс с АКМП и влияние на наблюдаемые эффекты триметазидина *per se* или в комбинации с фабомотизолом. Нейтральная версия метода ДНК-комет

Экспериментальная группа	Доза препарата (мг/кг/сут.)	n*	% ДНК в хвосте (M ± m)	Атипичных ДНК-комет (%)
Интakтный контроль	-	5	12,0 ± 3,9	8,0
Алкоголизация	-	5	9,7 ± 2,0 ($p_k = 0,570$)	2,0 ($p_k < 0,05$)
Алкоголизация + триметазидин	30	6	18,2 ± 1,9 ($p_a = 0,170$)	7,3 ($p_k > 0,05$); ($p_a < 0,05$)
Алкоголизация + триметазидин + фабомотизол	20 + 10	5	8,7 ± 2,1 ($p_a = 0,180$)	5,1 ($p_k > 0,05$); ($p_a < 0,05$)

Примечания: * — число животных в группе; p_k — по отношению к интактному контролю; p_a — по отношению группе алкоголизации.

Выявлено статистически значимое снижение уровня атипичных ДНК-комет в группе крыс с АКМП по сравнению с животными интактного контроля (1,9 против 7,1 %). В группе животных, получавших триметазидин, данный показатель оказался статистически значимо выше по сравнению с группой без введения препарата и не отличался от значения для интактного контроля. Для животных, получавших комбинацию триметазидин + фабомотизол, также наблюдалось повышение процентного содержания атипичных



Рис. 2. TUNEL-анализ миокарда крысы (ув. $\times 1000$). Стрелкой указан апоптотический кардиомиоцит

ДНК-комет по сравнению с алкоголизированными животными.

Анализ данных TUNEL показал, что у контрольных животных наблюдается незначительный уровень кардиомиоцитов, находящихся на стадии апоптоза (рис. 2). Индекс апоптоза составил в среднем 0,014, что согласуется с данными литературы [13]. Ни в одной из экспериментальных групп не выявлено значимых отличий по сравнению с контрольной — индекс апоптоза для группы животных с АКМП и животных, получавших фабомотизол составил 0,02 и 0,015, соответственно.

Таким образом, в ходе исследований установлено, что сформировавшаяся АКМП у крыс не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК и апоптотической гибелью кардиомиоцитов. У контрольных животных индекс апоптоза составил 0,014 (1,4 % апоптотических клеток), тогда как в ~8 % кардиомиоцитов наблюдали высокую степень фрагментации ДНК. Настоящие данные позволяют заключить, что выявляемые атипичные ДНК-кометы не могут рассматриваться как апоптотические, и клеточная гибель кардиомиоцитов реализуется отличным от апоптоза путём.

Согласно современным представлениям, ведущую роль в поддержании тканевого гомеостаза в сердечной мышце играет процесс аутофагии [14]. Нарушение аутофагии установлено при гипертензии, ишемии-реперфузии, инфаркте миокарда, а также при АКМП [14, 15]. Высокая активность аутофагии в сердечной мышце у пациентов с дилатированной кардиомиопатией ассоциировалась с лучшим прогнозом [16]. Индуктор аутофагии рапамицин снижал выраженность экспериментальной АКМП у крыс [17].

Деградация ДНК клеток в процессе аутофагии происходит предположительно при участии фермента ДНКазы II, которая вносит разрывы в ДНК, не детектируемые методом TUNEL [18]. В настоящем исследовании выявлен низкий уровень TUNEL-позитивных кардиомиоцитов, тогда как около 8 % имели фрагментированную ДНК. Вышеописанное позволяет предполагать, что атипичные ДНК-кометы на препаратах

миокарда крыс могут формировать клетки, находящиеся на стадии аутофагической деградации хроматина. В пользу этого предположения косвенно свидетельствуют полученные данные о значительном снижении таких ДНК-комет у крыс с АКМП, при которой наблюдается ингибирование аутофагии в ткани миокарда [15]. Ранее было показано, что фабомотизол и триметазидин проявляют кардиопротективное действие, статистически значимо снижая интенсивность дилатационной алкогольной кардиомиопатии [6]. В настоящем исследовании введение на фоне абстиненции фабомотизола и триметазидина *per se* или в комбинации приводило к увеличению содержания атипичных ДНК-комет в миокарде крыс с АКМП до значений интактного контроля. Это позволяет рассматривать появление кардиомиоцитов с фрагментированной ДНК как важный механизм регуляции и поддержания гомеостаза миокарда. Полученные данные определяют перспективность исследований, направленных на изучение роли и механизмов аутофагии в функционировании миокарда с целью разработки фармакологических мишеней для терапии АКМП и других сердечно-сосудистых патологий.

Заключение

Сформировавшаяся АКМП у крыс не сопровождается увеличением уровня повреждений ДНК и апоптотической гибелью клеток миокарда. У крыс с АКМП выявлено снижение уровня кардиомиоцитов с высокой степенью фрагментации ДНК, детектируемых на препаратах в виде атипичных ДНК-комет и являющихся, предположительно, клетками на стадии аутофагической фрагментации хроматина. Фабомотизол и триметазидин или их комбинации, вводимые животным с АКМП на фоне абстиненции, приводят к восстановлению уровней клеток с фрагментированной ДНК до значений физиологической нормы, что свидетельствует о значимой роли их возникновения в поддержании тканевого гомеостаза миокарда.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Жанатаев Алий Курманович*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: zhanataev@academpharm.ru

SPIN-код: 7070-0510

к. б. н., зав. лабораторией фармакологии мутагенеза
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
Москва**Zhanataev Alii***Corresponding author*

e-mail: zhanataev@academpharm.ru

SPIN code: 7070-0510

Candidate of Biological Sciences, head of laboratory
of pharmacology of mutagenesis FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow**Мирошкина Ирина Александровна**

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-код: 4697-7938

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

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research Officer at the laboratory of drug toxicology
FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow**Цорин Иосиф Борисович**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скри-
нинга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Заку-
сова», Москва**Tsorin Iosif**

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Doctor of Biological Sciences, leading researcher at
the laboratory of pharmacological screening FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow**Чайка Злата Владимировна**

SPIN-код: 1680-2370

н. с. лаборатории фармакологии мутагенеза ФГБ-
НУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
Москва**Chayka Zlata**

SPIN code: 1680-2370

Research Officer at the laboratory of pharmacology
of mutagenesis FSBI «Zakusov institute of
Pharmacology», Moscow**Крыжановский Сергей Александрович**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скри-
нинга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. За-
кусова», Москва**Kryzhanovskii Sergei**

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, head of the laboratory of
pharmacological screening FSBI «Zakusov institute
of Pharmacology», Moscow**Дурнев Андрей Дмитриевич**

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. лаборато-
рией лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Durnev Andrei**

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

Grand PhD Medical Sciences, Professor,
Corresponding Member, RAS, head of the laboratory
of drug toxicology, FSBI «Zakusov institute of
Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Ивашкин В.Т., Драпкина О.М., Ашихмин Я.И. Алкоголь-
ная кардиомиопатия // *Медицинская помощь: Научно-практиче-
ский журнал*. — 2006. — №3. — С.11–15. [Ivashkin VT, Drapkina OM,
Yashikhmin YI. Alcoholic cardio-myopathy. *Meditinskaya pomoshch*:
Nauchno-prakticheskii zhurnal. 2006;(3):11–15. (In Russ).]
2. Юсупова А.О. Алкогольная кардиомиопатия: основ-

ные аспекты эпидемиологии, патогенеза и лекарственной терапии
// *Рациональная фармакотерапия в кардиологии*. — 2014. — Т.10.
— №6. — С:651–658. [Yusupova AO. Alcoholic cardiomyopathy: basic
aspects of epidemiology, pathogenesis and pharmacotherapy. *Rational
Pharmacotherapy in Cardiology*. 2014;10(6):651–658. (In Russ).]

3. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., и др. Трансля-
ционная модель алкогольной кардиомиопатии // *Молекулярная меди-
цина*. — 2015. — №3. — С.40–47. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Kolik LG,

- et al. Translation model of alcoholic cardiomyopathy. *Molecular medicine*. 2015;(3):40–47. (In Russ.). DOI: 10.1007/s10517-017-3865-0
4. Piano MR, Phillips SA. Alcoholic cardiomyopathy: pathophysiologic insights. *Cardiovasc. Toxicol.* 2014;14(4):291–308. DOI: 10.1007/s12012-014-9252-4
 5. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Шредер О.В., и др. Генотоксические поражения и болезни // *Молекулярная медицина*. — 2013. — №3. — С.3–19. [Durnev AD, Zhanataev AK, Shreder OV, et al. Genotoxic events and diseases. *Molecular medicine*. 2013;(3):3–19. (In Russ).]
 6. Цорин И.Б., Мирошкина И.А., Ионова Е.О., и др. Сравнительное изучение кардиопротекторного действия триметазидина и фабомотизола гидрохлорида у крыс со сформировавшейся алкогольной кардиомиопатией в условиях продолжающегося потребления этанола // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. — 2016. — №3. — С.38–41. [Tsorin IB, Miroshkina IA, Ionova EO, et al. Comparative study of the trimetazidine and fabomotizole hydrochloride cardioprotective effect in rats with established alcoholic cardiomyopathy with the continued ethanol consumptio. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2016;(3):38–41. (In Russ).]
 7. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. *Mutagenesis*. 2003;18(1):45–51.
 8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч.1. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях. — М.: Гриф и К; 2012. — С.115–128. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendatsii po otsenke DNK-povrezhdenii metodom shchelochного gel'elektroforeza ot del'nykh kletok v farmakologicheskikh issledovaniyakh. Moscow: Grif i K; 2012. P. 115–128. (In Russ).]
 9. Сапожников А.Г., Доросевич А.Е. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. — С.: САУ; 2000. [Sapozhnikov AG, Dorosevich AE. Gistologicheskaya i mikroskopicheskaya tekhnika: Rukovodstvo. Smolensk: SAU; 2000. (In Russ).]
 10. Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Чайка З.В., и др. Феномен атипичных ДНК-комет // *Цитология*. — 2017. — Т.59. — №3. — С.163–168. [Zhanataev AK, Anisina EA, Chayka ZV, et al. Phenomenon of atypical DNA comets. *Tsitologiya*. 2017;59 (3):163–168. (In Russ).]
 11. Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, et al. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*. 2013;28(4):427–432. DOI: 10.1093/mutage/get018
 12. Hartmann A, Kiskinis E, Fjdlman A, et al. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. *Mutat Res*. 2001;(497):199–212.
 13. Akiyama K, Gluckman TL, Terhakopian A, et al. Apoptosis in experimental myocardial infarction in situ and in the perfused heart in vitro. *Tissue Cell*. 1997;(29):733–743.
 14. Wang S, Ren J. Role of autophagy and regulatory mechanisms in alcoholic cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2018 Jun;1864(6 Pt A):2003–2009. DOI: 10.1016/j.bbadis.2018.03.016
 15. Shimomura H, Terasaki F, Hayashi T, et al. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn Circ J*. 2001;(65):965–968. DOI: 10.1253/jcj.65.965
 16. Saito T, Asai K, Sato S, et al. Autophagic vacuoles in cardiomyocytes of dilated cardiomyopathy with initially decompensated heart failure predict improved prognosis. *Autophagy*. 2016;12(3):579–87. DOI: 10.1080/15548627.2016.1145326
 17. Tu X, Wang C, Ru X, et al. Therapeutic effects of rapamycin on alcoholic cardiomyopathy. *Exp Ther Med*. 2017 Oct;14(4):2763–2770. DOI: 10.3892/etm.2017.4901
 18. Fujiwara Y, Wada K, Kabuta T. Lysosomal degradation of intracellular nucleic acids-multiple autophagic pathways. *J Biochem*. 2017 Feb 1;161(2):145–154. DOI: 10.1093/jb/mvw085

Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека

Торшин И.Ю.^{1,2}, Громова О.А.^{1,2}, Фролова Д.Е.³,
Гришина Т.Р.³, Лапочкина Н.П.³

¹ – Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Информатика и управление» Российской академии наук», Москва

² – Центр хранения и анализа больших данных, МГУ, Москва

³ – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ивановская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Иваново

Резюме. Различные типы клеток по-разному откликаются на воздействие витамина D₃. В работе представлены результаты дозозависимого дифференциального хемотранскриптомного анализа холекальциферола по отношению к клеткам опухоли молочной железы (линия MCF7) и к клеткам-предшественникам нейронов (линия NPC). В опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов), и снижалась экспрессия генов, вовлечённых в поддержание энергетического метаболизма (482 гена), деление/пролиферацию клеток (387 генов), ремонт ДНК (391 ген), синтез и транспорт белков (188 генов) и в поддержание хронического воспаления (факторы ФНО/NF-κB, 105 генов). В нейрональных клетках схожие изменения в экспрессии этих категорий генов происходили в значительно меньшей степени и не достигали статистической значимости. Снижение ремонта ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, снижение энергетического метаболизма снижает способность опухолевых клеток к делению и к сопротивлению терапевтическому воздействию. Интересно отметить, что витамин D₃ способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (9 генов) и способствовал усилению противоопухолевых эффектов витамина А (5 генов). Также, витамин D₃ снижал экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, c-src тирозинкиназа, c-тус и др). Таким образом, витамин D₃ дозозависимо подавлял деление именно опухолевых клеток, не оказывая негативного воздействия на выживаемость нейронов.

Ключевые слова: хемотранскриптомика; холекальциферол; интеллектуальный анализ данных; фармакоинформатика; противоопухолевое действие

Для цитирования:

Торшин И.Ю., Громова О.А., Фролова Д.Е., Гришина Т.Р., Лапочкина Н.П. Дозозависимый хемотранскриптомный анализ дифференциального действия витамина D на экспрессию генов в клетках-предшественниках нейронов NPC и в опухолевых клетках MCF7 человека // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.35–51. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10013.

Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the differential effects of vitamin D₃ on gene expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7 tumor cells

Torshin I.Yu.^{1,2}, Gromova O.A.^{1,2}, Frolova D.E.³, Grishina T.R.³, Lapochkina N.P.³

¹ – Federal Research Center «Computer Science and Control» of the Russian Academy of Sciences, Moscow

² – Center for storage and analysis of big data, Moscow State University, Moscow

³ – Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Ivanovo State Medical Academy» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

Resume. Different cell types respond differently to the effects of vitamin D₃. The paper presents the results of a dose-dependent differential chemotranscriptome analysis of vitamin D₃ in relation to breast tumor cells (MCF7 line) and neuron progenitor cells (NPC line). Expression of the genes involved in immunomodulation (192 genes) was significantly increased in tumor cells and in the intracellular signaling from receptors (275 genes) and the expression of genes involved in maintaining energy metabolism (482 genes), cell division / proliferation (387 genes), DNA repair (391 gene), synthesis and transport of proteins (188 genes) and in maintaining chronic inflammation (factors of TNF / NF-κB. 105 genes). In neuronal cells, similar changes in the expression of these categories of genes occurred to a much lesser extent and did not reach statistical significance. The reduction in DNA repair in tumor cells stimulates their apoptosis, the decrease in energy metabolism reduces the ability of tumor cells to divide and to resist therapeutic effects. It is interesting to note that vitamin D₃ contributed to a decrease in the expression of genes supporting the cellular response to gamma radiation (9 genes) and contributed to the enhancement

of the antitumor effects of vitamin A (5 genes). Also, vitamin D₃ reduced the expression of genes that express potential target proteins of antitumor drugs (casein kinase, c-src tyrosine kinase, c-myc, etc.). Thus, vitamin D₃ suppressed the division of tumor cells in a dose-dependent manner, without adversely affecting the survival of neurons.

Keywords: chemotranscriptomics, cholecalciferol, data mining; pharmacoinformatics; antitumor effect; big data

For citations:

Torshin IYu, Gromova OA, Frolova DE, Grishina TR, Lapochkina N.P. Dose-dependent chemotranscriptomics analysis of the differential effects of vitamin D₃ on gene expression in human neuronal progenitor cells NPC and in MCF7 tumor cells. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:35–51. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10013.

Введение

Физиологическое воздействие витамина D₃ не ограничивается общеизвестной ролью в регуляции гомеостаза кальция и фосфора, но также ассоциировано с комплексом иммуномодулирующих, нейропротекторных, противоопухолевых свойств, влияниями на уровни факторов роста и обновления тканей, поддержание баланса между жировой и мышечной тканями, синтез гормонов, липидный метаболизм и др. [1].

Активация рецепторов VDR является наиважнейшим способом реализации биологических эффектов витамина D₃, попадающего в ЖКТ в форме холекальциферола. Формирование нанодисперсной водной эмульсии является первым важным шагом усвоения витамина D₃. Витамин D₃ может поступать в ЖКТ уже в виде раствора мицелл (препарат «Аквадетрим») или же эмульгироваться внутри кишечника при участии желчных кислот в тонком кишечнике. Всасываясь из мицелл в кровь, холекальциферол поступает в печень и почки, посредством которых синтезируется наиболее биологически активный витамин D₃ — кальцитриол (1,25-дигидроксивитамин D₃ или «1,25(OH)2D₃»). Биологическое воздействие активной формы витами-

на D₃ оказывается через связывание с рецептором витамина D (VDR) [1, 2]. Рецептор витамина D, подобно стероидным и многим другим гормональным рецепторам, является фактором транскрипции, регулирующим экспрессию нескольких тысяч генов в геноме человека. Молекула рецептора включает витамин-связывающий и ДНК-связывающий домены (рис. 1).

Далеко не все роли витамина D были исследованы. Поэтому, исследования воздействий рецепторов VDR с геномной ДНК (полногеномные анализы) имеют важное значение для комплексной оценки физиологического воздействия витамина D на здоровье человека. В частности, системно-биологический анализ данных полногеномных исследований рецептора VDR, проведенных секвенированием посредством иммунопреципитации хроматина (технология ChIP-seq), указал на весьма широкий спектр потенциальных применений витамина D в терапии [3]. Было установлено потенциальное воздействие витамина D на транскрипцию около 2 700 генов человека. Была произведена рубрикация всех известных к настоящему времени специфических биологических ролей витамина D, которые включают поддержание стабильности генома (в т. ч. цикл деления клетки, ремонт ДНК, реструктурирование хро-

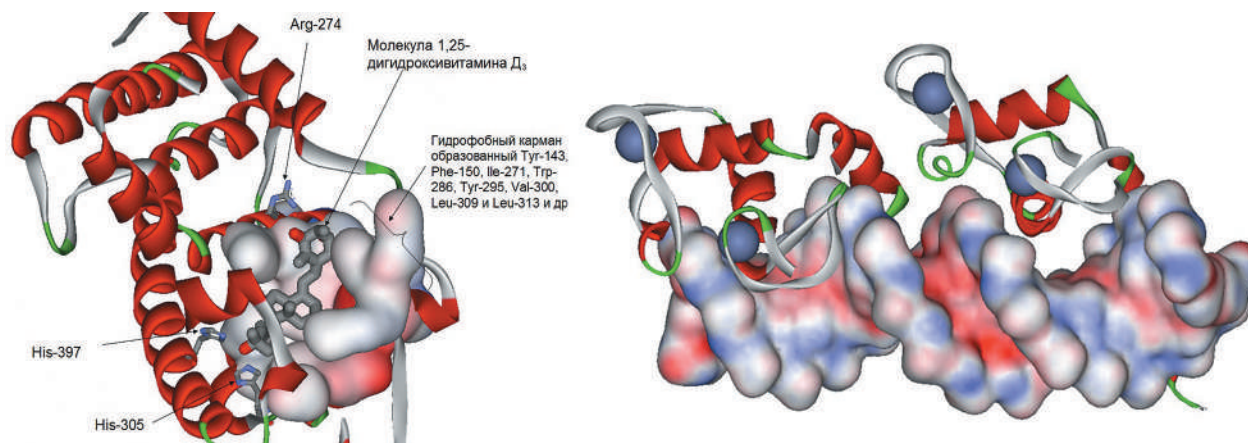


Рис. 1. Пространственная структура рецептора витамина D (VDR)

А) Витамин-связывающий домен рецептора

Б) ДНК-связывающий домен рецептора. Показаны атомы цинка (сферы) необходимые для взаимодействия с геномной ДНК и активации рецептором процессов транскрипции



Рис. 2. Результаты полногеномного анализа сайтов связывания рецептора витамина D в геноме человека

мосом), поддержку процессов синтеза и деградации белков, иммунитета, регуляцию эмбриогенеза, энергетический метаболизм. К геномным ролям витамина D также относятся: осуществление эффектов нейротрофических и ростовых факторов (в т. ч. инсулина), регуляция свертывания крови, гаметогенез и апоптоз (рис. 2). Результаты анализа также указали на эпигенетический потенциал витамина D, осуществляющийся посредством нормализации ацетилирования гистонов — специальных ДНК-стабилизирующих белков, и существенно расширили перспективы применений препаратов витамина D для профилактики и терапии широкого круга заболеваний [3].

С терапевтической точки зрения крайне важно знать о дифференцированном действии витамина D на различные типы клеток. Фармакологический опыт показывает, что подавляющее большинство синтетических лекарств действуют по очень узким молекулярным механизмам, ингибируя некоторые фиксированные белки (например, статины ингибируют HMG-CoA-редуктазу, цитотоксические противоопухолевые препараты ингибируют те или иные киназы и др.). Поэтому, ожидать существенных различий при воздействии на разные типы клеток, по умолчанию, не приходится.

В то же время, витамин D, действуя в значительной мере через одноименный рецептор (VDR), влияет на экспрессию (транскрипцию) нескольких тысяч генов. Поскольку на транскрипцию генов влияют и многие другие факторы, связанные с состоянием

клетки, то эффекты витамина D будут в существенной мере зависеть от типа клеток. Наблюдаемые в экспериментальных и клинических исследованиях противоопухолевые эффекты витамина D указывают на ингибирование роста опухолевых клеток без какого-либо негативного воздействия на другие типы клеток. Поэтому, представляет интерес выяснить, каким именно образом осуществляется такое дифференцированное действие витамина D.

Изучение дифференцированного действия витамина D на опухолевые клетки особенно важно, принимая во внимание необходимость продолжительного использования препаратов витамина D. Дело в том, что формирование резистентности опухолевых клеток к различным противоопухолевым препаратам осуществляется, в основном, на уровне протеома (секвестрация и выведение лекарств, повышение активности ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков, повышение репарации ДНК, подавление апоптотических сигнальных каскадов, пребывание клетки вне фазы клеточного цикла, взаимодействие с ростовыми факторами и цитокинами) [4]. Поэтому, резистентность опухолевых клеток к действию того или иного препарата вырабатывается гораздо сложнее, если препарат не только «тактически» ингибирует тот или иной белок протеома, но, «стратегически» снижает экспрессию генов, важных для выживания и пролиферации опухолевых клеток (что и наблюдается в случае кальцитриола).

В настоящей работе представлены результаты хемотранскриптомного исследования дозозависимых эффектов воздействия кальцитриола на транскрипцию 12 700 аннотированных генов человека в клетках-предшественниках нейронов (линия NPC) и линии MCF7 опухолевых клеток молочной железы. Моделировалась стимуляция клеток кальцитриолом в 6 различных концентрациях в течение 24 ч. В результате проведенного анализа установлены функциональные группы генов и конкретные гены, экспрессия которых дозозависимо и достоверно изменяется под воздействием кальцитриола в двух исследованных типах клеток. Соответственно, была получена комплексная дифференциальная картина возможных воздействий кальцитриола на транскриптом опухолевых и нормальных клеток человека.

Материалы и методы

Транскриптомные исследования лекарств *in vitro* требуют комплекса специального оборудования для анализа экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов, крайней аккуратности в выборе анализируемых клеточных культур, обработке получаемых данных и, поэтому, весьма дорогостоящи (от 10 000 до 20 000 евро на транскриптомное исследование только 1-й молекулы). В общем случае, такого рода исследования практически не доступны ни в России, ни за рубежом для подавляющего большинства врачей-исследователей.

В то же время, в базе данных GEO (Gene Expression Omnibus. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) накоплены результаты более чем 160 000 транскриптомных исследований (>50 000 терабайт транскриптомных данных). С использованием новейших методов искусственного интеллекта для анализа «сверхбольших данных» (big data) в Институте фармакоинформатики при ФИЦ ИУ РАН был разработан метод хемотранскриптомного анализа эффектов молекул.

Результаты транскриптомных экспериментов в базе данных GEO представлены в виде таблиц, столбцам которой соответствуют гены, а строкам — соответствующие воздействия на клетку (например, те или иные молекулы). Элементами таблицы являются изменения экспрессии гена при соответствующем воздействии. Каждой такой «таблице транскриптомного эксперимента» соответствуют (1) *тип клеток*, для которых изучались изменения экспрессии, (2) *интенсивность воздействия* (прежде всего, концентрации воздействующих молекул) и (3) *время воздействия* (6, 12, 24 ч и др.). Изменения экспрессии оцениваются относительно контроля (как правило, ДМСО, диметилсульфоксид).

При задании (1) *типа клеток* (например, фибробласты), (2) концентрации и (3) времени воздействия,

каждый столбец такой таблицы соответствует химической реакции «Ген_{*i*} → мРНК_{*j*}», в результате которой осуществляется синтез *i*-ой молекулы мРНК_{*j*}, соответствующей *i*-ому гену (Ген_{*i*}). Данные, содержащиеся в таком столбце таблицы **T** транскриптомного эксперимента, включающей информацию об изменении экспрессии **N** генов при воздействии **n** молекул, могут рассматриваться как описание определённого элемента реактома (т. е. совокупности всех химических реакций). Соответственно, становится возможным применение теории хемографов [5], методологии хемоинформационного [6–9] и хемореактомного анализа [9–12] для осуществления хемотранскриптомного моделирования.

Хемотранскриптомный анализ. Исходной выборкой информации для обучения алгоритмов хемотранскриптомного анализа является *i*-й $g_i = (X_j, \Delta_j)^T$ столбец таблицы, $T = (X_j, \Delta_j)$, $i = 1, \dots, N$, $j = 1, \dots, n$ соответствующий *i*-му гену и содержащий информацию о структуре *j*-й воздействующей молекулы (хемограф X_j) и изменение транскрипции (экспрессии) генов при воздействии данной молекулы, $\Delta_j \in R$. Хемограф (χ -граф) — особая разновидность графа (т. е. математического объекта, являющегося как совокупности множества вершин и множества ребер — связей между вершинами). Хемографом называется конечный, связный, неориентированный, размеченный граф без петель, с кликовым числом, не превышающим 3.

Данные, представленные в столбцах g_i , обрабатываются методами хемоинформационного анализа, основанными на комбинаторной теории разрешимости [9–12]. Комбинаторная теория разрешимости, представляющая собой развитие алгебраического подхода к задачам распознавания, является современным математическим инструментом для исследования признаков описаний объектов. В применении к анализу хемографов, практически важны *теорема о полноте кортежей инвариантов произвольного хемографа и теорема соответствия критерия полноты инварианта критерию разрешимости/регулярности* [5, 9], на основании которых становится возможным определение и настройка («обучение») функций расстояния между хемографами.

При использовании *метрики Хэмминга*, функция расстояния между хемографами d_χ над бинарными χ -инвариантами определяется как

$$d_\chi(X_1, X_2) = \frac{1}{|\chi|} \sum_{k=1}^{|\chi|} \omega_k \hat{i}[k] \hat{j}[X_1] \chi \oplus \hat{i}[k] \hat{j}[X_2] \chi$$

где:

χ — множество элементарных χ -инвариантов (всех возможных фрагментов химических структур);

$\hat{i}[\cdot] \chi$ — кортеж-инвариант (список фрагментов структур, применимый к структуре любой молекулы);

$\hat{B}[X_j]$ — способ вычисления бинарных признаков описаний для хемографа.

X_j , соответствующих фрагментам молекулярной структуры из множества χ ;

ω_k — вес k -го признака. Приведённое выше выражение, отражающее «химическое расстояние» между двумя произвольными молекулами X_1 и X_2 , является основой хемоинформационного анализа вообще и хемотранскриптомного анализа, в частности.

Расстояние d_χ является настраиваемой метрикой, т. к. содержит произвольно настраиваемые параметры — веса ω_k . Для набора данных, заданных i -м столбцом (g_i) таблицы T транскриптомного эксперимента, настройка вектора параметров (ω_k) может осуществляться теми или иными методами машинного обучения. Мы используем метод хеометрического анализа, который подразумевает использование процедуры согласования пар метрик, одной из которых является «химическое расстояние» d_χ , а второй — метрика d_Δ , вычисляемая на основе значений изменений экспрессии Δ_j , представленных в столбце g_i . Согласование заключается в подборе таких значений веса ω_k , при которых различия между значениями согласуемой пары метрик, d_χ и d_Δ , минимально.

Задача машинного обучения для согласования метрик формулируется как $\arg \min_{(\omega_k)} [L(d_\chi(X_i, X_j), d_\Delta(\Delta_i, \Delta_j))] \quad i=1, \dots, N, j=1, \dots, n$, где L — используемая функция потерь (сумма квадратов невязок, стандартное отклонение и т. п.). Соответственно, в результате обучения алгоритма «химическое расстояние» $d_\chi(X_{i1}, X_{i2})$ между парой молекул X_{i1} и X_{i2} соответствует различию значения в значениях изменений экспрессии Δ_{i1} и Δ_{i2} , отражаемых метрикой $d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2})$ с точностью до линейного преобразования y_i , т. е. $d_\Delta(\Delta_{i1}, \Delta_{i2}) = y_i(d_\chi(X_{i1}, X_{i2})) = a_{\chi \rightarrow \Delta} d_\chi(X_{i1}, X_{i2}) + b_{\chi \rightarrow \Delta}$.

В целом, на первом этапе хемотранскриптомного анализа для i -го гена, описываемого столбцом таблицы T проводится обучение алгоритмов для вычисления химических расстояний d_χ .

На втором этапе, для исследуемой молекулы X считываются расстояния $d_\chi(X, X_j)$ до всех хемографов X_j столбца $g_i = (X_j, \Delta_j)^T$ и, по формуле $d_\Delta = y_i(d_\chi)$, вычисляются оценки рассто-

яний d_Δ от искомого изменения экспрессии Δ_X до известных значений Δ_j столбца g_i . Затем, для каждой j -й молекулы по формуле $\Delta_X = d^{-1}(d_\Delta, \Delta_j)$ вычисляются оценки искомого изменения экспрессии, образующие множество чисел $A = \{\Delta_{X_1}, \Delta_{X_2}, \dots, \Delta_{X_n}, \dots, \Delta_X\}$, к которому применяется оператор $\hat{\phi}(x)$ для формирования эмпирической функции распределения (э. ф. р.) так, что $\hat{\phi}(x)A = \sup\{|B \subseteq A | \forall a \in B : a \leq x\}|/|A|$, $x \in R$. С использованием полученной э. ф. р. $\hat{\phi}(x)A$ искомое изменение экспрессии Δ_X вычисляется как математическое ожидание $\hat{\phi}(x)A$, а точность вычисления Δ_X — как стандартное отклонение $\hat{\phi}(x)A$. Представленные далее в таблицах и рисунках оценки изменений экспрессии различных констант были получены как математическое ожидание и дисперсия соответствующей эмпирической функции распределения.

На третьем этапе, для исследуемой молекулы X для каждого гена вычисляются оценки $\Delta_X(c_m)$ при различных концентрациях c_m вещества X . Графики в координатах $\{\Delta_X(c_m), c_m\}$ анализируются методами регрессионного анализа и выявляются достоверные дозозависимые тренды изменения экспрессии в зависимости от c_m . Отбираются только те кривые $\Delta_X(c_m)$, которые могут быть описаны достоверными линейными трендами (коэффициент корреляции 0,6 и более, $p < 0,05$ по критерию Колмогорова–Смирнова) во всём диапазоне исследуемых концентраций (0,01–10 мкмоль кальцитриола). Для каждого из отобранных трендов устанавливается знак изменения экспрессии i -го гена («+»-тренд — достоверное повышение экспрессии при увеличении концентрации кальцитриола, «-»-тренд — достоверное снижение экспрессии i -го гена при увеличении концентрации кальцитриола), и соответствующие трендам гены подразделяются на список генов, для которых показано достоверное повышение экспрессии, группу генов и список генов со сниженной экспрессией. К двум полученным спискам генов применяются методы системно-биологического анализа.

Системно-биологический анализ. Списки генов с достоверным повышением или снижением экспрессии генов, которые были получены в результате применения, описанного выше хемотранскриптомного подхода, анализировались посредством метода функционального связывания [2]. Анализ проводится с использованием международной номенклатуры Gene Ontology (GO), описывающей физиологические функции генов и соответствующих белков. Данный

метод основан на системном рассмотрении органов, тканей, клеток и их мельчайших компонентов — белков, ДНК, метаболитов (в т. ч. витаминов и других микронутриентов), в рамках фундаментальных основ молекулярной биологии и биохимии. Так, на основе информации определённой геномной ДНК синтезируется соответствующий белок, выполняющий строго очерченный круг специфических функций. Как мутации гена, так и дефициты кофакторов белка (ионов металлов — кальция, магния, цинка, витаминов группы В и др.) будут приводить к падению активности тех или иных белков и проявлению той или иной специфической клинической симптоматики.

Метод анализа функциональных взаимосвязей, соединяя данные различных уровней (данные о моногенных заболеваниях, биохимические данные о кофакторах белков, данные о клеточных ролях белков, симптоматика и критерии диагностики заболеваний и т. д.), позволяет систематически рассмотреть все возможные функциональные эффекты воздействия кальцитриола на транскрипцию каждого из генов. В целом, при использовании метода анализа функциональных взаимосвязей для каждого гена человека составляется аннотированная таблица изменений экспрессии генов, включающая следующие описания [2]: соответствующий гену белок, список биохимически необходимых эссенциальных кофакторов белка (в т. ч. с указанием потребности ионов кальция для активности рассматриваемого белка), список моногенных заболеваний, связанных с полной или частичной потерей активности этого белка, список клеточных функций белка (по номенклатуре GO и др.), список отдельных симптомов заболеваний, список диагнозов по МКБ-10 и другая информация из баз данных.

Далее, в полученной таблице выделяются гены, частота встречаемости функциональных описаний которых существенно отличается при достоверном повышении экспрессии по сравнению с достоверным снижением экспрессии, и проводятся последующие анализы их функций на основании статистических критериев. Для статистической обработки результатов исследования использовались методы математической статистики, включающие расчёт числовых характеристик случайных величин, проверки статистических гипотез с использованием параметрических и непараметрических критериев, корреляционного и дисперсионного анализа. Сравнение прогнозируемых и наблюдаемых частот встречаемости исследуемых признаков проводилось с помощью критерия χ -квадрат, Т-критерия Вилкоксона—Манна—Уитни и теста Стьюдента.

Результаты и обсуждение

Хемотранскриптомный анализ (24 ч инкубации) показал достоверные дозозависимые эффек-

ты витамина D₃ на транскрипцию 3 620 генов в линии клеток MCF7 и 4 465 генов в линии клеток NPC. При этом изменения транскрипции 2 831 генов были приблизительно одинаковы в обеих линиях клеток. Достоверные дозозависимые изменения транскрипции соответствовали значению $p < 0,05$ (t-тест), модулю коэффициента корреляции более 0,5 и изменению транскрипции на 5 % или более в расчёте на 1 мкмоль витамина D₃. Для опухолевых клеток MCF7 экспрессия 1 012 генов снизилась (список генов «MCF7-»), а экспрессия 2 607 генов повысилась (список «MCF7+»). В случае нейрональных клеток NPC экспрессия 2010 генов снизилась (список «NPC-»), а экспрессия 2 454 генов повысилась (список «NPC+»). Таким образом, даже наблюдаемые различия в числах генов указывают на дифференцированность воздействия витамина D₃ на разные типы клеток.

Для установления более детальных закономерностей в группах генов, экспрессия которых дозозависимо повышалась или снижалась при моделировании воздействия витамина D₃, был проведён сравнительный системно-биологический анализ четырёх списков генов. В ходе проведения системно-биологического анализа были выявлены различия в частоте встречаемости ключевых слов в описаниях генов (данные UNIPROT), функциональных категорий генов/белков по номенклатуре GO (Gene Ontology), данных о встречаемости различных кофакторов, ассоциированных с генами заболевания и элементы реактома человека.

Анализы с использованием функциональной аннотации генов по международной номенклатуре «GO» позволили установить дифференцированное действие витамина D на опухолевые клетки и на нейрональные клетки. Были установлены достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры «GO». Экспертный анализ позволил рубрицировать эти 97 категорий в 9 функциональных групп генов: «Синтез/транспорт белка», «Регуляция экспрессии генов», «Ремонт ДНК», «Энергетический метаболизм», «Деление клеток», «Воспаление», «Внутриклеточная передача сигнала», «Деградация белка», «Иммунотототация» (табл. 1, 2). На рис. 3 отражены профили частоты встречаемости генов этих 9 функциональных групп в зависимости от количественного изменения экспрессии гена на 1 мкмоль витамина D₃.

Хемотранскриптомный анализ показал, что под воздействием витамина D₃ в линии NPC нейрональных клеток может изменяться транскрипция гораздо большего числа генов (4 465 генов), чем в линии MCF7 опухолевых клеток (3 620 генов). Тем не менее, из 97 выявленных категорий функций генов по номенклатуре GO, достоверные изменения экспрессии генов из 73 катего-

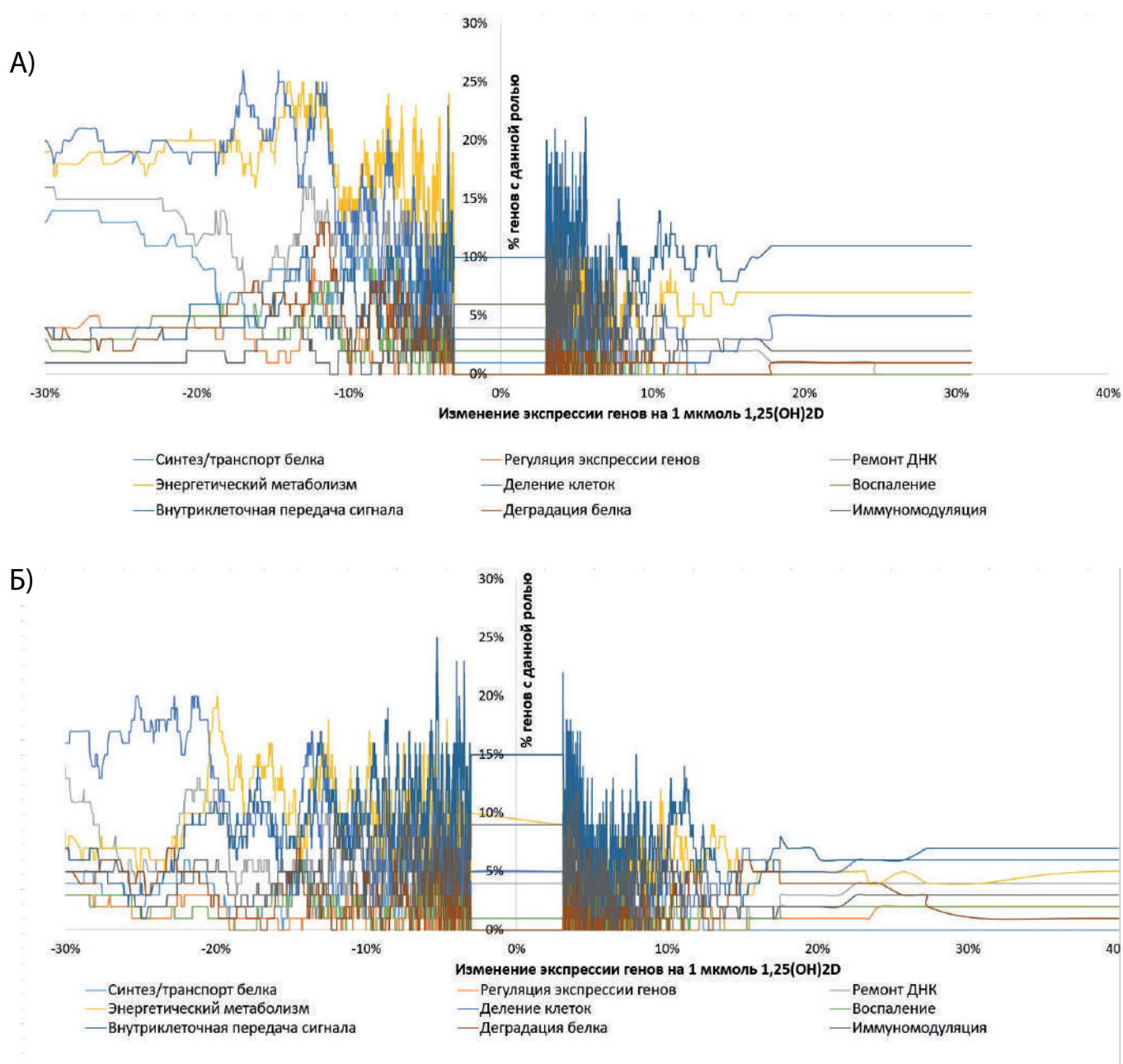


Рис. 3. Частота встречаемости генов каждой из 9 функциональных групп, экспрессия которых дозозависимо изменяется при воздействии витамина D₃ на клетки (по результатам хемотранскриптомного анализа)

А) Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для опухолевых клеток MCF7. Очевидно, что экспрессия генов систематически снижается в группах генов «Синтез/транспорт белка», «Регуляция экспрессии генов», «Ремонт ДНК», «Энергетический метаболизм», «Деление клеток», «Воспаление», «Дegrаdация белка».

Б) Профиль частоты встречаемости генов функциональных групп для нейрональных клеток NPC.

рий GO наблюдались исключительно в линии опухолевых клеток MCF7 (табл. 2), но не в линии нейрональных клеток (табл. 1). Таким образом, 74 категории генов, перечисленные в табл. 2, описывают *дифференцированное противоопухолевое воздействие витамина D*.

На рис. 4. отображены числа генов «*n*-» и «*n*+», соответствующие функциональным категориям генов, перечисленным в табл. 1 и 2. Анализ профилей ча-

стоты встречаемости генов 9 функциональных групп (рис. 4 и данных на рис. 5) позволяет утверждать, что в опухолевых клетках MCF7 систематически снижается экспрессия генов из групп «энергетический метаболизм», «деление/пролиферация клеток», «ремонт ДНК», «синтез и транспорт белков», «поддержание хронического воспаления». Одновременно, в опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия

Таблица 1

Категории международной номенклатуры генов GO (Gene Ontology), экспрессия генов в которых одинаковым образом изменялась в обеих линиях клеток (опухолевых MCF7, нейрональных NPC) при воздействии витамина D₃

Категория GO	Описание категории GO	<i>n</i> -	<i>n</i> +	<i>P</i>
	Синтез/транспорт белка			
[GO:0070125]	трансляция белка в митохондриях	35	1	1,25E-08
[GO:0006409]	экспорт тРНК из ядра	19	1	5,46E-05
[GO:0005761]	митохондриальная рибосома	13	0	0,000305
	Регуляция экспрессии генов			
[GO:0060964]	регулирование подавления генов посредством микроРНК	28	1	4,85E-07
	Ремонт ДНК			
[GO:0036297]	межниточный перекрестный ремонт ДНК	21	1	1,9E-05
[GO:0032201]	поддержание теломер через полуконсервативную репликацию	31	2	3,99E-07
[GO:0032212]	позитивное регулирование поддержания теломер посредством теломеразы	14	2	0,002647
[GO:1900034]	регулирование клеточного ответа на тепло	35	8	3,48E-05
	Энергетический метаболизм			
[GO:0006110]	регуляция гликолитического процесса	19	1	5,46E-05
	Деление клеток			
[GO:0007052]	организация митотического шпинделя	19	1	5,46E-05
[GO:0060071]	сигнальный путь Wnt	40	7	1,28E-06
[GO:0051301]	деление клеток	136	28	7,19E-18
[GO:0090263]	позитивная регуляция канонического сигнального пути Wnt	40	11	4,37E-05
[GO:0000278]	клеточный цикл (митоз)	41	12	6,07E-05
[GO:0000086]	G2/M митотический переход	47	14	2,06E-05
[GO:0071850]	остановка клеточного цикла	1	7	0,033717
	Воспаление			
[GO:0038061]	передача сигналов через NF-κB	36	4	3,67E-07
	Внутриклеточная передача сигнала			
[GO:0070374]	позитивное регулирование каскадов ERK1 и ERK2	7	31	9,16E-05
[GO:0007188]	аденилатциклаза-модулирующий G-белковый сигнальный путь рецепторов	0	7	0,008095
	Деградация белка			
[GO:0000502]	протеасомный комплекс	32	2	2,38E-07
[GO:0031398]	позитивная регуляция убиквитирования белков	14	5	0,038484
	Иммуномодуляция			
[GO:1901687]	процесс биосинтеза производных глутатиона	1	7	0,033717
[GO:0071347]	клеточный ответ на интерлейкин-1	2	15	0,001579
[GO:0071354]	клеточный ответ на интерлейкин-6	0	5	0,025256
[GO:0070498]	сигнальный путь интерлейкина-1	0	4	0,045392

Примечания: «*n*-» — число генов со сниженной экспрессией; «*n*» — число генов со повышенной экспрессией при воздействии витамина D₃; *p* — статистическая достоверность различий по критерию χ^2 .

Таблица 2

Категории международной номенклатуры генов GO (Gene Ontology), экспрессия генов в которых при воздействии витамина D₃ достоверно изменялась только в линии опухолевых MCF7

Категория GO	Описание категории GO	n-	n+	P
	Синтез/транспорт белка			
[GO:0006626]	трансляция белка в митохондриях	19	1	5,46E-05
[GO:0030150]	экспорт тРНК из ядра	10	1	0,006581
[GO:0000028]	сборка малой рибосомальной субъединицы	10	1	0,006581
[GO:0032543]	митохондриальный синтез белка	10	1	0,006581
[GO:0006400]	модификация тРНК	5	0	0,025256
[GO:0046826]	отрицательная регуляция экспорта белка из ядра	5	0	0,025256
[GO:0005840]	рибосома	14	3	0,007505
[GO:0006413]	иницирование синтеза белка (трансляции)	35	8	3,48E-05
[GO:0061077]	фолдинг белков	13	3	0,012245
	Регуляция экспрессии генов			
[GO:0003899]	5'-3'-РНК-полимеразная активность	18	0	2,12E-05
[GO:0000375]	сплайсинг мРНК	13	0	0,000305
[GO:0006362]	продолжение транскрипции от промотора РНК-полимеразы I	13	1	0,001315
[GO:0006361]	инициация транскрипции от промоторов РНКазы-1	13	1	0,001315
[GO:0048026]	позитивная регуляция сплайсинга мРНК	10	1	0,006581
	Ремонт ДНК			
[GO:0006303]	ремонт двухконцевых обрывов ДНК	25	0	5,28E-07
[GO:0006297]	ресинтез ДНК при ремонте ДНК	23	1	6,66E-06
[GO:0042276]	синтез ДНК поверх повреждений, подверженный ошибкам	20	0	7,35E-06
[GO:0070987]	безошибочный синтез ДНК поверх повреждений	18	0	2,12E-05
[GO:0000731]	синтез ДНК при ремонте ДНК	18	1	9,25E-05
[GO:0006284]	ремонт ДНК посредством вырезки повреждённых нуклеотидов	15	0	0,000104
[GO:0045739]	позитивная регуляция репарации ДНК	14	0	0,000178
[GO:0006301]	ремонт ДНК после репликации	11	1	0,003839
[GO:0043968]	ацетилирование гистона H2A	9	1	0,011309
[GO:0003684]	связывание повреждённой ДНК	26	3	1,81E-05
[GO:0031571]	контрольная точка повреждения ДНК G1	7	1	0,033717
[GO:0000076]	контрольная точка репликации ДНК	5	0	0,025256
[GO:0043097]	переработка пиримидиновых нуклеозидов	5	0	0,025256
[GO:0000002]	поддержание митохондриального генома	5	0	0,025256
[GO:0071480]	клеточный ответ на гамма-излучение	9	4	0,034559
[GO:0070911]	глобальный ремонт геномной ДНК вырезкой нуклеотидов	9	2	0,034559
[GO:0010224]	ответ на УФО	4	0	0,045392
[GO:0034644]	клеточный ответ на УФО	11	3	0,032206
[GO:0006977]	отклик на повреждение ДНК, передача сигнала посредством p53, приводящая к остановке клеточного цикла	19	6	0,009103
[GO:0060548]	отрицательная регуляция апоптоза	15	5	0,024982
[GO:0000723]	поддержание теломер	22	10	0,033183
	Внутриклеточная передача сигнала			
[GO:0006120]	митохондриальный перенос электронов, от НАДФ к убихинону	16	1	0,000267
[GO:0008137]	активность НАДФ-дегидрогеназы	15	1	0,000453
[GO:0005747]	митохондриальный комплекс I дыхательной цепи	15	1	0,000453

[GO:0001836]	высвобождение цитохрома с из митохондрий	7	0	0,008095
[GO:0006119]	окислительное фосфорилирование	6	0	0,014233
[GO:0005753]	митохондриальный АТФ-синтазный комплекс	6	0	0,014233
[GO:0006094]	глюконеогенез	16	4	0,007145
[GO:0051156]	метаболизм глюкозо-6-фосфата	4	0	0,045392
[GO:0051539]	кофактор 4/4-железо-серный кластер	14	5	0,038484
[GO:0005759]	матрикс митохондрий	81	35	1,46E-05
[GO:0005739]	митохондрия	283	133	7,88E-15
	Деление клеток			
[GO:0070374]	позитивное регулирование каскадов ERK1 и ERK2	7	31	9,16E-05
[GO:0007188]	аденилатциклаза-модулирующий G-белковый сигнальный путь рецепторов	0	7	0,008095
	Деградация белка			
[GO:0008543]	сигнальный путь рецептора фактора роста фибробластов	25	5	0,000247
[GO:0005657]	репликационная "вилка"	5	0	0,025256
[GO:0046655]	метаболизм фолиевой кислоты	5	0	0,025256
[GO:0015631]	связывание тубулина	16	4	0,007145
[GO:0035999]	интерконверсия тетрагидрофолатов	4	0	0,045392
[GO:0070531]	комплекс BRCA1-A (подавление роста опухолей)	4	0	0,045392
[GO:0045652]	регуляция дифференциации мегакариоцитов	4	13	0,028708
	Воспаление			
[GO:0033209]	сигнальный путь ФНО-альфа	35	9	8,1E-05
[GO:0032481]	позитивная регуляция синтеза интерферона типа I	14	4	0,01816
[GO:0035722]	сигнальный путь интерлейкина-12	20	9	0,040355
	Внутриклеточная передача сигнала			
[GO:0007165]	передача сигнала	76	130	0,000112
[GO:0005509]	связывание ионов кальция	45	87	0,000201
[GO:0001972]	связывание ретиноидов рецепторами	0	5	0,045069
[GO:0007259]	каскад JAK-STAT	0	8	0,004637
[GO:0030574]	катаболизм коллагена	2	13	0,004434
[GO:0045597]	положительная регуляция клеточной дифференциации	0	7	0,008095
	Деградация белка			
[GO:0019773]	альфа-субъединица протеасомы	7	0	0,008095
[GO:0000209]	полиубиквитирование белков	68	20	2,29E-07
[GO:0042787]	убиквитирование и катаболизм белков	30	13	0,009147
	Деградация белка			
[GO:0010629]	отрицательная регуляция экспрессии генов	18	34	0,025525
[GO:0006955]	иммунный ответ	12	42	3,95E-05
[GO:0002250]	адаптивный иммунный ответ	6	31	3,64E-05
[GO:0030593]	хемотаксис нейтрофилов	2	13	0,004434
[GO:0038111]	сигнальный путь интерлейкина-7	1	8	0,019493
[GO:0043124]	отрицательная регуляция IκB-киназы/NF-κB	1	9	0,011309
[GO:0042347]	отрицательная регуляция импорта NF-κappaB в ядро клетки	0	4	0,045392

Примечания: «n-» – число генов со сниженной экспрессией; «n+» – число генов со повышенной экспрессией; p – статистическая достоверность различий по критерию χ^2 .

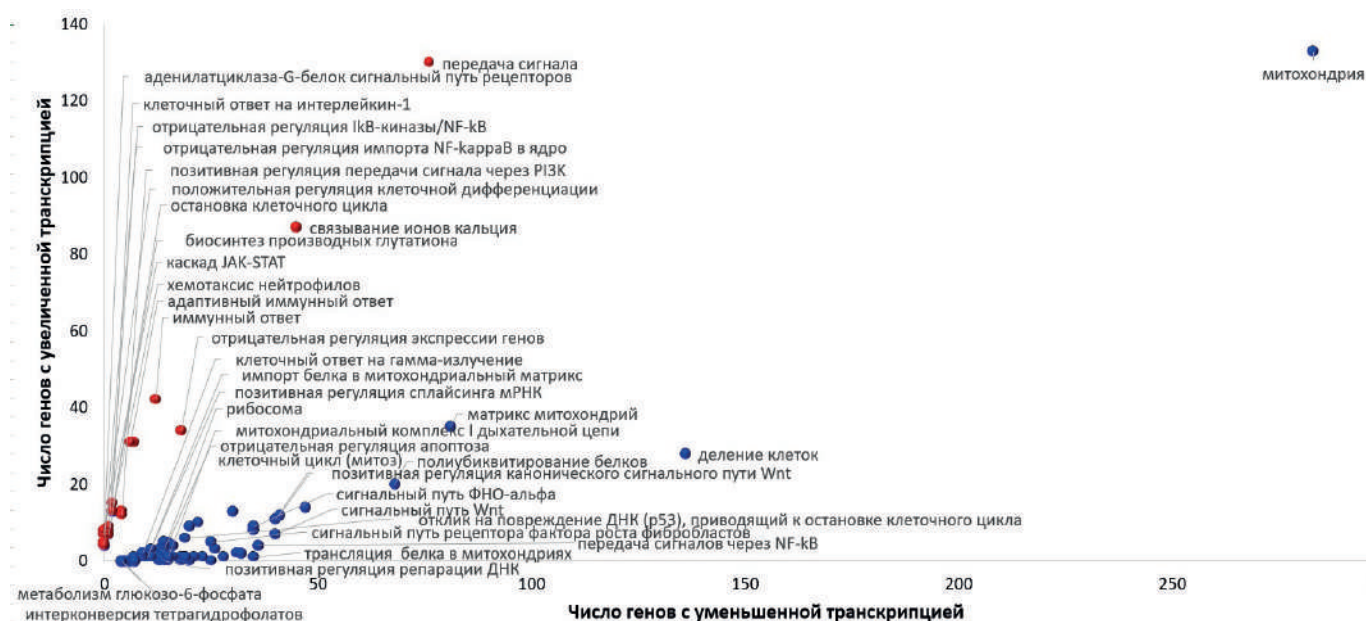


Рис. 4. Функциональные аннотации по номенклатуре GO и изменения экспрессии генов, вызываемые витамином D₃ при воздействии на опухолевые клетки линии MCF7 (по результатам хемотранскриптомного анализа)

Примечание: Красным цветом обозначены группы генов по аннотации GO, экспрессия которых преимущественно повышалась. Синим цветом обозначены группы генов, экспрессия которых преимущественно снижалась.

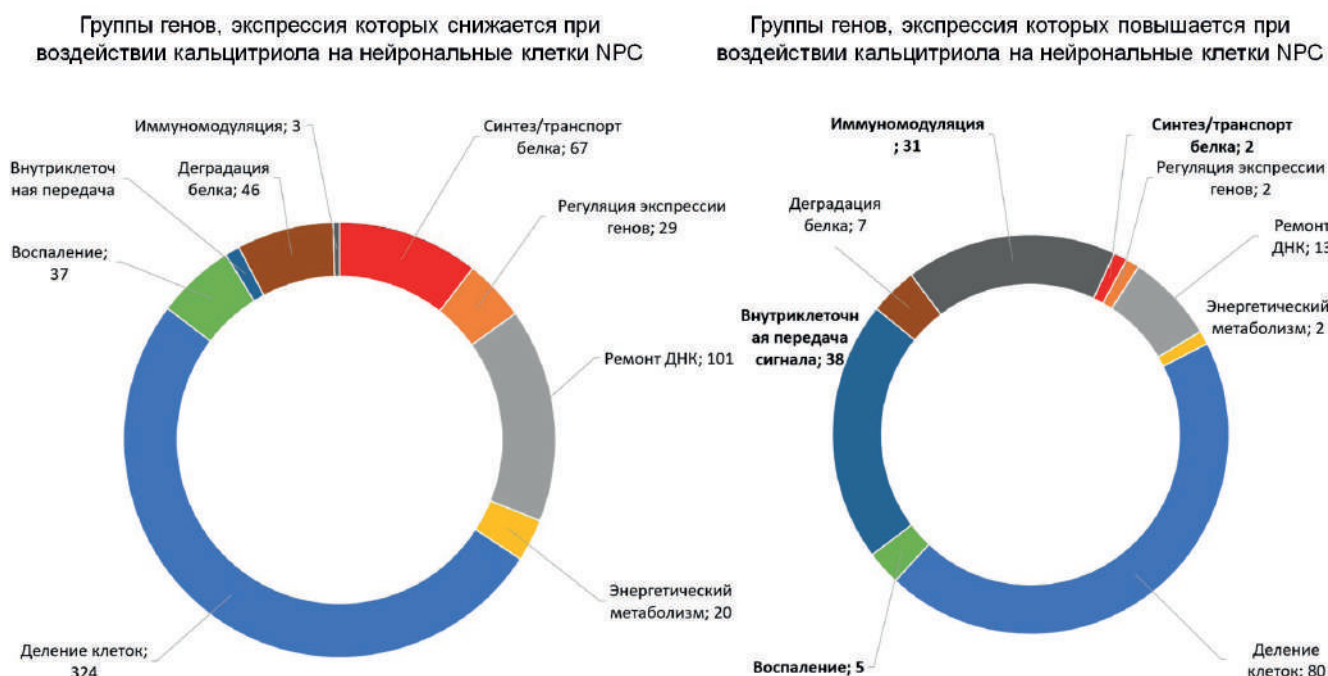


Рис. 5. Процентные соотношения встречаемости функциональных групп генов со сниженной и с повышенной экспрессией при воздействии витамина D₃ на клетки (по результатам хемотранскриптомного анализа)

генов, вовлечённых в иммуномодуляцию и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов.

Таким образом, гены, экспрессия которых дозозависимо повышается при воздействии витамина D₃, существенно отличаются по своим биологическим функциям от генов, экспрессия которых дозозависимо

понижается (на что наглядно указывают диаграммы процентных соотношений функциональных групп генов, см. рис. 5). Установленные изменения транскрипции имеют важную физиологическую интерпретацию.

Во-первых, хемотранскриптомный анализ витамина D₃ в опухолевых клетках MCF7 указывает на

систематическое снижение экспрессии генов, вовлечённых в синтез и транспорт белков (188 генов) и в деградацию белков (151 ген). Эти изменения соответствуют ингибированию *гомеостаза белков*: и новые белки синтезируются медленнее, и старые, дисфункциональные белки перерабатываются медленнее. Снижение протеасомального распада белков способствует снижению хронического воспаления (каскад NF-kB, см. далее) и, одновременно, увеличению продолжительности активации апоптотических сигнальных каскадов. Снижение синтеза белка (в т. ч. митохондриального синтеза белка, сплайсинг мРНК, транспорта и фолдинга белков) соответствует снижению количества ферментов, обеспечивающих метаболизм ксенобиотиков (в т. ч. противоопухолевых средств) и количества белков, участвующих в энергетическом метаболизме клетки (синтез АТФ).

Во-вторых, под воздействием витамина D₃ установлено выраженное снижение экспрессии генов, вовлечённых в энергетический метаболизм (482 гена, нейрональные клетки — только 20 генов, табл. 1, 2). Снижение экспрессии этих категорий генов (в т. ч. генов, кодирующих митохондриальные комплексы дыхательной цепи, ферменты окислительного фосфорилирования, метаболизма глюкозо-6-фосфата, НАДФ-дегидрогеназу и др. (табл. 2) соответствует *снижению обеспеченности опухолевых клеток АТФ*. Иначе говоря, витамин D₃ дифференцированно снижает энергообеспеченность именно опухолевых клеток, что способствует снижению интенсивности процессов пролиферации и сопротивляемость опухолевых клеток к терапевтическому воздействию.

В-третьих, витамин D₃ *способствует снижению транскрипции генов, непосредственно вовлечённых собственно в пролиферацию опухолевых клеток* (387 генов, нейрональные — 324 гена) и в процессы ремонта ДНК (391 ген, нейрональные — 101 ген). Белки, соответствующие этим генам, осуществляют такие фундаментальные процессы, как поддержание целостности теломер, ремонт ДНК, активность сигнального пути рецептора фактора роста фибробластов, метаболизм фолиевой кислоты и др. (табл. 1, 2). Снижение активности теломеразы соответствует уменьшению числа возможных делений клетки, а снижение ремонта ДНК является одним из механизмов преодоления резистентности опухолевых клеток к терапии [4]. Снижение ремонта ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, усиливая эффекты снижения синтеза АТФ.

В-четвёртых, хемотранскрипционный анализ указал на снижение транскрипции генов из функциональной группы «Хроническое воспаление» (MCF7 — 105 генов, нейрональные клетки — 37 генов). Гены этой группы вовлечены преимущественно в осуществление биологических эффектов провоспалительных факто-

ров ФНО-альфа и NF-kB. Установлено, что витамин D действительно ингибирует эффекты провоспалительного транскрипционного фактора NF-kB [1]. Результаты хемотранскрипционного анализа показывают, что данный механизм действия витамина D₃ осуществляется посредством предотвращения протеасомной деградации регуляторного белка Iκ-B и торможения транслокации NF-kB внутрь клеточного ядра. Взаимодействуя с регулятором Iκ-B, транскрипционный фактор NF-kB не может перемещаться в клеточное ядро и активировать экспрессию генов, опосредующих провоспалительные эффекты цитокина ФНО-альфа.

В-пятых, под воздействием витамина D₃ в опухолевых клетках MCF7 достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов). Экспрессия этих категорий генов повышалась и в нейрональных клетках, но в значительно меньшей степени (иммуномодуляция — 31 ген, внутриклеточная передача сигналов — 38 генов). Повышение экспрессии этих групп генов соответствует дифференцированному противоопухолевому действию витамина D.

Иммуномодуляция витамином D при воздействии на опухолевые клетки заключается в снижении хронического воспаления (экспрессия 9 генов отрицательной регуляции IκB-киназы/NF-kB и 4 генов отрицательной регуляции импорта NF-κappaB в ядро клетки) на фоне активации лимфоцитарного иммунного ответа. В опухолевых клетках MCF7 отмечено преимущественное повышение экспрессии генов, поддерживающих адаптивный иммунный ответ (31 ген), хемотаксис нейтрофилов (13 генов) и сигнальный путь интерлейкина-7 (8 генов). Интерлейкин-7 играет исключительно важную роль в делении и вызревании клеток лимфоидного ряда; дефицит интерлейкина-7 может быть одной из причин тяжёлого комбинированного иммунодефицита [13].

Интенсификация *внутриклеточной передачи сигнала* также соответствует противоопухолевому действию витамина D. Опухолевые заболевания характеризуются выраженной активацией пролиферативных сигнальных каскадов на фоне блокады каскадов, регулирующих дифференцировку клеток [14]. Поэтому, в ходе противоопухолевой терапии необходима поддержка внутриклеточной передачи сигнала, поддерживающей дифференциацию клеток.

В клетках MCF7 витамин D₃ стимулирует экспрессию генов, поддерживающих положительную регуляцию клеточной дифференциации (категория [GO:0045597], 7 генов). В частности, каскад JAK-STAT (8 генов) стимулирует дифференциацию клеток эпителия молочных желёз [15]. Стимулируя, экспрессию генов в категории [GO:0030574] «ката-

близм коллагена» (13 генов), витамин D снижает жёсткость внеклеточного матрикса вокруг опухолевых клеток. Известно, что повышенная механическая жёсткость внеклеточного матрикса вызывает механосенситивную передачу сигнала в мезенхимальных клетках, которая стимулирует пролиферацию клеток опухолей молочной железы [16]. Кроме того, рецепторы ретиноидов (категория [GO:0001972] «связывание рецепторами ретиноидов») способствуют подавлению роста опухолей через сигнальные каскады p53/p21/p16 и PI3K-AKT, способствуя ингибированию метаболизма углеводов опухолевых клеток и нормализации процессов дифференциации [17]. Таким образом, витамин D способствует усилению противоопухолевых эффектов витамина A.

Крайне интересно отметить, что витамин D способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих клеточный ответ на гамма-излучение (категория [GO:0071480], 9 генов). Например, витамин D₃ способствует снижению экспрессии гена ATR (в среднем, на 8 % на 1 мкмоль витамина D₃). Это ген кодирует одноимённый белок ATR — серин/треониновую протеинкиназу, которая действует как датчик повреждения ДНК и активирует внутриклеточную сигнализацию при ионизирующем излучении или ультрафиоле-

товом излучении. ATR фосфорилирует белки BRCA1, CHEK1, MCM2, RAD17, RPA2, SMC1, p53/TP53, гистоны H2AX/H2AFX, тем самым регулируя механизм ответа на повреждение ДНК [18, 19]. Витамин D₃ также снижает экспрессию генов (TMEM109, трансмембранный белок 109, опосредует клеточный ответ на повреждение ДНК излучением [20]), XRCC5 (белок ремонта ДНК, участвует в стабилизации повреждённых концов ДНК [21]), GTF2H5 (транскрипционный фактор, восстанавливает повреждения нуклеотидов) и др. Снижение экспрессии генов этой функциональной категории способствует усилению отклика опухолевых клеток на радиотерапию.

В заключение приведём ещё несколько примеров конкретных генов, экспрессия которых дозозависимо изменялась при хемотранскриптомном моделировании эффектов витамина D на опухолевые клетки MCF7. Витамин D снижал экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, c-src тирозинкиназа, c-тус и др. — см. табл. 3 и рис. 5).

Следует отметить, что многие из перечисленных в табл. 2 и на рис. 4–6 изменений транскрипции генов под воздействием витамина D₃ соответствуют действию уже имеющихся или перспективных про-

Таблица 3

Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамина D₃ (по результатам хемотранскриптомного анализа)

Ген	% ИЭ	Белок	Функция белка
CSNK1A1	-46,5	Казеинкиназа альфа-1	Передача сигналов в каскаде Wnt
CSK	-32,5	c-src тирозинкиназа	Подавляет передачу сигналов различными рецепторами
MTHFD1	-29,6	Метилентетрагидрофолат дегидрогеназа	Синтез биологически активных фолатов
ZDNHC7	-24,3	Цинковый палец ZDNHC7	Пальмитоилирует рецепторы эстрогенов
HSD17B10	-23,7	Гидроксистероид 17-бета дегидрогеназа 10	Катализирует 17-бета-окисление андрогенов
KLF8	-22,8	Крупнель-подобный фактор 8	Способствует прогрессии цикла деления клетки
MYCBP	-20,4	c-тус-связывающий белок	Активирует транскрипционную активность MYC-киназы
PLCB3	11,5	Фосфолипаза C-бета-3 фосфатидилинозитол-специфическая	Синтез сигнальных молекул диацилглицерина (ДАГ) и инозитол-1.4.5-трифосфата (ИФ3)
CTNNBIP1	12,0	Бета-катенин-взаимодействующий белок 1	Отрицательный регулятор сигнального пути Wnt
RASSF4	12,5	Ras-ассоциированный 4	Супрессор роста опухолей
DDIT4	14,5	Транскрипт 4, индуцируемый повреждением ДНК	Ингибирует белок mTORC1 через сигнальный путь AKT1-TSC1/2-RHEB
IRF5	15,6	Интерферон-регуляторный фактор 5	Участвует в активации транскрипции интерферонов A и B

Примечание: %ИЭ — процент изменения экспрессии на 1 мкмоль витамина D₃.

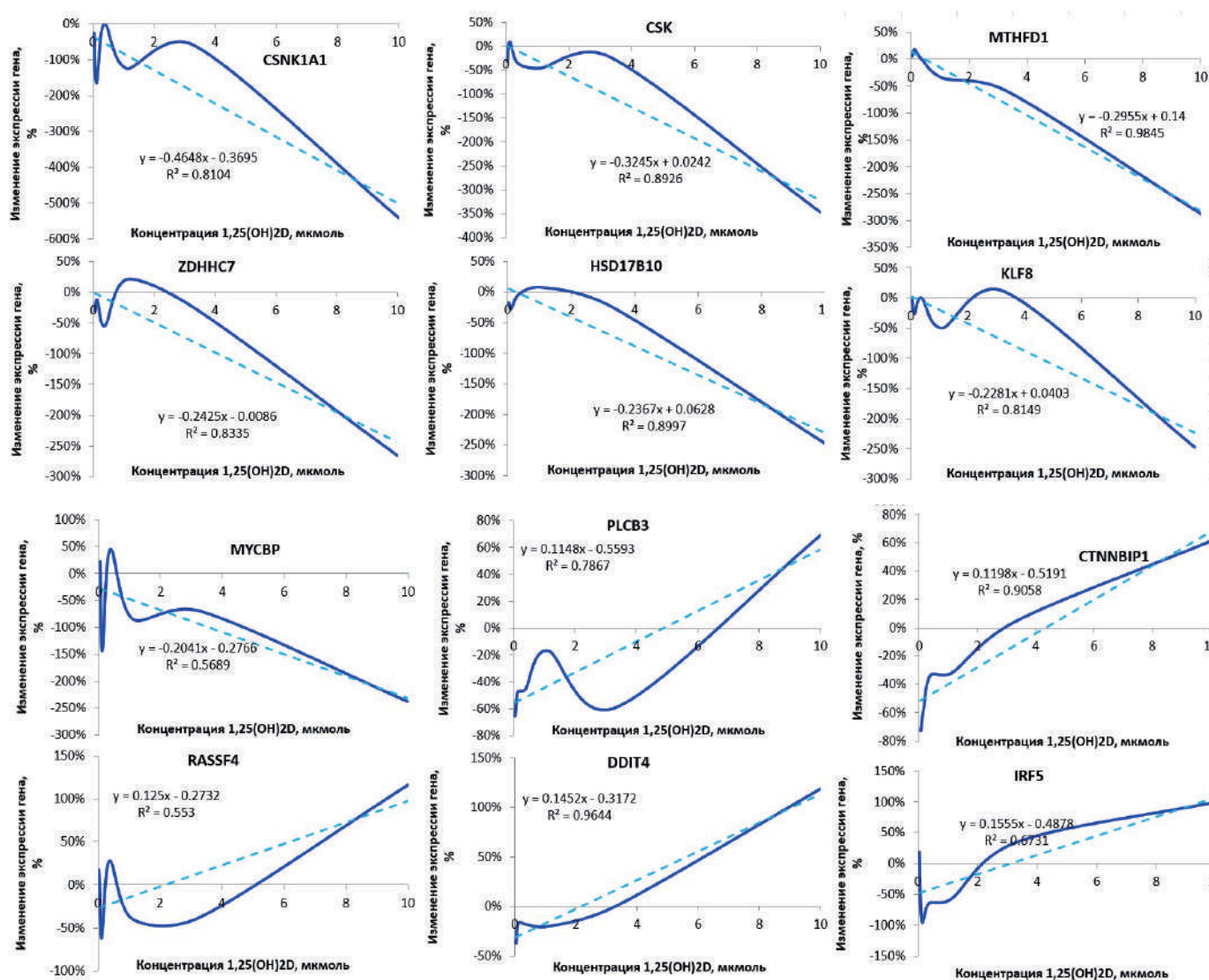


Рис. 6. Примеры дозозависимого изменения экспрессии генов под воздействием витамин D₃ (по результатам хемотранскриптомного анализа)

тивоопухолевых препаратов. Например, снижение транскрипции гена CSNK1A1 (-46,48 % на 1 мкМ), кодирующего казеинкиназу альфа-1, соответствует снижению количества молекул этого фермента в клетке. Казеинкиназы участвуют в передаче сигналов Wnt посредством фосфорилирования белков, а ингибиторы казеинкиназ – перспективные противоопухолевые препараты [22]. Повышение транскрипции гена CTNBNBP1 (11,98 % на 1 мкМ) соответствует увеличению общей внутриклеточной активности бета-катенин-взаимодействующего белка 1, который действует как отрицательный регулятор сигнального пути Wnt. Многие ингибиторы пути Wnt используются как противоопухолевые средства [23].

Снижение транскрипции генов CSK (-32,45 % на 1 мкМ), MYCBP (-20,41 % на 1 мкМ) и MTHFD1 (-29,55 % на 1 мкМ) также соответствует действию

противоопухолевых средств. Ген CSK кодирует c-src тирозинкиназу, которая участвует в регуляции роста дифференцировки, миграции клеток и иммунного ответа (фосфорилирует киназы LCK, SRC, HCK, FYN, LYN и подавляет передачу сигналов различными рецепторами [24]. Ген MYCBP, кодирующий с-тус-связывающий белок, необходим для активации транскрипционной активности MYC-киназы. Ингибиторы MYC-киназы – перспективные противоопухолевые средства. Ген MTHFD1 кодирует метилентетрагидрофолат дегидрогеназу, участвующую в эндогенном синтезе биологически активных фолатов. Как известно, антифолиевые препараты (метотрексат, триметоприм, азатиоприн, азидотимидин) являются противоопухолевыми препаратами.

Витамин D способствует снижению транскрипции генов, участвующих в метаболизме стероидных

гормонов. Ген ZDNHC7 (-24,25 % на 1 мкМ) кодирует «цинковый палец» ZDNHC7, который необходим для пальмитоилирования рецепторов эстрогенов (ESR1), прогестерона (PGR) и андрогенов (AR), направляя их в плазматическую мембрану клетки и, тем самым, усиливая действие этих стероидов на клетку [25]. Одновременно снижается транскрипция гена HSD17B10 (-23,67 % на 1 мкМ), кодирующего гидроксистероид-17-бета дегидрогеназу 10, катализирующую 17-бета-окисление андрогенов и эстрогенов. Противодействие витамином D эффектам стероидных гормонов особенно важно для такой эстроген-зависимой опухолевой линии клеток, как MCF7 [25].

Витамин D также способствует *повышению транскрипции генов, кодирующих белки с известным противоопухолевым действием*: RASSF4 (12,50 % на 1 мкМ, белок «Ras-ассоциированный домен 4» – супрессор роста опухолей, способствующий остановке цикла деления клетки и апоптозу [26]), DDIT4 (14,52 % на 1 мкМ, «транскрипт-4, индуцируемый повреждением ДНК» – ингибирует mTORC1 через сигнальный путь AKT1-TSC1/2-RHEB, активирует апоптоз в ответ на повреждение ДНК [27]), SLURP1 (18 % на 1 мкМ, белок SLURP1 обладает противоопухолевой активностью [28]) и др.

Таким образом, хемотранскриптомный анализ витамина D₃ указал на характерные изменения транскрипции генов, способствующие снижению интенсивности метаболизма белков и ДНК, снижению пролиферации клеток и хронического воспаления и, в целом, противоопухолевым эффектам. При этом было показано дифференциальное действие витамина D₃ именно на опухолевые клетки (MCF7); на нейроны витамин D₃, наоборот, оказывал разноплановое цитопротекторное действие.

Противоопухолевое действие витамина D₃ в составе «Аквадетрима» было продемонстрировано экспериментально. Исследование было проведено на 50 самцах мышей-гибридов F1 (возраст 2,5–3 мес., масса тела 26–29 г). В качестве опухолевой модели использована перевиваемая эпидермоидная карцинома лёгких Льюис (КЛЛ). Подопытные животные легко переносили препарат, не было отмечено каких-либо симптомов интоксикации. Воздействие препарата до 13 сут. развития КЛЛ сопровождалось нарастающей тенденцией торможения роста опухоли на 25–30 % ($p = 0,016$). В группе животных, получавших Аквадетрим, наблюдались отчётливые признаки подавления процессов метастазирования – число малых метастазов статистически значимо снижалось на 35–40 % ($p < 0,05$) [29]. Таким образом, препарат Аквадетрим, действующим началом которого является витамин D в водном растворе мицелл, достоверно подавляет процессы метастазирования карциномы лёгких Лью-

ис. Результаты хемотранскриптомного исследования указывают на механизмы дифференциального противоопухолевого воздействия препарата.

Заключение

Исследование транскриптомных эффектов препаратов представляет собой «передовой фронт» современной молекулярной фармакологии и позволяют установить неочевидные механизмы действия препаратов, более детально очертить спектр патологий, на которые может благоприятно воздействовать исследуемая молекула. Как правило, для подавляющего большинства имеющихся на рынке лекарств данные о воздействии на транскриптом отсутствуют. В то же время изучать эффекты лекарств на транскрипцию генов крайне важно, т. к. транскриптомные исследования указывают на долговременные последствия приёма лекарств [2]. Изучение долговременных, транскриптомных эффектов прогормона витамина D особенно важно в случае его противоопухолевых активностей.

В настоящей работе представлены результаты дифференциального хемотранскриптомного анализа витамина D₃ (Аквадетрим) по отношению к клеткам опухоли молочной железы (линия MCF7) и к клеткам-предшественникам нейронов (линия NPC) в условиях инкубации клеток с витамином D₃ в течение 24 ч. Достоверные дозозависимые эффекты влияния витамина D₃ на транскрипцию генов (что соответствует изменению транскрипции на 5 % или более на 1 мкмоль витамина D₃) показаны для 3 620 генов в линии клеток MCF7 и для 4 465 генов в линии клеток NPC. При этом оценки изменений экспрессии 2 831 генов были приблизительно одинаковы в обеих линиях клеток. Анализы с использованием функциональной аннотации генов по международной номенклатуре «GO» позволили установить дифференцированное действие витамина D на опухолевые клетки и на нейрональные клетки. Были установлены достоверные отличия в экспрессии генов, относящихся к 97 категориям номенклатуры «GO». В опухолевых клетках достоверно повышалась экспрессия генов, вовлечённых в иммуномодуляцию (192 гена) и во внутриклеточную передачу сигналов от рецепторов (275 генов). Экспрессия этих категорий генов повышалась и в нейрональных клетках, но в значительно меньшей степени (иммуномодуляция – 31 ген, внутриклеточная передача сигналов – 38 генов). В опухолевых клетках существенно снижалась экспрессия генов, вовлечённых в поддержание энергетического метаболизма (482 гена), деление/пролиферацию клеток (387 генов), ремонт ДНК (391 ген), синтез и транспорт белков (188 генов) и в поддержание хронического воспаления

(факторы ФНО/NF- κ B, 105 генов). В нейрональных клетках количества генов в этих категориях были существенно ниже (энергетический метаболизм — 20 генов, пролиферация клеток — 324 гена, ремонт ДНК — 101 ген, синтез/транспорт белков — 67 генов, поддержание воспаления — 37 генов). Снижение ремонта ДНК в опухолевых клетках стимулирует их апоптоз, снижение энергетического метаболизма снижает способность опухолевых клеток к делению и к сопротивлению терапевтическому воздействию. Интересно отметить, что витамин D₃ способствовал снижению экспрессии генов, поддерживающих кле-

точный ответ на гамма-излучение (9 генов) и способствовал усилению противоопухолевых эффектов витамина A (5 генов). Также витамин D снижал экспрессию генов, ингибиторы белков которых являются перспективными противоопухолевыми препаратами (казеинкиназа, c-src тирозинкиназа, c-myc и др.). Таким образом, витамин D₃ в существенной мере подавляет деление именно опухолевых клеток, одновременно профилируя неврологические осложнения противоопухолевой терапии.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ17-07-00935.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Громова Ольга Алексеевна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: unesco.gromova@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7663-710X

SPIN-код: 6317-9833

д. м. н., профессор, в. н. с., научный руководитель института фармакоинформатики, ФИЦ ИУ РАН, Москва; в. н. с., МГУ, Москва

Gromova Olga

Corresponding author

e-mail: unesco.gromova@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7663-710X

SPIN-код: 6317-9833

DM, professor, Leading Researcher, Head of Institute of pharmacoinformatics FRC CSC RAS, Moscow; Leading Researcher, MSU, Moscow

Торшин Иван Юрьевич

ORCID iD 0000-0002-2659-7998,

SPIN-код: 1375-1114

к. х. н., с. н. с., ФИЦ ИУ РАН, Москва; с. н. с., МГУ, Москва

Torshin Ivan

ORCID iD 0000-0002-2659-7998,

SPIN code: 1375-1114

PhD in Chemistry, Senior researcher in of Institute of Pharmacoinformatics at the Department of Intellectual Systems FRC CSC RAS, Moscow; Senior Research Officer MSU, Moscow

Фролова Дарья Евгеньевна

ассистент кафедры онкологии, ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Frolova Daria

assistant of Oncology Department, FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Гришина Татьяна Романовна

ORCID ID: 0000-0002-1665-1188

SPIN-код: 1241-0701

д. м. н., профессор, зав. кафедрой фармакологии, ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Grishina Tatiana

ORCID ID: 0000-0002-1665-1188

SPIN code: 1241-0701

DM, professor, Head of Department of pharmacology, FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Лапочкина Нина Павловна

ORCID ID: 0000-0001-6722-2810

ФГБОУ ВО ИвГМА Минздрава России

Lapochkina Nina

ORCID ID: 0000-0001-6722-2810

FSBEI HE IvSMA MOH Russia

Литература / References

1. Громова О.А., Торшин И.Ю. *Витамин D. Смена парадигмы* / под ред. Е.И. Гусева, И.Н. Захаровой. — М.: ГЭОТАР-Медиа; 2017. — 568 с. [Gromova OA, Torshin IYu. *Vitamin D. Smena paradigmy*. Ed by EI Guseva, IN Zakharova. Moscow: GEOTAR-Media; 2017. (In Russ.).] ISBN 978-5-9704-4058-2.
2. Torshin IYu. *Sensing the change: from molecular genetics to personalized medicine*. Nova Biomedical Books. NY. USA. 2009. In "Bioinformatics in the Post-Genomic Era" series. ISBN 1-60692-217-0.
3. Громова О.А., Торшин И.Ю., Спиричев В.Б. Полногеномный анализ сайтов связывания рецептора витамина D указывает на широкий спектр потенциальных применений витамина D в терапии // *Медицинский совет*. — 2016. — №1. — С.12–21. [Gromova OA, Torshin IY, Spirichev VB. The genome-wide analysis of the vitamin D receptor binding sites evidences a wide range of potential therapeutic applications of vitamin D. *Meditsinskiy Sovet*. 2016;1:12–21. (In Russ.).] DOI:10.21518/2079-701X-2016-1-12-21
4. Свирновский А.И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема. *Международные обзоры: клиническая практика и здоровье*. — 2014. — Т.11. — №5. — С.15–38. [Svirnovski AI. Rezistentnost' opukholevykh kletok k terapevticheskim vozdeystviyam kak mediko-biologicheskaya problema. *Mezhdunarodnye obzory: klinicheskaya praktika i zdorov'e*. 2014;11(5):15–38. (In Russ.).] DOI: 10.21518/2079-701X-2016-1-12-21
5. Torshin IY, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs. part 1: fundamentals of modern chemical bonding theory and the concept of the chemograph. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014;24(1):11–23. DOI: 10.1134/S1054661814010209
6. Торшин И.Ю., Громова О.А., Федотова Л.Э., и др. Хемоинформационный анализ молекулы оротовой кислоты указывает на противовоспалительные, нейропротекторные и кардиопротекторные свойства лиганда магния // *Фарматека*. — 2013. — Т.266 — №13. — С.95–104. [Torshin IYu, Gromova OA, Fedotova LE, et al. Chemoinformation analysis of orotic acid molecule indicates anti-inflammatory, neuroprotective and cardioprotective properties of the magnesium ligand. *Pharmateca*. 2013;266(13):95–104. (In Russ.).]
7. Torshin IY. The study of the solvability of the genome annotation problem on sets of elementary motifs. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2011;21(4):652–662. DOI: 10.1134/S1054661811040171
8. Torshin IY, Rudakov KV. Combinatorial analysis of the solvability properties of the problems of recognition and completeness of algorithmic models. part 1: factorization approach. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2017;27(1):16–28. DOI: 10.1134/S1054661817010151
9. Torshin IY, Rudakov KV. On the application of the combinatorial theory of solvability to the analysis of chemographs: Part 2. Local completeness of invariants of chemographs in view of the combinatorial theory of solvability. *Pattern Recognition and Image Analysis (Advances in Mathematical Theory and Applications)*. 2014;24(2):196–208. DOI: 10.1134/S1054661814020151
10. Громова О.А., Торшин И.Ю., Федотова Л.Э., Громов А.Н. Хемореактомный анализ сукцината этилметилгидроксипиридина // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. — 2016. — Т8. — №3. — С.53–60. [Gromova OA, Torshin IYu, Fedotova LE, Gromov AN. Chemoreactome analysis of ethylmethylhydroxypyridine succinate. *Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika. Neurology, neuropsychiatry, psychosomatics*. 2016;8(3):53–60. (In Russ.).] DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2016-3-53-60>
11. Громова О.А., Торшин И.Ю., Федотова Л.Э. Геронтоинформационный анализ свойств молекулы мексидола // *Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика*. — 2017. — Т.9. — №4. — С.46–54. [Gromova OA, Torshin IYu, Fedotova LE. Geriatric information analysis of the molecular properties of mexidole. *Neurologiya, neiropsikhiatriya, psikhosomatika*. 2017;9(4):46–54. (In Russ.).] DOI: <http://dx.doi.org/10.14412/2074-2711-2017-4-46-54>
12. Торшин И.Ю., Громова О.А., Сардарян И.С., Федотова Л.Э. Сравнительный хемореактомный анализ мексидола // *Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова*. — 2017. — Т.117. — №1-2. — С.75–83. [Torshin IYu, Gromova OA, Sardaryan IS, Fedotova LE. A comparative chemoreactome analysis of mexidol. *Zhurnal neurologii i psikhiatrii imeni S.S. Korsakova*. 2017;117(1-2):75–83. (In Russ.).] DOI: 10.17116/jnevro20171171275-84
13. Huang HY, Luther SA. Expression and function of interleukin-7 in secondary and tertiary lymphoid organs. *Semin Immunol*. 2012;24(3):175–89. DOI: 10.1016/j.smim.2012.02.008.
14. Sever R, Brugge JS. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2015;5(4). pii: 5/4/a006098.
15. Thomas SJ, Snowden JA, Zeidler MP, Danson SJ. The role of JAK/STAT signalling in the pathogenesis, prognosis and treatment of solid tumours. *Br J Cancer*. 2015;113(3):365–71. DOI: 10.1038/bjc.2015.233
16. Ishihara S, Inman DR, Li WJ, et al. Mechano-Signal Transduction in Mesenchymal Stem Cells Induces Prosaposin Secretion to Drive the Proliferation of Breast Cancer Cells. *Cancer Res*. 2017;77(22):6179–6189. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-0569
17. Zhang R, Li H, Zhang S, et al. RXR α provokes tumor suppression through p53/p21/p16 and PI3K-AKT signaling pathways during stem cell differentiation and in cancer cells. *Cell Death Dis*. 2018;9(5):532. DOI: 10.1038/s41419-018-0610-1
18. Zhang J, Bao S, Furumai R, et al. Protein phosphatase 5 is required for ATR-mediated checkpoint activation. *Mol Cell Biol*. 2005;25(22):9910–9. DOI: 10.1128/MCB.25.22.9910-9919.2005
19. Kang Y, Cheong HM, Lee JH, et al. Protein phosphatase 5 is necessary for ATR-mediated DNA repair. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;404(1):476–81. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.12.005
20. Yamashita A, Taniwaki T, Kaikoi Y, Yamazaki T. Protective role of the endoplasmic reticulum protein mitsugumin23 against ultraviolet C-induced cell death. *FEBS Lett*. 2013;587(9):1299–303. DOI: 10.1016/j.febslet.2013.03.024
21. Willis DM, Loewy AP, Charlton-Kachigian N, et al. Regulation of osteocalcin gene expression by a novel Ku antigen transcription factor complex. *J Biol Chem*. 2002;277(40):37280–91. DOI: 10.1074/jbc.M206482200
22. Liu C, Li Y, Semenov M, et al. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002;108(6):837–847.
23. Graham TA, Clements WK, Kimelman D, Xu W. The crystal structure of the beta-catenin/ICAT complex reveals the inhibitory mechanism of ICAT. *Mol Cell*. 2002;10(3):563–571.
24. Sun G, Budde RJ. Expression, purification, and initial characterization of human Yes protein tyrosine kinase from a bacterial expression system. *Arch Biochem Biophys*. 1997;345(1):135–42. DOI: 10.1006/abbi.1997.0236
25. Pedram A, Razandi M, Deschenes RJ, Levin ER. DHHC-7 and -21 are palmitoylacyltransferases for sex steroid receptors. *Mol Biol Cell*. 2012;23(1):188–99. DOI: 10.1091/mbc.E11-07-0638
26. Eckfeld K, Hesson L, Vos MD, et al. RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res*. 2004;64(23):8688–93. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2065
27. Gery S, Park DJ, Vuong PT, et al. RTP801 is a novel retinoic acid-responsive gene associated with myeloid differentiation. *Exp Hematol*. 2007;35(4):572–8. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.01.049
28. Ridge RJ, Sloane NH. Partial N-terminal amino acid sequence of the anti-neoplastic urinary protein (ANUP) and the anti-tumour effect of the N-terminal nonapeptide of the unique cytokine present in human granulocytes. *Cytokine*. 1996;8(1):1–5. DOI: 10.1006/cyto.1996.0001.29
29. Громова О.А., Пронин А.В., Гришина Т.Р., и др. Противоопухолевые эффекты Аквадетрима водного раствора мицелл с витамином D // *Фарматека*. — 2015. — Т.313. — №20. — С.63–68. [Gromova OA, Pronin AV, Grishina TR, et al. Antitumor effects of Akvadetrim – vitamin D aqueous micellar solution. *Pharmateca*. 2015;313(20): 63–68. (In Russ.).]

Поиск взаимосвязи между анксиолитическим действием оригинального производного пирроло [1, 2-а] пиазина, лиганда TSPO – ГМЛ-1 и его концентрациями в плазме крови крыс

Яркова М.А.¹, Литвин А.А.¹, Колыванов Г.Б.¹, Жердев В.П.¹, Середенин С.Б.¹, Гегечкори В.И.²

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

² – ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва

Резюме. Проведено сопоставление зависимости «концентрация – эффект» нового потенциального анксиолитического средства ГМЛ-1, являющегося лигандом TSPO. Крысам однократно, внутрижелудочно вводили ГМЛ-1 в дозе 1 мг/кг. Оценивали концентрации исследуемого вещества в плазме крови и поведение животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». Установлено, что величина анксиолитического эффекта ГМЛ-1 не коррелирует с его концентрацией в плазме крови.

Ключевые слова: лиганд TSPO; ГМЛ-1; корреляция «эффект-концентрация»

Для цитирования:

Яркова М. А., Литвин А. А., Колыванов Г. Б., Жердев В. П., Середенин С. Б., Гегечкори В. И. Поиск взаимосвязи между анксиолитическим действием оригинального производного пирроло [1,2-а]пиазина, лиганда TSPO – ГМЛ-1 и его концентрациями в плазме крови крыс // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.52–58. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10014.

Search of the correlation between anxiolytic effect of original derivative of pyrrolo[1,2-a]pyrazine TSPO-ligand (GML-1) and its concentrations in the rat blood plasma

Yarkova M.A.¹, Litvin A.A.¹, Kolyvanov G.B.¹, Zherdev V.P.¹, Seredenin S.B.¹, Gegchkori V.I.²

¹ – FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

² – FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow

Resume. Comparison of “concentration-effect” relation for a new potential anxiolytic drug GML-1, being TSPO ligand was carried out. GML-1 was administered in rats once, intragastrically in the dose 1 mg/kg. Tested drug concentrations in the rat blood plasma and animals behavior in the test of “elevated plus maze” were evaluated. A value of GML-1 anxiolytic effect does not correlate to concentration in the rat blood plasma.

Keywords: ligand of TSPO; GML-1; “effect-concentration” correlation

For citations:

Yarkova MA, Litvin AA, Kolyvanov GB, Zherdev VP, Seredenin SB, Gegchkori VI. Search of the correlation between anxiolytic effect of original derivative of pyrrolo[1,2-a]pyrazine TSPO-ligand (GML-1) and its concentrations in the rat blood plasma. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:52–58. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10014.

Введение

Создание лекарственных средств, относящихся к лигандам митохондриального транслокаторного белка (Translocator protein; TSPO), обладающих анксиолитической активностью, нетоксичных и без побочных эффектов – одна из актуальных проблем современной психофармакологии.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» на основе фармакофорной модели строения лигандов TSPO и метода молекулярного докинга была создана группа гетероциклических лигандов TSPO

ряда 1-фенилпирроло[1, 2-а]пиазин-3-карбоксамидов [1]. По результатам исследований *in vitro* и *in vivo*, в качестве наиболее перспективного анксиолитического средства было отобрано вещество, представляющее собой N-бензил-N-метил-1-фенилпирроло [1, 2-а] пиазин-3-карбоксамид (рабочий шифр ГМЛ-1) [2, 3].

На грызунах в тестах «приподнятый крестообразный лабиринт» (ПКЛ) и «открытое поле со световой вспышкой» (в модификации *Бородин П.М.*) показано, что ГМЛ-1 в интервале доз 0,1–10,0 мг/кг обладает анксиолитической активностью (внутрибрюшинное, пероральное введение), выраженность эффекта ГМЛ-1 соот-

ветствовала диазепаму в дозе 1 мг/кг. При этом ГМЛ-1 обладает низкой острой токсичностью после внутрибрюшинного введения ($LD_{50} > 1000$ мг/кг) [2, 3].

Полученные данные указывают на высокий потенциал ГМЛ-1 как анксиолитика.

Необходимым этапом разработки оригинального лекарственного средства является изучение его доклинической фармакокинетики (ФК). Фармакокинетические данные необходимы для установления зависимости «концентрация — эффект», которая характеризуется меньшими видовыми различиями, чем зависимость «доза — эффект» и поэтому может быть использована для прогнозирования действия фармакологического средства у человека [4].

Исходя из вышеизложенного, цель данного исследования заключалась в сопоставлении продолжительности анксиолитического эффекта ГМЛ-1 в тесте ПКЛ с концентрациями потенциального анксиолитика в плазме крови крыс после его введения внутрь.

Материалы и методы

На рис. 1 представлена структурная формула изучаемого соединения. Молекулярная масса ГМЛ-1 — 341,4 г/моль. Фармацевтическая субстанция синтезирована в отделе химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» и представляет собой гомогенный порошок жёлто-зелёного цвета, без запаха. Субстанция мало растворима в воде, легко растворима в этиловом спирте, очень легко растворима в хлороформе и диметилсульфоксиде.

Животные получены из питомника «Пушино» при филиале «Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» и содержались в условиях лабораторного вивария в контролируемых условиях окружающей среды. Изучение

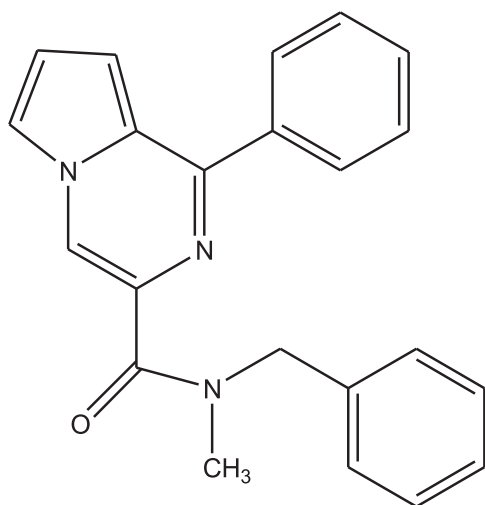


Рис. 1. Структура соединения ГМЛ-1

чение ФК и продолжительности анксиолитического действия ГМЛ-1 после его введения внутрь проводили на аутбредных крысах-самцах Wistar (220 ± 20 г) в тесте ПКЛ [5]. Исследуемое вещество вводили однократно внутрижелудочно в виде водной суспензии с твин 80 в дозе 1,0 мг/кг, животным контрольных групп вводили воду дистиллированную.

Поведение животных в тесте ПКЛ в течение 5 мин фиксировали через 1, 2, 3, 4, 5 и 6 ч после введения ГМЛ-1. В частности, оценивали пребывание (в %) животных в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах лабиринта и число заходов (в %) в открытые рукава по отношению к суммарному числу заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта. На каждый временной интервал использовали по 8 животных опытных и контрольных групп.

Для изучения ФК исследуемого вещества пробы крови отбирали в течение 12 ч: 0,0 (контроль), 15 и 30 мин, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10 и 12 ч. На каждый момент времени использовали по 6 животных.

Все манипуляции с экспериментальными животными выполнены в соответствии с нормативной документацией, касающейся гуманного обращения с животными, и стандартными операционными процедурами (СОП) лабораторий фармакологической генетики и фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Проведение экспериментов с животными одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Полученные путём декапитации животных образцы крови центрифугировали (3000 об/мин в течение 10 мин) с целью получения плазмы.

Для количественного определения ГМЛ-1 в плазме крови животных использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию с масс-спектрометрическим детектированием [6].

Статистическую обработку полученных в тесте ПКЛ результатов проводили, используя однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA, критерий Краскела-Уоллиса) и непараметрический анализ для независимых переменных (U-критерий Манна-Уитни). Данные результатов экспериментов представлены в таблице в виде $M \pm SD$, где M — среднее арифметическое; SD — стандартное отклонение. Для оценки степени взаимосвязи показателей анксиолитического эффекта с концентрациями ГМЛ-1 в плазме крови использовали выборочный коэффициент корреляции Пирсона (r) [7].

Оценку значимости рассчитанных выборочных коэффициентов корреляции по величине статистики t_r вычисляли по формуле:

$$t_r = r \times \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}, \text{ где } n - \text{объём выборки [8].}$$

Таблица 1

Влияние ГМЛ-1 на поведение крыс в тесте ПКЛ после однократного
внутрижелудочного введения в дозе 1,0 мг/кг

Группы / <i>p</i>	Время в открытых рукавах ($t_{откр.}$), с	Время в закрытых рукавах ($t_{закр.}$), с	Количество заходов в открытые рукава ($N_{откр.}$)	Количество заходов в закрытые рукава ($N_{закр.}$)	$\frac{t_{откр.}}{t_{откр.} + t_{закр.}}$, %	$\frac{N_{откр.}}{N_{откр.} + N_{закр.}}$, %
1 ч						
Контроль	4,75 (4,75)	271,13 (4,39)	0,25 (0,25)	3,25 (0,41)	1,66 (1,66)	6,25 (6,25)
ГМЛ-1	48,75 (14,65)*	227,88 (18,37)*	1,50 (0,38)*	3,75 (0,70)	18,10 (5,62)*	25,88 (5,15)*
<i>p</i> (ANOVA)	0,0025	0,0748	0,0094	0,2566	0,0024	0,0110
2 ч						
Контроль	16,13 (9,30)	258,75 (11,65)	0,38 (0,18)	3,38 (0,46)	6,02 (3,50)	8,75 (4,58)
ГМЛ-1	83,38 (35,75)*	202,50 (36,11)	1,63 (0,38)*	3,13 (0,67)	29,25 (12,44)*	35,07 (3,60)*
<i>p</i> (ANOVA)	0,0118	0,0950	0,0014	0,4325	0,0129	0,0029
3 ч						
Контроль	18,25 (7,04)	265,88 (5,80)	0,63 (0,26)	2,13 (0,30)	6,31 (2,44)	18,54 (7,42)
ГМЛ-1	54,88 (14,01)*	214,00 (12,96)*	1,38 (0,26)	4,38 (0,60)*	20,20 (5,02)	24,40 (5,12)
<i>p</i> (ANOVA)	0,2868	0,0629	0,0172	0,0271	0,2584	0,4236
4 ч						
Контроль	0,00 (0,00)	296,63 (1,55)	0,00 (0,00)	1,63 (0,26)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
ГМЛ-1	18,88 (7,94)*	264,50 (12,00)*	0,88 (0,35)*	3,50 (0,63)*	6,93 (2,93)*	14,18 (4,83)*
<i>p</i> (ANOVA)	0,0327	0,0305	0,0603	0,0538	0,0324	0,0628
5 ч						
Контроль	0,00 (0,00)	297,00 (1,80)	0,00 (0,00)	1,38 (0,26)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
ГМЛ-1	21,63 (10,50)*	250,13 (13,35)*	1,25 (0,53)*	4,63 (0,71)*	8,06 (3,87)*	16,74 (5,97)*
<i>p</i> (ANOVA)	0,0191	0,0003	0,0232	0,0050	0,0190	0,0189
6 ч						
Контроль	20,88 (14,31)	270,13 (15,56)	0,50 (0,38)	2,13 (0,30)	7,30 (4,99)	9,38 (6,58)
ГМЛ-1	35,13 (9,60)	244,88 (10,15)	1,13 (0,13)	2,88 (0,44)	12,39 (3,26)	30,42 (3,89)*
<i>p</i> (ANOVA)	0,3108	0,2996	0,1700	0,4944	0,2968	0,1511

Примечания: Данные представлены в виде M(SD), где M—среднее арифметическое; SD—стандартное отклонение; число животных в группе — 8; * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой «Контроль» согласно критерию Манна-Уитни; *p* (ANOVA) — *p*-значение по результатам теста Краскела-Уоллеса.

Результаты и обсуждение

Оценка продолжительности анксиолитического эффекта ГМЛ-1 у крыс в тесте ПКЛ

Анализ поведения крыс в тесте ПКЛ после внутрижелудочного введения ГМЛ-1 в дозе 1,0 мг/кг показал наличие выраженного анксиолитического эффекта у животных в течение первых пяти часов. Достоверно значимо увеличилось время пребывания и количество заходов в открытые рукава, сократилось время пребывания в закрытых рукавах лабиринта, значительно выросли интегральные показатели поведения животных

в ПКЛ, такие как процент пребывания в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах ($\frac{t_{откр.}}{t_{откр.} + t_{закр.}}$) и процент

заходов в открытые рукава по отношению к числу заходов в открытые и закрытые рукава ($\frac{N_{откр.}}{N_{откр.} + N_{закр.}}$),

по сравнению с контрольными группами (табл. 1). Изменение интенсивности анксиолитического эффекта исследуемого вещества у крыс на протяжении 6 ч наблюдения представлены на рис. 2 А, Б. Из рис. 2 А, Б

Таблица 2

Концентрации в плазме крови и поведенческие характеристики, обуславливающие анксиолитический эффект ГМЛ-1, у крыс в тесте ПКЛ в течение 6 ч после однократного внутрижелудочного введения в дозе 1,0 мг/кг

Время (ч)	Концентрация нг/мл (<i>n</i> = 6)	Группы животных	$\frac{t_{откр.}}{t_{откр.} + t_{закр.}}$, %	$\frac{N_{откр.}}{N_{откр.} + N_{закр.}}$, %
0,25	2,5 ± 1,3	-	-	-
0,5	4,5 ± 2,7	-	-	-
1	11,1 ± 9,3	Контроль	1,66 ± 1,66	6,25 ± 6,25
		Опыт	18,10 ± 5,62*	25,88 ± 5,15*
2	8,7 ± 8,8	Контроль	6,02 ± 3,50	8,75 ± 4,58
		Опыт	29,25 ± 12,44*	35,07 ± 3,60*
3	6,6 ± 4,9	Контроль	6,31 ± 2,44	18,54 ± 7,42
		Опыт	20,20 ± 5,02*	24,40 ± 5,12*
4	4,6 ± 3,9	Контроль	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		Опыт	6,93 ± 2,93*	14,18 ± 4,83*
5	3,7 ± 2,8	Контроль	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
		Опыт	8,06 ± 3,87*	16,74 ± 5,97*
6	2,9 ± 1,5	Контроль	7,30 ± 4,99	9,38 ± 6,58
		Опыт	12,39 ± 3,26	30,42 ± 3,89*
<i>r</i> ₃			0,786	0,763
<i>r</i> ₆			0,342	0,709

Примечания: $t_{откр.}$ — время нахождения в открытых рукавах, с; $t_{закр.}$ — время нахождения в закрытых рукавах, с; $N_{откр.}$ — число заходов в открытые рукава; $N_{закр.}$ — число заходов в закрытые рукава; r — коэффициент корреляции; * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с группой «Контроль» согласно критерию Манна–Уитни.

видно, что максимальный эффект регистрировался через 2 ч после введения ГМЛ-1, затем выраженность эффекта падала и к 6 ч устанавливалась на уровне кон-

трольных групп. Так, для показателя $\frac{t_{откр.}}{t_{откр.} + t_{закр.}}$ достоверность различий между контрольными и 6-часовыми значениями была статистически незначимой, из чего следует, что анксиолитический эффект исследуемого вещества регистрировался в течение 5 ч. Для другого интегрального параметра $\frac{N_{откр.}}{N_{откр.} + N_{закр.}}$ достоверность различий между контрольными и 6-часовыми значениями была статистически значимой.

Таким образом, на основании анализа результатов эксперимента установлено, что анксиолитическое действие ГМЛ-1 в дозе 1,0 мг/кг продолжается в первые 5 ч после введения.

ФК ГМЛ-1 у крыс

Усреднённые концентрации ГМЛ-1 в плазме крови крыс после однократного введения исследуемого вещества внутрь в дозе 1,0 мг/кг представлены в табл. 2 и на рис. 2. Из рис. 2 видно, что ГМЛ-1 относительно быстро всасывается из ЖКТ в системный крово-

ток крыс (время достижения максимальной концентрации составило 1 ч). После достижения максимума концентрация анксиолитика линейно снижалась.

Сопоставление фармакодинамических показателей и концентраций ГМЛ-1 в плазме крови

С целью выявления возможных корреляционных зависимостей (степени выраженности связи) проведено сопоставление фармакодинамических показателей и концентраций ГМЛ-1 в плазме крови крыс после его однократного введения внутрь. Учитывая, что анксиолитический эффект ГМЛ-1 регистрировался в течение 5–6 ч после введения вещества, для выявления возможных корреляций с его концентрациями в плазме крови крыс использовали те же временные интервалы.

Установлено, что между концентрациями ГМЛ-1 в плазме крови крыс и его анксиолитическим эффектом существуют причинно-следственные связи (корреляционные зависимости) (табл. 2). Так, при сопоставлении пребывания животных в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах лабиринта с концентрациями анксиолитика в течение 5 ч эксперимента выборочный коэффициент корреляции (r_3) составил 0,786. Для ин-

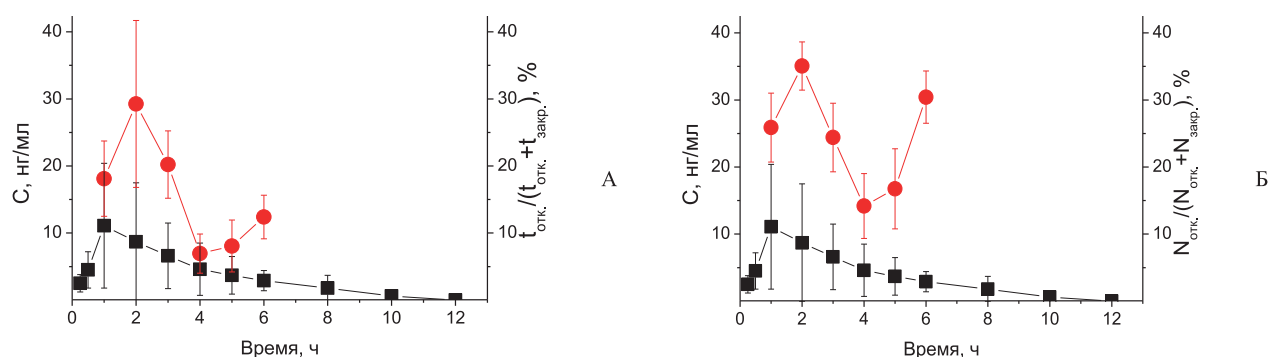


Рис. 2. Зависимость между концентрацией ГМЛ-1 в плазме крови крыс и его анксиолитическим эффектом после однократного перорального введения в дозе 1 мг/кг:

А — для пребывания (в %) животных в открытых рукавах по отношению к суммарному времени в открытых и закрытых рукавах лабиринта; Б — для числа заходов (в %) в открытые рукава по отношению к суммарному числу заходов в открытые и закрытые рукава лабиринта.

тегрального параметра $\frac{N_{откр.}}{N_{откр.} + N_{закр.}}$ значение r_3 равнялось 0,763. Выборочный коэффициент корреляции для временного интервала 6 ч (r_6) для параметров, характеризующих анксиолитический эффект, и концентраций ГМЛ-1 составил 0,342 и 0,709, соответственно.

Далее была проведена оценка значимости рассчитанных выборочных коэффициентов корреляции по величине статистики t_r . Установлено, что полученные значения t_r являются статистически недостоверными для данных объёмов выборок ($n = 5$ и $n = 6$, соответственно).

Для многих лекарственных препаратов зависимость эффекта от концентрации хорошо описывается сигмидной функцией (моделью Хилла) [9] или так называемой моделью E_{max} . Эта модель имеет три параметра: максимально возможный уровень эффекта (E_{max}), концентрация, при которой достигается 50 % максимального эффекта (EC_{50}), параметр формы зависимости (γ), который для многих препаратов принимается равным 1 (гиперболическая функция). Зависимость эффекта

от концентрации (C) в рамках такой модели описывается следующим уравнением: $E = \frac{E_{max} \times C^\gamma}{EC_{50}^\gamma + C^\gamma}$. Однако

имеющиеся данные не позволили успешно её применить. Возможно, для адекватной аппроксимации требуется больше исходных данных. Несмотря на то, что E_{max} -модель можно считать базовой моделью фармакодинамики, тем не менее, когда наблюдаемый эффект не превышает 50 % от максимального значения, или значение параметра E_{max} не может быть предсказано, зависимость «концентрация — эффект» можно аппроксимировать линейной моделью:

$$E = E_0 + S \times C(t),$$

где:

$C(t)$ — концентрация лекарственного вещества;

S — параметр эффекта;

E_0 — значение показателя эффекта без введения исследуемого вещества (обычно контроль) [8].

Последнее соотношение означает, что интенсивность фармакологического эффекта линейно зависит от уровня лекарственного вещества в плазме /сыворотке крови на низких концентрациях. На основе данной модели можно прогнозировать отсутствие эффекта при нулевых значениях концентрации, однако невозможно предсказать максимальный эффект. Более того, линейаризация допустима, если исследуемое вещество обратимо связывается с рецепторами, что в результате приводит к прямому фармакологическому эффекту. Использование линейной модели также не позволило адекватно описать имеющиеся в нашем распоряжении ряды данных.

Таким образом, между параметрами, характеризующими анксиолитический эффект, и концентрациями ГМЛ-1 в плазме крови крыс отсутствуют достоверно значимые причинно-следственные связи. Следует ещё раз отметить, что между максимальными значениями концентрации ГМЛ-1 в плазме крови и фармакологическим эффектом имеется временной сдвиг, т. е. максимальный эффект наступает на 1 ч позже максимальной концентрации. Однако, начиная с 2 ч и до 5 ч после введения ГМЛ-1 включительно, отмечается линейное снижение изучаемых характеристик. Таким образом, при увеличении объёма выборки и более частом отборе проб и одновременной регистрацией эффекта, эти связи могут быть выявлены.

С другой стороны, по мере снижения концентрации ГМЛ-1 в плазме крови наступает момент, когда создавшийся уровень изучаемого соединения не вызывает анксиолитического эффекта. По-видимому, для проявления анксиолитического эффекта требуются концентрации ГМЛ-1 в плазме крови крыс выше 2,9 нг/мл.

Выводы

1. Анксиолитическое действие ГМЛ-1 в дозе 1,0 мг/кг в тесте ПКЛ продолжается в первые 5 ч после однократ-

ного внутрижелудочного введения.

2. Величина анксиолитического эффекта ГМЛ-1 у

крыс после введения внутрь не коррелирует с концентрацией анксиолитика в плазме крови.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Литвин Александр Алексеевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN-код: 6193-5770

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

Litvin Alexander

Corresponding author

e-mail: litbiopharm@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-2818-3457

SPIN code: 6193-5770

Doctor of Biological Sciences, leading researcher of
the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Яркова Милада Арнольдовна

ORCID ID: 0000-0002-2877-5786

SPIN-код: 5118-1530

д. м. н., профессор РАН, в.н.с. лаборатории
фармакогенетики ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва

Yarkova Milada

ORCID ID: 0000-0002-2877-5786

SPIN code: 5118-1530

Doctor of Medical Sciences, Professor RAS, leading
researcher of the laboratory of pharmacogenetics
FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Колыванов Геннадий Борисович

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN-код: 2538-8639

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

Kolyvanov Gennadiy

ORCID ID: 0000-0002-2571-0047

SPIN code: 2538-8639

Grand PhD in Biological sciences, leading researcher
of the laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Жердев Владимир Павлович

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN-код: 2213-9592

д. м. н., профессор, заведующий лабораторией
фармакокинетики ФГБНУ «НИИ фармакологии
имени В.В. Закусова», Москва

Zherdev Vladimir

ORCID ID: 0000-0003-2710-7134

SPIN code: 2213-9592

Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of
laboratory of pharmacokinetics FSBI «Zakusov
institute of Pharmacology», Moscow

Середенин Сергей Борисович

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN-код: 3896-4655

д. м. н., профессор, академик РАН, заведующий
лабораторией фармакогенетики ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Seredenin Sergey

ORCID ID: 0000-0003-4482-9331

SPIN code: 3896-4655

Doctor of Medical Sciences, Professor, academician
RAS, Head of laboratory of pharmacogenetics FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Гегечкори Владимир Ираклиевич

ORCID ID: 0000-0001-8437-1148

SPIN-код: 8964-0804

к. фарм. н., старший преподаватель кафедры фарма-
цевтической и токсикологической химии им. Арзамас-
цева А.П., ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сече-
нова Минздрава России (Сеченовский Университет),
Москва

Gegechkori Vladimir

ORCID ID: 0000-0001-8437-1148

SPIN code: 8964-0804

Candidate of Pharmaceutical Sciences, Senior
Lecturer of the Department of Pharmaceutical
and Toxicological Chemistry named after A.P.
Arzamastsev FSAEI HE I.M. Sechenov First MSMU
MOH Russia (Sechenovskiy University), Moscow

Литература / References

1. Патент РФ на изобретение №2572076/ 27.12.14. Бюлл. № 36 Середенин С.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Деева О.А. и др. 1-арил-пирроло[1,2-а]пиразин-3-карбоксамиды с нейрпсихотропной активностью. [Patent RUS № 2572076/ 27.12.14. Byul. №34. Seredenin SB, Mokrov GV, Gudasheva TA, Deeva OA, et al. 1-arylpyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamide with neuropsychotropic activity. (In Russ).] Доступно по <http://www.freepatent/2572076>. Ссылка активна на 03.09.2018.
2. Ярков С.А., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. и др. Фармакологическое изучение новых соединений — регуляторов 18 кДа транслокаторного белка // *Экспериментальная и клиническая фармакология*. — 2016. — Т.79. — №1. — С.7–11. [Yarkov S.A., Mokrov G.V., Gudasheva T.A. et al. Pharmacological study of new compounds acting as regulators of 18-kDa translocator protein ligands. *Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology*. 2016;79(1):7–11. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2016-79-1-7-11
3. Mokrov GV, Deeva OA, Gudasheva TA, et al. Design, synthesis and anxiolytic-like activity of 1-arylpyrrolo[1,2-a]pyrazine-3-carboxamides. *Bioorg Med Chem*. 2015 Jul 1;23(13):3368–78. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.04.049
4. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* / Под ред. А.Н. Миронова, — М.: Гриф и К; 2012. [Rukovodstvo po provedeniyu doklinicheskikh issledovaniy lekarstvennykh sredstv. Part one. Ed by Mironov A.N. Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ).]
5. Lister RG. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology (Berl)*. 1987;92(2):180–5.
6. Новицкий А.А., Бочков П.О., Литвин А.А. и др. Методика количественного определения N-бензил-N-метил-1-фенилпирроло[1,2-А]пиразин-3-карбоксамида в плазме крови с использованием ВЭЖХ/МС // *Вестник Московского государственного университета. Серия 2. Химия*. — 2018. — Т.59. — №1. — С.43–45. [Novitskiy AA., Bochkov PO, Litvin AA, et al. Development and validation of the quantification of GML-1 compound (N-benzyl-N-methyl-1-phenylpyrrolo[1,2-A] pyrazine-3-carbamide) in the rat blood plasma by HPLC-MS. *Vestnik Moscovskogo gosudarstvennogo universiteta. Seria 2. Khimiya*. 2018;59(1):43–45 (In Russ).] DOI: 10.3103/S0027131418010042
7. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. *Математическая статистика в клинических исследованиях*. — М.: Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД»; 2001. [Sergienko VI, Bondareva IB. *Matematicheskaya statistika v klinicheskikh issledovaniyakh*. Moscow: Geotar-Med; 2001. (In Russ).]
8. Сергиенко В.И., Желлифф Р., Бондарева И.Б. *Прикладная фармакокинетика: основные положения и клиническое применение*. — М.: Издательство РАМН; 2003. [Sergienko VI, Gelliff R, Bondareva IB. *Prikladnaya farmakokinetika: osnovnye polozheniya b klinicheskoe primeneniye*. Moscow: Izdatelstvo RAMN; 2003. (In Russ).]
9. Hill AV. The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *Proc. Physiol. Soc*. 1910;40: 4–7.

К возможности применения эхокардиографии у мелких лабораторных животных для проведения острых фармакологических тестов

Ионова Е.О., Цорин И.Б., Барчуков В.В.,
Столярчук В.Н., Крыжановский С.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Резюме. Цель настоящего исследования – изучение адекватности метода эхокардиографии на мелких лабораторных животных при проведении острых фармакологических тестов. В опытах на белых беспородных крысах-самцах показано, что не-селективный агонист β -адренорецепторов изопротеренол (20 мкг/кг, в/в) уменьшает конечно-систолический и конечно-диастолический размеры и объёмы левого желудочка сердца, измеренные с помощью эхокардиографии, и увеличивает фракции укорочения и выброса, т. е. обладает положительным инотропным эффектом. Кардиоселективный β_1 -адреноблокатор метопролол (1 мг/кг, в/в), напротив, увеличивает размеры левого желудочка и уменьшает фракции укорочения и выброса, т. е. обладает отрицательным инотропным эффектом. Таким образом, метод эхокардиографии на мелких лабораторных животных может быть использован для проведения острых фармакологических тестов.

Ключевые слова: эхокардиография; крысы; острые фармакологические тесты; изопротеренол; метопролол

Для цитирования:

Ионова Е.О., Цорин И.Б., Барчуков В.В., Столярчук В.Н., Крыжановский С.А. К возможности применения эхокардиографии у мелких лабораторных животных для проведения острых фармакологических тестов // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – №2. – С.59–64. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10015.

The possibility of using echocardiography in small laboratory animals for acute pharmacological tests

Ionova E.O., Tsorin I. B., Barchukov V.V., Stolyaruk V. N., Kryzhanovskii S.A.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. The purpose of this investigation is to study the adequacy of the echocardiography method in small laboratory animals for performing acute pharmacological tests. In experiments on white mongrel male rats, a nonselective β -adrenoreceptor agonist isoproterenol (20 μ g /kg, i.v.) reduces the end-systolic and end-diastolic dimensions and volumes of the heart left ventricle, measured by echocardiography, and increases the shortening and ejection fractions, i.e. has a positive inotropic effect. Cardiospecific β_1 -adrenoblocker metoprolol (1 mg / kg, i.v.), on the contrary, increases the left ventricle sizes and reduces the shortening and ejection fractions, i.e. has a negative inotropic effect. Thus, the method of echocardiography in small laboratory animals can be used to conduct acute pharmacological tests.

Keywords: echocardiography; rats; acute pharmacological tests; isoproterenol; metoprolol

For citations:

Ionova EO, Tsorin IB, Barchukov VV, Stolyaruk VN, Kryzhanovskii SA. The possibility of using echocardiography in small laboratory animals for acute pharmacological tests. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:59–64. (In Russ). DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10015.

Введение

Метод эхокардиографии достаточно широко применяется при проведении экспериментальных исследований на мелких лабораторных животных. В подавляющем большинстве случаев его используют для оценки интенсивности ремоделирования левого желудочка сердца при воспроизведении различных видов патологии миокарда [1–3]. Помимо этого, эхокардиографию используют для изучения влияния лекарственных средств и/или биологически активных веществ на процессы патологического ремоделирования миокарда [4–6]. В литературе (библиотека

PubMed) не приводится сообщений об использовании эхокардиографии при проведении острых фармакологических тестов, оценивающих влияние вновь синтезированных соединений на инотропную функцию сердца. Обычно для этих целей используют инвазивные методы исследования: измеряют максимальную скорость нарастания внутрижелудочкового давления в фазу изометрического сокращения (dp/dt макс), что требует катетеризации левого желудочка сердца [7, 8] или с помощью расходомера крови оценивают фазовый кровоток в восходящей части дуги аорты, для чего необходимо вскрытие грудной клетки и перевод животного на искусственное дыхание [9]. Естественно,

что использование достаточно травматичных процедур, приводящих или к нарушению функциональной активности аортального клапана, или к сдавлению дуги аорты, может негативно влиять, а при определённых условиях и искажать результаты исследований. В силу этого, представляется целесообразным внедрение в повседневную практику неинвазивных методов исследований, не обладающих отрицательными воздействиями на организм и позволяющих в реальном масштабе времени получить максимально адекватные результаты. Одним из таких возможных подходов является использование метода эхокардиографии, который ранее для проведения острых фармакологических тестов не применялся.

Цель исследования

Цель настоящего исследования — изучение возможности использования метода эхокардиографии на мелких лабораторных животных при проведении острых фармакологических тестов.

Материалы и методы

Животные

Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 180–200 г, полученных из Филиал «Столбовая» Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства». Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол

Наркотизированных (уретан 1300 мг/кг в/б) крыс рандомизировали на две группы: 1-я ($n = 5$) — изопроterenол (20 мкг/кг, в/в, болюсом), 2-я ($n = 5$) метопролол (1 мг/кг, в/в, болюсом). Регистрацию эхокардиограммы проводили за 5 мин до введения изучаемых лекарственных средств и в течение 5 мин после окон-

чания их введения. В работе использовали изопроterenол («Sigma», Германия) и метопролол («Astra Zeneca», Швеция).

Эхокардиографические исследования

При помощи эхокардиографии оценивали состояние внутрисердечной гемодинамики. Измерения проводили в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический (КСР) и конечно-диастолический (КДР) размеры левого желудочка сердца, затем по методу Teichholz рассчитывали такие показатели, как фракция выброса (ФВ), фракция укорочения (ФУ), конечно-систолический объём (КСО), конечно-диастолический объём (КДО) левого желудочка, а также ударный объём (УО) сердца. Эхокардиографические показатели оценивали, как минимум, по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [10]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц).

Статистическая обработка полученных данных

Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Так как выборки имели распределение близкое к нормальному, то для определения статистической значимости изменений, вызываемых тестируемыми веществами, использовали дисперсионный анализ повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннелу. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$, критерии двухсторонние. Полученные результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок.

Результаты и обсуждение

Как следует из результатов первой серии экспериментов (табл. 1, рис. 1), неселективный β -адреномиметик изопроterenол (20 мкг/кг, в/в, $n = 5$) через 1 мин после окончания введения вызывает статистически значимое по сравнению фоном перед введением увеличение показателей, характеризующих систолическую (инотропную) функцию левого желудочка сердца: фракции укорочения (соответственно, $52,1 \pm 1,5 \%$ и $46,5 \pm 1,5 \%$; $p = 0,0007$) и фракции выброса (соответственно, $88,7 \pm 1,0 \%$ и $82,3 \pm 1,4 \%$; $p = 0,041$). Помимо этого, отмечаются известные из классической фармакологии характерные для β -адреномиметиков изменения показателей, отра-

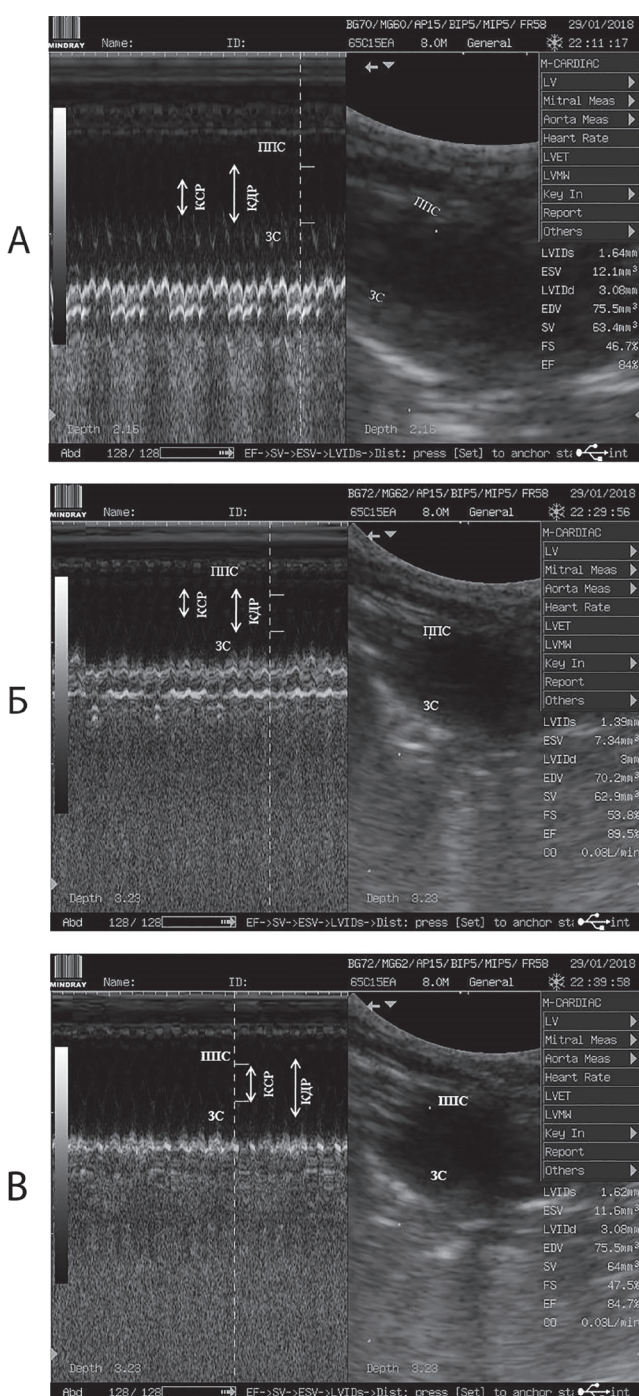


Рис. 1. Фармакологическая проба с изопроterenолом. Эхограмма сердца крысы до (А) и через 1 (Б) и 5 (В) минут после введения препарата

жающих состояние внутрисердечной гемодинамики [11, 12]. Так, например, конечно-диастолический объём левого желудочка сердца снижается по сравнению фоном перед введением с $59,42 \pm 6,53$ до $47,18 \pm 5,87$ мм³ ($p = 0,001$). Однако это снижение существенно меньше, чем уменьшение конечно-систолического объёма, соответственно, с $9,68 \pm 1,48$ до $5,51 \pm 0,83$ мм³ ($p = 0,0013$). Согласно

Таблица 1

Влияние изопроterenолола (20 мкг/ кг, в/в) на показатели внутрисердечной гемодинамики наркотизированных крыс (уретан, 1300 мг/кг, в/б; $n = 5$)

Показатель	Исходный уровень	Через 1 мин после введения вещества	Через 5 мин после введения вещества
КСР, мм	$1,51 \pm 0,08$	$1,25 \pm 0,06$ $p = 0,0002$	$1,45 \pm 0,06$ $p > 0,2$
КСО, мм ³	$9,68 \pm 1,48$	$5,51 \pm 0,83$ $p = 0,0013$	$8,71 \pm 1,22$ $p > 0,2$
КСР, мм	$2,82 \pm 0,11$	$2,60 \pm 0,10$ $p = 0,0086$	$2,82 \pm 0,07$ $p > 0,2$
КСО, мм ³	$59,42 \pm 6,53$	$47,18 \pm 5,87$ $p = 0,001$	$59,01 \pm 4,55$ $p > 0,2$
УО, мм ³	$49,74 \pm 5,28$	$41,66 \pm 5,17$ $p = 0,031$	$50,30 \pm 3,67$ $p > 0,2$
ФУ, %	$46,5 \pm 1,5$	$52,1 \pm 1,5$ $p = 0,0007$	$48,5 \pm 1,7$ $p > 0,2$
ФВ, %	$82,3 \pm 1,4$	$88,7 \pm 1,0$ $p = 0,041$	$84,2 \pm 1,4$ $p > 0,2$

Примечания: указаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p – по отношению к исходному уровню.

Таблица 2

Влияние метопролола (1,0 мг/кг, в/в) на показатели внутрисердечной гемодинамики наркотизированных крыс (уретан, 1300 мг/кг, в/б; $n = 5$)

Показатель	Исходный уровень	Через 2 мин после введения вещества	Через 5 мин после введения вещества
КСР, мм	$1,29 \pm 0,04$	$1,99 \pm 0,07$ $p < 0,001$	$2,14 \pm 0,06$ $p < 0,001$
КСО, мм ³	$6,06 \pm 0,55$	$21,43 \pm 2,03$ $p < 0,001$	$26,51 \pm 1,87$ $p < 0,001$
КСР, мм	$2,93 \pm 0,12$	$3,54 \pm 0,09$ $p < 0,001$	$3,74 \pm 0,14$ $p < 0,001$
КСО, мм ³	$66,21 \pm 7,38$	$113,79 \pm 8,51$ $p = 0,0014$	$134,12 \pm 13,78$ $p < 0,001$
УО, мм ³	$60,15 \pm 7,20$	$92,36 \pm 7,48$ $p = 0,0051$	$107,61 \pm 12,18$ $p < 0,001$
ФУ, %	$55,6 \pm 1,6$	$43,8 \pm 1,4$ $p < 0,001$	$42,6 \pm 1,1$ $p < 0,001$
ФВ, %	$90,5 \pm 0,9$	$81,1 \pm 1,33$ $p < 0,001$	$79,9 \pm 1,1$ $p < 0,001$

Примечания: указаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p – по отношению к исходному уровню.

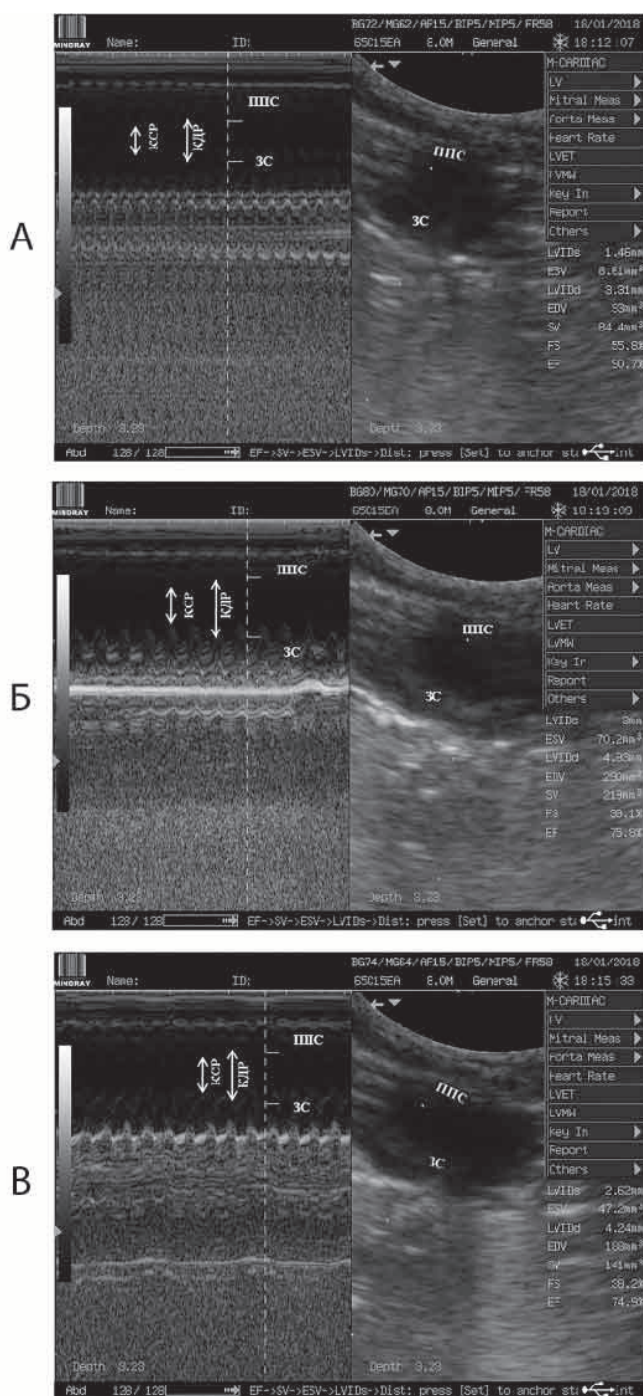


Рис. 2. Фармакологическая проба с метопрололом. Эхограмма сердца крысы до (А) и через 2 (Б) и 5 (В) минут после введения препарата

но полученным результатам, длительность действия изопротеренола, введенного однократно болюсом, незначительна и уже через 5 мин после окончания его введения все регистрируемые показатели практически не отличаются от фона (табл. 1), что полностью соответствует известным из литературы фармакокинетическим характеристикам препарата.

Во второй серии экспериментов изучали воз-

можность использования эхокардиографии при проведении острых фармакологических тестов для оценки отрицательного инотропного действия изучаемых соединений. Показано, что кардиоселективный β_1 -адреноблокатор метопролол (1 мг/кг в/в, $n = 5$) вызывает статистически значимое снижение систолической функции левого желудочка сердца (табл 2, рис. 2). Так, через 2 мин после окончания введения препарата фракция укорочения снизилась по сравнению с фоном с $55,6 \pm 1,6$ до $43,8 \pm 1,4$ % ($p < 0,001$), а фракция выброса – с $90,5 \pm 0,9$ до $81,1 \pm 1,33$ % ($p < 0,001$). Также зарегистрированы характерные для β -адреноблокаторов изменения геометрии левого желудочка сердца [13, 14] – увеличение по сравнению с фоном конечно-систолического и конечно-диастолического объемов левого желудочка сердца, соответственно, с $6,06 \pm 0,55$ до $21,43 \pm 2,03$ мм ($p < 0,001$) и с $66,21 \pm 6,53$ мм до $113,79 \pm 8,51$ мм ($p < 0,0014$). Через 5 мин после окончания введения препарата его кардиодепрессивные эффекты полностью сохраняются (см. табл. 2, рис. 2), что обусловлено тем, что $T_{1/2}$ метопролола при внутривенном введении колеблется в пределах 3–5 ч.

Заключение

Таким образом, результаты настоящего исследования убедительно свидетельствуют о том, что метод эхокардиографии на мелких лабораторных животных может быть использован при проведении острых фармакологических тестов по изучению влияния биологически активных соединений на инотропную функцию сердца. В отличие от традиционно применяемых для этих целей инвазивных методов исследования, (определение $dp/dt_{\max}$ или величины фазового кровотока в восходящей части дуги аорты) метод эхокардиографии имеет ряд преимуществ. Во-первых, он атравматичен, что практически нивелирует риск получения некорректных результатов, связанных с травматичным операционным вмешательством, а во-вторых, позволяет получить информацию не только о состоянии инотропной функции сердца, но и об изменении геометрии левого желудочка сердца под влиянием изучаемых соединений, что представляется достаточно важным. Также есть, все основания говорить о том, что метод эхокардиографии на мелких лабораторных животных может быть использован не только при проведении острых фармакологических тестов по оценке инотропной функции сердца, но и при проведении экспериментов по изучению механизмов, лежащих в основе изменения сократимости миокарда.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова», Москва

Kryzhanovskii Sergey

Corresponding author

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

Doctor of Medical Sciences, Head of Laboratory of pharmacological screening FSBI "ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY", Moscow

Ионова Екатерина Олеговна

ORCID ID: 0000-0003-0154-722X

SPIN-код: 5042-1952

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

Ionova Ekaterina

ORCID ID: 0000-0003-0154-722X

SPIN code: 5042-1952

Junior researcher, laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Цорин Иосиф Борисович

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

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

Tsorin Iosif

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Doctor of Biological Sciences, leading researcher, laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Барчуков Владимир Валерьевич

ORCID ID: 0000-0003-4229-3107

SPIN-код: 6743-4280

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

Barchukov Vladimir

ORCID ID: 0000-0003-4229-3107

SPIN code: 6743-4280

Research Officer, laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Столярук Валерий Николаевич

ORCID ID: 0000-0002-4779-427X

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

Stolyaruk Valeriy

ORCID ID: 0000-0002-4779-427X

Senior researcher, laboratory of pharmacological screening, FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Boudia D, Domergue V, Mateo P, et al. Beneficial effects of exercise training in heart failure are lost in male diabetic rats. *J Appl Physiol.* (1985). 2017 Dec 1;123(6):1579–1591. DOI: 10.1152/jappphysiol.00117.2017
2. Squair JW, Liu J, Tetzlaff W, et al. Spinal cord injury-induced cardiomyocyte atrophy and impaired cardiac function are severity dependent. *Exp Physiol.* 2018 Feb 1;103(2):179–189. DOI: 10.1113/EP086549
3. Wu LH, Zhang Q, Zhang S, et al. Effects of gene knockdown of CNP on ventricular remodeling after myocardial ischemia-reperfusion injury through NPRB/Cgmp signaling pathway in rats. *J Cell Biochem.* 2018 Feb;119(2):1804–1818. DOI: 10.1002/jcb.26341
4. Wang B, Ma X, Zhao L, et al. Injection of basic fibroblast growth factor together with adipose-derived stem cell transplantation: improved cardiac remodeling and function in myocardial infarction. *Clin Exp Med.* 2016 Nov;16(4):539–550. DOI: 10.1007/s10238-015-0383-0
5. Yu B, Wang W. Cardioprotective effects of morroniside in rats following acute myocardial infarction. *Inflammation.* 2018 Mar;41(2):432–436. DOI: 10.1007/s10753-017-0699-x
6. Pessoa FG, Mady C, Fonseca KCB, et al. Erythropoietin reduces collagen deposition after myocardial infarction but does not improve cardiac function. *Can J Physiol Pharmacol.* 2018 Jun;96(6):541–549. DOI: 10.1139/cjpp-2017-0169
7. Shu L, Zhang W, Huang C, et al. Troxerutin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via pi3k/akt pathway in rats. *Cell Physiol Biochem.* 2017;44(5):1939–1948. DOI: 10.1159/000485884
8. Rostamzadeh F, Najafipour H, Yeganeh-Hajahmadi M, Joukar S. Opioid receptors mediate inotropic and depressor effects of apelin in rats with 2K1C-induced chronic renovascular hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2018 Feb;45(2):187–197. DOI: 10.1111/1440-1681.12860
9. Tsorin IB, Palka IP, Chichkanov GG. Specific features of the effect of selective anxiolytic afobazole on cardiovascular system. *Exp. Clin.*

Pharmacol. 2009;72(5):41–45.

10. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, et al. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18(12):1440–1463. DOI: 10.1016/j.echo.2005.10.005

11. Fowler NO, Holmes JC. Hemodynamic effects of isoproterenol and norepinephrine in acute cardiac tamponade. *J Clin Invest.* 1969;48(3):

502–507. DOI: 10.1172/JCI106007

12. Fehske W, Grube E, Steinborn W, et al. Cardiac effects of isoproterenol in the complex echocardiographic evaluation. *Z Kardiol.* 1980;69(2):81–91.

13. Nigri A, Mangieri E, Martuscelli E, Reale A. Acute hemodynamic effects of acebutolol and propranolol. *Clin Ther.* 1984;6(5):693–698.

14. Kalischer AL, Johnson LL, Johnson YE, et al. Effects of propranolol and timolol on left ventricular volumes during exercise in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol.* 1984;3(1):210–218.

Исследование острой токсичности ГМЛ-1

Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Алексеева С.В.,
Волкова А.В., Дурнев А.Д.

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

Резюме. *Актуальность.* Оценка острой токсичности является необходимым этапом доклинического исследования нового оригинального анксиолитического лекарственного средства ГМЛ-1. *Цель настоящей работы* – изучение острой токсичности ГМЛ-1. *Методы.* ГМЛ-1 вводили однократно перорально и внутрибрюшинно мышам и крысам в максимально возможных объемах для каждого из способов введения и для каждого из видов животных, в максимально возможных концентрациях. Животные контрольных групп получили эквивалентный объем 1 % раствора крахмала. Регистрировались сроки развития интоксикации животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины. Эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие проводили через 14 сут. после введения препаратов. *Результаты.* Определение средних смертельных доз не представлялось возможным из-за отсутствия гибели животных в условиях достижения максимально возможных концентраций и максимально допустимых объемов введения. Морфологическая картина внутренних органов, обнаруженная при патологоанатомическом вскрытии всех экспериментальных животных, не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных. *Заключение.* Установлено, что препарат ГМЛ-1 при пероральном и внутрибрюшинном введении является малотоксичным и по классификации Сидорова К. К. (1973 г.) может быть отнесен к 4-му классу токсичности.

Ключевые слова: ГМЛ-1; острая токсичность; мыши; крысы

Для цитирования:

Мирошкина И.А., Сорокина А.В., Алексеева С.В., Волкова А.В., Дурнев А.Д. Исследование острой токсичности ГМЛ-1 // *Фармакокинетика и фармакодинамика*. – 2018. – № 2. – С.65–70. DOI: 10.24411/2587-7836-2018-10016.

Study of acute toxicity of the drug GML-1

Sorokina A.V., Alekseeva S.V., Miroshkina I.A., Volkova A.V., Durnev A.D.
FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow

Resume. *Relevance.* The acute toxicity evaluation is the anecessary stage of preclinical research of the new original anxiolytic drug GML-1. The present investigation aim is study of the GML-1 acute toxicity. *Methods.* GML-1 was administered once orally and intraperitoneally to mice and rats in the maximum possible volumes for each of the administration methods and for each animal species, at the highest possible concentrations. Equivalent volume of 1 % starch solution was administered to animals of the control groups. Euthanasia and pathoanatomical dissection were performed 14 days after the drug administration. *The animal* intoxication periods with a detailed description of the observed clinical picture were registered. *Results.* The mean lethal doses were not identified because GML-1 did not cause death of animals at injection of the maximum allowable volumes and maximum allowable concentrations. The morphological view of the internal organs, detected during pathoanatomical dissection of all experimental animals, did not differ from that observed in control animals. *Conclusion.* It was determined that the drug GML-1 at oral and intraperitoneal injection concerns to low-toxic substances. According to classification *Sidorov K.K.* (1973) this drug may be related to 4th toxicity class.

Keywords: GML-1; acute toxicity; mice; rats

For citations:

Sorokina AV, Alekseeva SV, Miroshkina IA, Volkova AV, Durnev AD. Study of acute toxicity of the drug GML-1. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2018;2:65–70. (In Russ). DOI: 10.24411/2588-0519-2018-10016.

Введение

Исследования острой токсичности химических соединений имеют давнюю, более чем вековую историю и не утратили своего значения [1]. С точки зрения получения фундаментальных знаний важность этих исследований определяется получением новых сведений о токсичности тех или иных веществ, что определяет направления новых хими-

ческих синтезов, пополняет соответствующие библиотеки подходов *in silico*, расширяет представления о видовой зависимости летальных эффектов и раскрывает множество других принципиально важных параметров, характеризующих взаимодействие в системе вещество – живой организм.

С практической точки зрения оценка острой токсичности – необходимый этап доклинических исследований, определяющий принципиальную

возможность превращения фармакологического вещества в лекарство, а также предоставляющий базовые данные, позволяющие судить о начальной (стартовой) дозе для клинических исследований; диапазоне условно безопасных доз, фокусах клинического мониторинга потенциальных нежелательных явлений.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» разработано новое оригинальное лекарственное средство ГМЛ-1 — быстродействующий анксиолитик на основе производного пирроло [1, 2-а] пипразина, лиганда 18 кДа транслокаторного белка (TSPO). Оценка острой токсичности является необходимым этапом доклинического исследования безопасности ГМЛ-1.

Целью настоящей работы явилось изучение острой токсичности ГМЛ-1.

Задачи исследования — установить среднелетальные дозы ГМЛ-1, оценить выраженность его токсического действия и переносимость при однократном пероральном и внутрибрюшинном введении, зарегистрировать сроки развития интоксикации и гибели животных с подробным описанием наблюдаемой клинической картины, а также определить класс токсичности ГМЛ-1.

Материалы и методы

В эксперименте использовали таблеточную массу ГМЛ-1, предназначенную для формирования таблеток ГМЛ-1 г/х пролонгированного. Каждые 100 г массы содержали ГМЛ-1 — 1 г; MCC-101 — 88 г; Kollidon — 6 г; Polyplasdon XL — 4 г; магния стеарат — 1 г. ГМЛ-1 был произведён в опытно-технологическом отделе ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (серия 220916).

Из таблеточной массы готовили суспензию *ex tempore* дисперсионным методом на 1 % растворе крахмала. Исследование проводили на белых беспородных мышах ($n = 48$, масса 18–20 г) и белых беспородных крысах ($n = 48$, масса 180–220 г), обоего пола в соотношении 1:1. Животные содержались в виварии в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики». Животные были акклиматизированы в помещении вивария в течение 5 дней до начала проведения испытаний. Во время данного периода ежедневно проводили осмотр внешнего состояния животных, патологических отклонений у крыс и мышей не было обнаружено [2–4]. Группы животных формировали методом случайного отбора с использованием массы тела в качестве ведущего признака (разброс по исходной массе между и внутри групп в пределах одного пола не превышал $\pm 10\%$).

ГМЛ-1 вводили однократно в дозах: 4 г/кг (таблеточная масса) или 40 мг/кг (активное вещество) перорально самкам и самцам мышей и крыс; 1 г/кг (таблеточная масса) или 10 мг/кг (активное вещество) внутрибрюшинно самкам и самцам мышей и крыс. ГМЛ-1 вводили в максимально возможных объёмах для каждого из способов введения и для каждого из видов животных (мыши — 0,5 мл перорально и 1 мл внутрибрюшинно; крысы — 5 мл перорально и 5 мл внутрибрюшинно), в максимально возможных для введения концентрациях (16 % — при пероральном введении мышам и крысам, 2 % — при внутрибрюшинном введении мышам, 4 % — при внутрибрюшинном введении крысам). Животные контрольных групп получили эквивалентный объём 1 % раствора крахмала однократно. Препараты вводили перорально с помощью металлического атравматического зонда и внутрибрюшинно с помощью одноразовых шприцов [5].

Далее наблюдали за опытными и контрольными группами в течение 14 сут. Первые 8 ч после введения препарата каждая особь находилась в индивидуальной, прозрачной, пластиковой камере для непрерывного визуального наблюдения. Затем животных помещали в клетки группового содержания и осматривали ежедневно утром и вечером с целью выявления их возможной гибели, а также описания их общего состояния и особенностей поведения [6, 7]. Массу тела животных определяли перед введением ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала. В первую неделю наблюдения мышей и крыс взвешивали ежедневно, со второй недели наблюдения и до окончания эксперимента — еженедельно. Суточное потребление корма и воды фиксировали до введения ГМЛ-1 или 1 % раствора крахмала, а также в первые, седьмые и четырнадцатые сутки эксперимента. Животных, павших в ходе исследования, вскрывали. Эвтаназию и патологоанатомическое вскрытие всех животных проводили через 14 суток после введения препаратов [2].

Статистическую обработку полученных данных по динамике массы тела и её прироста проводили следующим образом. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий проверяли с помощью критерия Левена для множественных сравнений. Так как распределение изучаемых данных значительно не отличалось от нормального, а дисперсии были гомогенны, то для определения статистической значимости изменений использовали параметрические методы. Для сравнения нескольких выборок применяли однофакторный дисперсионный анализ или дисперсионный анализ для повторных измерений с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннелу. В случае сравнения двух вы-

Таблица 1

Оценка суточного потребления воды и корма у мышей в течение двух недель после введения препарата ГМЛ-1

Группа	Корм, гр.				Вода, мл			
	до введения	1-й день	7-й день	14-й день	до введения	1-й день	7-й день	14-й день
Контроль peros ♀	3,7 (3,7 ч 4,1)	3,1 [■] (3,1 ч 3,3)	2,6 [■] (2,6 ч 2,8)	3,3 [■] (3,3 ч 3,4)	8,1 (8,0 ч 8,8)	6,5 [■] (6,4 ч 6,9)	4,9 [■] (4,8 ч 5,2)	6,6 [■] (6,6 ч 6,8)
ГМЛ-1 peros 4 г/кг ♀	3,2* (3,1 ч 3,4)	1,9 [■] * (1,6 ч 1,9)	3,3* (2,9 ч 3,4)	3,4 [■] (3,3 ч 3,5)	6,8* (6,6 ч 7,1)	1,7 [■] * (1,5 ч 1,7)	10,5 [■] * (9,3 ч 10,6)	6,8 (6,6 ч 6,9)
Контроль peros ♂	3,7 (3,5 ч 3,9)	3,6 (3,5 ч 3,9)	3,4 [■] (3,2 ч 3,5)	3,5 [■] (3,3 ч 3,7)	6,6 (6,3 ч 7,1)	5,0 [■] (4,8 ч 5,3)	3,4 [■] (3,2 ч 3,5)	8,2 [■] (7,9 ч 8,8)
ГМЛ-1 peros 4 г/кг ♂	2,5* (2,4 ч 2,6)	2,4* (2,1 ч 2,6)	4,5 [■] * (3,9 ч 4,6)	4,3 [■] * (4,2 ч 4,5)	6,7 (6,5 ч 6,9)	1,7 [■] * (1,8 ч 1,8)	6,9* (6,0 ч 7,2)	7,5 [■] * (7,3 ч 7,8)
Контроль в/бр ♀	3,0 (2,9 ч 3,1)	3,3 [■] (3,2 ч 3,5)	2,8 [■] (2,7 ч 3,0)	3,5 [■] (3,4 ч 3,6)	6,7 (6,4 ч 6,9)	5,0 [■] (4,7 ч 5,2)	8,4 [■] (7,9 ч 8,8)	8,3 [■] (8,0 ч 8,6)
ГМЛ-1 в/бр 1 г/кг ♀	2,7* (2,5 ч 2,8)	0,8 [■] * (0,8 ч 0,9)	4,7 [■] * (4,6 ч 4,8)	4,4 [■] * (4,3 ч 4,4)	6,8 (6,2 ч 7,1)	3,4 [■] * (3,3 ч 3,5)	8,4 [■] (8,2 ч 8,5)	7,6 [■] * (7,4 ч 7,6)
Контроль в/бр ♂	5,0 (4,8 ч 5,2)	4,2 [■] (4,0 ч 4,3)	4,5 [■] (4,3 ч 4,6)	5,0 (5,0 ч 5,1)	8,4 (8,0 ч 8,6)	5,0 [■] (4,8 ч 5,2)	8,4 (8,0 ч 8,5)	6,7 [■] (6,6 ч 6,7)
ГМЛ-1 в/бр 1 г/кг ♂	4,0* (3,9 ч 4,2)	0,0 [■] * (0,0 ч 0,0)	5,5 [■] * (5,3 ч 5,7)	5,3 [■] * (5,1 ч 5,5)	6,6* (6,5 ч 7,0)	1,6 [■] * (1,6 ч 1,7)	6,6* (6,5 ч 6,9)	9,9 [■] * (9,5 ч 10,4)

Примечания: оценку значимости различий между выборочными средними осуществляли при условии, что статистическая совокупность включает не менее 4 наблюдений (числовых значений). * – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных, получавших 1 % раствор крахмала. ■ – статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными.

борок использовали t-критерий Стьюдента. Полученные результаты описывали с помощью средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

При изучении острой токсичности препарата ГМЛ-1 на беспородных белых мышках и крысах обоего пола при пероральном или внутрибрюшинном введении определение средней смертельной дозы не представлялось возможным из-за отсутствия гибели животных в условиях достижения максимально возможных концентраций и максимально допустимых объёмов введения.

В ходе эксперимента у мышей и крыс, получивших ГМЛ-1 перорально или внутрибрюшинно, отмечалось постепенное угнетение двигательной активности, нарушение ритма дыхания, которое было учащённым и поверхностным или, наоборот редким. Не было отмечено нарушений ушного и корнеального рефлексов. Когда через 8 ч животных помещали в клетки группового содержания, дви-

гательная активность восстановилась, отдельные особи (мыши) были гиперактивны, выпрыгивали из рук, вокализировали. При этом мыши и крысы были сгорбленными, с взъерошенной шерстью, бока у некоторых были втянуты. Следует подчеркнуть, что уже к началу вторых суток после введения ГМЛ-1 большинство мышей и крыс были активны и любопытны. При этом многие опытные животные оставались сгорбленными, шерсть была взъерошена. В дальнейшем внешний вид и состояние опытных мышей и крыс постепенно нормализовались, к концу первой недели и до окончания эксперимента животные были активны, охотно потребляли корм, пили воду. Поведение экспериментальных мышей и крыс в этот период наблюдения не отличалось от поведения животных контрольной группы.

В первые двое суток после введения препарата отмечалось резкое уменьшение потребления корма и воды (табл. 1, 2), а также резкое снижение массы тела и её прироста у всех опытных животных. Масса тела и её прирост у мышей и крыс, получивших ГМЛ-1 перорально или внутрибрюшинно, начинали возрастать со 2–3 дня.

Таблица 2

Оценка суточного потребления воды и корма у мышей в течение двух недель после введения препарата ГМЛ-1

Группа	Корм, гр.				Вода, мл			
	до введения	1-й день	7-й день	14-й день	до введения	1-й день	7-й день	14-й день
Контроль peros ♀	15,1 (14,6 ч 15,3)	16,2 [•] (15,7 ч 16,5)	15,6 [•] (15,2 ч 16,3)	13,6 [•] (12,9 ч 13,8)	25,1 (24,3 ч 25,5)	23,4 [•] (22,7 ч 23,8)	19,9 [•] (19,3 ч 20,8)	27,1 [•] (25,8 ч 27,5)
ГМЛ-1 peros 4 г/кг ♀	15,4 (15,2 ч 16,3)	14,3 ^{•*} (13,9 ч 14,7)	14,1 [*] (14,1 ч 14,7)	16,2 ^{•*} (15,7 ч 16,4)	23,0 [*] (22,7 ч 24,2)	18,3 ^{•*} (17,8 ч 18,8)	24,7 ^{•*} (24,6 ч 25,6)	20,2 ^{•*} (19,7 ч 20,4)
Контроль peros ♂	18,6 (17,8 ч 18,8)	17,7 [•] (17,1 ч 17,9)	17,9 (17,8 ч 18,2)	19,7 [•] (19,6 ч 19,8)	42,2 (40,4 ч 42,7)	28,7 [•] (27,6 ч 29,1)	26,7 [•] (26,7 ч 27,2)	28,4 [•] (28,2 ч 28,5)
ГМЛ-1 peros 4 г/кг ♂	18,9 (18,6 ч 19,1)	17,8 [•] (17,2 ч 17,9)	21,1 ^{•*} (20,5 ч 21,8)	24,8 ^{•*} (23,7 ч 26,5)	29,1 [*] (28,5 ч 29,4)	24,9 [*] (24,1 ч 25,1)	31,5 ^{•*} (30,6 ч 32,7)	30,5 [*] (29,2 ч 32,6)
Контроль в/бр ♀	14,7 (14,4 ч 14,9)	15,6 [•] (15,1 ч 15,7)	10,6 (10,3 ч 10,7)	15,1 [•] (14,5 ч 15,4)	23,4 (22,9 ч 23,6)	25,1 [•] (24,3 ч 25,3)	18,5 [•] (18,0 ч 18,6)	28,5 [•] (27,4 ч 29,0)
ГМЛ-1 в/бр 1 г/кг ♀	14,6 (14,4 ч 15,0)	3,3 ^{•*} (3,3 ч 3,4)	14,3 [*] (14,3 ч 14,8)	18,1 ^{•*} (18,1 ч 18,2)	23,2 (22,9 ч 23,8)	4,9 ^{•*} (4,9 ч 5,0)	23,1 [*] (23,0 ч 23,8)	23,3 [*] (23,2 ч 23,3)
Контроль в/бр ♂	17,8 (17,0 ч 18,7)	17,4 [•] (16,6 ч 18,4)	18,4 [•] (17,8 ч 19,1)	19,4 [•] (18,7 ч 20,3)	24,9 (23,8 ч 26,2)	24,9 (23,8 ч 26,3)	31,8 [•] (30,7 ч 33,0)	30,0 [•] (29,0 ч 31,4)
ГМЛ-1 в/бр 1 г/кг ♂	17,7 (16,1 ч 18,1)	5,0 ^{•*} (4,8 ч 5,2)	17,2 [*] (16,6 ч 17,7)	25,7 ^{•*} (24,1 ч 26,3)	18,7 [*] (17,0 ч 19,1)	8,3 ^{•*} (8,1 ч 8,7)	24,7 ^{•*} (23,9 ч 25,4)	31,9 [•] (29,9 ч 32,7)

Примечания: оценку значимости различий между выборочными средними осуществляли при условии, что статистическая совокупность включает не менее 4 наблюдений (числовых значений). * — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольной группой животных, получавших 1 % раствор крахмала. • — статистически значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с исходными данными.

В группе мышей, получивших ГМЛ-1 перорально, исходные значения массы у самок были достигнуты лишь на второй неделе, у самцов на 3-й день. К окончанию эксперимента у самцов не отмечено значимых различий в приросте массы тела между опытными и контрольными животными. У самок в течение всего эксперимента показатели прироста были значимо ниже контрольных данных (рис. 1 а, б).

В группе мышей, получивших ГМЛ-1 внутривентриально, первые семь дней показатели прироста массы тела имели отрицательное значение. К окончанию эксперимента показатели прироста массы опытных животных не имели статистических различий с показателями контрольной группы (рис. 1 в, г).

В группе крыс, получивших ГМЛ-1 перорально, у самок с пятых суток и до окончания эксперимента показатели прироста массы тела были в 2 раза ниже контрольных значений. У самцов в течение всего периода наблюдения не отмечено значимых различий в показателях с контрольной группой животных (рис. 1 д, е).

В группе крыс, получивших ГМЛ-1 внутривентриально, показатели прироста массы тела у самок

достигли положительных результатов на 7-й день, а у самцов на 4-й день. Показатели прироста массы опытных самок в течение всего эксперимента были значительно ниже контрольных данных (рис. 1 ж, з).

Важно, что к окончанию эксперимента не было выявлено закономерных различий в показателях прироста массы тела у опытных животных по сравнению с контрольными значениями. В показателях потребления корма и воды в данных группах к окончанию эксперимента также не было выявлено закономерных различий с контрольными группами (см. табл. 1, 2).

Морфологическая картина внутренних органов, обнаруженная при патологоанатомическом вскрытии всех экспериментальных животных, не отличалась от таковой, наблюдаемой у контрольных животных.

В результате исследования установлено, что ГМЛ-1 при пероральном и внутривентриальном введении является малотоксичным и, по классификации Сидорова К.К. (1973 г.), может быть отнесен к 4-у классу токсичности. В соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 препарат ГМЛ-1 относится к 3-у классу опасности для перорального способа введения.

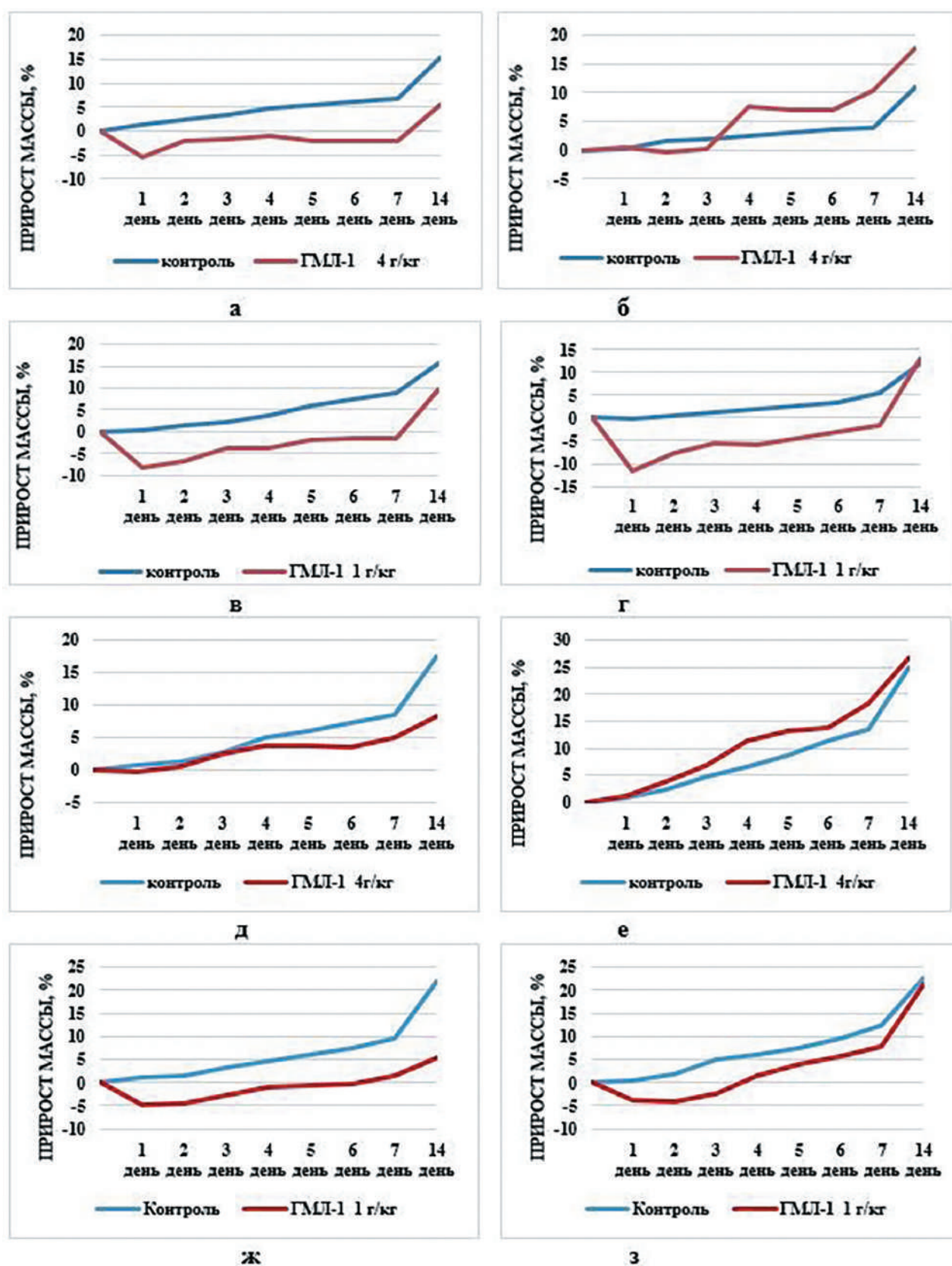


Рис. 1. Динамика прироста массы тела (%) у экспериментальных животных при исследовании острой токсичности ГМЛ-1
а — мыши самки после перорального введения ГМЛ-1 в дозе 4 г/кг; б — мыши самцы после перорального введения ГМЛ-1 в дозе 4 г/кг; в — мыши самки после внутрибрюшинного введения ГМЛ-1 в дозе 1 г/кг; г — мыши самцы после внутрибрюшинного введения ГМЛ-1 в дозе 1 г/кг; д — крысы самки после перорального введения ГМЛ-1 в дозе 4 г/кг; е — крысы самцы после перорального введения ГМЛ-1 в дозе 4 г/кг; ж — крысы самки после внутрибрюшинного введения ГМЛ-1 в дозе 1 г/кг; з — крысы самцы после внутрибрюшинного введения ГМЛ-1 в дозе 1 г/кг.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошкина Ирина Александровна*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-код: 4697-7938

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

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research Officer at the laboratory of drug toxicology
FSBI «Zakusov institute of Pharmacology», Moscow**Сорокина Александра Валериановна**

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

в. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии,
к.б.н., ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. За-
кусова», Москва**Sorokina Aleksandra**

ORCID ID: 0000-0002-9600-7244

Leading researcher of the laboratory of drug
toxicology, Candidate of Biological Sciences, FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow**Алексеева Светлана Витальевна**

SPIN-код: 8985-3418

с. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»,
Москва**Alekseeva Svetlana Vital'evna**

SPIN code: 8985-3418

senior researcher, laboratory of drug toxicology FSBI
«Zakusov institute of Pharmacology», Moscow**Волкова Анна Валерьевна**

SPIN-код: 9587-6581

с. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ
«НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Мо-
сква**Volkova Anna**

SPIN code: 9587-6581

senior researcher at the laboratory of
psychopharmacology FSBI «Zakusov institute of
Pharmacology», Moscow**Дурнев Андрей Дмитриевич**

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. лаборато-
рией лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва**Durnev Andrei**

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

Doctor of Medical Sciences, Professor,
Corresponding Member, RAS, head of the laboratory
of drug toxicology, FSBI «Zakusov institute of
Pharmacology», Moscow

Литература / References

1. Красовский Г.Н., Рахманин Ю.А., Егорова Н.А. *Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека*. — М.: Медицина; 2009. [Krasovskii GN, Rakhmanin YuA, Egorova NA. *Ekstrapolyatsiya toksikologicheskikh dannykh s zhivotnykh na cheloveka*. Moscow: Medicine; 2009. (In Russ).]
2. Беленький М.Б. *Элементы количественной оценки фармакологического эффекта*. — Л.: Медгиз; 1963. [Belen'kii M.B. *Elementy kolichestvennoi otsenki farmakologicheskogo effekta*. Leningrad: Medgiz; 1963. (In Russ).]
3. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств. Изучение острой токсичности. — М.: Гриф и К; 2012. — С. 15–17. [Guidance on Preclinical Evaluation of Medicines. Part 1. Metodicheskie rekomendatsii po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya lekarstvennykh sredstv. Izuchenie ostroi toksichnosti. Moscow: Grif i K; 2012. P. 15–17 (In Russ).]

4. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academies Press (US). Washington (DC). 2011. DOI: 10.17226/12910

5. *Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств*. РД 64-126-91. — М.: МЗ России, ФК; 1992. [Pravila doklinicheskoi otsenki bezopasnosti farmakologicheskikh sredstv. RD 64-126-91. Moscow: Rosminzdrav, FK; 1992. (In Russ).]

6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. — М.: Медицина; 2005. С. 41–47. [Guideline for Experimental (Preclinical) Studying of New Pharmacological Substances. Metodicheskie ukazaniya po izucheniyu obshchetoksicheskogo deistviya farmakologicheskikh veshchestv. Moscow: Medicine; 2005. P. 41–47 (In Russ).]

7. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. — М.: Медицина; 1974. [Gatsura VV. Metody pervichnogo farmakologicheskogo issledovaniya biologicheskii aktivnykh veshchestv. Moscow: Medicine; 1974. (In Russ).]



Издательство ОКИ

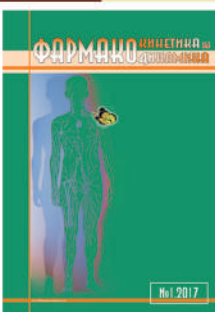
ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей,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

Сайт издательства: www.izdat-ok.ru



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

Сайт журнала: www.clinvest.ru



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

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



Журнал «Фармакогенетика и фармакогеномика» публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, 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



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

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

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



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

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

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

Приобрести книгу

можно в офисе ООО «Издательство ОКИ»

тел.: +7 (910) 449-22-73

e-mail: eva88@list.ru

Выходные данные

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

