

Болотова Вера Цезаревна

**РАЗРАБОТКА НОВОГО НООТРОПНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
ЭТАНОЛАМИНА, БУТАНДИОВОЙ И ТРАНС-БУТЕНДИОВОЙ КИСЛОТ
(экспериментальное исследование)**

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора фармацевтических наук

Санкт-Петербург, 2023

Работа выполнена на кафедре фармакологии и клинической фармакологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный консультант:

Шустов Евгений Борисович, доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С.Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства»

Официальные оппоненты:

Раменская Галина Владиславовна, доктор фармацевтических наук, профессор, директор Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет);

Фатеев Иван Владимирович, доктор медицинских наук, начальник отдела научно-исследовательского центра (медико-биологической защиты) ФБГУ «Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» МО РФ;

Воронина Татьяна Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая лабораторией психофармакологии ФГБНУ "НИИ фармакологии имени В.В. Закусова"

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России), г. Пермь

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 г. в ____ ч. на заседании диссертационного совета 21.2.005.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, ученой степени доктора наук, созданного при ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России по адресу 400066, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России.

Автореферат разослан «__» _____ 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, доктор медицинских наук

Шаталова Ольга Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Заболевания центральной нервной системы и сопровождающие их расстройства психической деятельности являются не только одной из самых частых причин обращений за медицинской помощью, но и ведут к нарушениям социализации пациентов, их трудоспособности, способности к самообслуживанию. Наиболее распространёнными нарушениями являются восприятие, обработка, усвоение, хранение и обмен информацией, способность к планированию, построение и осуществление программы действий, ориентация во времени, пространстве и социальной среде [Слободин Т.А. и др. 2012]. Согласно популяционным исследованиям, около 5% лиц старше 65 лет страдают деменцией, у 12-17% выявляются когнитивные нарушения, выходящие за рамки возрастной нормы, но не достигающие выраженности слабоумия [Захаров В.В. и др. 2007, Chehrehnegar N. et al. 2020]. Распространенность умеренных когнитивных нарушений (УКН) среди лиц пожилого возраста достигает 12—17%, а среди неврологических больных у УКН встречается в 44% случаев [Пилипович А.А. и др. 2020, Petersen R.C. et al. 2016]. По статистике, не менее 5% деменций, возникших в пожилом возрасте, вызываются системными дисметаболическими расстройствами [Яхно Н.Н. и др. 2007], не менее чем в 30% случаев имеется сочетание первичного органического поражения головного мозга и дисметаболических нарушений [Petretto D.R. et al. 2021].

По прогнозам экспертов Всемирной организации здравоохранения, число больных, страдающих деменцией, с каждым годом увеличивается. Так, в 2000 г число пациентов с деменцией достигало 24,3 млн человек, а в 2010 г. – уже 35,6 млн человек. По оценкам, к 2030 г. ожидается увеличение числа больных деменцией до 65,7 млн человек, к 2040 г. – до 81,1 млн ч

е Хроническая ишемия и гипоксия головного мозга являются факторами риска развития церебрального амилоидоза – главного патогенетического события болезни Альцгеймера, а инфаркты головного мозга способствуют более быстрой клинической манифестации симптомного или малосимптомного нейродегенеративного процесса [Snowdon D.A. et al.1997]. Известно, что отложение амилоидного белка происходит не только в паренхиме головного мозга, но и в церебральных сосудах, вызывая амилоидную микроангиопатию [Мхитарян Э.А. и др. 2006], которая усугубляет и видоизменяет сосудистые когнитивные нарушения [Захаров В.В. и др. 2014].

Приоритетным в лечении пациентов с лёгкими и умеренными недементными когнитивными нарушениями является нейропротективная терапия, которая замедляет прогрессирование патологического процесса и уменьшает заболеваемость деменцией.

Основными представителями лекарственных препаратов с нейропротективным действием являются ноотропные средства. Среди ноотропных препаратов особый интерес представляют лекарственные средства, воспроизводящие физиологические эффекты эндогенных веществ, в частности, аминокетанол и его производные, интермедиаты цикла Кребса.

Группа нейропротекторных фармакологических средств представлена в клинической практике достаточно широко, однако эффективность их применения у пациентов с когнитивными нарушениями остается низкой, что и определяет **актуальность** проведения исследований по поиску новых, более эффективных в отношении когнитивных функций, представителей группы ноотропных средств.

Степень разработанности

Изучаемое соединение является новым фармакологически активным веществом, состоящим из продуктов взаимодействия транс-бутандиовой кислоты и диэтилэтанолamina (ДЭАЭ) с бутандиовой кислотой, представляющим собой янтарную соль фумарового эфира диэтилэтанолamina.

В литературе описаны фармакологические свойства отдельных аналогов веществ, образующих исследуемое соединение, и реализующих свои эффекты на рецепторном и субстратном уровнях. Диметилэтанолamin (ДМАЕ) – естественный компонент тканей мозга человека, повышает уровень ацетилхолина в головном мозге за счет субстратной активации его синтеза или торможения его окисления до бетаина, является прекурсором ацетилхолина, активирует холинергические рецепторы, обладает антиоксидантными свойствами, улучшает захват и перенос кислорода к тканям, выражено стимулирует когнитивные функции и способствует повышению умственной и физической работоспособности у пожилых людей, после перенесённого ишемического инсульта и черепно-мозговой травмы, отравлении барбитуратами и хронического алкоголизма.

Входящий в состав разработанного вещества диэтилэтанолamin, подобно диметилэтаноламину, обеспечивает синтез медиатора ацетилхолина и фосфатидилхолина - структурного компонента клеточных мембран нейронов, стимулирует передачу импульса в холинергических волокнах, выражено улучшает пластичность мембран нейронов, обладает антиоксидантным действием. В сумме, перечисленные плеiotропные эффекты диэтилэтанолamina способствуют повышению концентрации внимания, улучшают процессы запоминания и воспроизведения информации, оптимизируют познавательные и поведенческие реакции, устраняют эмоциональную раздражительность и неврологическую симптоматику.

Не меньший интерес представляют интермедиаты цикла Кребса янтарная и фумаровая кислоты, которые защищают клетки от гипоксии, препятствуют развитию митохондриальной дисфункции, расширяют сосуды конечностей и почек. Янтарная кислота активирует

специфические рецепторы (SUCNR1), оказывая метаболическое и гормоноподобное действие, повышает содержание сигнального белка, стимулирующего рост эндотелия сосудов (VEGF), выполняет роль нейронального регулятора высвобождения провоспалительных агентов после гипоксии/ишемии мозга, ограничивает размер очага инфаркта [Кондрашова М.Н. и др. 2002, Приходько В.А. и др. 2021а,б, Ariza A.C. et al. 2012, Blad C.C. et al. 2012, Regard J.B. 2008].

Фумаровая кислота оказывает антигипоксическое действие в условиях выраженной гипоксии [Маевский Е. И. и др. 2017]. Производное фумаровой кислоты – диметилфумарат, ингибирует синтез провоспалительных цитокинов и хемокинов, препятствует развитию аутоиммунного воспаления нейронов и в настоящее время применяется для лечения рассеянного склероза [Breuer J. et al. 2017].

Известно, что янтарный эфир диметилэтанолamina оказывает отчетливое позитивное влияние на работоспособность, устойчивость к гипоксии, стрессу и воздействию низких температур. В медицинской литературе известно описание антиастенического действия диметиламиноэтилового эфира янтарной кислоты [Nakus M. et al. 1972].

В целом, каждое в отдельности вещество не обладает достаточным спектром фармакологических свойств, чтобы в условиях монотерапии эффективно устранять когнитивные расстройства. Более того, на мировом фармацевтическом рынке отсутствуют препараты с ноотропной активностью широкого спектра действия, разработанные на основе фумаровой кислоты.

Соответствие исследований государственным и ведомственным программам:

Разработка новых, высокоэффективных средств в рамках восстановительной неврологии рассматривается как один из приоритетов отечественной медицинской науки (Распоряжение Правительства РФ от 28.12.2012 №2580-р «Об утверждении стратегии развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года», п. 2.9. Научная платформа «Неврология и нейронауки», п. 2.7. Научная платформа «Фармакология», распоряжения Правительства Российской Федерации от 31.12.2020 г. №3684-р об утверждении «Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021-2030 годы).

Работа выполнена в соответствии с Государственным контрактом № 14. N08.12.0120 DI «Лекарственное средство на основе солей органических кислот с диэтиламиноэтанолом, обладающее нейропротекторным действием» (2016-2018).

Цель исследования. Разработка нового ноотропного препарата на основе структуры диэтилэтанолamina с интермедиатами цикла Кребса.

Задачи исследования:

1. Осуществить выбор наиболее активного соединения на основе структуры диэтилэтанолamina с интермедиатами цикла Кребса.
2. Изучить антигипоксическое действие различных доз выбранного соединения при однократном введении в условиях острой (нормобарической, гемической и гистотоксической) гипоксии.
3. Изучить нейропротекторное действие соединения на моделях глобальной ишемии головного мозга, окклюзии средней мозговой артерии и направленного кортикального шока.
4. Изучить влияние нового фармакологически активного соединения на поведение, когнитивные функции, пространственную ориентацию и память животных.
5. Установить возможные нейропротекторные механизмы действия бутандиовой соли транс-бутендиового эфира диэтилэтанолamina (янтарнокислой соли фумарового эфира диэтилэтанолamina, ФДЭС) с использованием методов компьютерного моделирования биологического действия и модели амилоидной токсичности *in vitro*.
6. Исследовать фармакокинетические характеристики ФДЭС при пероральном поступлении в организм лабораторных животных.
7. Составить алгоритм лабораторной технологии производства таблеток.
8. Провести первичную оценку безопасности субстанции ФДЭС при однократном введении и изучить безопасность таблеток ФДЭС при курсовом введении.

Научная новизна:

1. Впервые показано наличие нейропротекторного, нейрореабилитационного и когнитивного компонентов действия, характерного для ноотропных средств, для нового производного транс-бутендиового эфира диэтиламиноэтанола – его янтарнокислой соли.
2. Впервые изучено нейропротекторное действие ФДЭС. Установлено, что данное вещество в условиях гипоксического, ишемического и травматического поражения головного мозга уменьшает выраженность когнитивно-мнестических и эмоциональных нарушений, а также препятствует развитию дегенеративных гистоморфологических изменений ткани головного мозга.
3. Впервые показано, что янтарнокислая соль фумарового эфира диэтилэтанолamina не только предотвращает развитие нейродегенеративных процессов в структурах головного мозга, но и устраняет неврологический дефицит, вызванный гипоксически-ишемическими процессами. Выявлена способность этого соединения повышать выживаемость лабораторных животных и восстанавливать их когнитивную и двигательную активность.
4. Впервые было установлено, что механизм нейропротекторного действия ФДЭС связан с его способностью активировать нейрональный депо-управляемый вход кальция в

- постсинаптические дендритные шипики, защищать грибовидные шипики дендритных синапсов от амилоидной синаптотоксичности и повышать нейропластичность в гиппокампе.
5. Впервые проведён компьютерный прогноз фармакологической активности исследуемого соединения, согласно которому ФДЭС способствует увеличению когнитивной активности и снижению последствий, вызванных ишемией головного мозга и черепно-мозговой травмой. Эти эффекты в дальнейшем были подтверждены в экспериментах на животных.
 6. Впервые изучена безопасность исследуемого вещества. Однократное инъекционное и пероральное введение соединения ФДЭС в дозе 2000 мг/кг не вызывало гибели мышей обоего пола, что позволяет отнести исследуемое вещество к «5 классу токсичности или не классифицируется».
 7. Впервые изучена безопасность таблеток ФДЭС при курсовом пероральном введении в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг. Установлено, что таблетки ФДЭС в терапевтической дозе и превышающей ее в 10 раз не вызывает статистически значимого увеличения реакции гиперчувствительности замедленного типа, токсического воздействия на внутренние органы, не оказывает тератогенного и эмбриотоксического действия на плод по сравнению с контрольной группой животных, получавшей воду очищенную.
 8. Впервые изучены фармакокинетические параметры ФДЭС при пероральном введении его таблетированной лекарственной формы. Установлено, что фармакокинетическая кривая для однократного перорального введения таблеток ФДЭС носит моноэкспоненциальный характер. Биодоступность таблеток составила 25,0%, пик концентрации в плазме крови наблюдался через 30 мин после однократного перорального введения, объем распределения равен 28,09 л/кг, период полувыведения - 0,37 ч (22,2 мин), среднее время удержания в организме крысы - 14,79 ч. ФДЭС определялся в плазме крови и моче более 24 ч.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретически и экспериментально обосновано новое перспективное направление создания ноотропного вещества широкого спектра, сочетающего нейропротекторные и антиамнестические свойства, для профилактики и лечения когнитивных нарушений ЦНС, вызванных гипоксически-ишемическими процессами, на основе янтарнокислой соли фумарового эфира диэтилэтаноламина.

Исследование ноотропных свойств нового производного фумаровой кислоты позволило установить, что ФДЭС обладает высокой нейропротекторной и антиамнестической активностями, превосходит по эффективности используемый препарат цитофлавин, обосновать перспективность создания на его основе эффективного ноотропного средства с широким спектром действия для профилактики и лечения когнитивных нарушений в комплексной терапии гипоксических состояний, ишемического инсульта и травмы головного мозга.

Показана безопасность субстанции ФДЭС при однократном введении в дозах до 3000 мг/кг и таблеток ФДЭС при курсовом пероральном введении в дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг.

Методология и методы исследования

Настоящее исследование носило комплексный характер, предполагающий сочетание экспериментальных исследований *in vitro* и *in vivo* и методов компьютерного моделирования *in silico*.

Экспериментальные исследования выполнены с использованием белых беспородных крыс и мышей в соответствии с рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств. Механизм нейропротекторного действия нового ноотропного вещества ФДЭС изучен на модели амилоидной синаптотоксичности *in vitro*.

Использован физико-химический метод - ВЭЖХ для изучения фармакокинетики ФДЭС.

Статистическую обработку результатов экспериментов проводили в пакете программ «Statistica 6.0» (США) с использованием стандартных параметрических и непараметрических методов.

Все исследования, проведенные с использованием животных, были одобрены комиссией по этике Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Бутановая соль транс-бутендиового эфира диэтилэаноламина (ФДЭС) оказывает нейропротекторную активность в условиях острой гипоксии, значительно повышает устойчивость животных к гипоксии.
2. В условиях тотальной ишемии мозга ФДЭС значительно повышает выживаемость животных и снижает неврологический дефицит у крыс после окклюзии средней мозговой артерии и дозированного кортикального удара, способствует восстановлению координаторных и сенсомоторных функций, уменьшает степень повреждения мозга.
3. ФДЭС выражено повышает когнитивные функции лабораторных животных, в том числе в условиях экспериментального их нарушения.
4. Нейропротекторная активность ФДЭС в поддержании уровня нейронального депонированного входа кальция и оптимальной структуры шипикового аппарата синапса проявляется на модели амилоидной токсичности.
5. ФДЭС – безопасная фармацевтическая субстанция, характеризующаяся приемлемой для перорального применения фармакокинетикой.

Степень достоверности и апробация работы

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментального материала с использованием современных методов и

методологических подходов, соответствующих целям и критериям доказательной медицины. Выводы, сформулированные в диссертации, подтверждены экспериментальным материалом, анализом литературы и статистической обработкой результатов.

Основные результаты работы обсуждались на: научно-практических конференциях с международным участием «Биомедицина и биомоделирование» (Московская область, 2014, 2017-2022), всероссийской научной конференции «Фармакология экстремальных состояний», посвященной 150-летию Н.П. Кравкова (г. Санкт-Петербург, 2015), III, IV всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (г. Санкт-Петербург, 2015, 2016), международной конференции «Новые тенденции в разработке лекарственных средств» (г. Турку, Финляндия, 2015), всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития», посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ (г. Курск, 2016), V конгрессе фармакологов России «Научные основы поиска и создания новых лекарственных средств» (г. Ярославль, 2018), научно-практической конференции «Актуальные вопросы токсикологии и фармакологии», посвященной 100-летию со дня рождения академика С.Н. Голикова (г. Санкт-Петербург, 2019), республиканской научно-практической конференции с международным участием «Современное состояние фармацевтической промышленности: проблемы и перспективы» (г. Ташкент, 2019, 2020), международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учебного заведения «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» «Современные достижения фармацевтической науки и практики» (г. Витебск, 2019), на заседании Санкт-Петербургского научного общества фармакологов (г. Санкт-Петербург, 2020-2021).

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Автор сформулировал цели и задачи исследования, спланировал и выполнил ряд экспериментов, провел работу по обработке и интерпретации полученных данных, а также подготовил и опубликовал результаты собственных экспериментальных исследований.

Публикации.

По материалам диссертационного исследования опубликовано 33 печатные работы, из них 13 в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией, получено 2 патента на изобретение, опубликована 1 монография, внедрены 2 методические рекомендации по доклиническому изучению новых лекарственных средств, обладающих антигипоксическим и актопротекторным действием.

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертационного исследования представлены на 238 страницах машинописного текста и состоят из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 7 глав с результатами собственных исследований и их обсуждением, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 445 источников, в том числе 240 на русском и 205 на иностранных языках. Работа проиллюстрирована 75 таблицами и 40 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **главе 1** представлена фармакологическая характеристика современных ноотропных препаратов для лечения когнитивных нарушений, описано действие интермедиантов цикла Кребса на функциональное состояние ЦНС, обозначены молекулярные механизмы ноотропного действия на уровне синаптических мембран, определены перспективные направления развития фармакологического класса ноотропных препаратов.

В **главе 2** описаны материалы и методы доклинических и технологических исследований. Эксперименты выполнены на 1292 белых беспородных лабораторных мышах самцах массой 22-30 г и мышах самцах линии СВА массой 18-22 г, 587 белых беспородных крысах-самцах и 72 крысах-самках массой 200-250 г.

Все эксперименты выполняли в соответствии с «Правилами надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» (решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 г. № 81), согласно утвержденному письменному протоколу. Животные были получены ФГУП ПЛЖ «Рапполово» (Ленинградская область), прошли необходимый карантин и содержались в стандартных условиях сертифицированного вивария на обычном пищевом рационе, со свободным доступом к воде.

Объектом исследования была выбрана бутановая соль транс-бутендиового эфира диэтилэтаноламина (янтарная соль фумарового эфира диэтилэтаноламина) (рабочий шифр соединения ФДЭС). Синтез производных этаноламина выполнен на кафедре органической химии (зав. - д.х.н. профессор Яковлев И.П.), а лекарственная форма (таблетки) – на кафедре технологии лекарственных форм, Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета (зав. - д.ф.н. профессор Флисюк Е.В.).

В качестве препаратов сравнения на разных этапах исследования применялись: цитофлавин (ООО «НТФФ ПОЛИСАН», Россия); 1,2,4-тиадиазол-3,5-диамин (амтизол) ресинтезирован на кафедре органической химии СПХФУ; триметазидин (Лаборатории Сервье, Франция); пирацетам (ноотропил, UCSB Pharma S.A., Бельгия). Исследуемые объекты и их дозы представлены в таблице (Таблица 1).

Таблица 1. Объекты исследования и их дозы

Объекты исследования	Дозы, мг/кг
ФДЭС	10, 25, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800
Цитофлавин	10, 25, 50, 75, 170, 600
Пирацетам	120, 900
Триметазидин	0,5

Животные опытной и контрольной групп, в пределах каждой серии исследований, были из одного привоза и одного возраста, рандомизированы на подгруппы по массе. Каждая экспериментальная и контрольная группа включала от 8 до 16 животных.

Моделирование острой гипоксии. Для определения антигипоксической активности нового производного этаноламина использовали модели острой нормобарической, гипобарической, гемической и гистотоксической гипоксии [Каркищенко Н.Н. и др. 2017а].

Методы моделирования ишемической патологии головного мозга. Церебральную ишемию у наркотизированных хлоралгидратом (350 мг/кг, Sigma, США) крыс моделировали двусторонней перевязкой левой и правой общих сонных артерий, окклюзией средней мозговой артерии (ОСМА) [Koizumi J. et al. 1986, Longa E.Z. et al. 1989] и с помощью контролируемого кортикального удара [Paxinos G. et al. 2013].

Методы оценки поведения, координации и когнитивных функций животных. Поведение животных оценивали общепризнанными тестами «Открытое поле» [Martin-Arenas F.J. et al. 2014] и «Приподнятый крестообразный лабиринт» [Walf A.A. et al. 2007]. Для изучения влияния исследуемых препаратов на когнитивные функции были выбраны тесты: «Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)», «Экстраполяционное избегание», «Т-лабиринт», «Лабиринт Барнс». Оценку моторной дисфункции проводили с помощью тестов «цилиндр» [Gharbawie O.A. et al. 2004], «сужающаяся дорожка» [Cummings B.J. et al. 2007], «стимулирование конечностей» [De Ruyck M. et al. 1989], координацию движений и формирование утомления исследовали на аппаратно-программном комплексе «Ротарод+» [Kuhn P.L. et al. 1995].

Методы оценки физической работоспособности животных. Физическую работоспособность лабораторных животных оценивали в тесте «вынужденное плавание» [Каркищенко Н.Н. и др. 2017б].

Модели *in vitro* и *in silico* по изучению механизма действия. Выполнен прогноз взаимодействия ФДЭС с молекулярными мишенями с использованием программы PASS Targets 21 [Rawanduzy A. et al. 1997, Lehmann M.L. et al. 2010], обучающая выборка которой составлена на основе информации, извлеченной из базы данных ChEMBL, версия 21 [Miller B.F. et al. 2014],

а механизм действия изучен в первичных культурах нейронов гиппокампа мышей дикого типа (с добавлением синтетических бета-амилоидов 1-42 (A β 42)) [Luo Y. et al. 2013, Zhang H. et al. 2015]

Методы оценки фармакокинетики. Изучение фармакокинетических параметров в крови крыс осуществляли при двух путях введения (внутривенно и при пути введения, предполагающегося для клинического применения, т. е. перорально).

Для количественного определения препарата ФДЭС в биологических жидкостях использована система высокоэффективной жидкостной хроматографии на основе жидкостного хроматографа модели Agilent 1200 «Agilent Technologies», с насосом, встроенным дегазатором, оборудованным системой автоматического ввода пробы с масс-селективным детектором (МС) Agilent 6410B Triple Quadrupole LC/MS с электрораспылительной ионизацией, хроматографической колонкой: ZORBAX Eclipse XDB-C18 4.6 x 50 mm (Agilent Technologies) с программным обеспечением для сбора и обработки данных MassHunter Agilent Technologies.

Взятие крови и мочи осуществляли через 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 часов и 1, 2, 3, 4, 6, 24 часов соответственно после внутрижелудочного введения субстанции ФДЭС (доза 5 мг/кг).

Для разработки методики извлечения исследуемого соединения из биологических сред выбраны два направления: извлечение препарата после осаждения ацетонитрилом в соотношении 3:1 и применение мембранных фильтров с отсечением по молекулярной массе (3 кДа, 10 кДа). Отработку методик проводили с использованием образцов мочи и крови с созданными концентрациями ФДЭС на трёх различных уровнях: 10, 100 и 500 нг/мл.

Осаждение белковой фракции проводят добавлением трехкратного избытка ацетонитрила, содержащего 0,1 % муравьиной кислоты. Выпадающий осадок белковой фракции центрифугируют при 14000 об/мин на охлаждаемой центрифуге 10 мин. Верхний прозрачный ацетонитрильный раствор используют для анализа.

В случае применения мембранных фильтров с отсечением по молекулярной массе (3 кДа или 10 кДа) образец биосреды (300-400 мкл) наносят на фильтр и центрифугируют 10 мин при 14000 об/мин в охлаждаемой центрифуге. Прозрачный раствор на дне виалы используют для анализа.

Расчет фармакокинетических параметров проводился с помощью пользовательского приложения-макроста к программе Microsoft Excel – PKSolver (Zhang Y.I. et al. 2010). Производился расчет следующих параметров фармакокинетики: кажущаяся начальная концентрация препарата (C_0); период полувыведения препарата ($T_{1/2}$); почечный клиренс (Cl_R , л/час/кг); общий (кажущийся) объём распределения (V_d , л/кг); объём распределения препарата (V_d); площадь под кривой «концентрация — время» (AUC, AUMC_{inf}); абсолютная биодоступность (F, %); константа элиминации; среднее время пребывания в организме молекулы препарата (MRT).

Модели по оценке острой и хронической безопасности. Определение летальных доз ФДЭС при пероральном введении проводили в соответствии с ГОСТ 32296-2013, при внутривенном и подкожном введении - по экспресс-методу Прозоровского [Прозоровский В.Б. 2007], и изучали хроническую токсичность [Миронов А.Н. 2012].

Материалы и методы технологии производства таблеток. Изучены физико-химические свойства субстанции ФДЭС. Осуществлён подбор состава для технологии таблеток [ГФ IV 2018а, 2018б].

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ «Statistica 6.0». Осуществляли проверку нормальности распределения количественных признаков при малом числе наблюдений с использованием W-критерия Шапиро-Уилка, оценивали значимость различий при нормальном распределении количественных признаков с помощью t-критерия Стьюдента (для независимых выборок), а при ненормальном распределении - с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни (для сравнения двух попарно не связанных между собой вариационных рядов), а также применялся однофакторный дисперсионный анализ ANOVA в случае множественных сравнений. Статистическую значимость изменений показателей в динамике у животных одной и той же группы оценивали, применяя критерий Вилкоксона для связанных выборок. Числовые данные, приводимые в таблицах, представлены в виде: средняя арифметическая (M) \pm ошибка среднего (m). Уровень доверительной вероятности был задан равным $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В главе 3. Представлены результаты скрининга новых эфиров аминоксанола с янтарной и фумаровой кислотой и их солей с кислотами цикла Кребса на наличие психоактивирующего и антигипоксического эффектов

Для скрининга были использованы 20 новых соединений, из них 10 – производных диметилэтанолamina, и 10 – производных диэтилэтанолamina. В каждой группе были представлены янтарные и фумаровые эфиры, а также собственно основания и их янтарные, фумаровые, кетоглутаровые и яблочнокислые соли.

Проведенное исследование показало, что среди изучаемых производных эфиров этаноламинов достоверное психоактивирующее действие, проявляющееся повышением физической работоспособности относительно контрольной группы, сопоставимое или превышающее активность референтного ноотропного препарата аминоксанола ряда – нооклерила (50 мг/кг, +74%, 75 мг/кг, +58%). было выявлено у следующих соединения: из группы сукцинатных эфиров диметилэтанолamina – янтарная (25 мг/кг, +82%; , 50 мг/кг - +58%), фумаровая (10 мг/кг - +74%, 25 мг/кг - +101%) и DL-яблочная соль (25 мг/кг, +58%); из группы фумаровых эфиров диметилэтанолamina – фумаровая (75 мг/кг, +175%) соль и основание (25

мг/кг, +71%); из группы сукцинатных эфиров диэтилэтанолamina – фумаровая соль (75 мг/кг, +85%); из группы фумаровых эфиров диэтилэтанолamina – янтарная (10 мг/кг, +162%) и кетоглутаровая (25 мг/кг, +55%, 50 мг/кг - +46.%, 75 мг/кг - +59%) соли. Именно эти соединения в дальнейшем подвергались тестированию на наличие антигипоксической активности.

Профилактическое введение (за 1 ч до барокамерного воздействия) исследуемых препаратов и препаратов сравнения обеспечивало выраженную защиту мозга животных от гипоксического воздействия. Сопоставимую с препаратами сравнения (предуктал, 450% от контроля, пирацетам – 612%) антигипоксическую активность была выявлена у янтарной и фумаровой соли янтарного эфира диметиламиноэтанола (соответственно, 638 и 452% от контроля), фумаровая соль янтарного эфира диэтиламиноэтанола (408% от контроля), янтарная соль фумарового эфира диэтиламиноэтанола (487% от контроля). Умеренная антигипоксическая активность, уступающая препаратам сравнения, была отмечена для фумаровых солей фумаровых эфиров диметил- и диэтиламиноэтанола (соответственно, 276 и 352% от контроля), кетоглутаровой соли фумарового эфира диэтиламиноэтанола (295% от контроля) и рацемической яблочной соли янтарного эфира диметиламиноэтанола (272% от контроля). Основание фумарового эфира диметиламиноэтанола обладало слабой антигипоксической активностью (187% от контроля).

Обобщенные результаты скрининговых серий новых биологически активных веществ на предмет возможного обнаружения у них ноотропной активности, сочетающей психоактивирующий и антигипоксический компоненты, представлены в таблице (Таблица 2).

Таблица 2. – Оценка вероятности обнаружения ноотропной активности у новых соединений с выявленным психоактивирующим и нейропротекторным (антигипоксическим) действием

Соединение	Выраженность активности		Вероятность ноотропного действия
	Психоактивирующей	Нейропротекторной (антигипоксической)	
ФДМ-основание	+	+	низкая
ФДМ-фумарат	+++	+	высокая
СДМ-сукцинат	+	+++	высокая
СДМ-фумарат	+	++	умеренная
ФДЭ-кетоглутарат	+	+	Низкая
ФДЭ-сукцинат	+++	+++	Очень высокая
СДЭ-фумарат	++	+	умеренная

Примечание: СДМ – янтарный эфир диметиламиноэтанола; ФДМ – фумаровый эфир диметиламиноэтанола; СДЭ – янтарный эфир диэтиламиноэтанола; ФДЭ – фумаровый эфир диэтиламиноэтанола. Выраженность эффекта в сравнении с контролем: + слабая, ++ - умеренная, +++ - высокая.

Таким образом, по результатам скрининга фармакологической активности новых соединений нами для дальнейшего экспериментального исследования потенциального

ноотропного действия было выбрано соединение янтарная соль фумарового эфира диэтиламиноэтанола (рабочее обозначение ФДЭС) в эффективной дозе 10 мг/кг.

В главе 4 изучено нейропротекторное действие ФДЭС, которое обеспечивалось антигипоксическим и противоишемическим эффектом. Исследования, представленные в данной главе, выполнялись совместно с И.А. Титович, Ю.И. Сысоевым.

Влияние ФДЭС на устойчивость мозга к критической гипоксии. Антигипоксическая активность исследуемых соединений оценивалась как отношение среднегрупповых концентраций кислорода, вызывающих гибель животных, в контрольной группе к соответствующему значению при приеме анализируемой дозы препарата. Кривые «Доза-Эффект» для ФДЭС и препарата сравнения цитофлавина представлены на рисунке (Рисунок 1).

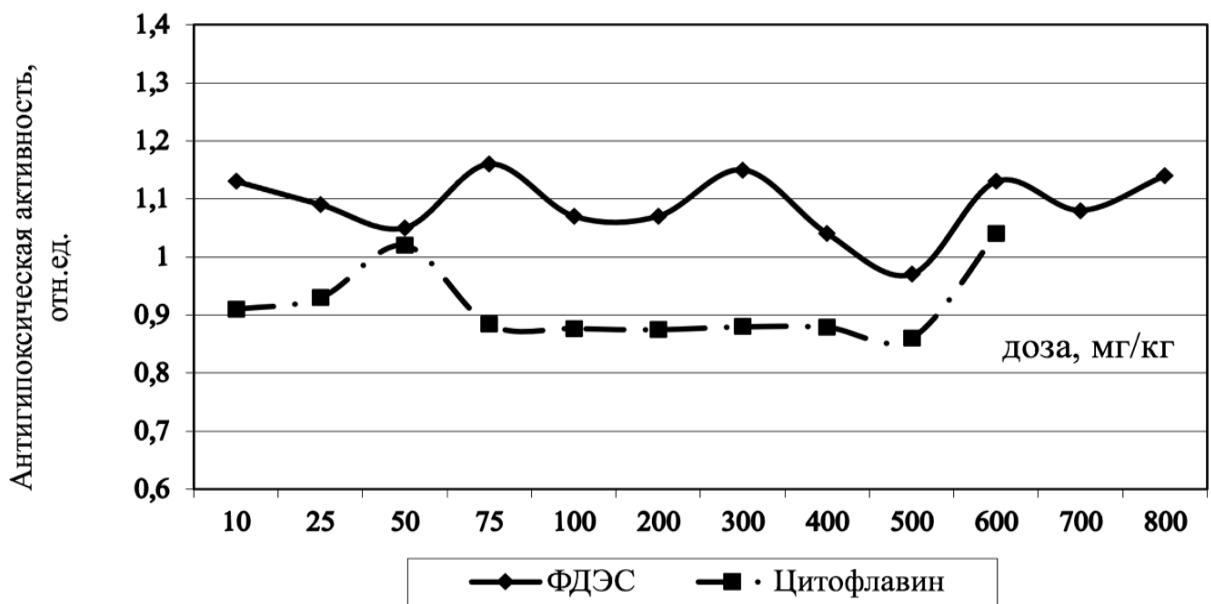


Рисунок 1. – Кривые «Доза-Эффект» для антигипоксической активности ФДЭС и Цитофлавина. Примечание: антигипоксическая активность плацебо в контроле равна 1,0.

Кривая «Доза-Эффект» для ФДЭС на модели нормобарической гипоксии отражает «плоский» характер зависимости, т.е. увеличение дозы не сопровождается повышением антигипоксической активности. Такая зависимость не соответствует субстратному механизму действия, для которого типичным является существенно более высокая активность высоких доз препарата по сравнению с низкими. Вероятно, антигипоксическая активность ФДЭС в основном связана с катионной частью его молекулы и реализуется через рецепторные механизмы действия.

Препарат сравнения цитофлавин на модели критической нормобарической гипоксии не оказывал антигипоксического действия. При этом тренд активности направлен на повышение в высоких дозах цитофлавина, что является отражением субстратного механизма действия входящего в его состав сукцината.

При острой гемической гипоксии ФДЭС в дозе 50 мг/кг обеспечивал повышение средней продолжительности жизни на 21% по отношению к контролю и выживаемость 38% к 30 минуте пробы. В дозе 75 мг/кг антигипоксическая активность ФДЭС на этой модели была более высокой (прирост времени жизни составил 65%, выживаемость – 75%). Все указанные изменения были статистически достоверными. Препарат сравнения цитофлавин не был эффективен на данной модели.

В модели острой гистотоксической гипоксии было установлено, что ФДЭС в дозах 50 мг/кг и 75 мг/кг увеличивал продолжительность жизни в 1,22 раза и 1,16 раза соответственно и выживаемости мышей на 50 и 38% соответственно по сравнению с контрольной группой мышей. По эффективности ФДЭС (50 мг/кг) превосходил по активности цитофлавина в среднем дозовом диапазоне (10-75 мг/кг), но уступал в 1,16 раза цитофлавинову в максимальной субстратной дозе 600 мг/кг.

Для интегральной оценки антигипоксической активности препаратов, используя методы векторного анализа, определяли усредненную интегральную активность (УИА) по формуле:

$$\text{УИА} = \sqrt{\frac{a^2 + b^2 + c^2}{3}}$$
, где *a*, *b* и *c* — антигипоксическая активность (в относительных единицах) в тестах «нормобарическая гипоксия» (ОНГ), «гемическая гипоксия» (ОГГ) и «гистотоксическая гипоксия» (ОГТГ) соответственно (Таблица 3).

Таблица 3. – Сравнительная оценка антигипоксической активности ФДЭС и цитофлавина в сопоставимых дозах

Соединение	Доза мг/кг	Антигипоксическая активность, отн. ед.			УИА
		ОНГ	ОГГ	ОГТГ	
ФДЭС	10	1,13	0,92	1,0	1,02
	25	1,09	1,02	0,96	1,02
	50	1,05	1,21	1,22	1,16
	75	1,16*	1,65**	1,16*	1,34**
Цитофлавин	10	0,91	0,83	0,57	0,78
	25	0,93	0,89	0,70	0,85
	50	1,02	0,86	0,50	0,82
	75	0,88	1,06	0,71	0,89

Примечание: 1) антигипоксическая активность плацебо (контрольная группа) равна 1,0.

2) отличия от контроля статистически значимы, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$, метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок.

Таким образом, интегральная оценка антигипоксической активности в трех моделях острой (критической) гипоксии – нормобарической, гемической и гистотоксической, показывает, что новое соединение ФДЭС в дозе 50 мг/кг (УИА=1,16) оказывает умеренное, а в дозе 75 мг/кг (УИА=1,34) - выраженное антигипоксическое действие.

По результатам скринингового исследования для ФДЭС была установлена эффективная доза 10 мг/кг тогда, как в дозе 75 мг/кг исследуемое вещество статистически значимо увеличивало выживаемость животных в условиях острой нормобарической, гемической и гистотоксической гипоксии. Для установления эффективной дозы в реализации ноотропного эффекта новой субстанции, в дальнейших исследованиях ФДЭС был изучен в дозах 10 и 75 мг/кг.

Оценка нейропротекторного действия на модели перевязки общих сонных артерий. На модели глобальной ишемии головного мозга введение исследуемого вещества и препаратов сравнения осуществлялись внутрижелудочно за 30 минут и через 30 минут после до операции и далее ежедневно в течение 21 дня. Оценивали влияние на выживаемость, координацию движений, на пространственную ориентацию и память животных.

Установлено, что перманентная перевязка общих сонных артерий вызывает гибель животных, наиболее выраженную в первые сутки после операции и продолжающуюся до 72 часов. К 7 суткам в живых осталось 33,3%, а к 21-м суткам в живых осталось 25% контрольных крыс (Таблица 4). Введение ФДЭС перед операцией позволило снизить летальность животных в послеоперационном периоде. ФДЭС в дозе 10 мг/кг оказывал статистически не значимую тенденцию к увеличению доли выживших животных на 33% ($p=0,09$) тогда, как в дозе 75 мг/кг статистически значимо обеспечивал увеличение данного показателя на 42% ($p=0,05$), то есть, для препарата ФДЭС характерно нейропротекторное действие, определяемое по показателю выживаемости на модели тотальной ишемии головного мозга.

Таблица 4. – Влияние исследуемых препаратов на выживаемость крыс после двусторонней необратимой перевязки обеих общих сонных артерий

Группа	Выживаемость, %				
	1 сутки	3 сутки	7 сутки	14 сутки	21 сутки
Ложнооперированные	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
Не леченные (контроль)	50,0	41,7	33,3	25,0	25,0
ФДЭС 10 мг/кг	66,7	58,3	58,3	58,3	58,3
ФДЭС 75 мг/кг	66,7	66,7	66,7	66,7 *	66,7 *
Цитофлавин 170 мг/кг	50,0	41,7	25,0	25,0	25,0

Примечание: * – достоверные отличия от контрольной группы животных ($p<0,05$), метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок.

Необходимо отметить, что препарат сравнения цитофлавин не оказывал влияния на выживание животных при развитии тотальной ишемии мозга.

В контрольной группе ишемизированных крыс, вызванной ОСМА, время удержания на вращающемся стержне (Ротарод) на 21 сутки восстановительного послеоперационного периода достоверно снизилось в 4,2 раза по сравнению с исходными значениями. ФДЭС в обеих дозах этот показатель снизился в среднем только в 1,5 раза ($p<0,05$), статистически значимо отличаясь от значений контрольной группы (Рисунок 2).

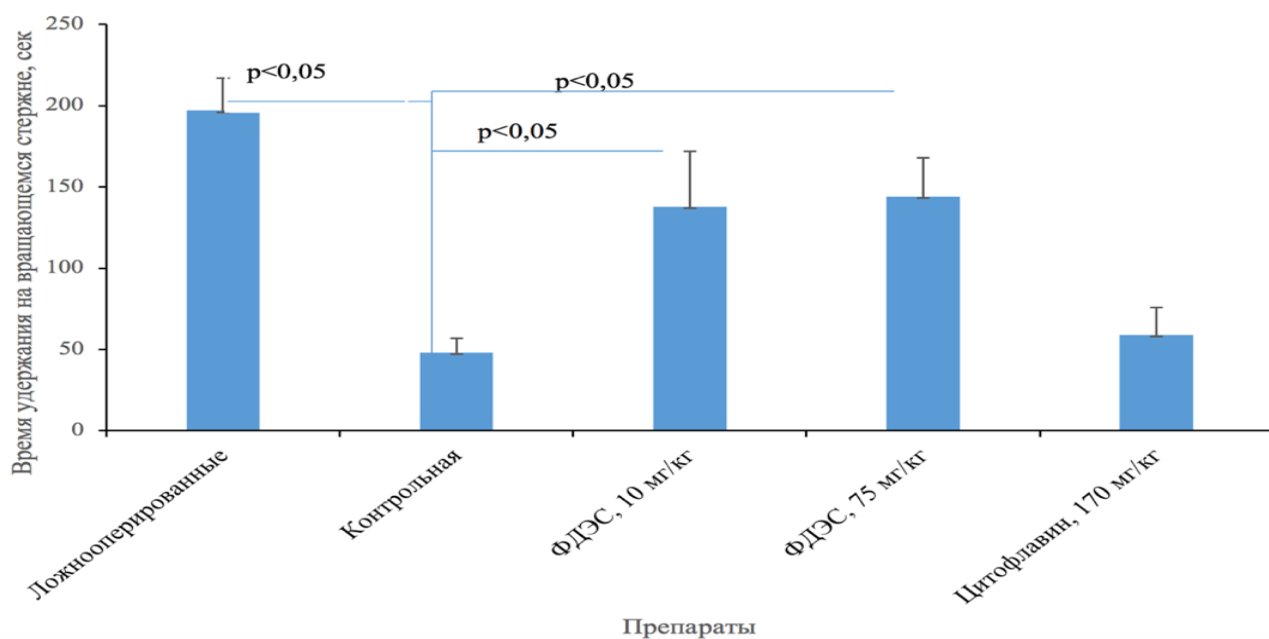


Рисунок 2. – Влияние исследуемых препаратов на координацию движений у животных после ОСМА (тест Ротарод, 21 сутки)

При проведении теста пространственной ориентации и памяти животных «Лабиринт Барнес» в контрольной группе животных выявлено как увеличение количества ошибок с 0,8 до 4,6 усл. ед., так и времени выполнения теста с 32 до 79 с, что свидетельствует о чувствительности данной методики к посттравматическим нарушениям ЦНС у животных в остром периоде. В группах животных, получавших ФДЭС в дозах 10 или 75 мг/кг, на 5 сутки после ишемии наблюдали достоверное уменьшение времени, требуемое для нахождения норки, на 35-40% ($p < 0,05$) по сравнению с группой контроля. Индексы защиты для ФДЭС в дозе 10 мг был равен 0,68, для дозы 75 мг/кг – 0,61. Кроме того, животные из этих групп допускали меньше ошибок при выполнении данного теста.

На 12 день после ишемии во всех группах были отмечены достоверные позитивные изменения времени, требуемого для нахождения норки в группах животных, а также снижение ошибок, по сравнению с 5 сутками после перевязки сонных артерий. Наилучший результат по влиянию на когнитивные функции на 12 сутки продемонстрировало исследуемое вещество в дозе 10 мг/кг, которое способствовало полной нормализации показателя ошибочных действий. Для цитофлавина в дозе 170 мг/кг защитное действие на 5 и 12 сутки после перевязки сонных артерий в тесте «Лабиринт Барнс» не определялось.

Изучение влияния ФДЭС на модели фокальной черепно-мозговой травмы. В фоновом периоде и по окончании восстановительного периода (21 день) у животных с фокальной черепно-мозговой травмой проводили тесты «Сужающаяся дорожка» и «Цилиндр». Оценка неврологического дефицита проводилась с помощью теста «Стимулирование конечностей»

через 24 часа после операции и далее на 3-и, 7-е, 14-е и 21-е сутки. Также оценивали объем травматического поражения головного мозга.

Тест «Стимулирование конечностей» выявил снижение неврологического дефицита после ЧМТ у животных, получавших ФДЭС. Изучаемый препарат в дозе 10 мг/кг и 75 мг/кг в первые сутки после травмы мозга уменьшал неврологический дефицит у крыс в 3 раза и 3,1 раза соответственно по сравнению с группой контроля. Тенденция к снижению неврологического дефицита сохранялась у данных групп животных до конца эксперимента в равной степени для обеих доз препарата: на 3-й день - в 1,6 раза и 1,5 раза соответственно, на 7-й день - в 1,9 раза и 1,86, и на 14-й день в 1,6 раза и 1,56 раза соответственно по сравнению с группой контроля (Таблица 5). К 21-му дню ФДЭС практически полностью устранял неврологический дефицит у крыс, развивающийся после фокальной ЧМТ. По эффективности исследуемое вещество было сопоставимо с препаратами сравнения пирацетамом и цитофлавином.

Таблица 5. – Влияние ФДЭС на сенсомоторные функции животных, выживших после фокальной черепно-мозговой травмы, в тесте «Стимулирование конечностей»

Группа	Продолжительность лечения				
	1-й день	3-й день	7-й день	14-й день	21-й день
Ложнооперированные	14,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0	14,0±0,0
Контроль	2,8±0,4*	6,2±0,7*	6,4±0,5*	8,3±0,5*	10,5±0,5*
ФДЭС 10 мг/кг	6,3±0,4 ^{*,**}	9,8±0,5 ^{*,**}	11,9±0,5 ^{*,**}	13,5±0,3 ^{*,**}	13,7±0,2 ^{*,**}
ФДЭС 75 мг/кг	6,4±0,4 ^{*,**}	9,2±0,5 ^{*,**}	11,8±0,5 ^{*,**}	12,9±0,4 ^{*,**}	13,0±0,3 ^{*,**}
Пирацетам 900 мг/кг	5,4±0,5 ^{*,**}	8,5±1,2 ^{*,**}	10,9±0,3 ^{*,**}	13,0±0,3 ^{*,**}	13,1±0,3 ^{*,**}
Цитофлавин 170 мг/кг	5,2±0,5 ^{*,**}	9,2±0,5 ^{*,**}	11,8±0,4 ^{*,**}	13,3±0,3 ^{*,**}	13,5±0,2 ^{*,**}

Примечание: * - статистически значимое отличие от группы ложнооперированных животных ($p < 0,05$), ** - статистически значимое отличие от контрольной группы ($p < 0,05$), метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок.

Степень неврологического дефицита на конкретный момент времени восстановительного периода определяется как отношение разности между фактическим значением показателя сенсомоторных функций в тесте «Стимулирование конечностей» и максимально возможного значения этого показателя (равно 14), к этому значению и выражается в процентах (Рисунок 3). Снижение неврологического дефицита отражает процесс реабилитации после травмы мозга, скорость которого может быть охарактеризована как тангенс угла наклона регрессионной кривой восстановления сенсомоторных функций животных.

Анализ рисунка 3 показывает, что наиболее выраженное различие исследуемого соединения и препаратов сравнения от контрольной (нелеченной) группы животных определяется в первые сутки после травмы, что связано с нейропротекторным действием препаратов при их введении за 30 минут до нанесения дозированной ЧМТ.

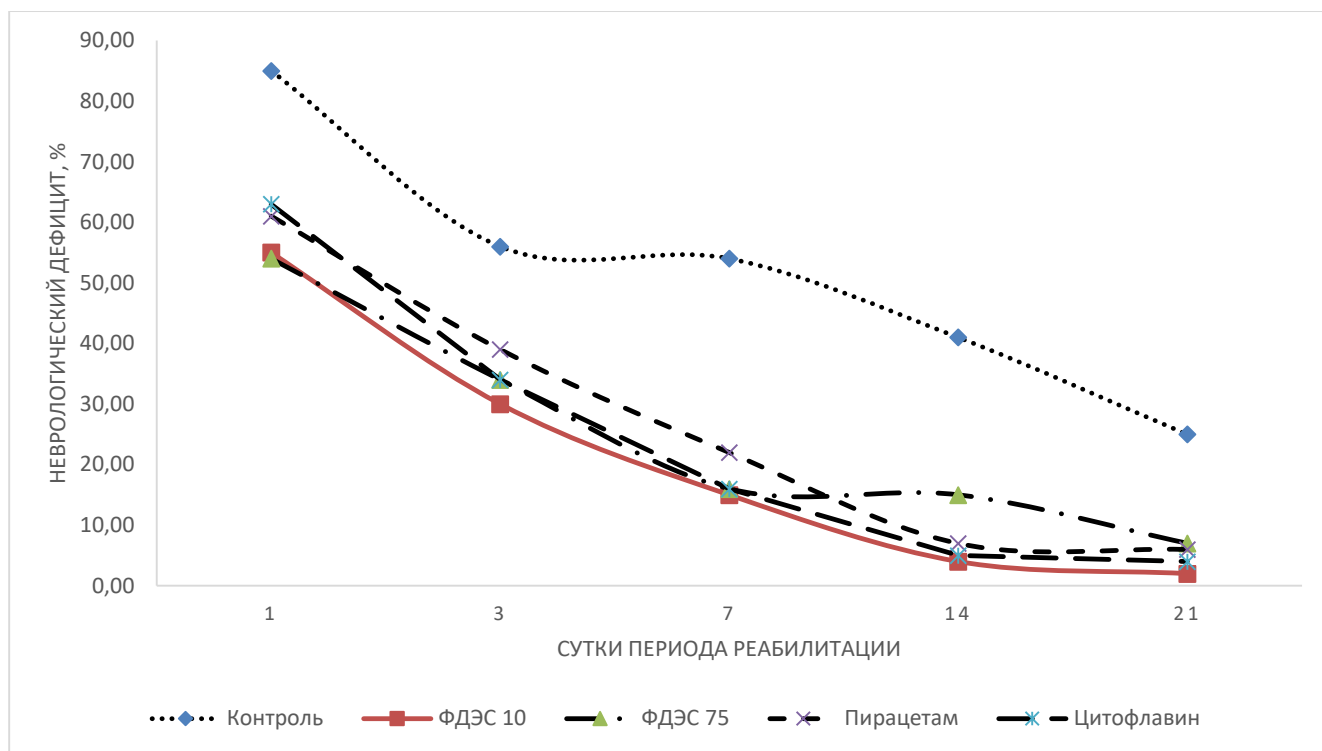


Рисунок 3. – Динамика неврологического дефицита в периоде реабилитации после дозированной фокальной черепно-мозговой травмы

Примерно треть (35-36%) возникающего после ЧМТ неврологического дефицита может быть компенсировано профилактическим однократным введением ФДЭС вне зависимости от дозы препарата. Последующее введение исследуемых препаратов, как следует из рисунка 3, поддерживало достигнутое нейропротекторное действие (меньшая степень повреждения мозга при дозированной травме), но не оказывало стимулирующего влияния на процессы восстановления сенсомоторных функций конечностей животных. Это заключение подтверждается расчетом регрессионных функций, значения углового коэффициента которых находится в диапазоне от 0,29 до 0,36 балл/сутки и не отличается от такового для группы контроля (0,35 балл/сутки). Нейропротекторная активность препаратов сравнения была несколько ниже (26-28%).

Количественная оценка этого нейропротекторного действия может быть выполнена путем расчета индекса защиты (ИЗ), показывающего, какую часть изменений, возникающих от неблагоприятного воздействия в контрольной группе, компенсирует введение исследуемого препарата. Значения этого показателя, определенного по показателю сенсомоторной функции конечностей животных на 1 сутки реабилитационного периода для исследуемых соединений (Рисунок 4).

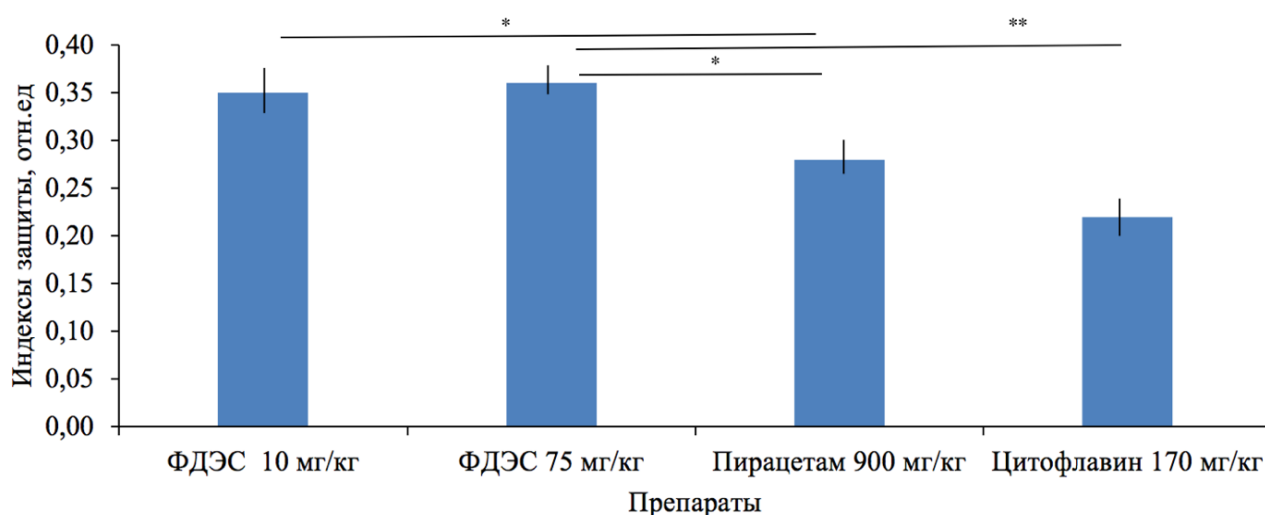


Рисунок 4. – Индексы защиты исследуемых соединений при профилактическом введении за 30 мин до нанесения дозированной черепно-мозговой травмы лабораторным животным.

(отличия от препарата сравнения статистически значимы, * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,005$, метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок).

В тесте «Цилиндр» на 21-й день после ЧМТ у крыс всех групп использование левой лапы (является контролатеральной поврежденному полушарию головного мозга) снижалось. У животных контрольной группы оно снижалось на 30%, что является статистически достоверным признаком фокального повреждения мозга при ЧМТ. У животных, которым вводили ФДЭС в дозе 10 мг/кг и 75 мг/кг на фоне ишемического повреждения головного мозга, использование левой лапы было возможным в 31,5% попыток, что на 15% выше, чем в группе контрольных (не леченных) животных. При этом степень снижения по сравнению с исходным уровнем свидетельствует о более полном восстановлении моторной функции. При расчете индекса защиты (ИЗ) по показателю использования конечности контролатеральной зоны фокальной ЧМТ, было установлено, что для ФДЭС в дозе 10 мг/кг он был равен 0,50 (т. е. препарат при курсовом приеме через 21 день восстановительного периода в 2 раза снижал негативное влияние травмы на этот показатель). Для ФДЭС в дозе 75 мг/кг и препаратов сравнения пирацетама и цитофлавина этот эффект был выражен слабее. Так, для ФДЭС в дозе 75 мг/кг ИЗ=0,13, для пирацетама в дозе 900 мг/кг ИЗ=0,27, для цитофлавина в дозе 170 мг/кг ИЗ=0,40. Установлено, что для ФДЭС (доза 10 мг/кг) и цитофлавина (доза 170 мг/кг) защитное действие было статистически достоверным.

Признаком посттравматического сенсомоторного дефицита, проявляющегося дискоординацией постановки лап животных при ходьбе в тесте «Сужающаяся дорожка», является увеличение доли соскальзывания контролатеральных по отношению к очагу поражения мозга лап крысы с опоры. В нашем исследовании, выполненном на 21 сутки восстановительного

периода, продольная асимметрия (разница между координаторной функцией передних и задних лап) не выявлялась, что позволило объединить данные, полученные для передних и задних лап в единый показатель сенсомоторного дефицита, который выражался в процентах от общего количества выполненных животными движений лапами. Установлено, что в тесте «Сужающаяся дорожка» спустя 21 день после фокального травматического поражения головного мозга у крыс выявляется отчетливый сенсомоторный дефицит, проявляющийся увеличением на 30% доли ошибок в постановке лап травмированных животных. Анализ индексов защиты показывает, что все исследуемые соединения при курсовом применении обладают близкими защитными свойствами относительно этого показателя, причем защитное действие ФДЭС в дозе 10 мг/кг и цитофлавина в дозе 170 мг/кг было статистически значимым.

Таким образом, по эффективности ФДЭС в тестах сенсомоторного дефицита «Стимулирование конечностей», «Цилиндр», «Сужающаяся дорожка» был сопоставим с препаратами сравнения пираретамом и цитофлавином, а иногда и превосходил их.

Курсовое (21 день) введение ФДЭС в дозе 10 и 75 мг/кг вызывало статистически значимое уменьшение очага поражения головного мозга у крыс в 1,54 раза ($p < 0,05$) и 1,38 раза ($p < 0,05$) соответственно, по сравнению с животными контрольной группы. Цитофлавин и пираретам данный показатель уменьшали в 1,3 раза ($p < 0,05$) и 1,2 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с контролем.

Глава 5. Влияние ФДЭС на поведение и когнитивные функции лабораторных животных

Влияние ФДЭС на спонтанное поведение лабораторных животных. Однократное пероральное применение препарата ФДЭС в дозе 10 мг/кг проявлялось в сравнении с плацебо-контролем повышением общей двигательной и поисково-исследовательской активности в тесте «Открытое поле» (коэффициент детерминации $D=0,20$, $p=0,03$) или меньшим ее угнетением в тесте приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ), менее выраженным ростом показателя эмоционального реагирования (коэффициент детерминации $D=0,14$, $p=0,09$). Введение препарата ФДЭС в более высокой дозе (75 мг/кг) проявлялось снижением стрессовой реактивности организма животных (снижение эмоционального реагирования, вегетативной лабильности, менее выраженное стрессовое угнетение ЦНС). 2-х недельное курсовое применение препарата ФДЭС практически не оказывало влияние на поведение животных в тестах ОП и ПКЛ.

В условиях ишемии головного мозга (перевязки общих сонных артерий) у лабораторных животных в тесте «Открытое поле» (таблица 6) было установлено, что препарат сравнения цитофлавин в дозе 170 мг/кг не проявил защитного действия в отношении эмоциональной лабильности, тогда как ФДЭС в дозе 10 мг/кг не только был более активен в отношении показателей эмоциональной сферы, но и оказывал защитное действие в отношении собственно поведенческой активности (ОДА, ПИА).

Таблица 6. – Влияние исследуемых препаратов на поведение крыс с ишемией головного мозга в тесте «Открытое поле», через 21 день

Группа, доза	ОДА, у. е.	ПИА, у. е.	Аг, у. е.	ЭЛ, у. е.
Ложнооперированные	41,6±7,3	9,9±0,4*	1,6±0,5	2,0±0,3
Контроль	9,3±1,3*	2,3±0,5*	5,3±0,9*	5,5±0,9*
ФДЭС, 10 мг/кг	28,5±6,9**	6,3±0,7**	2,0±0,5**	3,0±0,5**
ФДЭС, 75 мг/кг	18,6±5,8**	3,6±0,4**	2,4±0,7**	3,7±0,7**
Цитофлавин 170 мг/кг	20,3±2,0**	3,7±0,9*	4,3±0,9*	3,6±0,7**

Примечание: * - отличия от соответствующего исходного показателя статистически значимы, $p < 0,05$; ** - отличия от соответствующего показателя контрольной группы статистически значимы, $p < 0,05$, метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок; Обозначения: ОДА - общая двигательная активность; ПИА - поисково-исследовательская активность; Аг - агрессивность, ЭЛ - эмоциональная лабильность.

Влияние ФДЭС на когнитивные функции. Исследования, отраженные в данном подразделе, были проведены совместно с И.А. Титович. Результаты исследования влияния ФДЭС на обучение животных в тесте Т-образного лабиринта представлены в таблице 7.

Таблица 7. – Влияние ФДЭС на когнитивные функции в тесте «Т-лабиринт»

Группа	Количество животных, сохранившие навык выбора «правильного» рукава после окончания обучения, %		
	1 –й день	5-й день	10-й день
Контроль	0,0	0,0	0,0
Пирацетам 900 мг/кг	28,5 *	28,5 *	0,0
ФДЭС, 10 мг/кг	50,0 *	62,5 *	50,0 *
ФДЭС, 75 мг/кг	87,5 *	87,5 *	50,0 *

Примечание: * статистически значимое отличие от соответствующего показателя контрольной группы, $p < 0,05$, метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок.

Установлено, что при отсроченном тестировании 100% животных контрольной группы не сохранили навык выбора «правильного рукава», то есть тест «Т-лабиринт» может рассматриваться как тест оперативной памяти, при проведении которого у животных не фиксируется длительный памятный след. Пирацетам в условиях однократного введения оказывал слабое стимулирующее действие на процессы обучения животных и закрепления в памяти результатов обучения. Эффективность ФДЭС в исследованных дозах существенно повышала эффективность обучения, запоминания и воспроизведения информации у животных. При этом выявленный эффект является дозозависимым (прием более высокой дозы сопровождается более высоким эффектом), но не пропорциональным так, как увеличение дозы ФДЭС в 7,5 раз вело к усилению эффекта на 25-35% с нивелированием разницы к 10 дню.

В тесте «Экстраполяционное избегания» изучалась способность исследуемых препаратов при курсовом применении (14 дней) сохранять памятный след о способе избегания

водной среды. В ходе проведенного исследования было установлено, что в контрольной группе животных латентное время решения экстраполяционной задачи (подныривания) увеличивалось в 1,7 раза; количество крыс, решивших экстраполяционную задачу, уменьшалось на 10% по сравнению с исходным уровнем (таблица 8).

Таблица 8. – Влияние 14-дневного перорального введения ФДЭС на формирование и воспроизведение памятного следа в тесте «экстраполяционное избавление» (n=10)

Группа, наблюдений	число	Латентный период подныривания, М ± m, мин		Доля животных, решивших экстраполяционную задачу, %	
		После обучения	Через 14 дней	Исходно	Через 14 дней
Контроль		1,28 ± 0,17	1,82 ± 0,20	70	60
Пирацетам 900 мг/кг		0,57 ± 0,18 *	0,27 ± 0,03 *	70	90
ФДЭС 10 мг/кг		0,58 ± 0,18 *	0,35 ± 0,08 *	70	90
ФДЭС 75 мг/кг		0,52 ± 0,15 *	0,18 ± 0,05 *	70	80

Примечание: * статистически значимое отличие от соответствующего показателя контрольной группы, $p < 0,05$, метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок.

В группе животных, которым вводили эталонный ноотропный препарат пирацетам, после завершения обучения наблюдали достоверное улучшение когнитивных функций - снижение времени подныривания в 2,3 раза, а спустя 2 недели приема препарата - и повышение на 20% количества крыс, которые смогли выполнить экстраполяционную задачу, что свидетельствует о закреплении алгоритма решения задачи и его сохранения во времени.

При применении ФДЭС в дозах 10 и 75 мг/кг повышение когнитивных функций сопоставимо с действием пирацетама, но реализуется в существенно более низкой дозе, т. е. соединение обладает более высокой активностью.

Антиамнестическое действие на модели скополаминовой амнезии. Исследование выполнено совместно с И.А. Титович, Д. С. Лисицким, А. В. Бельской, М. В. Михайловой, Ю. И. Сысоевым. В тесте УРПИ среди интактных животных через 2 часа после обучения памятный след сохранили 83% животных. Скополамин значимо ухудшал этот показатель, снижая число обученных крыс до 16% (таблица 9). Под влиянием пирацетама происходило нивелирование отрицательного действия холиноблокатора и количество обученных животных через 2 часа составило 83%.

ФДЭС в обеих дозах показал сопоставимый с препаратом сравнения эффект, увеличивая число крыс, сохранивших навык через 2 ч до 75% (10 мг/кг и 75 мг/кг).

Через 24 часа среди интактных животных после обучения памятный след сохранили 75% животных. Скополамин значимо ухудшал этот показатель, снижая число обученных крыс до 41%. Под влиянием пирацетама количество обученных животных через 24 часа составило 100%. ФДЭС в обеих дозах показал сопоставимый с препаратом сравнения эффект, увеличивая число крыс, сохранивших навык через 24 ч до 91% (10 мг/кг) и 83% (75 мг/кг) соответственно.

Таблица 9. – Антиамнестический эффект ФДЭС на модели амнезии, вызванной скополомином (воспроизведение УРПИ через 2 часа и 24 часа после обучения)

Группа	Число наблюдений, n	Латентный период, М ± m, мин		Доля животных, воспроизводящих памятный след, %		ИААД, ед	
		Через 2 ч	Через 24 ч	Через 2 ч	Через 24 ч	Через 2 ч	Через 24 ч
Интактные	12	1,80 ± 0,13	1,75 ± 0,15	83,0	75,0	-	-
Скополамин	12	0,67 ± 0,20	0,95 ± 0,22	16,0	41,0	0	0
Пирацетам 900 мг/кг + скополамин	12	1,70 ± 0,18 *	1,85 ± 0,17 *	83,0 *	100,0 *	0,92*	1,12*
ФДЭС 10 мг/кг + скополамин	12	1,58 ± 0,22 *	1,90 ± 0,12 *	75,0 *	91,0 *	0,81 *	1,18*
ФДЭС 75 мг/кг + скополамин	12	1,57 ± 0,22 *	1,75 ± 0,17 *	75,0 *	83,0 *	0,80 *	1,00*

Примечание: ИААД - индекс антиамнестического действия, * - достоверность отличий от контрольных животных со скополомином, метод точной вероятности Фишера для несвязанных выборок, $p \leq 0,05$

Глава 6. Механизм действия. Исследования, представленные в данной главе, выполнялись совместно с Сыроевым Ю.И., Попугаевой Е.А., Чернюк Д.П., Титович И.А., Загладкиной Е.В.

В первичной гиппокампальной культуре, полученной из новорожденных мышей дикого типа, *in vitro* исследовали действие ФДЭС на кальциевый вход в дендритные шипики и в сому нейронов [Попугаева Е.А. 2021]. Регистрируемые кальциевые токи могли быть отнесены к депоуправляемым. Полученные результаты приведены на рисунке (Рисунок 5).

Было обнаружено, что синтетический амилоид Аβета в 2,2 раза вызывал снижение амплитуды нДУВК по сравнению с группой контроля Известный из литературных источников активатор постсинаптических нДУВК гиперфорин в 2,8 раза ($p < 0,0005$) повышал амплитуду нДУВК в группе нейронов с Аβета. Результаты исследования свидетельствуют о том, что ФДЭС является положительным регулятором нДУВК и статистически значимо повышает в 2 раза ($p < 0,0005$) амплитуду нДУВК в группе нейронов с Аβета по сравнению с группой синтетического амилоида Аβета.

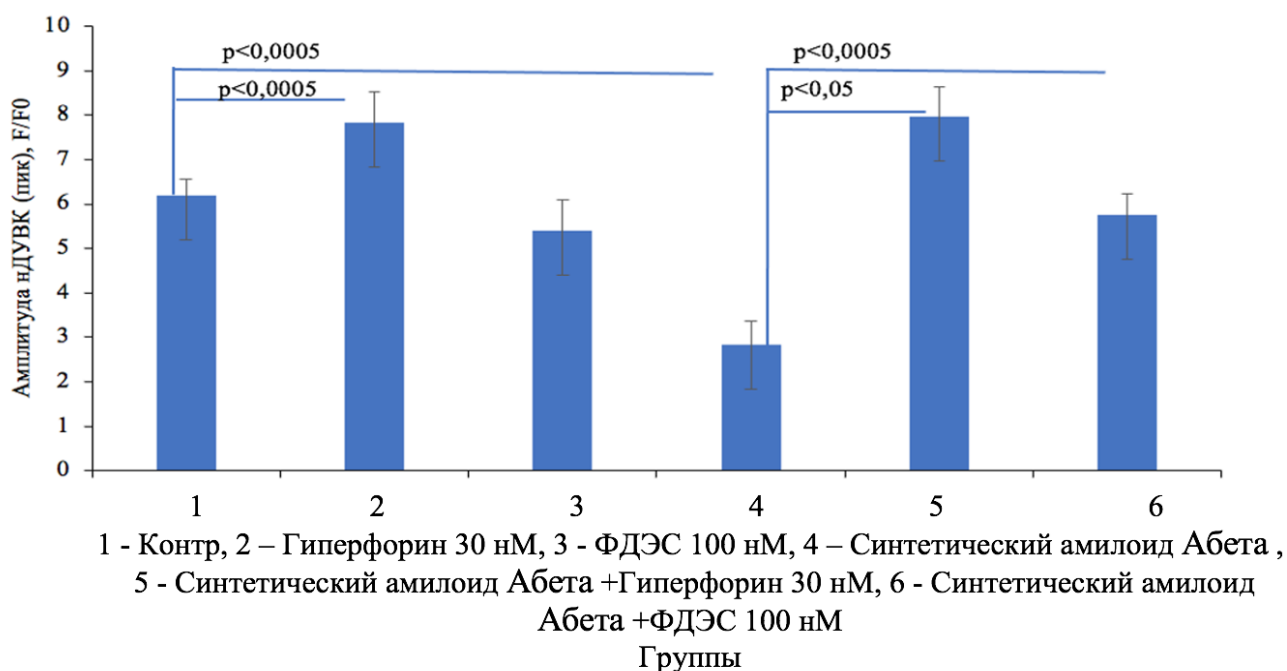


Рисунок 5. – Исследование влияния ФДЭС на постсинаптический нейрональный деполуправляемый вход кальция в условиях амилоидной синаптотоксичности

В отдельной серии экспериментов было установлено, что выключение экспрессии гена TRPC6 в культуре гиппокампа мыши приводило к значительному в 2,3 раза ($p < 0,0005$) снижению амплитуды нДУВК с $6,22 \pm 0,51$ у.е. до $2,7 \pm 0,30$ у.е. для контрольной группы. Гиперфорин (доза 30 нМ) не смог восстановить амплитуду нДУВК в отсутствие гена TRPC6 до контрольного уровня, хотя и вызвал статистически значимое повышение в 1,54 раза ($p < 0,005$) амплитуды нДУВК. Субстанция ФДЭС не проявила способности активировать TRPC6 в отсутствие гена TRPC6, что позволяет считать это соединение специфическим активатором TRPC6-зависимого TRPC.

Установлено, что на модели амилоидной нейротоксичности синтетический аналог амилоида (Абета) вызывает резкое (в 2,5 раза, $p < 0,001$) сокращение доли активных грибовидных шипиков, достоверно (в 1,6 раза, $p < 0,001$) увеличивает количество тонких шипиков. Гиперфорин в концентрации 300 нМ способствует восстановлению в 2,8 раза ($p < 0,0005$) доли грибовидных шипиков, (Рисунки 6, 7), снижал в 1,8 раза ($p < 0,0005$) процент тонких шипиков и в 1,5 раза ($p < 0,05$) - пеньковых шипиков, по сравнению с группой нейронов, выдержанных в присутствии Абета.

Установлено, что ФДЭС (100 нМ) восстанавливает в 2,2 раза ($p < 0,0005$) процент грибовидных шипиков по сравнению с группой Абета. Аналогично гиперфорину, изучаемое вещество достоверно снижает процент тонких и пеньковых шипиков в 1,3 раза ($p < 0,05$) и 1,6 раза ($p < 0,05$) соответственно по сравнению с группой Абета. Полученные данные свидетельствуют о

том, что ФДЭС способен защитить грибовидные шипики от амилоидной токсичности и его рабочая концентрация лежит в наномолярном диапазоне.

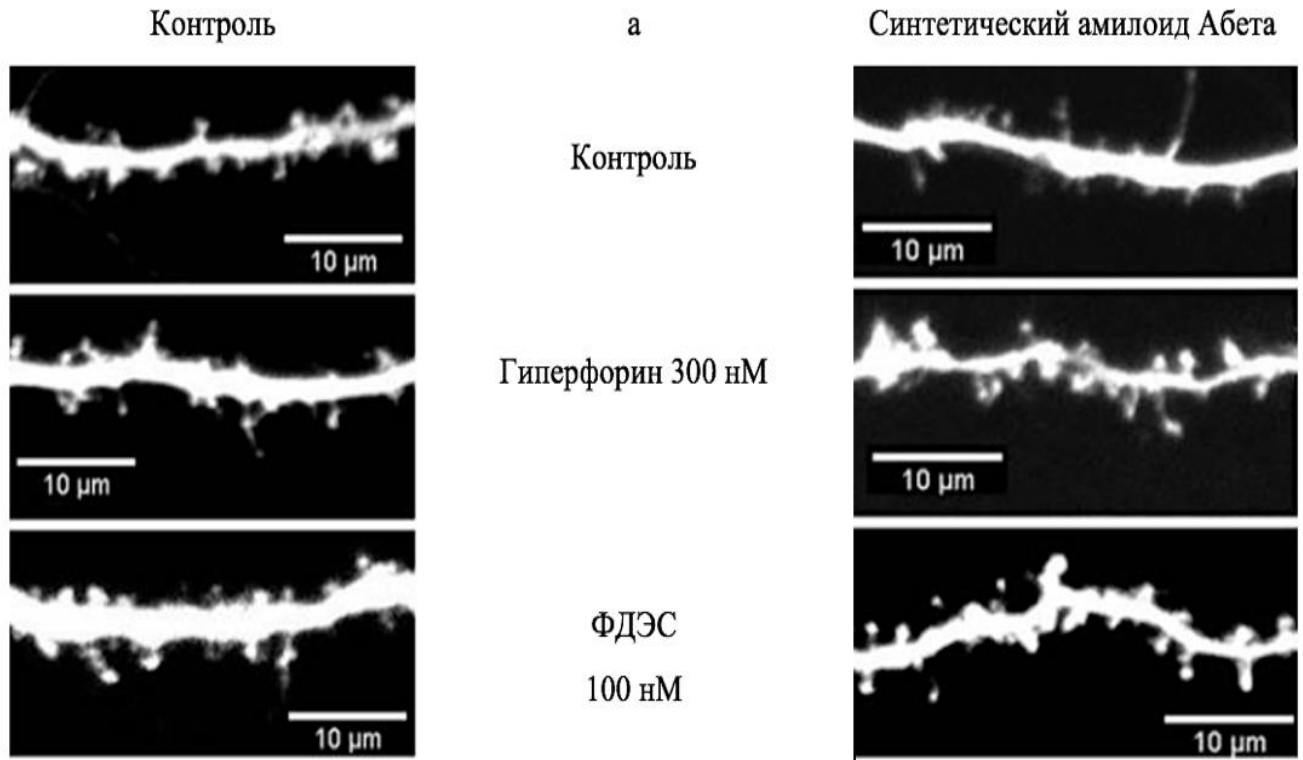


Рисунок 6. – Влияние ФДЭС на дендритные шипики нейронов в условиях амилоидной токсичности в концентрации 100 нМ. Микрофотографии каждой исследованной группы гиппокампальных нейронов, трансфицированных плазмидой TD-Tomato.

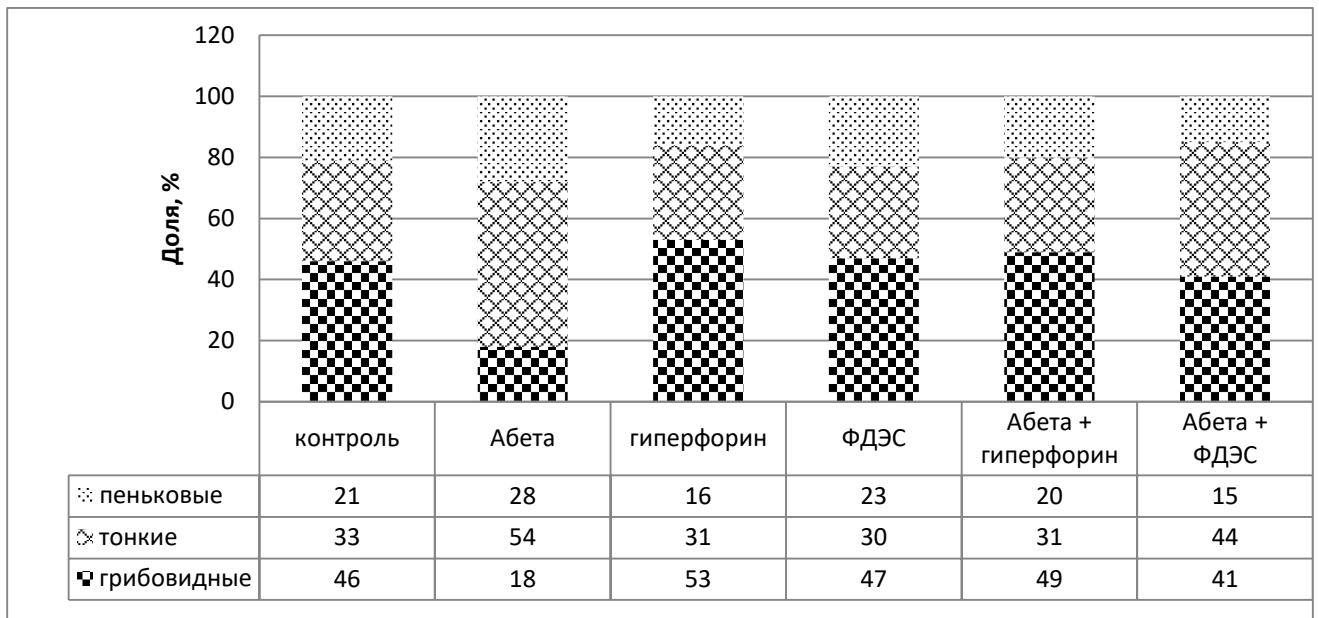


Рисунок 7. – Количественный анализ морфологии дендритных шипиков (программное обеспечение NeuronStudio).

Таким образом, в ходе проведенного исследования было установлено, что механизм нейропротекторного действия ФДЭС связан не только с активацией нейронального депо-

управляемого входа кальция в постсинаптические дендритные шипики, но и со способностью соединения защищать грибовидные шипики в условиях амилоидной синаптотоксичности. Более того, ФДЭС способен восстановить нДУВК в условиях амилоидной синаптотоксичности до уровня контрольной группы.

Совместно с А.В. Дмитриевым и В.В. Поройковым для других видов биологической активности ФДЭС был выполнен компьютерный прогноз взаимодействия ФДЭС с молекулярными мишенями с использованием новой версии программы PASS Targets 21, обучающая выборка которой составлена на основе информации, извлеченной из базы данных ChEMBL, версия 21. В качестве наиболее вероятных видов активности ФДЭС были предсказаны (в скобках – вероятность наличия соответствующей активности): ингибитор транскрипционного фактора NF kappa B1 (83,5%), ингибитор мембранной проницаемости (85,4%), агонист предсердного натрийуретического пептида (87,7%), антагонист фибриногеновых рецепторов тромбоцитов (90,9%), антигипоксанта (86,2%), агонист инсулиновых рецепторов (81,9%).

Глава 7. Фармакокинетика. Исследования, результаты которых отражены в данной главе, были выполнены совместно с Н.Ю. Сипкиной и Д. Ю. Ивкин.

Количественное определение ФДЭС в биосредах (плазма крови, моча) осуществлялось в системе высокоэффективной жидкостной хроматографии по методике, отработанной в ходе предварительных исследований. При этом параметры точность и прецизионность, повторяемость метода и его воспроизводимость были валидированы. Установлено, калибровочные кривые носят линейный характер, с коэффициентом аппроксимации (R^2), равным 0,9979. Внутрисуточные процентные колебания не превышали 20% в диапазонах концентраций от 1–100 мкг/мл, а суточные - не превышали 15% (Таблица 10). При исследовании стандартных растворов соединения после 72 часов хранения при комнатной температуре, а также при изучении влияния процессов замораживания и таяния средние абсолютные процентные колебания находились в одних и тех же пределах, что свидетельствует о стабильности исследуемого вещества.

Таблица 10 – Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения ФДЭС

Параметр/Единицы измерения	Значение
Внутрисуточные колебания (повторяемость), %	≤ 20
Междусуточные колебания (воспроизводимость), %	≤ 15
Точность (ср. по концентрациям), %	98,78
Порог количественного определения, нг/мл	1000
Предел обнаружения, нг/мл	10
Средняя ошибка измерения, %	2,18

С помощью однофакторного дисперсионного анализа не было установлено влияние значимости факторов «исследователь», «повторное определение», «достоверности различий

между рядами заданных и измеренных значений». Следовательно, согласно результатам, полученным в ходе валидационных испытаний, предлагаемая методика, удовлетворяет установленным требованиям и является пригодной для использования в аналитической лаборатории. Было установлено, что фармакокинетическая кривая зависимости «время-концентрация» при однократном пероральном введении крысам ФДЭС имеет фазу увеличения концентрации (фазу абсорбции), во время которой через 0,5 ч после введения достигается максимальная концентрация в плазме крови. Вторая часть фармакокинетической кривой характеризует выведение соединения ФДЭС и показывает, что распределение в организме неравномерно (Рисунок 8). Кажущийся объем распределения превышает реальный объем тела крысы в 24,1 раза, что указывает на депонирование и неравномерное распределение в органах и тканях. Биодоступность при пероральном приеме составила 25%.

В моче ФДЭС начинает определяться уже в 1 час исследования, достигая максимума ко 2 часу и определяется в моче более 24 часов (Рисунок 9). При этом более 90% экскретируемого соединения выделяется в первые 24 часа после введения.

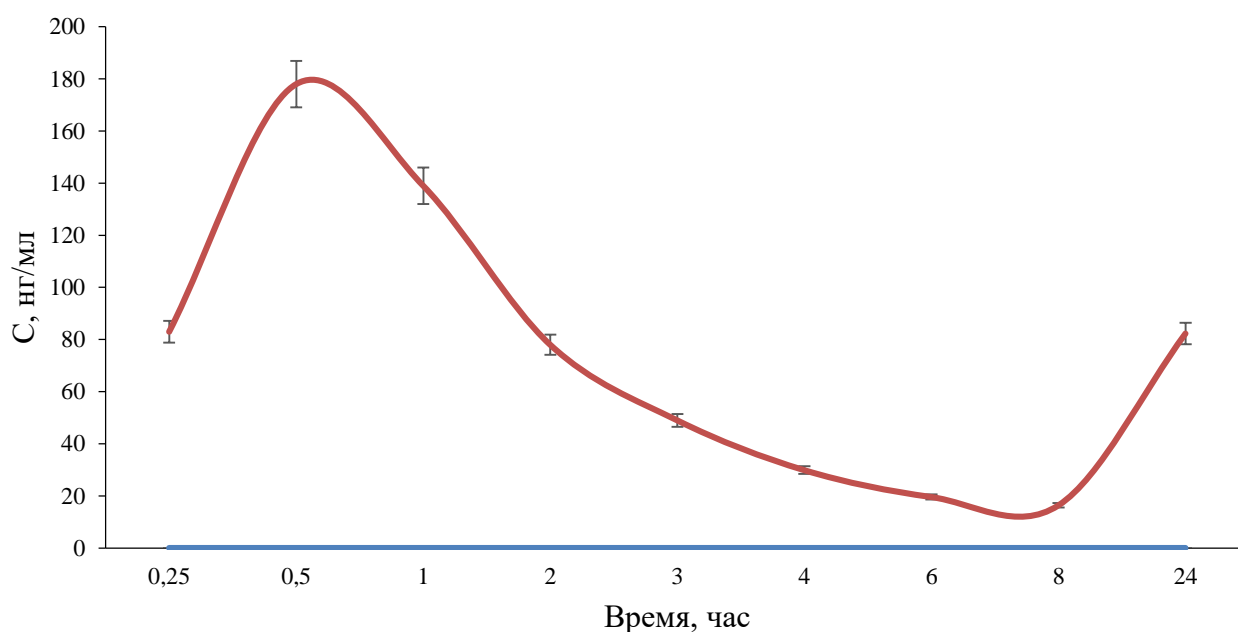


Рисунок 8 – Фармакокинетическая кривая зависимости «время-концентрация» при однократном пероральном введении крысам ФДЭС в дозе 5 мг/кг

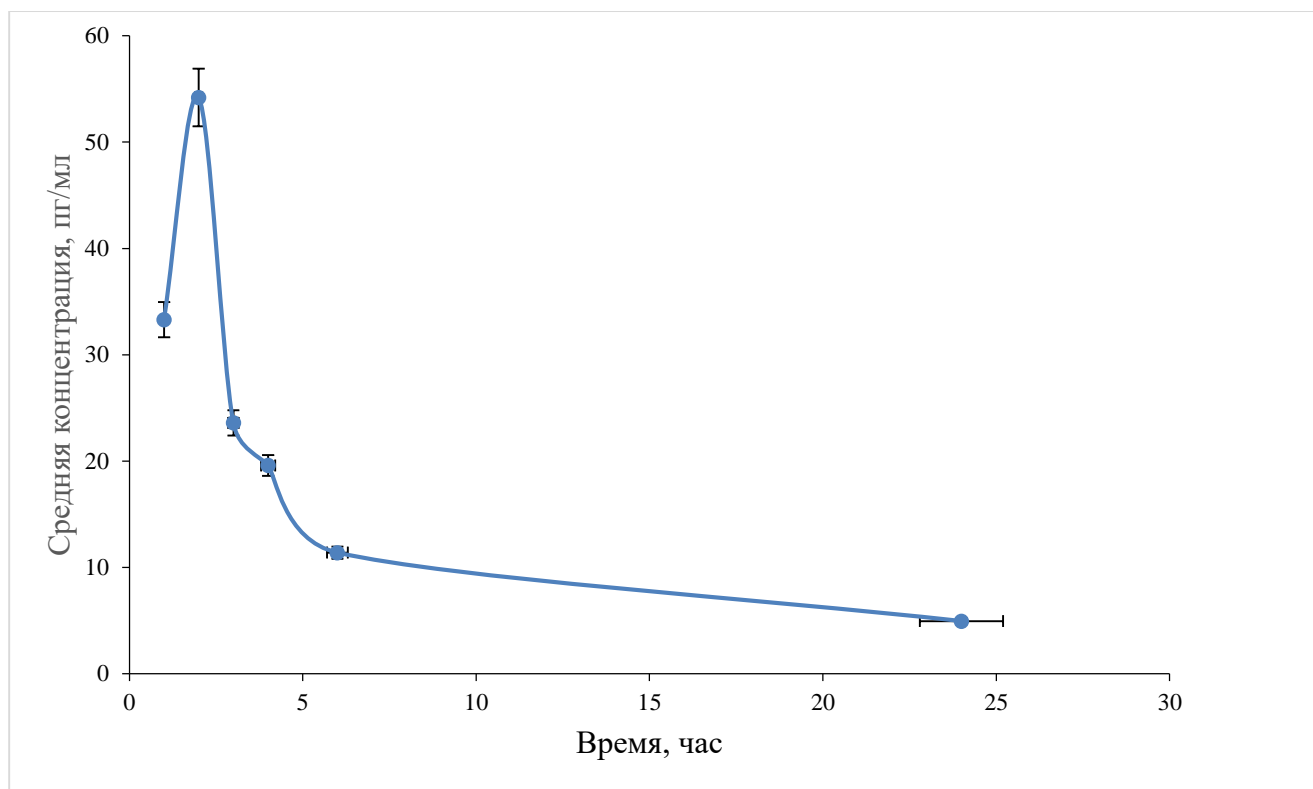


Рисунок 9 – Почечная экскреция соединения ФДЭС при пероральном введении крысам в дозе 5 мг/кг

С помощью программы «PALLAS 3.00» выполнен компьютерный прогноз возможных метаболитов соединения ФДЭС, определено 13 структур метаболитов. В результате прогноза метаболизма можно предполагать, что ФДЭС может быть субстратом целого ряда ферментов цитохрома P450, а также сульфотрансферазы. При этом реакция, в результате которой может быть получен продукт 12 (О-сульфатирование) потенциально может быть катализирована сульфотрансферазой, реакция глюкуронирования может быть катализирована УДФ-глюкуронилтрансферазой. Остальные 11 метаболитов могут образовываться под воздействием цитохрома P450.

Основным метаболитом ФДЭС можно считать продукт окисления и гидроксирования катионной части молекулы, который присутствует на всех масс-хроматограммах. Поскольку одновременно окисление и гидроксирование субстратов может идти в печени при участии цитохромов семейства P450, можно предположить участие этих ферментов в фактической биотрансформации этого соединения.

Глава 8. Разработка технологии производства таблеток ФДЭС. Исследования, результаты которых представлены в данной главе, выполнялись совместно с О.А. Терентьевой.

Субстанция ФДЭС обладает следующими физико-химическими свойствами: белый аморфный порошок с температурой плавления от 97 до 100°C, очень хорошо растворимый в воде и этиловом спирте, практически нерастворимый в этилацетате, рН 1%-ного водного раствора

исследуемого вещества находится в диапазоне от 3,0 до 4,0 [Юсковец В.Н. и др. 2016], учет которых необходим при разработке ГЛФ препарата:

Контроль качества субстанции осуществлялся в соответствии с требованиями ГФIV с применением ранее разработанной методики ВЭЖХ.

Субстанция ФДЭС является полидисперсным аморфным порошком с преимущественно равносторонними частицами и их более крупными агломератами. Поверхность частиц шероховатая, неоднородная, а форма краев сглажена (Рисунок 10).

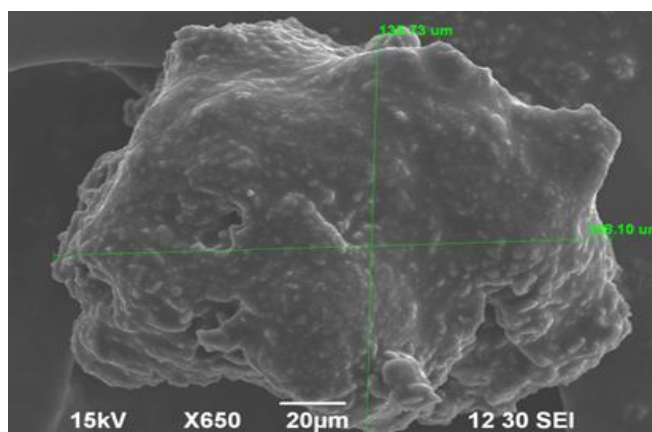


Рисунок 10 – Микрофотография частиц порошка ФДЭС

Размер частиц основной фракции порошка ФДЭС составляет 1,0-0,5 мм, что является приемлемым для смешения с порошкообразными материалами со сходным гранулометрическим составом и последующего прессования.

Кроме того, ФДЭС очень легко растворяется в воде, имеет удовлетворительную вибросыпучесть и насыпную массу, однако плохо высыпается из канала диаметром 10 мм, а при прямом контакте с воздухом окружающей средой увеличивается её слёживаемость и комкование.

В связи с чем, для получения таблеток наиболее оптимальным является метод влажной грануляции.

Изучены технологические свойства субстанции ФДЭС и массы для таблетирования, определены основные фармацевтико-технологические показатели качества лабораторных образцов таблеток. Установлено, что масса для таблетирования, содержащая крахмал картофельный, лактозы моногидрат и кальция гидрофосфата дигидрат, обеспечивает их надлежащие технологические показатели качества.

Доза действующего вещества таблетки составляла 60 мг, а масса таблетки равна 450 мг.

На основе проведенного фармакопейного анализа лабораторных таблеток были определены их основные характеристики лекарственной формы: таблетки белого цвета, гладкие, без вкраплений; диаметр таблетки $-10,0 \pm 0,1$ мм; прочность на истираемость $-99,99 \pm 0,03\%$; прочность на раздавливание $-156,9 \pm 7,9$ н; распадаемость $6,0 \pm 0,3$ мин; прирост массы через 24 ч,

$\varphi=80\%$; $t=25^{\circ}\text{C}$); $9,23\pm 0,71\%$, прирост массы через 48 ч, ($t=25^{\circ}\text{C}$, $\varphi=50\%$) $1,73\pm 0,11\%$. Составлена технологическая схема лабораторного производства таблеток (Рисунок 11).

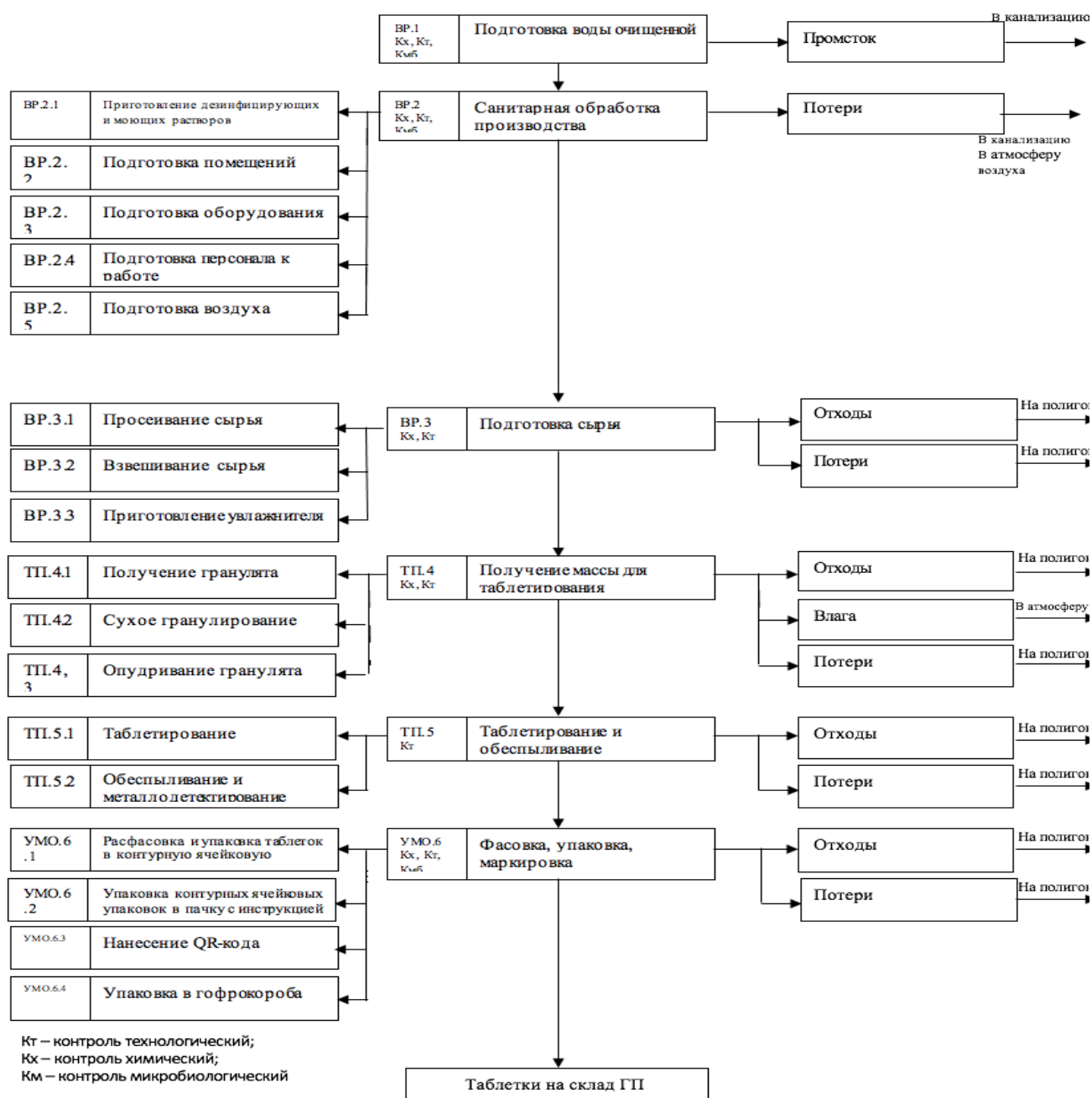


Рисунок 11. Технологическая схема производства таблеток ФДЭС

Глава 9. Предварительная оценка безопасности ФДЭС. Оценка острой токсичности исследуемой фармацевтической субстанции проведена по экспресс-методу Прозоровского. LD_{50} при внутривенном введении составили 2070 ± 220 мг/кг (самцов) и 1990 ± 250 мг/кг (самок), а при подкожном введении - 2550 ± 430 мг/кг (самцов) и 2550 ± 240 мг/кг (самок). Однократное внутрижелудочное введение крысам растворов испытуемой ФС в исследуемом диапазоне доз

(300 мг/кг; 2000 мг/кг) не оказывало статистически значимого (критерий Стьюдента, $p > 0,05$) влияния на динамику массы тела аутбредных крыс самцов и самок и не вызывало их гибели.

Вскрытие животных на 14 день после введения исследуемой субстанции не показало наличия каких-либо остаточных явлений, связанных с интоксикацией. Данные макроскопического исследования изучаемых органов свидетельствуют о безопасности ФДЭС. Испытуемая субстанция не обладает раздражающим действием на слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта и слизистую брюшной полости. Все показатели абсолютной и относительной массы органов крыс самцов и самок находились в пределах физиологической нормы. Половых различий в течение наблюдения в опытных и контрольных группах не отмечалось. Статистически значимых различий исследуемых показателей не выявлено. Таким образом, синтезированное соединение может быть отнесено к категории малотоксичных веществ.

На белых аутбредных лабораторных крысах самцах и самках была изучена хроническая токсичность таблеток ФДЭС при ежедневном (1 раз в день в течение 180 дней) внутрижелудочном введении в трех экспериментальных дозах аутбредным крысам обоего пола. На всех испытанных дозах (5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг) клинические симптомы отравления животных отсутствовали. Хроническое внутрижелудочное введение таблеток в исследуемом диапазоне доз в сравнении с группой контрольных животных не оказывало статистически значимого влияния на динамику прироста массы тела и патологических изменений органов аутбредных крыс самцов и самок. Испытуемое вещество не обладает раздражающим действием на слизистые в месте введения. Данные исследования свидетельствуют о безопасности анализируемого вещества ФДЭС и его пероральной лекарственной формы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что новое соединение – янтарнокислая соль фумарового эфира диэтилэтаноламина оказывает выраженную антигипоксическую, актопротекторную и нейропротекторную активность, стимулирует нейропластические процессы в мозге, устраняет неврологические (двигательные и когнитивные) нарушения, вызванные гипоксически-ишемическими поражениями мозга, и обладает низкой токсичностью и приемлемой фармакокинетикой при приеме во внутрь. Молекулярные механизмы действия ФДЭС связаны с его способностью активировать нейрональный депо-управляемый вход кальция в постсинаптические дендритные шипики за счёт специфической активации TRPC6-зависимого нДУВК, а также защищать грибовидные шипики от амилоидной синаптотоксичности. В высоких дозах за счет включения интермедиатов цикла Кребса янтарной и фумаровой кислот возможно нарастание значимости субстратного механизма действия препарата на процессы энергопродукции в условиях гипоксически-ишемических повреждений и интенсивных физических нагрузках.

На основании результатов проведенных доклинических исследований оценена фармакологическая эффективность ФДЭС и проведено сравнение доз 10 мг/кг и 75 мг/кг (Таблица 11).

Таблица 11. – Обобщённые фармакологические эффекты разных доз ФДЭС

Фармакологические показатели	Тесты	Показатели	ФДЭС, мг/кг	
			10	75
Нейропротекторная активность в условиях ишемии мозга				
Антигипоксический	ОНГ, ОГГ, ОГтГ	УИАА, у.е.	1,02	1,34
		Средняя выживаемость животных	13%	57%
	Тотальная ишемия мозга	Выживаемость животных	↑ 33,3%	↑ 42%
Неврологический дефицит	Ротарод	Координация движений	↑188%	↑200%
	Экстраполяционное избавление	Обучение	↑ 75%	↑48%
		Пространственная память	↑ 35%	↑29%
	Стимулирование конечностей	Сенсомоторные нарушения	↓128,5	↓92,9
	Цилиндр		↓83%	↓ 226
	Сужающая дорожка		↓44%	↓31,5
Ишемия мозга	Очаг некроза мозга	↓53,9%	↓37,3%	
Поведение				
В условиях ишемии	Открытое поле	Общая двигательная активность	↑206%	↑100%
Когнитивные функции				
Обучение, запоминание,	Лабиринт Барнс	Обучение	↑ 75%	↑42%
		Пространственная	↑35%	↑29%

Фармакологические показатели	Тесты	Показатели	ФДЭС, мг/кг	
			10	75
хранение, построение программы действия	Т-лабиринт	память		
		Оперативная память	↑50%	↑50%
Антиамнестический	Скополаминовая амнезия	Индекс антиамнестического действия, ед	1,18	1,12
Физическая работоспособность	Вынужденное плавание с грузом	Длительность выполнения нагрузки	↑ 162%	↓ 9%

Примечание: Расчёты всех показателей проведены по отношению к группе контрольных животных, показатели которых взяты за 100%; ИААД – индекс антиамнестического действия; УИАА – усредненная интегральная активность.

Таким образом, основные нейрореабилитационные и когнитивные эффекты действия ФДЭС при внутрижелудочном введении лабораторным животным достигаются при использовании препарата в разовой дозе 10 мг/кг. Однако для достижения выраженного антигипоксического и нейропротекторного действия препарата может потребоваться повышение дозы до 75 мг/кг.

Следовательно, при экстраполяции оптимальных доз с лабораторных животных на человека, с учетом коэффициентов межвидового переноса, средняя терапевтическая доза препарата будет составлять 60 мг для человека массой 70 кг, что соответствует приему во внутрь по 1 таблетке ФДЭС 1-2 раза в день, но не более 7 таблеток в сутки.

ВЫВОДЫ

1. Скрининговое исследование 20 новых синтезированных производных солей янтарного и фумарового эфиров диметил- и диэтилэтанолamina показало наличие умеренного психоактивирующего и нейропротекторного (антигипоксического) действия. Наиболее высокая ноотропная активность была выявлена у янтарнокислой соли фумарового эфира диэтилэтанолamina (ФДЭС).
2. ФДЭС в дозе 10 мг/кг оказывает умеренное, а в дозе 75 мг/кг - выраженное антигипоксическое действие. По антигипоксической активности соединение превосходит референтный препарат цитофлавин (доза 170 мг/кг).
3. ФДЭС оказывает нейропротекторное действие. На 21 день после двусторонней необратимой перевязки обеих общих сонных артерий у животных курсовое внутрижелудочное введение ФДЭС в дозе 75 мг/кг повышает выживаемость крыс, а после окклюзии средней мозговой артерии увеличивает координацию их движений и активацию когнитивных процессов, превосходя активность цитофлавина (доза 170 мг/кг). Позитивное влияние ФДЭС в дозе 10 мг/кг отмечалось на уровне статистических тенденций.
4. После дозированной фокальной черепно-мозговой травмы ФДЭС устранял сенсомоторный дефицит у крыс в тестах «Сужающаяся дорожка», «Цилиндр» и «Стимулирование конечностей». В дозах 10 и 75 мг/кг статистически значимо уменьшал очаг поражения головного мозга в 1,54 раза ($p < 0,05$) и 1,38 раза ($p < 0,05$), что превосходило нейропротекторное действие цитофлавина и пирацетама на данной модели.
5. У здоровых животных при однократном пероральном введении ФДЭС (доза 10 мг/кг) статистически значимо повышал поведенческую активность крыс ($p = 0,03$) и снижал показатель их психологического комфорта ($p = 0,02$) в тесте открытое поле. ФДЭС в дозе 75 мг/кг при однократном приеме снижал стрессовую реактивность животных ($p = 0,0004$). Двухнедельное курсовое применение препарата ФДЭС практически не оказывало влияние на поведение животных в тестах открытое поле и приподнятый крестообразный лабиринт. ФДЭС (доза 75 мг/кг) демонстрировало умеренное статистически значимое повышение показателя комфортности животных в тесте открытое поле ($p = 0,05$), а также тенденцию к незначительному снижению вегетативной лабильности.
6. ФДЭС в эффективных дозах (10 и 75 мг/кг) статистически значимо улучшал когнитивные функции животных в тесте «Экстраполяционное избавление», способствовал закреплению алгоритма решения задачи и его сохранения во времени у крыс. При курсовом применении один раз в день на протяжении 14 дней оптимальной для проявления позитивного действия на когнитивные процессы является доза ФДЭС 10 мг/кг. В Т-образном лабиринте его введение существенно повышало эффективность обучения, запоминания и воспроизведения

информации у животных, оказывая дозозависимое действие. Данное действие вещества было сопоставимо с эффектом высокой (900 мг/кг) дозы пираретама.

7. ФДЭС устраняет амнезию, вызванную введением скополамина - блокатора m1AChR рецепторов, расположенных в гиппокампе. Антиамнестическое действие ФДЭС сопоставимо с активностью пираретама (индекс антиамнестического действия исследуемого соединения составил 1,18, для пираретама - 1,12).
8. Компьютерный прогноз биологической активности ФДЭС с помощью программы PASS 2014 в качестве наиболее вероятных видов активности предсказал ингибирование транскрипционного фактора NF kappa B1(83,5%), уменьшение мембранной проницаемости (85,4%), агонизм к рецепторам предсердного натрийуретического пептида (87,7%), антагонизм к фибриногеновым рецепторам тромбоцитов (90,9%), антигипоксанта (86,2%), агонизм к инсулиновым рецепторам (81,9%).
9. ФДЭС демонстрирует нейропротекторные свойства в первичной гиппокампальной культуре мышей за счёт стабилизации и усиления синаптической передачи. В концентрации 100 нМ ФДЭС активизирует нейрональный депо-управляемый вход кальция в постсинаптические дендритные шипики, за счёт специфической активации TRPC6-зависимых ионных каналов и защищает грибовидные шипики от амилоидной синаптотоксичности. Эффект сопоставим с действием эталонного препарата гиперфорина.
10. Изучена безопасность субстанции и таблеток ФДЭС. Средние летальные дозы (LD50) исследуемого соединения у мышей при внутривенном введении составили 2070±220 мг/кг (самцы) и 1990±250 мг/кг (самки), при подкожном - 2550±430 мг/кг (самцы) и 2550±240 мг/кг (самки). Введение таблеток ФДЭС в исследованных дозах 5 мг/кг, 25 мг/кг и 50 мг/кг длительностью (180 дней) не вызывала у крыс тяжёлых патологических изменений со стороны внутренних органов и систем организма. Установлено, что новая субстанция и таблетки ФДЭС безопасны при пероральном приеме.
11. Определены основные фармакокинетические параметры однократного перорального приема таблеток ФДЭС. Было установлено, что фармакокинетическая кривая для этого способа введения таблеток ФДЭС имеет моноэкспоненциальный характер. Биодоступность исследуемых таблеток составила 25,0%, максимальная концентрация наблюдалась через 30 минут после введения, объем распределения составил 28,09 л/кг, период полувыведения составил 0,37 ч (22,2 мин), среднее время удерживания в организме крысы составило 14,79 ч. ФДЭС определяли в плазме крови и мочи в более 24 часов. Основным метаболитом ФДЭС можно считать продукт окисления и гидроксирования катионной части молекулы с участием ферментов цитохрома семейства P 450 печени.

НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ:

1. Соли кислот цикла Кребса и фумарового эфира производных аминокэтанола могут быть основой для разработки новых представителей класса ноотропных средств.

2. Янтарнокислая соль фумарового эфира диэтиламиноэтанола (ФДЭС) при внутрижелудочном введении в дозе 10 мг/кг обладает высокой антигипоксической, нейропротекторной и антиамнестической активностью, превосходящей референсный препарат цитофлавин (170 мг/кг), и сопоставимое с эффективностью высокой (900 мг/кг) дозы пирацетама, что позволяет рекомендовать использование этого соединения в качестве основы для создания эффективного лекарственного средства для профилактики и лечения когнитивных нарушений, при ишемически-гипоксическом повреждении мозга (нарушениях церебрального кровообращения, черепно-мозговых травмах).

3. Полученные в ходе исследования материалы, подтверждающие специфическую активность соединения ФДЭС, его низкой токсичности и особенностях фармакокинетики, включены в подготовленное регистрационное досье на новое лекарственное средство и получено разрешение на проведение его клинических испытаний.

4. Данные, представленные в диссертационном исследовании о новом ноотропном веществе, янтарнокислой соли фумарового эфира диэтиламиноэтанола, могут быть использованы в учебном процессе по дисциплине «Фармакология».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**Статьи в научных журналах и изданиях, рекомендованных ВАК РФ:**

1. Шустов Е.Б. **Болотова В. Ц.** Биологическое моделирование утомления при физических нагрузках //Биомедицина. – 2013. №3. – С. 95 – 104.
2. Шустов Е.Б., Каркищенко В.Н., Семёнов Х.Х., Оковитый С.В., Юсковец В.Н., **Болотова В. Ц.** Поиск закономерностей, определяющих антигипоксическую активность соединений с ноотропным и нейропротекторным действием //Биомедицина. – 2015. – №1. – С. 18 – 23.
3. Титович И. А., **Болотова В. Ц.** Экспериментальное изучение антигипоксической активности нового производного аминокэтанола // Биомедицина. – 2016. – №. 1. – С. 77 – 83.
4. Титович И.А., Радько С.В., Лисицкий Д.С., Оковитый С.В., **Болотова В.Ц.**, Бельская А.В., Михайлова М.В., Сысоев Ю.И. Изучение влияния производного аминокэтанола на когнитивные функции лабораторных животных // Биомедицина. – 2017. – №. 3. – С. 102 –110.
5. Титович И.А., Сысоев Ю.И., **Болотова В.Ц.**, Оковитый С.В. Нейротропная активность нового производного аминокэтанола в условиях экспериментальной ишемии головного мозга // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2017. – Т. 80.– № 5.– С. 3 – 6.
<https://doi.org/10.30906/0869-2092-2017-80-5-3-6>
6. Сысоев Ю.И., Титович И.А., Оковитый С.В., Лалаев Б.Ю., **Болотова В.Ц.**, Кимаев А.Н., Загладкина Е.В. Производные этаноламина как нейропротекторные средства // Фармация. – 2019. – Т. 68, № 1. – С.48 – 55. DOI: <https://doi.org/10.29296/25419218-2019-01-07>
7. **Болотова В.Ц.** Разработка нового ноотропного препарата на основе производных фумаровой кислоты. //Биомедицинский журнал Medline.ru. Тематический выпуск, посвященный 100-летию со дня рождения акад. С.Н. Голикова. // СПб, 23-24 мая 2019. – 2019. – С. 53 – 54.
8. Сысоев Ю.И., Попугаева Е.А., Чернюк Д.П., Титович И.А., Загладкина Е.В., **Болотова В.Ц.**, Безпрозванный И.Б., Оковитый С.В. Механизм действия нового производного этаноламина – бис{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2-еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандиоата // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т. 82, № 4. – С.3 – 10. DOI: <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2019-82-4-3-10>
9. **Болотова В.Ц.**, Ивкин Д.Ю., Шустов Е.Б., Оковитый С.В. Изучение безопасности нового ноотропного препарата на основе производного фумаровой кислоты // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2020 – Т.21, №1– С.119-126.
10. **Болотова В.Ц.**, Титович И.А., Шустов Е.Б. Изучение нейропротекторной активности нового производного фумаровой кислоты // Биомедицина. – 2021 – Т.17, №3 – С.100-104.
<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-3-100-104>.

11. **Болотова В. Ц.**, Титович И.А., Шустов Е.Б. Влияние янтарной соли фумарового эфира диэтилэтанолamina на когнитивные способности лабораторных животных. //Биомедицина. – 2022. – Т. 18. – № 3. – С. 104-108. <http://dx.doi.org/10.33647/2074-5982-18-3-104-108>
12. **Болотова В. Ц.**, Терентьева О. А., Флисюк Е. В., Шустов Е. Б. Фармакопейный анализ таблеток производного диэтилэтанолamina // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2022. – Т. 19. – № 4. – С. 142-146. – DOI 10.19163/1994-9480-2022-19-4-142-146.
13. **Болотова В. Ц.**, Титович И.А., Шустов Е.Б. Антигипоксическая и антиишемическая активность нового фумарового производного диэтилэтанолamina. // Вестник новых медицинских технологий. – 2023. – № 2. – С. 77–80. DOI: 10.24412/1609-2163-2023-2-77-80. EDN ULQYMF.

Патенты

1. Нейропротекторное средство на основе бис-{2-[(2E)-4-гидрокси-4-оксобут-2еноилокси]-N,N-диэтилэтанаминия} бутандионата. Оковитый С.В., Шустов Е.Б., **Болотова В.Ц.**, Титович И.А. Патент на изобретение № 2588365 С1, 27.06.2016.
2. Фармацевтическая композиция для лечения последствий черепно-мозговой травмы и способ её получения (варианты). Наркевич И.А., Теслев А.А., Оковитый С.В., Ивкин Д.Ю., **Болотова В.Ц.**, Сысоев Ю.И., Терентьева О.А., Титович И.А., Флисюк Е.В. Патент на изобретение № 2693633 С1, 03.07.2019.

Статьи в иных журналах, методические рекомендации и монографии

1. **Болотова В.Ц.**, Шустов Е.Б. Фармакологическая коррекция когнитивных нарушений: современные взгляды на механизмы действия и перспективы развития группы ноотропных препаратов. //Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук. – 2019 – Т. 23, № 1 – С. 71 – 81. DOI: [10.26163/GIEF.2019.23.1.013](https://doi.org/10.26163/GIEF.2019.23.1.013)
2. **Болотова В.Ц.**, Шустов Е.Б., Оковитый С.В. Изыскание соединений с актопротекторной активностью среди производных аминокэтанола с кислотами цикла Кребса. //Формулы фармации. 2020; 2 (3):28-35 DOI: [10.17816/phf50230/2713-153X-2020-4-2-28-35](https://doi.org/10.17816/phf50230/2713-153X-2020-4-2-28-35)
3. Шустов Е.Б., Новиков В.С., Оковитый С.В., **Болотова В.Ц.**, Селизарова Н.О., Ким А.Е. Патогенетические механизмы повышенной утомляемости и основные направления ее фармакологической коррекции. //Вестник образования и развития науки Российской академии естественных наук. – 2020 – Т. 24, №4 – С.26-40. DOI: [10.26163/RAEN.2020.10.87.004](https://doi.org/10.26163/RAEN.2020.10.87.004)
4. Шустов Е.Б., Оковитый С.В., **Болотова В.Ц.**, Ким А.Е. Батарея тестов для изучения адаптогенного действия биологически активных веществ в доклинических исследованиях.

//Формулы фармации. – 2021 – Т. 3, №2 – С. 10-25. DOI: 10.17816/phf65230/2713-153X-2021-2-3-10-25.

5. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Капанадзе Г.Д., Ревякин А.О., Семенов Х.Х., **Болотова В.Ц.**, Дуля М.С. Биомедицинское (доклиническое) изучение антигипоксической активности лекарственных средств. Методические рекомендации МР21.44-2017. //ФМБА России, Москва. – 2017. – 98 с.
6. Каркищенко Н.Н., Каркищенко В.Н., Шустов Е.Б., Берзин И.А., Капанадзе Г.Д., Фокин Ю.В., Семенов Х.Х., Станкова Н.В., **Болотова В.Ц.** Методические рекомендации по биомедицинскому (доклиническому) изучению лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность. Методические рекомендации МР21.43 – 2017 //ФМБА России, Москва. – 2017. – 134 с.
7. Оковитый С.В., Шустов Е.Б., **Болотова В.Ц.** Работоспособность. Утомление. Коррекция. Монография. //М.: Кнорус – 2019. – 330 с.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ИЗ – Индекс защиты

КА – Коэффициент активности

ЛД50 – Средняя летальная доза

нДУВК – Нейрональный депо-управляемый вход кальция

ОгемГ – Острая гемическая гипоксия

ОДА – Общая двигательная активность

ОгтГ – Острая гистотоксическая гипоксия

ОНГ – Острая нормобарическая гипоксия

ПИА – Поисково-исследовательскую активность

ФДЭС – Янтарная соль фумарового эфира диэтиламиноэтанола

Ab – Абета белок

Ab42 – Синтетический бета-амилоид 1-42

D – Коэффициент детерминации

НУР – Гиперфорин

Pa – Вероятность наличия конкретного вида активности

V – Объем повреждения головного мозга (мм³)

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем глубокую искреннюю благодарность за помощь и поддержку при проведении экспериментальных исследований:

1. Сотрудникам Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета:

- кафедры фармакологии и клинической фармакологии: к.б.н., доценту Титович И.А., к.б.н., доценту Сысоеву Ю.И., заведующему кафедрой фармакологии и клинической фармакологии, д.м.н., профессору Оковитому С.В.;

- начальнику центра экспериментальной фармакологии, к.б.н., доценту Ивкину Д.Ю.;

- кафедры органической химии: химику-синтетику Юскавцу В.Н., д.х.н., профессору И.П. Яковлеву;

- кафедры технологии лекарственных форм: к.фарм.н., старшему преподавателю Терентьевой О.А., заведующему кафедрой технологии лекарственных форм, д.фарм.н., профессору Флисюк Е.В.;

- сотруднице Центра контроля качества к.ф.н. Сипкиной Н.Ю.

2. Сотрудникам лабораторией молекулярной нейродегенерации Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого д.б.н. Попугаевой Е.А., лаборанту Чернюк Д.П. и профессору, д.б.н. Безпрозванному И.Б.

3. Старшему научному сотруднику к.б.н. А.В. Дмитриеву и заведующему отделом биоинформатики Научно-исследовательского Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН член-корреспонденту РАН профессору В.В. Поройкову.

4. Сотрудникам Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-клинический центр токсикологии имени академика С. Н. Голикова Федерального медико-биологического агентства» к.б.н. Лисицкому Д.С., Бельской А.В., Михайловой М.В.

Болотова Вера Цезаревна

**РАЗРАБОТКА НОВОГО НООТРОПНОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ
ЭТАНОЛАМИНА, БУТАНДИОВОЙ И ТРАНС-БУТЕНДИОВОЙ КИСЛОТ
(экспериментальное исследование)**

3.3.6 – Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
доктора фармацевтических наук