

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРМСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ АКАДЕМИКА Е.А. ВАГНЕРА

МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

на правах рукописи

ЗЕНКОВА ЕЛЕНА АНДРЕЕВНА

**ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОЕДИНЕНИЯ Г-104 –
НЕНАРКОТИЧЕСКОГО АНАЛЬГЕТИКА НА ОСНОВЕ ПРОИЗВОДНЫХ
ИЗОХИНОЛИНА И ГЕКСАНОВОЙ КИСЛОТЫ**

14.03.06. - Фармакология, клиническая фармакология

14.04.01. - Технология получения лекарств

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук,

профессор Вдовина Г.П.

Научный консультант:

доктор медицинских наук,

профессор Гречко О. Ю.

ПЕРМЬ - 2017

ОГЛАВЛЕНИЕ

ГЛАВА 1. Современные подходы к обезболиванию и пути поиска новых обезболивающих средств (обзор литературы)	12
1.1 Понятие и оценка боли и болевого синдрома	12
1.2 Современные обезболивающие средства: механизмы действия, преимущества, недостатки	15
1.3 Перспективные производные алкалоидов изохинолинового ряда, их биологическая активность. Изменение активности соединений при участии аминокислот	23
1.4 Влияние вспомогательных веществ на фармакологическую активность соединений. Современные инструментальные методы определения лекарственных соединений в плазме крови	27
ГЛАВА 2. Материалы и методы	32
2.1. Животные (тест- система) и их содержание	32
2.2 Исследование обезболивающей активности	33
2.3 Оценка сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для анальгетиков. Изучение дополнительных свойств	39
2.4 Определение острой токсичности	47
2.5 Разработка лекарственной формы соединения Г-104	49
2.6 Изучение фармакокинетики и фармакодинамики субстанции и фармацевтических композиций соединения Г-104	51
2.7 Статистическая обработка данных	53
ГЛАВА 3. Исследование обезболивающей активности соединения Г-104 при пероральном способе введения	54
3.1 Изучение обезболивающей активности и расчет ЭД ₅₀ соединения Г-104 на экспериментальных моделях боли	54

3.2	Расчет терапевтического индекса соединения Г-104	56
3.3	Оценка анальгетического действия соединения Г-104 на модели термической боли	57
3.4	Исследование анальгетической активности соединения Г-104 на модели механической соматической боли	58
3.5	Оценка анальгетического действия соединения Г-104 на моделях боли, вызванной альгогенами	59
3.6	Изучение механизма обезболивающего действия соединения Г-104	61
3.7	Заключение	65
ГЛАВА 4. Оценка сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для анальгетиков. Изучение дополнительных свойств соединения Г-104		68
4.1	Изучение влияния соединения Г-104 на дыхательный центр	68
4.2	Оценка толерантности к обезболивающему действию соединения Г-104 ...	69
4.3	Изучение синдрома отмены	70
4.4	Исследование аддиктивного потенциала соединения Г-104	71
4.5	Оценка влияния соединения Г-104 на спонтанную двигательную активность и эмоциональность	72
4.6	Влияние соединения Г-104 на координацию и мышечный тонус в тестах «горизонтальная проволока» и «Ротарод»	76
4.7	Оценка влияния соединения Г-104 на рефлекторную деятельность	77
4.8.	Изучение влияния соединения Г-104 на сердечно-сосудистую систему	78
4.9	Исследование ulcerогенного действия и влияния на моторику желудочно-кишечного тракта соединения Г-104	80
4.10	Оценка противокашлевого действия соединения Г-104	81
4.11	Заключение	82
ГЛАВА 5. Исследование острой токсичности соединения Г-104		83

5.1 Токсикометрия.....	83
5.2 Влияние острого введения соединения Г-104 на потребление пищи и воды, массу тела экспериментальных животных	84
5.3 Изучение клинической картины интоксикации при исследовании острой токсичности соединения Г-104.....	85
5.4 Макроскопическая (патоморфологическая) оценка влияния соединения Г-104 на внутренние органы	86
5.5 Влияние соединения Г-104 на показатели периферической крови	88
5.6 Оценка влияния соединения Г-104 на биохимические показатели крови при изучении острой токсичности.....	89
5.7 Заключение по результатам изучения острой токсичности	90
ГЛАВА 6. Разработка лекарственной формы. Технологические, фармакокинетические и фармакодинамические исследования	92
6.1 Изучение технологических параметров соединения Г-104 и выбор вспомогательных веществ.....	92
6.2 Изучение фармакокинетики фармацевтических композиций соединения Г-104 в сравнении с субстанцией при пероральном пути введения.....	94
6.3 Изучение фармакодинамики фармацевтических композиций соединения Г-104 в сравнении с субстанцией при пероральном пути введения.....	97
6.4 Расчет дозы соединения Г-104 для I фазы клинических исследований.....	98
6.5 Технологические параметры готовых лекарственных форм соединения Г-104. Выбор оптимального состава.....	99
6.6 Заключение	102
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	104
ВЫВОДЫ	111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	112

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	134
ПРИЛОЖЕНИЕ А	135
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	136
ПРИЛОЖЕНИЕ В	143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

Болевой синдром и его терапевтическая коррекция являются одной из ведущих проблем в современной медицине [Кукушкин М.Л., 2011; Чиссов В.И., 2007]. При этом имеющиеся на сегодняшний день анальгетики не всегда отвечают требованиям высокой эффективности и безопасности [Страчунский Л.С., 2009; Чурюканов В.В., 2002], в связи с чем поиск новых соединений, обладающих высокой анальгетической активностью представляется актуальным [Спасов А.А., 2014].

Природные изохинолиновые алкалоиды широко применяются в фармакологии и обладают самыми различными видами биологической активности [Семенов А.А., 2000]. В то же время большой интерес представляют собой и синтетические аналоги изохинолиновых алкалоидов, среди которых выявлены соединения, являющиеся перспективными агентами, модулирующими активность дофамин-, серотонинергической систем [Shonberg J., 2015; Mi G. 2017], проявляющие антипролиферативную [Gao F., 2015] и обезболивающую [Voight E., 2014] активности. Общеизвестным является факт усиления фармакологического эффекта [Федотова Ю.О., 2012; Xu В., 2017] и снижения токсичности [Боят В., 2009] при конъюгации фармакофора с аминокислотами [Ташмухамедов Р. И., 2007]. Так, присоединение 6-аминогексановой кислоты позволило получить соединения с более выраженным фармакологическим эффектом [Гущин И.С., 2003].

Наличие у группы производных изохинолинов высокой обезболивающей активности [Montrucchio D., 2013; Voight E., 2014; Wu Y., 2015], а также данные о снижении специфической токсичности при введении в молекулу аминокислоты [Усанова А.А., 2015; Раснецов, Л. Д., 2012] послужили предпосылкой к проведению настоящего исследования.

В ФГБУН ИТХ УрО РАН синтезированы соединения, представляющие собой производные изохинолина и аминоксановой кислоты. Предварительные скрининговые исследования [Вихарев Ю.Б., 2005; Шкляев Ю.В., 2001] показали анальгетическую активность ряда указанных соединений и низкую токсичность при исследовании острой токсичности. Соединение 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминоксановой кислоты было включено в федеральную целевую программу «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу».

Учитывая вышеизложенное, углубленное доклиническое изучение анальгетической активности и безопасности одного из производных изохинолина и аминоксановой кислоты соединения 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминоксановой кислоты под лабораторным шифром соединение Г-104 представляет теоретический и практический интерес для здравоохранения.

Тема утверждена на заседании Ученого Совета ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России (протокол № 9 от 11 мая 2012 г.) и включена в план НИР.

Целью настоящей работы явилось исследование анальгетической активности и безопасности соединения 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминоксановой кислоты – (далее соединение Г-104) и разработка на его основе капсулированной лекарственной формы.

Исходя из цели исследования, были сформулированы основные **задачи**:

1. Определить специфическую анальгетическую активность соединения Г-104 в тестах *in vivo* при пероральном способе введения в сравнении с препаратом из группы ненаркотических анальгетиков (Кеторолак) и препаратом со смешанным механизмом действия, включающем в себя опиоидный и неопиоидный компоненты (Трамадол).

2. Оценить сопутствующие и нежелательные эффекты, характерные для анальгетиков (респираторную депрессию, толерантность к анальгетическому

действию, синдром отмены, аддиктивный потенциал, седацию, ulcerогенность и т.д.). Изучить дополнительные свойства соединения Г-104.

3. Определить острую токсичность соединения Г-104 на лабораторных животных при пероральном способе введения.

4. Разработать капсулированную лекарственную форму соединения Г-104 на основании технологических, фармакокинетических и фармакодинамических исследований.

Научная новизна. В ходе фармакологического доклинического исследования нового синтезированного соединения Г-104 на белых лабораторных нелинейных крысах впервые показано его выраженное анальгетическое действие с применением соответствующих экспериментальных моделей боли, проявляемое в дозе 30 мг/кг, в ряде тестов превосходящее анальгетики Кеторолак в дозе 0,85 мг/кг и Трамадол в дозе 4,29 мг/кг. Впервые установлено, что соединение Г-104 не вызывает толерантности к обезболивающему эффекту, синдрома отмены, аддикции, угнетающего действия на центральную нервную систему, не оказывает существенного влияния на сердечно-сосудистую и дыхательную системы. Впервые показано, что соединение Г-104 не влияет на слизистую оболочку желудочно-кишечного тракта и его моторику. Впервые исследована острая токсичность соединения Г-104, позволяющая отнести данное соединение к V классу практически нетоксичных веществ и IV классу опасности как малоопасное вещество. Впервые была изучена фармакокинетика соединения Г-104 при пероральном пути введения, позволяющая говорить о хорошей всасываемости и биодоступности соединения, но малом периоде полувыведения ($T_{1/2} = 1,9 (1,2-2,9)$ ч). Впервые разработана пероральная лекарственная форма капсулы, подобран оптимальный набор вспомогательных веществ, позволяющий пролонгировать анальгетический эффект до 8 часов, изучены его фармакокинетический и фармакодинамический профили. Рассчитана эффективная доза для человека с целью передачи полученного лекарственного препарата на дальнейшие клинические исследования. Установлена стабильность в естественных условиях в течение 2-х лет (время наблюдения).

По результатам работы подана заявка на изобретение «6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил аминокгексановой кислоты и фармацевтическая композиция на ее основе, обладающие анальгетической активностью» (приоритетная справка №2016143500/15 от 03.11.2016 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы. Проведенные исследования углубляют и расширяют представления о фармакологической активности производных изохинолина и аминокгексановой кислоты. Производное изохинолина и аминокгексановой кислоты соединение Г-104 проявляет выраженные анальгетические свойства, в то же время доказано отсутствие способности вызывать побочные эффекты со стороны центральной нервной, сердечно-сосудистой и дыхательной систем. Полученные результаты исследования фармакологической активности нового биологически активного соединения Г-104 и разработанная капсулированная лекарственная форма позволяют рекомендовать его для дальнейшего клинического изучения. Исследования проведены в рамках государственного контракта № 13411.1008799.13.075 на тему: «Доклинические исследования лекарственного средства - ненаркотического анальгетика на основе производных гексановой кислоты».

Методология и методы исследования. Методологической основой работы по изучению общетоксических, анальгетических и предполагаемых побочных эффектов изучаемого соединения Г-104 являлось действующее Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Арзамасцев Е.В., 2012; Воронина Т.А., 2012]. Исследования фармакокинетики были проведены в соответствии с требованиями Руководства, предъявляемыми к доклиническому этапу изучения фармакокинетики новых лекарственных средств [Гуськова Т.А., 2012], с использованием современного метода высокоэффективной жидкостной хроматографии. Весь объем исследований проведен на экспериментальных животных (белых крысах и морских свинках) на базе отдела доклинических исследований ЦНИЛ ФГБОУ ВО ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера Минздрава России.

Положения, выдвигаемые на защиту.

1. Соединение Г-104 в дозе ЭД₅₀ 30 мг/кг при пероральном пути введения проявляет анальгетическое действие на различных моделях боли. В тесте укусные корчи исследуемое вещество превосходит по обезболивающей активности препараты сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадол (4,29 мг/кг, п/о) и сопоставим с таковыми в тестах отведения хвоста от луча света, дозированного механического раздражения основания хвоста крыс с помощью зажима (метод Гаффнера), формалиновой гипералгезии, а также превосходит референтные препараты по условному терапевтическому индексу.

2. Соединение Г-104 не вызывает дыхательной депрессии, толерантности к анальгетическому эффекту, синдрома отмены, седативного действия, не обладает аддиктивным потенциалом, ульцерогенностью. Соединение Г-104 не влияет на моторику желудочно-кишечного тракта, сердечно-сосудистую систему, не обладает дополнительной противокашлевой активностью.

3. По результатам изучения острой токсичности соединение Г-104 относится к V классу практически нетоксичных веществ и IV классу опасности как малоопасное вещество.

4. Наиболее оптимальной фармацевтической композицией является комбинация соединения Г-104 с гидроксипропилцеллюлозой (ГПЦ), предполагаемая доза для человека 350 мг, что соответствует 0 размеру желатиновых капсул.

Апробация работы и публикации. Основные фрагменты диссертационной работы доложены на IV международной конференции «Техническая химия. От теории к практике» (Пермь, 2014), VI всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2016), Всероссийской научно-практической с международным участием конференции «Наукоемкие биомедицинские технологии: от фундаментальных исследований до внедрения» (Пермь, 2016), V международной конференции «Техническая химия.

От теории к практике» (Пермь, 2016). По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК.

Личное участие автора. Автором самостоятельно проведен поиск и анализ литературных источников. Автором в составе научного коллектива проведено изучение анальгетической активности, влияния на органы и системы организма, изучение технологических параметров субстанции Г-104. Вклад автора заключается в непосредственном участии в изучении острой токсичности, проведении всех необходимых манипуляций с экспериментальными животными. Личное участие автора заключается также в разработке и валидации методики количественного определения соединения Г-104 в плазме крови, проведении фармакокинетического исследования соединения Г-104. Автором проведена разработка состава капсул соединения Г-104, изучение их фармакокинетики, анальгетической активности, технологических характеристик. При статистической обработке и анализе полученных результатов, написании журнальных статей, оформлении рукописи диссертации и автореферата вклад автора является определяющим.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 144 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, пяти глав, общих выводов и списка литературы, включающего 208 источников, в том числе 120 иностранных; содержит 53 таблицы, 10 рисунков, 3 приложения.

ГЛАВА 1. Современные подходы к обезболиванию и пути поиска новых обезболивающих средств (обзор литературы)

1.1 Понятие и оценка боли и болевого синдрома

Интерес к проблеме регуляции болевой чувствительности возрастает с каждым годом, что во многом обусловлено все возрастающим количеством людей, страдающих от различных видов боли [Ширанов А., 2010; Moulin D., 2002], в частности, в России их число составляет по некоторым данным, около 20% взрослого населения [Осипова Н.А., 2010].

Боль, наиболее частый симптом при различных заболеваниях, определяется Международной ассоциацией по изучению боли (IASP) как «неприятное чувство и эмоциональное переживание, связанное с явным или скрытым повреждением ткани, так и состоянием, описываемом как повреждение». Известно, что боль независимо от ее происхождения, значительно усугубляет как физическое, так и психологическое состояние больного. Боль — понятие клинически и патогенетически сложное и неоднородное [Вейн А.М., 1997]. Она различается по интенсивности, локализации и по своим субъективным проявлениям. Все болевые синдромы в зависимости от этиопатогенеза можно условно разделить на три основные группы: невропатические, психогенные и ноцицептивные [Решетняк В.К., 2004].

К невропатической боли относят боль, возникающую вследствие прямого повреждения или болезни соматосенсорной системы.

Психогенные болевые синдромы характеризуются наличием у пациентов боли, необъяснимой никакими известными соматическими заболеваниями или поражением структур нервной системы.

Ноцицептивные болевые синдромы возникают вследствие активации ноцицепторов при травме, воспалении, отеке тканей. Клинически среди них выделяют посттравматический и послеоперационный болевые синдромы, боли

при воспалении суставов, стенокардические боли и многие другие [Кукушкин М.Л., 2010].

Боль всегда субъективна, и её конечная оценка определяется местом и характером повреждения, природой повреждающего фактора, психологическим состоянием человека и его индивидуальным жизненным опытом. Для интерпретации степени выраженности болевого синдрома у человека используются неинвазивные критерии объективизации: регистрация интенсивности боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ, visual analog scale — VAS), представляющая собой отрезок прямой длиной 10 см, цифровая рейтинговая шкала (ЦРШ, numerical rating scale — NRS), также предназначенная для определения интенсивности боли и состоящая из 11 пунктов. Для детей используются шкалы с рисунками счастливых и несчастливых лиц [Бывальцев В.А., 2011].

В экспериментальной фармакологии в связи с особенностями количественного измерения болевого порога у животных заслуживают внимания экспериментальные модели боли, позволяющие обнаружить и количественно оценить обезболивающий эффект соединения. Согласно действующему Руководству они разделены на следующие группы [Воронина Т.А., 2012]:

1. Методы оценки соматогенной боли:

1.1 Методы оценки термической соматической боли

1.1.1 Тест отдергивания хвоста от теплового излучения (tail-flick)

1.1.2 Тест тепловой иммерсии хвоста при погружении в горячую воду (tail-immersion)

1.1.3 Тест термического раздражения лап – подошвенный тест (Hargreaves test)

1.1.4 Тест горячей пластины (hot-plate)

1.2 Методы оценки механической соматической боли

1.2.1 Тест механического раздражения основания хвоста по Гаффнеру (Haffner's tail clip test)

1.2.2 Тест механического раздражения лапы или хвоста

1.3 Методы оценки электрической активности при реализации соматического рефлекса

1.3.1 Метод регистрации ноцицептивного флексорного рефлекса

1.4 Методы оценки боли, вызванной альгогенами

1.4.1 Методы оценки соматической боли, вызванной альгогенами

1.4.1.1 Формалиновый тест

1.4.1.2 Тест механической гипералгезии при воспалении

1.4.1.3 Тест термической гипералгезии при воспалении

1.4.1.4 Тест тактильной аллодинии

1.4.1.5 Тест хронического воспаления – адьювантного артрита

1.4.1.6 Тест орофасциальной тригеминальной боли

1.4.2 Метод оценки висцеральной боли, вызванной альгогенами

1.4.2.1 Метод оценки перитовисцеральной боли – тест корчей

2. Методы оценки нейрогенной боли

2.1 Моделирование нейропатического болевого синдрома

2.1.1 Моделирование нейропатического болевого синдрома, вызванного перерезкой седалищного нерва

2.1.2 Моделирование нейропатического болевого синдрома, вызванного перевязкой спинномозговых нервов

2.1.3 Моделирование диабетического нейропатического болевого синдрома

2.2 Моделирование центрального болевого синдрома

В конце 70-80 - х годов прошлого века широкое использование на этапе скрининга и оценки биологической активности приобрели тесты горячая пластинка (hot plate), реакция отведения хвоста от луча света (tail-flick) [D'Amour F., 1941] и укусные корчи. Эти модели не потеряли своей актуальности до настоящего времени и являются наиболее часто используемыми [Бондаренко Д.А., 2011]. Данные модели характеризуют различные уровни организации болевой чувствительности [Колик Л.Г., 2012]: спинальный уровень анальгезии - тест отведения хвоста от луча света, периферический уровень - тест укусные корчи.

1.2 Современные обезболивающие средства: механизмы действия, преимущества, недостатки

Как известно, восприятие и оценка боли регулируются ноцицептивной системой [Калюжный Л.В., 1984]. Болевой импульс воспринимается первичными ноцицепторами, которые помимо механического воздействия, могут быть активированы химическими стимулами (альгогенами). В частности, к тканевым альгогенам относятся простагландины, серотонин, гистамин, лейкотриены, к альгогенам плазмы крови - брадикинин, каллидин и выделяющиеся из периферических окончаний С-ноцицепторов субстанция Р и нейрокинин А [Кукушкин М.Л., 2011].

Основными проводниками болевой чувствительности являются тонкие миелиновые А- δ - и безмиелиновые С-волокна [Djouhri L., 2004], оканчивающиеся в задних рогах спинного мозга, в которых, в свою очередь, формируется поток восходящей импульсации, проходящей по неоспинальному, спиноретикулярному и спинозадному тракту в ретикулярную формацию, центральное серое вещество среднего мозга и ядра таламуса, традиционно являющихся ключевыми в восприятии и передаче болевого импульса [Михалович В.Л., 1990].

Наряду с многокомпонентной системой передачи болевого импульса было установлено наличие эндогенной «противоболевой» антиноцицептивной системы, анатомически представленной центральным серым веществом среднего мозга, ядрами ретикулярной формации [Игнатов Ю.Д., 1984]. Ведущая роль в обезболивающем механизме отводится эндогенным опиоидэргической и моноаминовой (катехоламинэргической и серотонинэргической) системам, детальное изучение которых позволило установить возможные точки приложения действия потенциальных анальгетиков [Брагин Е.О., 1991; Петрявская Н.В., 1984].

В современной клинической практике существует большое количество разнообразных обезболивающих средств, которые на сегодняшний день можно разделить на следующие группы [Воронина Т.А., 2012; Чурюканов В., 2002]:

А. Вещества преимущественно центрального действия.

I. Опиоидные (наркотические) анальгетики

1. Полные агонисты опиоидных рецепторов (морфин, тримепиридин, фентанил);
2. Агонисты-антагонисты и частичные агонисты опиоидных рецепторов (бупренорфин, буторфанол, налбуфин);

II. Неопиоидные средства центрального действия с анальгетической активностью:

1. α_2 – адреномиметики (клонидин);
2. Блокаторы Na^+ - каналов клеточных мембран (карбамазепин);
3. Ингибиторы обратного нейронального захвата моноаминов: серотонина и норадреналина (венфлаксин, милнаципран, дулоксетин);
4. Антагонисты рецепторов возбуждающих аминокислот (кетамин, мемантин);
5. Закись азота;
6. ГАМК_B-миметики (баклофен);
7. Блокаторы Ca^{2+} - каналов (L – типа: нимодипин; N-типа: зиконотид);
8. Габапентин;
9. Ингибиторы циклооксигеназы преимущественно в ЦНС – ненаркотические анальгетики производные парааминофенола (парацетамол);

III. Анальгетики смешанного механизма действия (опиоидный и неопиоидный компоненты) – трамадол;

Б. Вещества преимущественно периферического действия. Ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ) в периферических тканях, а также в ЦНС (нестероидные противовоспалительные средства (НПВС):

1. Вещества неизбирательного действия (ингибиторы ЦОГ-1 и ЦОГ-2) (ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, метамизол натрия, кеторолак);
2. Вещества, ингибирующие преимущественно ЦОГ-2 (мелоксикам);
3. Вещества, избирательно ингибирующие ЦОГ-2 (целекоксиб, рофекоксиб, нимесулид).

Традиционно, опиоидная система является приоритетной в **центральном** механизме антиноцицепции. При активации опиоидных рецепторов,

расположенных в сером околотоводопроводном веществе, ядрах таламуса и задних рогах спинного мозга, наступает выраженная анальгезия [Калюжный Л.В., 1984]. Представители группы препаратов, реализующих свои фармакологические эффекты в результате неизбирательного агонистического взаимодействия с опиоидными рецепторами (опиаты и опиоиды), наряду с традиционным морфином, применяются в терапии многих болевых синдромов. В известном «трехступенчатом» подходе морфин, бупренорфин, фентанил используются на «третьей ступени» «лестницы обезболивания ВОЗ» для купирования боли у онкологических больных сильной степени выраженности [Абузарова Г.Р., 2016; Каприн А.Д., 2015]. На сегодняшний день качество жизни и результаты любого вида лечения в онкологии невозможно оценить без учета динамики хронического болевого синдрома [Чиссов В.И., 2007].

Значительное место отводится морфину и опиоидам в терапии послеоперационной боли сильной степени [Гельфанд Б.Р., 2003; Ульрих Г.Э., 2015]. Заслуживают внимания исследования, показавшие эффективность подкожных имплантов с низкими дозами морфина, значительно снижающие выраженность болевого синдрома и улучшающие физическую активность пациентов с неонкологической болью при длительной трехлетней терапии [Hamza M., 2012]. В ряде зарубежных работ указывается на умеренную противоболевую эффективность и небольшое улучшение функционального состояния при краткосрочном назначении опиоидов при болях в пояснице [Chararro L., 2013, 2014].

Одновременно с выраженным анальгетическим эффектом, при использовании морфина возникают неблагоприятные реакции [Annemans L., 2011], ограничивающие его применение, наиболее существенным из которых является возникновение лекарственной зависимости [Chu L., 2012; Chaudet A., 2016; Manchikanti L., 2011]. Наряду с обезболивающей активностью, общепризнано возникновение тошноты, рвоты, обстипации, головокружения, миорелаксации, депрессии [De Conno F., 2008; Riley, J.L., 2010; Deyo R., 2015; Plante G., 2010].

Большое количество экспериментальных исследований посвящено устранению побочных эффектов класса опиоидов и опиатов. Так, при применении агонистов опиоидных рецепторов возможно развитие гипералгезии (опиоидиндуцированной гипералгезии [opioid-induced hyperalgesia (OIH)]) [Angst M., 2006; Donaldson R., 2016]. Установлено, что NMDA-рецепторы играют значительную роль в механизме развития гипералгезии, возникновение которой возможно предупредить предварительным введением NMDA- и 5HT₃-антагонистов [Lee M., 2011; Heintz C., 2011; Silverman S., 2009]. Указывается на вовлеченность субъединиц глутаматного рецептора NMDA в механизме развития абстиненции при отмене морфина [Перегуд Д.И., 2012]. Ведется поиск новых веществ, способных полностью излечивать от опиоидной зависимости [Zhang Y., 2014]. Значительные успехи достигнуты в изучении и предупреждении толерантности, неизбежно возникающей в ходе применения данной группы препаратов [Chu L., 2012; Lutz B., 2015; Shen C., 2011; Donaldson R., 2016].

В последнее время пристальное внимание уделяется к (каппа) подтипу опиоидных рецепторов, при избирательном связывании с которыми наступает выраженная анальгезия, но при этом нет опасности угнетения дыхания, не развивается эйфория и вероятность развития физической зависимости намного меньше [Спасов А.А., 2013; Cahill C., 2014]. Имеются исследования, показывающие, что κ (KOR) и μ (MOR) опиоидные рецепторы являются формой одного гетеродимера (KOR/MOR) [Hammock B., 2011], указывается на зависимость анальгетического эффекта при взаимодействии с данным типом рецепторов от половой принадлежности [Rasakham K., 2011].

Сигма-рецепторы, ранее обозначавшиеся как подтип опиоидных рецепторов, на сегодняшний день выделены в отдельный класс. При стимуляции данных рецепторов развивается гипералгезия, в то время как антагонисты сигма-рецепторов обладают выраженными антиноцицептивными свойствами без увеличения побочных эффектов [Almansa C., 2014; Choi S., 2013; Jeong Y., 2015; Moon J., 2013].

Помимо опиоидной, участником нейрохимической антиноцицептивной регуляции является система моноаминов (катехоламины, серотонин) [Зайцев А.А., 1984; Петрявская, Н.В., 1984]. Анальгетическое действие клофелина, связанное с влиянием на α_2 -адренорецепторы, достаточно полно изучено. В современной практике клофелин используется в терапии послеоперационных болей [Behdad S., 2013]. Имеются данные о способности клофелина снижать гиперальгезию и аллодинию [Rauck R., 2015]. Сведения о возможности комбинации клофелина с опиоидными и неопиоидными анальгетиками, позволяющей снизить дозы всех применяемых анальгетиков и, одновременно, уменьшить частоту и тяжесть нежелательных эффектов, достаточно противоречивы [Goyagi T., 1996; Mayson K., 2004; Oofuvong M., 2005].

«Микроопиоидный» анальгетик тапентадол [Candiotti K., 2010], являясь агонистом μ -опиоидных рецепторов, и в тоже время ингибируя обратный захват норадреналина, значительно меньше вызывает типичные побочные эффекты, характерные для опиоидов (желудочно-кишечные нарушения, лекарственную зависимость и т.д.) [Cepeda M., 2013; Merker M., 2012]. При этом выраженное анальгетическое свойство доказано не только в эксперименте, на моделях формалинового отека, острого воспаления, вызванного адьювантом Фрейнда и хронического артрита [Schiene K., 2011], но и подтверждено в клинической практике в терапии послеоперационных болей, заболеваний опорно-двигательного аппарата [Frampton J., 2010; Hartrick C., 2009].

Аналогичное влияние на опиоидную, адренергическую и серотонинергическую системы в механизме действия присутствует у трамадола. Показана его высокая обезболивающая активность с одновременным улучшением функционального статуса пациента при длительной терапии онкологической и неонкологической боли, различных гинекологических манипуляциях [Floris S., 2007; Hassan A., 2016]. После применения трамадола наиболее часто встречающимися побочными эффектами являются нарушение координации в пространстве, головокружение, тошнота, седация, сухость во рту и рвота [Leppert W., 2009]. При этом, проявляющиеся побочные эффекты, в частности обстипация

и лекарственная зависимость выражены в значительно меньшей степени, чем у представителей группы опиоидных анальгетиков [Grond S., 2004]. Наличие побочных эффектов диктует необходимость снижения дозировки при сохранении обезболивающего эффекта, что возможно в частности, путем комбинирования с новыми перспективными анальгетиками [Абузарова Г.Р., 2007].

Каннабиоидная система также является структурным элементом антиноцицептивной системы, реализующим свой эффект в ЦНС. Существуют два эндогенных каннабиоида – анадамид, который разрушается в организме ферментом амидгидролазой жирных кислот (ФААН), также называемой анандамидамидогидролаза, и 2-арахидоноилглицерол (2-АГ), разрушающийся преимущественно моноацилглицерол липазой (MGL). Интерес к этой области сфокусирован, в частности, на разработке ингибиторов ФААН и MGL, представляющих собой мишени для получения анальгетиков, как для купирования боли, вызванной воспалением, так и боли не воспалительного генеза [Ahn K., 2011; Desroches J., 2008, 2014; Guindon J., 2011].

На **периферическом** уровне регуляции болевой чувствительности, ряд исследований связан с влиянием на определенные ионные каналы. Из суперсемейства TRP катионных каналов, представленном у человека 6 семействами, наибольший интерес представляет семейство TRPV (ванилоидных) каналов, обеспечивающих активацию и сенситизацию ноцицепторов. Показана перспективность разработки соединений, модулирующих активность данных каналов [Миронов Н.Ю., 2006; Fernández-Carvajal A., 2011].

Значимое влияние на активацию ноцицептивной системы, как уже упоминалось выше, оказывается эндогенными альгогенами, из которых наиболее изученными в качестве мишеней антиноцицептивных средств являются простагландины, проявляющие провоспалительные и альгогенные свойства. Основная направленность действия большей части анальгетиков, реализующих свои эффекты на данном уровне, относится главным образом, к влиянию на каскад метаболизма арахидоновой кислоты [Inceoglu B., 2011], в частности к

ингибированию действия фермента циклооксигеназы (ЦОГ), являющейся ключевым звеном в синтезе простагландинов.

Все известные анальгетические препараты данной группы делятся на неизбирательные ингибиторы ЦОГ, блокирующие оба вида фермента (ЦОГ-1 и ЦОГ-2) и избирательные ингибиторы ЦОГ, блокирующие только ЦОГ-2 [Страчунский Л.С., 2009].

К первой группе относится большое количество препаратов неизбирательно блокирующих фермент ЦОГ (ацетилсалициловая кислота, кеторолак, индометацин, диклофенак), из которых заслуживает внимания кеторолак, обладающий высокой анальгетической активностью. Кеторолак на протяжении последних трех десятков лет является одним из представителей группы ингибиторов циклооксигеназы, проявляющих необходимый уровень анальгезии при различных видах боли [Vadivelu N., 2016]. В ряде обзоров [Wheatley R., 1996; Maslin B., 2008; Cassinelli E.H., 2008] продемонстрирована высокая степень анальгетического эффекта при лечении острой боли после оперативных вмешательств [Каратеев А.В., 2011], в том числе у детей [Forrest J., 1997]. Применение кеторолака для послеоперационного обезболивания обосновано данными доказательной медицины (Овечкин А.М., 2007). Теоретически данный препарат является анальгетиком периферического действия и не может проявлять обезболивающее действие выраженной степени, но имеются исследования, подтверждающие высокий уровень анальгезии как на экспериментальных моделях спинального и супраспинального уровня (тест горячая пластинка, модель отведения хвоста от луча света) [Domeg, F., 1990], так и работы, указывающие на анальгетическое действие, превосходящее морфин и трамадол. Так, в работе [Gopalraju P., 2014] пациенты, получившие кеторолак в дозе 30 мг в/в за 10 минут до стоматологических операций, указали на значительно меньшую интенсивность боли по оценке ВАШ и меньше потребности в дополнительном обезболивании ацетоаминофеном на протяжении 12 часов после операции, в сравнении с пациентами, получившими трамадол в

этих же условиях в дозе 50 мг в/в. Установлена сопоставимая с морфином анальгетическая активность кеторолака при травмах конечностей [Rainer T.H., 2000]. Показана высокая обезболивающая эффективность кеторолака при купировании постоперационных болей в отсроченном периоде от 30 до 150 минут, сопоставимая с наиболее сильнодействующим опиоидным анальгетиком фентанилом [Twersky R.S., 1995]. В экспериментальной фармакологии анальгетическая активность кеторолака была продемонстрирована на модели формалинового отека [Patiño-Camacho S., 2017]. Проявление обезболивающего действия на модели формалиновой гипералгезии зафиксировано как в I фазу, так и в фазу II. При этом наряду с общепринятым механизмом обезболивающего действия на данной модели, указывается на возможность задействованности АТФ-зависимых K^+ -каналов [Barreras-Espinoza I., 2016].

Главным общим недостатком указанной группы обезболивающих средств является наличие выраженного ulcerогенного действия [Осипова Н.А., 2011]. Кроме того, имеются сообщения об увеличении риска гематологических и кардиоваскулярных нарушений под влиянием избирательных ингибиторов ЦОГ-2 при использовании в качестве анальгетиков [Chen J., 2014].

Достоверных отличий в побочных эффектах между такими неизбирательными ингибиторами циклооксигеназы как кеторолак, диклофенак и кетопрофен не выявлено [Forrest J.B., 2002]. Установлено возникновение осложнений со стороны желудочно-кишечного тракта после приема кеторолака при несоблюдении рекомендованных схем применения [Viola E., 2016], повышение нефротоксичности кеторолака при комбинации с кофеином [Юдин М.А., 2012]. Интересен факт уменьшения побочных эффектов с одновременным повышением анальгетического действия при сочетании ингибиторов ЦОГ с мелатонином [Арушанян Э.Б., 2012].

Подтверждена взаимосвязь *иммунной* и ноцицептивной систем, что также открывает дополнительные возможности для обезболивающей терапии [Barr G., 2014; Ren K., 2010]. Полагают, что состояние иммунной системы может играть

определенную роль в формировании тяжелых болей у пациентов с онкологическими заболеваниями [Абрамов Ю.Б., 2009].

Большое значение придается оценке эмоционального компонента боли и влиянию фармакологических препаратов на перцепцию боли [Никенина Е.В., 2012]. Имеется доказательство различного содержания моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс с различной эмоциональной устойчивостью (эмоционально-реактивные и эмоционально-толерантные к звуковому стрессовому воздействию). Отмечается повышение содержания серотонина и дофамина в коре и стволе мозга в группе эмоционально-толерантных животных [Исмайлова Х.Ю., 2007].

1.3 Перспективные производные алкалоидов изохинолинового ряда, их биологическая активность. Изменение активности соединений при участии аминокислот

Алкалоиды изохинолинового ряда представляют собой обширнейший класс азотсодержащих соединений растительного происхождения с высокой и разнообразной биологической активностью. Основоположник отечественной химии алкалоидов Орехов А.П. в середине прошлого века разделил всех представителей производных изохинолина на 10 групп, и уже на тот момент большинство представителей этих групп были получены синтетически [Орехов А.П., 1955]. Общее количество выделенных алкалоидов по современным данным составляет около 1500 [Семенов А.А., 2000].

Биологическая активность проявляется для большинства природных производных изохинолинов. Бензилизохинолины (папаверин, курарин), апорфиновые алкалоиды (глауцин), фенантренизохинолиновые алкалоиды (морфин, кодеин), колхициновые алкалоиды (колхицин) и многие другие нашли применение в современной медицинской практике [Юнусов М.С., 2001].

Изохинолиновый алкалоид хелидонин, проявляет высокую антиаллергическую активность [Kim S., 2015], для проапорфиновых и апорфиновых алкалоидов установлена антихолинэстеразная активность [Dong J.,

2015]. Линдера (*Lindera aggregata*), эндемичное растение Китая, содержит алкалоиды исоболдин и норисоболдин, проявивших в эксперименте высокую антиартритную активность [Li Y., 2015; Wei Z., 2015]. Природные изохинолины калифорнидин, дигидросангвинарин, корипальмин и N-метилауротетанин ингибируют пролилолигопептидазу, являясь перспективными агентами для лечения шизофрении, биполярных аффективных расстройств и связанных с этим различных психиатрических нарушений [Cahlikova L., 2015].

На сегодняшний день продолжается направленный синтез как природных алкалоидов, производных изохинолина (например, группы Бензо [с] фенантридина [Castillo J., 2015]), так и новых биологически активных соединений на основе производных изохинолина [Карцев В.Г., 2001; Шкляев Ю.В., 2001,2002; Ibrahim S., 2015; Melzer B., 2015; Nguyen H., 2015; Ogiyama, T., 2014]. Новые молекулы обладают антиагрегационными и гипотензивными свойствами [Михайловский А.Г.,2001; Глушков В.А., 2001], проявляют противосудорожную активность [Сиракян С.Н., 2001]. Введение различных радикалов в молекулу изохинолина и изменение их положения влияет на способность к связыванию и блокаде дофаминовых рецепторов [Shonberg J., 2015]. Производное двух молекул изохинолин-3-карбоновой кислоты и бензойной кислоты в предварительных исследованиях проявило низкую токсичность и высокую противоопухолевую активность [Gao F., 2015]. Выраженную противоопухолевую активность в отношении раковых клеток придает производным изохинолина способность ингибировать человеческую топоизомеразу 1 [Wilson C., 2013; Woode E., 2015]. Установлено, что 3-нитроинденизохинолины являются активными ингибиторами указанного фермента, при этом обладают высокой токсичностью, связанной с наличием нитрогруппы. Проведенное исследование [Beck D., 2015] показало, что замена нитрогруппы фтором или хлором не снижает ингибирующей активности.

Анальгетическое действие, проявляемое на моделях укусных корчей, формалиновой гипералгезии и модели нейропатической боли описано для алкалоида гелсимиона [Liu M., 2011; Wu Y., 2015].

Морфин – сильное обезболивающее средство, представитель фенантренизохинолиновых алкалоидов, получаемый из мака снотворного. Наличие побочных эффектов, сопровождающих применение морфина, является одной из причин, стимулирующей дальнейшие исследования по изучению обезболивающей активности производных изохинолина.

Для ряда изохинолиновых алкалоидов обнаружен обезболивающий эффект, механизм которого опосредован воздействием на семейство TRP-каналов. Высокая антиноцицептивная активность на моделях как острой, так и хронической боли, индуцированной воспалением, продемонстрирована для апорфинового алкалоида децентрина, причем значительная эффективность была получена на модели гипералгезии, вызванной введением коричневого альдегида, известного как активатор TRPA-каналов, но не капсаицина - TRPV-активатора [Montrucchio D., 2013]. Синтетическое производное изохинолина под условным шифром А-1165442 проявляет выраженную обезболивающую активность путем антагонистического взаимодействия с TRPV1 –каналами [Voight E., 2014]. Из серии карбамидных производных тетрагидроизохинолина была выделена часть соединений, также оказывающая анальгетический эффект на различных моделях боли и в биологических исследованиях подтвердившая антагонизм в отношении TRPV1 –каналов [Qiu Q., 2015]. Как известно, ТТХ-резистентные натриевые токи способствуют возникновению длительных последовательностей потенциалов действия (ПД), когда продолжительность тонического разряда на порядки превышает длительность вызвавших его коротких стимулов; такие сигналы передаются в спинной мозг и интерпретируются как болевые [Кулагина И.Б., 2011]. Была получена суммация анальгетического эффекта при совместном применении производного 1-изохинолин-5-ил-3-(4-трифторметил-бензил)-карбамида, ранее проявившего высокую антагонистическую активность в отношении TRPV1-каналов, с блокатором Nav1.8 подтипа ТТХ-резистентных натриевых каналов, установленная на модели воспалительной боли, индуцированной полным адьювантом Фрейнда [Joshi S.K., 2009]. 6-фосфонометил-дека-гидроизохинолин-3-карбоновой кислоты, являясь

антагонистом NMDA –рецепторов обладает способностью значительно усиливать анальгетический эффект бупренорфина [Fischer B.D.,2008].

Бисбензилизохинолиновый алкалоид тетрандрин, в исследовании обезболивающих свойств на модели липополисахарид (ЛПС)-индуцированной гипералгезии продемонстрировал значительное обезболивающее действие, механизм которого связывают со снижением продукции циклооксигеназы (ЦОГ) и простагландина E₂ [Zhao H. 2014]. Для другого бисбензилизохинолинового алкалоида курина была установлена способность ингибировать воспалительную фазу II в формалиновом тесте, снижать число болевых реакций в тесте уксусных корчей и, кроме того, снижать продукцию простагландина E₂ [Leite F., 2014].

Показано, что аминокислоты выполняют большой объем регуляторных и специфических функций [Wu G., 2009]. Введение в структуру фармакологически активных соединений молекулы аминокислоты изменяет их активность и токсичность. Введение в молекулу 3,4-диметоксифенилэтиламина радикалов аминокислот обуславливает более выраженный анксиолитический эффект [Федотова Ю.О., 2012]. Производное лизина, глутаминовой и 6-аминогексановой кислот обладает рибонуклеазной, мембранолитической и противовирусной активностями и может быть использовано в медицине как активный компонент для разработки лекарственных форм противовирусных препаратов [Королева Л.С., 2008]. Конъюгат с аминокислотой β-аланином проявляет выраженную седативную активность [Курьянов В.О., 2010]. При введении аминокислот в производные лигустразин-бетулиновой кислоты, обнаружено значительное усиление ранее выявленной противоопухолевой активности против ряда линий раковых клеток [Ху В., 2017]. На третьей стадии клинических исследований находится противоопухолевый препарат паклитаксел в виде конъюгированной формы с докозогексановой кислотой, демонстрирующий повышение максимально переносимой дозы и соответственно, снижение токсичности [Боят В., 2009]. Соединения, имеющие в структуре аминокислотную кислоту, проявили отчетливый противоязвенный и гастропротекторный эффекты на

экспериментальной модели язвообразования под действием диклофенака [Усанова А.А., 2015].

1.4 Влияние вспомогательных веществ на фармакологическую активность соединений. Современные инструментальные методы определения лекарственных соединений в плазме крови

Современная фармацевтическая промышленность обладает большим арсеналом вспомогательных веществ [Егошина Ю.А., 2009], оказывающих различное влияние на фармакокинетику и фармакодинамику лекарственных препаратов [Гаврилов А.С., 2010].

Полимерные вспомогательные вещества используются при разработке современных лекарственных форм, существенно влияя на фармакокинетические и фармакодинамические параметры содержащегося в них лекарственного препарата. Создание наночастиц на основе нерастворимого соединения тетрандрина и поливинилпирролидона значительно повысило его противоопухолевую активность [Ху Н., 2014]. В технологии микрокапсулирования используются различные вспомогательные вещества, в частности поливиниловый спирт [Степанова Э.Ф., 2015]. Конъюгирование интерферона бета-1а и полиэтиленгликоля позволило улучшить фармакокинетические параметры, снизить иммуногенность и повысить безопасность лекарственного препарата [Джелия А.Б., 2015]. Создаются мицеллы на основе полимерных производных аспарагиновой кислоты и полиэтиленгликоля, обеспечивающие контролируемое высвобождение лекарств [Gong C., 2016].

Значительная часть исследований направлена на увеличение времени действия (пролонгирование) лекарственного препарата. Включение лекарственного препарата в ниосомы, состоящие из полиэтиленгликоля в 7 раз увеличило период полувыведения данного препарата [Куличенко А. Н., 2014]. Достигнуто повышение продолжительности действия лекарственного вещества в

матрице поливинилпирролидона [Жердев В.П., 2015]. Широкое распространение в качестве вспомогательных веществ имеют производные целлюлозы [Аутлов С.А., 2013]. Введение в состав лекарственной формы производных целлюлозы (этилцеллюлозы (ЭЦ), гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ)) позволяет значительно изменять биодоступность и скорость высвобождения лекарственного вещества. За счет сочетания легкорастворимых лекарственных веществ с полимерами, ограниченно растворимых в биологических жидкостях, достигается пролонгирование действия. В качестве полимеров в том числе используются такие производные целлюлозы как метилцеллюлоза (МЦ), этилцеллюлоза (ЭЦ), гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ) и т.д. [Алексеев К.В., 2012]. Запатентована матрица с пролонгированным высвобождением триметазида, содержащая в своем составе гидроксипропилметилцеллюлозу (ГПМЦ) [Теслев А.А., 2013]. Использование ГПМЦ различных типов (гипромеллоза тип 2910 и гипромеллоза тип 2208) в качестве вспомогательного вещества обеспечило модифицированное и пролонгированное высвобождение действующему веществу метопролол [Емшанова С.В., 2012]. Исследование по созданию новой лекарственной формы кеторолака показали, что при введении в состав гидроксипропилцеллюлозы был, во-первых, сохранен анальгетический эффект, подтвержденный на модели отдергивание хвоста от луча света, а во-вторых, достигнута пролонгация указанного обезболивающего действия до 8 часов [Abou el Ela Ael S, 2014].

Твердые желатиновые капсулы являются одной из самых популярных лекарственных форм, что объясняется их высокой биодоступностью и целым рядом преимуществ [Гаврилов А.С., 2010]:

- 1) Разнообразный цвет капсул, исходя из чего облегчается распознавание пациентом.
- 2) Способность капсул корректировать вкус, запах или другие неприятные свойства лекарственного препарата.
- 3) Возможность пролонгирования и локализации действия, защиты от неблагоприятного воздействия желудочного сока путем помещения лекарственного препарата в кишечнорастворимую капсулу.

4) Капсулы позволяют порошкам одновременно быть в компактной, но не спрессованной форме, таким образом сочетать преимущества таблеток (компактность) и порошков (быстрое растворение и всасывание лекарственного средства).

Согласно опросам [Дмитриева Е.В., 2010], капсулы находятся на втором месте по популярности у потребителей, после таблеток.

Фармакокинетические исследования являются необходимым этапом разработки лекарственных препаратов, в том числе на доклиническом этапе. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии является одним из современных методов анализа в фармации, широко используемый для количественного определения большого числа разнообразных лекарственных препаратов. В качестве примера можно привести разработку количественного определения с использованием метода ВЭЖХ с УФ-способом детектирования и жидкофазной экстракцией в плазме крови крыс этилметилгидроксипиридина гемисукцината, позволяющий значительно удешевить метод исследования в сравнении с твердофазной экстракцией и масс-спектроскопическим методом исследования [Черных А.В., 2015]. Доказана возможность использования метода ВЭЖХ для количественного определения как опиоидных, так и неопиоидных анальгетиков, среди которых присутствуют в том числе, производные фенантренизохинолинов [Анисимова И.Е., 2004; Ваталев А.А., 2011].

В современной фармации основным принципом создания новых лекарственных соединений является направленный синтез путем химического модифицирования структуры известных синтетических и природных лекарственных веществ. При этом ожидается, что биологическая активность нового соединения окажется сравнительно большей, а побочные эффекты менее значимыми. При всем многообразии существующих анальгетических средств, как было показано выше, универсального обезболивающего средства, проявляющего выраженный эффект при всех видах боли и лишенного недостатков и побочных эффектов, на сегодняшний день не существует. Поэтому поиск новых веществ и изучение их анальгетической активности на стандартных экспериментальных

моделях с последующей разработкой лекарственной формы в виде желатиновых капсул представляется актуальным.

Выбор в качестве экспериментальных моделей те, которые имитируют соматогенные болевые синдромы (тест отведение хвоста от луча света, укусные корчи, формалиновой гипералгезии и механического раздражения основания хвоста) во многом был обусловлен преобладающей частотой встречаемости и разнообразием этих синдромов [Кукушкин М.Л., 2011].

Морфин является эталонным обезболивающим средством при оценке анальгетического эффекта в экспериментальных моделях на животных в качестве препарата сравнения [Брагин Е.О., 1991; Калюжный Л.В., 1984; Woode E., 2015]. Но при этом, как указывалось выше, не лишен ряда существенных недостатков. В данном исследовании в качестве препаратов сравнения были выбраны препараты кеторолак и трамадол по ряду следующих причин. Использование данных препаратов позволит сравнивать изучаемое соединение как с препаратами периферического (кеторолак - неизбирательный ингибитор циклооксигеназы), так и центрального (трамадол - анальгетик, механизм анальгетического действия которого включает наряду со стимуляцией опиоидных рецепторов активацию серотонинергической и адренергической систем) действия. Кроме того, высокая обезболивающая активность данных препаратов продемонстрирована на выбранных для исследования моделях (отведение хвоста от луча света, формалиновая гипералгезия) [Domer, F., 1990; Barreras-Espinoza I., 2016; Patiño-Samacho S., 2017]. Высокое анальгетическое действие кеторолака и трамадола сопоставимо с опиоидными анальгетиками, при отсутствии побочных эффектов, характерных для опиоидов [Twersky R.S., 1995; Rainer T.H., 2000; Jazayeri S.M., 2012].

Изменение молекулы изохинолина путем введения в нее аминоксановой кислоты позволило получить соединение 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминоксановой кислоты. Предпосылки наличия у группы производных изохинолинов обезболивающей активности, последующее введение аминоксановой кислоты, предполагающее снижение общей токсичности,

обусловили углубленное изучение анальгетической активности, общей токсичности и сопутствующих возможных побочных эффектов производного 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминоксановой кислоты. Предварительное исследование показало, что данное соединение обладает выраженной анальгетической активностью [Вихарев Ю.Б., 2005].

Целью настоящей работы явилось исследование анальгетической активности и безопасности соединения 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминоксановой кислоты – (далее соединение Г-104) и разработка на его основе капсулированной лекарственной формы.

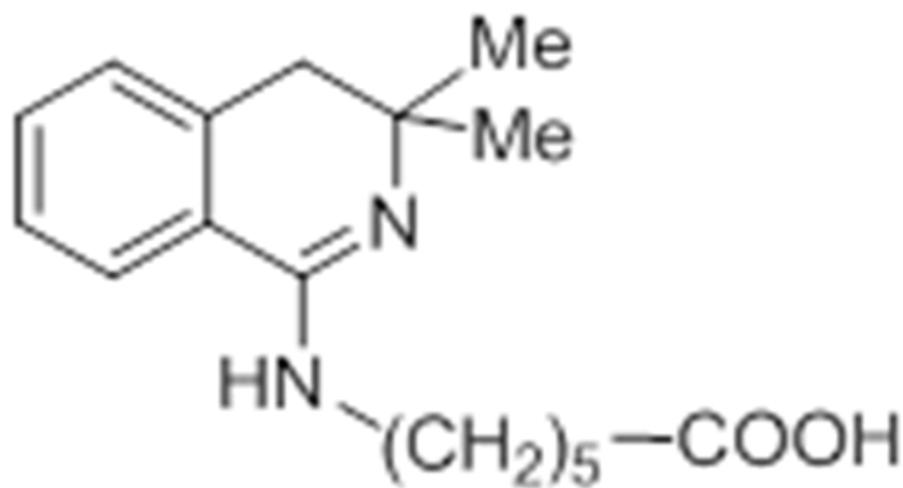


Рисунок 1. Химическая формула соединения 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминоксановой кислоты (условный лабораторный шифр - соединение Г-104).

ГЛАВА 2. Материалы и методы

2.1. Животные (тест- система) и их содержание

Все исследовательские работы с лабораторными животными выполнялись в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера, которые соответствуют требованиям Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях от 22.09.2010 г. На исследование получено разрешение Локального этического комитета при ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера (Приложение А).

Эксперименты выполнялись на белых нелинейных крысах обоего пола, массой 170,0–250,0 г, общее количество 300 особей, которые поступили из Питомника животных ФГУП ПЛЖ «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл., д. Рапполово). Группы морских свинок также состояли из животных обоего пола, массой 400-600 г. В исследование были отобраны животные без признаков отклонений в состоянии здоровья, так, чтобы разброс по исходной массе внутри экспериментальной группы не превышал $\pm 10\%$.

Каждому животному был присвоен индивидуальный номер: на различные участки тела крыс и морских свинок наносили определенные опознавательные знаки, либо определяли животное (морскую свинку) по характерным пятнам различной окраски со схематичным отображением в протоколе размещения этих пятен [Западнюк И.П., 1983].

Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, изложенным в санитарных правилах по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев) и в соответствии с Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации от 01 апреля 2016 г. №199н «Об утверждении правил лабораторной практики». Все процедуры по

рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП отдела доклинических исследований ЦНИЛ ПГМУ имени академика Е.А. Вагнера.

2.2. Исследование обезболивающей активности

2.2.1. Изучение анальгетической активности на различных моделях боли

2.2.1.1. Исследование обезболивающего действия на модели термической соматической боли

В настоящее время существует несколько методов оценки термической боли. В данном исследовании в качестве модели термической боли был выбран тест отведения хвоста от теплового излучения.

Тест отведения хвоста от теплового излучения

Метод основан на спинальном флексорном рефлексе в ответ на прогрессивно увеличивающееся воздействие теплового излучения на кожную поверхность. Болевое раздражение наносили на хвост локально, воздействуя постепенно увеличивающимся тепловым излучением с использованием оборудования Tail-flick Analgesia Meter (ИТС Inc/ Life Science, США). Регистрировали латентный период реакции отдергивания хвоста (время избавления от болевого раздражителя). Максимальное время экспозиции составляло 20 секунд. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое увеличение латентного периода реакции после введения изучаемого соединения [Воронина Т.А., 2012].

2.2.1.2. Исследование обезболивающего действия на модели механической соматической боли

Дозированное механическое раздражение основания хвоста крыс с помощью зажима (метод Гаффнера)

Тест зажима основания хвоста основан на раздражении низкпороговых механорецепторов и ноцицепторов рецептивного поля врожденного рефлекса скручивания к основанию хвоста крысы. Врожденную оборонительную реакцию крыс на защемление корня хвоста специальным зажимом оценивали по 4

балльной шкале: 0 – отсутствие реакции; 1 - вздрагивание и вокализация; 2 - побежка вперед; 3 - скручивание к основанию хвоста и кусание зажима.

Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое уменьшение интенсивности болевых реакций, оцененной в баллах, относительно контрольной группы.

2.2.1.3. Исследование обезболивающего действия на моделях боли, вызванной альгогенами

Химические тесты основаны на изменении чувствительности С-полимодалных ноцицепторов в присутствии медиаторов воспаления или при изменении рН.

Модель соматической боли, вызванной альгогенами (формалиновый тест)

Острую воспалительную реакцию вызывали субплантарным (под подошвенный апоневроз) введением 5% формалина (50 мкл на крысу). Регистрировали число болевых реакций (постукивание лапы об пол, встряхивание и облизывание) в течение первых 5-10 минут (I фаза) и с 30 по 50 минуты – (II фаза). Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое уменьшение числа болевых реакций в группе экспериментальных животных после введения лекарственного соединения относительно контрольной группы.

Модель висцеральной боли, вызванной альгогенами (тест уксусных корчей)

Внутрибрюшинное введение веществ, раздражающих серозные оболочки, вызывает у крыс сокращения абдоминальной мускулатуры. В эксперименте регистрировали число характерных двигательных реакций (лордозов, «корчей») на протяжении 20 мин после внутрибрюшинного введения 0,75% раствора уксусной кислоты из расчета 0,5 мл на крысу. Критерием анальгетического эффекта считали статистически значимое уменьшение числа «корчей» в группе экспериментальных животных после введения лекарственного соединения относительно контрольной группы.

2.2.2. Расчет средней эффективной дозы ($ЭД_{50}$) соединения Г-104

Средняя эффективная доза ($ЭД_{50}$) – это доза, вызывающая реакцию у 50 % экспериментальных животных [Беленький М.Л., 1968]. Расчет средней эффективной дозы ($ЭД_{50}$) производили по методу Личфилда-Уилкоксона в модификации Рота [Беленький М.Л., 1968].

2.2.3. Препараты сравнения

В качестве препаратов для сравнительной оценки анальгетической активности исследуемого соединения Г-104 были выбраны:

1. Кеторолак – представитель анальгетиков группы нестероидных противовоспалительных средств (НПВС), механизм действия которых связан с ингибированием фермента циклооксигеназы (ЦОГ) и снижением выработки простагландинов. Данный класс анальгетических препаратов относится к анальгетикам, действующим преимущественно в периферических тканях.

2. Трамадол – анальгетик смешанного механизма действия, включающего в себя как опиоидный, так и неопиоидный компоненты. Действие данного анальгетика реализуется преимущественно в центральной нервной системе.

Для введения экспериментальным животным использовались:

- Кеторолак – субстанция, ЗАО «Активный компонент», серия 10310, годен до 12.2015;
- Трамадол – капсулы, 50 мг, № 20, ООО «Озон», серия 04.08.11, годен до 09.2014.

Оба препарата вводили перорально (внутрижелудочно, путем погружения металлического атравматичного зонда в желудок) в виде раствора в воде очищенной.

Субстанция Кеторолака подготовки для растворения не требовала. Терапевтическая доза лекарственного средства Кеторолак для крысы была рассчитана следующим образом. Разовая доза Кеторолака для человека равна 10 мг. Терапевтическая (разовая) доза Кеторолака на массу тела человека равна 10 мг

/70 кг=0,14 мг/кг. Используя рекомендованную таблицу пересчета доз [Хабриев Р.У., 2005] получили:

$$\text{Доза человека} \times \text{Коэффициент человека} / \text{Коэффициент крысы} = 0,14 \text{ мг/кг} \times 39/6,5 = 0,85 \text{ мг/кг}$$

Терапевтическая доза лекарственного средства Трамадол для крысы была рассчитана следующим образом. Разовая доза Трамадола для человека равна 50 мг. Терапевтическая (разовая) доза Трамадола на массу тела человека равна 50мг/70 кг=0,71 мг/кг. Используя рекомендованную таблицу пересчета доз [Хабриев Р.У., 2005] получили:

$$\text{Доза человека} \times \text{Коэффициент человека} / \text{Коэффициент крысы} = 0,71 \text{ мг/кг} \times 39/6,5 = 4,29 \text{ мг/кг} = 0,429 \text{ мг/100 грамм.}$$

Содержимое капсул Трамадола было предварительно извлечено и вводилось в эквивалентном объеме исходя следующего расчета: содержимое капсулы с 50 мг Трамадола растворялось/суспендировалось в 50 мл воды. В 0,1 мл данного раствора/суспензии содержалось 0,1 мг Трамадола, на 100 грамм массы крысы использовалось 0,43 мл полученного раствора/суспензии, содержащее 0,429 мг Трамадола. Данный подход обеспечивал равномерное распределение всего количества Трамадола и позволял нивелировать наличие вспомогательных веществ.

2.2.4. Изучение механизма действия

В предварительных исследованиях в качестве предполагаемого механизма действия был указан серотонинергический механизм [Вихарев Ю. Б., 2005]. Вместе с тем, на сегодняшний день существует препарат Трамадол, проявляющий выраженное обезболивающее действие, имеющий в своем механизме действия наряду с активацией серотонинергической системы влияние на опиоидные рецепторы. Данный препарат был использован в исследовании в качестве препарата сравнения. В связи с этим, на первом этапе было исследовано возможное участие опиоидной системы в обезболивающем механизме действия изучаемого соединения Г-104. Для блокады всех подтипов опиоидных рецепторов

был использован полный антагонист налоксон (1 мг/кг, п/к). Оценку анальгетического действия на фоне введенного налоксона (n=8) проводили на моделях отведения хвоста от луча света и укусыные корчи в сравнении с контрольной группой, получавшей эквивалентное количество воды очищенной (n=8) и группой, получавшей соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) (n=8). Регистрировали изменения латентного периода наступления болевой реакции в тесте отведения хвоста от луча света и количество укусыных корчей в тесте укусыные корчи согласно методикам, изложенным в п. 2.2.1. Снижение обезболивающего действия на фоне введенного налоксона при сравнении с группой контроля и группой, получавшей соединение Г-104 интерпретировали как возможность вовлеченности опиатных рецепторов в механизм действия изучаемого соединения Г-104.

Предположение о том, что серотонин играет исключительно важную роль в регуляции болевой чувствительности было получено впервые около 50 лет назад в опытах [Tenen S.S., 1968], которые показали, что угнетение синтеза серотонина с помощью внутрибрюшинно введенного параклорфенилаланина (ПХФА) – ингибитора триптофангидроксилазы, уменьшает анальгетический эффект морфина. Полученные результаты позднее были подтверждены во многих опытах [Messing R.B., 1977] с использованием различных методов оценки болевой чувствительности: длительности периодов отведения хвоста в тесте тепловой иммерсии хвоста при погружении в горячую воду [Woolf C.J., 1980], на модели горячая пластинка [Malec D., 1980; Botting R., 1982]. Участие серотонинергической системы в обезболивании на сегодняшний день не вызывает сомнений [Zhang Y.Q., 2000]. Доказано обезболивающее действие селективных ингибиторов обратного захвата серотонина циталопрама и пароксетина на модели воспалительной боли, которое блокировалось на фоне введения антагониста 5-HT₂ рецепторов метисергида [Lee B.S., 2012]. Избирательный ингибитор обратного нейронального захвата серотонина флуоксетин проявляет обезболивающее действие на модели нейропатической боли [Baptista-de-Souza D., 2014], вызывает увеличение порога болевых реакций в тесте механической

гиперальгезии при воспалении, которое значительно нивелируется в присутствии ципрогептадина, избирательного антагониста 5-HT₂ рецепторов [Kostadinov I.D., 2014].

Для установления участия серотонинергической системы в обезболивающем механизме действия соединения Г-104 были использованы антагонист серотониновых 5HT-2 рецепторов метисергид (1 мг/кг внутривбрюшинно), и ингибитор синтеза серотонина парахлорфенилаланин (150 мг/кг, внутривбрюшинно, 3 дня). Данные дозы веществ и курс введения парахлорфенилаланина широко используются для экспериментального истощения серотониновой системы [Aydın T.H., 2016; Maleki N., 2005; Lee J.H., 2014]. Экспериментальные животные были разделены на 4 группы: крысы (n=8), получавшие соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о), крысы (n=8), получавшие соединение Г-104 + метисергид (1 мг/кг, в/б, Sigma, США), крысы (n=8), получавшие соединение Г-104 +парахлорфенилаланин (1 мг/кг, в/б, Sigma, США), крысы (n=8), получавшие воду очищенную (1мл/100 грамм). Парахлорфенилаланин вводился в течение трех дней до начала эксперимента с целью значительного снижения уровня серотонина, антагонист метисергид вводился за 15 минут до введения соединения Г-104. Оценку болевой чувствительности проводили на модели отведения хвоста от луча света (Tail-flick Analgesia Meter (ИТС Inc/ Life Science, США), регистрировали латентный период наступления болевой реакции. Максимальное время экспозиции составляло 20 секунд. Критерием вовлеченности серотонинергической системы в обезболивающий механизм соединения Г-104 считали статистически значимое уменьшение латентного периода наступления болевой реакции в группах, получивших метисергид и/или парахлорфенилаланин в сравнении с группой, получившей соединение Г-104, и отсутствие статистически значимых отличий при сравнении данных экспериментальных групп с контрольной группой.

Дополнительно было исследовано участие холинергической и дофаминергической систем в реализации обезболивающего эффекта соединения

Г-104. С этой целью анальгетический эффект соединения Г-104 был изучен на фоне предварительно введенного полного блокатора М-холинорецепторов атропина (1 мг/кг, в/м) и блокатора дофаминовых рецепторов галоперидола (0,05 мг/кг, в/б). Атропин и галоперидол вводили за 15 минут до введения соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о). Регистрировали латентный период наступления болевой реакции в тесте отведения хвоста от луча света. Уменьшение времени наступления болевой реакции интерпретировали как снижение обезболивающего эффекта на фоне соответствующего антагониста и, как следствие, участие указанной системы в механизме действия изучаемого соединения Г-104.

2.3. Оценка сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для анальгетиков. Изучение дополнительных свойств

2.3.1 Изучение влияния на дыхательный центр

Влияние на частоту и объем дыхания проводили на ненаркотизированных крысах [Воронина Т.А., 2012] (n=8). Графическую регистрацию дыхательных движений производили с помощью системы PowerLab 4/35 и компьютерной программы LabChart 8 (ADInstruments Ltd, Австралия). Рассчитывали количество дыхательных движений в минуту, учитывали случаи возникновения патологических форм дыхания (дыхание Чейн-Стокса, Кусмауля, Биота, агональное). Регистрацию проводили до введения соединения Г-104 (фон) и спустя 60 минут после перорального приема соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг.

2.3.2 Оценка толерантности к обезболивающему действию

При изучении толерантности к анальгетическому действию соединение Г-104 вводили перорально крысам (n=8) в дозе 30 мг/кг в течение 28 дней. Оценивали изменение анальгетической активности в тестах болевой чувствительности (отведение хвоста от луча света и укусные корчи) по методикам, изложенным в п. 2.2.1. «Изучение анальгетической активности соединения Г-104 на различных моделях боли».

2.3.3 Изучение синдрома отмены

Оценку синдрома отмены проводили без провокации налоксоном [Воронина Т.А., 2012]. Изучаемое соединение Г-104 вводили в течение 28 дней 1 раз в день перорально в дозе 30 мг/кг (n=8). На второй день после отмены вещества регистрировали следующие признаки синдрома отмены [Воронина Т.А., 2012; Константинопольский М.А., 2013]: прыжки, тремор по типу «барабанного боя», скрежет зубами, отряхивание, пилоэрекция, птоз, судороги, вокализация, ринорея, диспноэ, носовое кровотечение, жевание, развитие гиперальгезии в тесте отведения хвоста от луча света. Критерием развития синдрома отмены считали проявление гиперальгетического действия и выявление указанных признаков относительно контрольной группы, получавшей растворитель воду очищенную.

2.3.4 Изучение аддиктивного потенциала

Под аддиктивным потенциалом фармакологических средств понимают их способность вызывать патологическое пристрастие. В данной работе была использована условно-рефлекторная реакция предпочтения места [Звартау Э.Э., 2001]. Экспериментальная установка состояла из камер прямоугольной формы, которые были разделены на две половины: с белым цветом пола и черным цветом пола, так же отличающиеся по текстуре. Протокол исследования предусматривал периоды обусловливания и тестирования. Период фармакологического обусловливания продолжался 4 дня. Каждый день проводили две сессии выработки условного рефлекса на место. Первая сессия являлась дифференцировочной. Перед помещением в один из отсеков животным вводили растворитель – воду очищенную. Во время второй сессии вводили исследуемое соединение Г-104 в дозе 30 мг/кг, п/о (n=8) (в контрольной группе (n=8) – воду очищенную) перед помещением животного в противоположный отсек. Время нахождения в отсеке - 45 минут. Размещение животных после введения в том или ином отсеке производили в случайном порядке таким образом, что половину группы размещали в данном отсеке после введения исследуемого соединения, а

другую половину - после введения растворителя. После каждого опыта камеры обрабатывали 3% раствором перекиси водорода.

Заключительное тестирование выработки условного рефлекса на место проводили через 72 часа после последнего обусловливания. Из камеры вынималась перегородка между отсеками и в течение 15 минут крысы свободно исследовали экспериментальную камеру. Регистрировали время нахождения в отсеках и количество переходов из одного отсека в другой. Время, проводимое в отсеке, ассоциированном с действием изучаемого соединения Г-104, сравнивали со временем нахождения в отсеке, ассоциированном с растворителем. Положительное значение разности двух величин указывало на выработку УРПМ. За критерий предпочтения условно принималось время нахождения в данном отсеке более $2/3$ (более 600 сек) или, соответственно менее $1/3$ (300 сек) от общего времени теста (900 сек). Этот критерий примерно соответствует диапазону доверительных границ для животных контрольной группы [Звартау Э.Э., 2001].

2.3.5 Изучение влияния на спонтанную двигательную активность и эмоциональность

В качестве оценки степени воздействия на структуру поведения, в частности эмоциональность, горизонтально-вертикальную двигательную активность и исследовательскую активность был выбран тест «открытое поле» [Буреш Я., 1991]. Исследование проводилось при пероральном введении в следующих дозах: соединение Г-104 30, 150 и 300 мг/кг и препараты сравнения Трамадол 4,29 мг/кг и Кеторолак 0,85 мг/кг. Контрольной группе животных вводили воду очищенную. Каждая экспериментальная группа состояла из 8 животных. После введения животное помещалось в установку «открытое поле» и на протяжении 3-х минут у животного фиксировались следующие показатели: горизонтальная активность (число пересеченных квадратов); вертикальная активность (число стоек с опорой и без нее на край клетки); исследовательская активность (количество заглядываний в отверстия); эмоциональность и ее

вегетативные проявления (дефекация); груминг; латентное время начала движения.

Горизонтальная активность

Как правило, крысы реагируют замиранием на новые, потенциально опасные стимулы. Помещение животного в тест-систему «открытое поле» позволяет оценить как замирание, так и отдельные элементы активности, в частности число пересеченных квадратов как показатель горизонтальной активности.

Вертикальная и исследовательская активность

Вертикальная двигательная активность (ВДА) животных в открытом поле представлена двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу, а передние упираются в стенку поля (Climbing) или остаются на весу (Rearing). В качестве показателя вертикальной активности было выбрано общее число стоек. Оценку исследовательской активности проводили путем подсчета проявлений «норкового» рефлекса, выражающегося в засовывании головы внутрь отверстий в полу тест-системы «по глаза».

Эмоциональность и ее вегетативные проявления

Эмоциональные состояния также сопровождаются различными вегетативными явлениями (ускорение сердечного ритма, гальваническая кожная реакция, расширение зрачков и т.д.). Вегетативная функция, которую удобно учитывать вместе с измерением активности, - это дефекация. Те животные, которые меньше передвигаются и у которых наблюдается большая дефекация в ситуации открытого поля, считаются более эмоциональными, чем те, которые много передвигаются, но имеют низкий уровень дефекации. В данном исследовании подсчитывалось количество актов дефекации.

Груминг

Вторым наиболее распространенным видом активности после сна является груминг (15-20% от всей активности крысы) [Калуев А.В., 1999], заключающийся главным образом в вылизывании и почесывании. Груминг помимо прямой биологической функции, часто встречается у грызунов как важный элемент

поведения. Наряду с зеванием и потягиванием груминг традиционно относят к категории комфортного поведения. С другой стороны, хорошо известно, что именно у грызунов груминг специфически активизируется при действии стресса, и поэтому считается одним из его поведенческих маркеров. Сильный стресс или введение определенной группы препаратов приводит к снижению двигательной и исследовательской активности грызунов на фоне заметно возросшего груминга [Калуев А.В., 1999].

Латентное время начала движения

Как выше было отмечено, крысы реагируют замиранием при помещении в «открытое поле». Изменение латентного времени начала движения свидетельствует о снижении/увеличении страха и эмоционального стресса.

2.3.6 Влияние на координацию и мышечный тонус в тестах «горизонтальная проволока» и «Ротарод»

Оценка мышечного тонуса в тесте «горизонтальная проволока» [Буреш Я., 1991]

Соединение Г-104 вводили перорально в дозе 30 мг/кг (n=8). Крыс подвешивали за передние лапы к металлической проволоке, натянутой горизонтально на высоте 30 см от поверхности стола. Животные с ненарушенным мышечным тонусом быстро подтягивались и удерживались на перекладине четырьмя лапами в течение 5 секунд и более. Невыполнение этого рефлекса свидетельствовало о нарушении мышечного тонуса и неврологическом дефиците. Полученные результаты сравнивали с препаратами Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамаadolом (4,29 мг/кг, п/о).

Влияние соединения Г-104 на координацию движений

Оценку влияния соединения Г-104 на координацию движений проводили на установке вращающегося стержня для крыс (Аппаратно-программный комплекс Ротарод, Нейроботикс, Россия). Установка представляла собой горизонтальный стержень диаметром 70 мм, разделенный пластинами диаметром 370 мм на 4 отсека. Стержень вращали со скоростью 5 оборотов в минуту в

течение 2 минут [Воронина Т.А., 2012]. Тестирование проводили спустя 60 минут от перорального введения соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг (n=8) и препаратов сравнения Кеторолака (0,85 мг/кг) и Трамадола (4,29 мг/кг). Неспособность животных удержать равновесие в течение 2 минут рассматривали как нарушение координации движения.

2.3.7 Оценка влияния на рефлекторную деятельность

Для данного вида тестирования использовали поздние реакции [Буреш Я., 1991], которые вызывались адекватными стимулами, воздействующими через соответствующие рецепторы на специфические сегментарные центры, которые в то же время регулируются головным мозгом как единым целым. Иерархия исследуемых уровней включала следующее:

- Продолговатый мозг (реакция вздрагивания на резкий звук). В норме на громкий хлопок руками крыса реагирует замиранием, вытягиванием задних и сгибанием передних конечностей, глаза животного закрыты, а уши прижаты назад.

- Варолиев мост и средний мозг (координационный тест, рефлекс переворачивания).

а) При подбрасывании животного вверх ногами с высоты 40 см на мягкую поверхность (вату или полиуретановую подстилку), оно переворачивается во время падения и приземляется на четыре лапы.

б) Крысу кладут на спину. Когда голова фиксируется рукой, переворачивание начинается с задних конечностей.

- Кора головного мозга (реакция постановки лапы на опору). Крысу держат на краю стола и сдвигают одну заднюю конечность так, чтобы она свешивалась с края стола. Лапа немедленно будет подтянута на поверхность стола.

Оценка рефлекторной деятельности была проведена спустя 60 минут от введения соединения Г-104 в дозах 30, 150 и 300 мг/кг перорально. Каждая группа состояла из 8 животных.

2.3.8 Изучение влияния на сердечно-сосудистую систему

Оценку влияния на сердечно-сосудистую систему проводили путем регистрации электрокардиограммы (ЭКГ). Регистрацию ЭКГ проводили на ненаркотизированных крысах (n=8) с помощью прибора «Физиобелт» (ООО «Медицинские компьютерные системы», Россия). Измеряли величины зубцов P, R, S, T, (зубец Q у крыс отсутствует) в милливольтках (мВ), интервалы PQ, QR, комплекс QRS, QT, RR, TP в секундах (с), рассчитывали частоту сердечных сокращений (ЧСС=60/RR). Учитывали случаи нарушений сокращений сердца. Регистрацию проводили до введения вещества и через 60 минут после перорального введения соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг.

2.3.9 Изучение ulcerогенного действия и влияния на моторику желудочно-кишечного тракта

Исследование ulcerогенного действия соединения Г-104 проводили на крысах путем макроскопического и гистологического исследований слизистой оболочки желудка согласно общепринятой методике [Шварц Г.Я., 2012]. Исследуемое соединение вводилось белым нелинейным крысам в течение 4 дней в дозе ЭД₅₀ 30 мг/кг (n=8), дозах 150 мг/кг (n=8) и 300 мг/кг (n=8). По истечении периода введения животные подвергались эвтаназии, желудок и часть пищевода выделялись и детально исследовались на предмет обнаружения повреждений. Оценку ulcerогенного действия проводили по 4-х бальной шкале: 0 – отсутствие повреждений, 0,5 – гиперемия, 1 – единичные незначительные повреждения (1 или 2 точечных кровоизлияния); 2 – множественные кровоизлияния (эрозии, точечные кровоизлияния); 3 – значительные и множественные повреждения (эрозии, кровоизлияния); 4 – грубые повреждения, охватывающие всю поверхность слизистой (массивные кровоизлияния, эрозии, перфорации). Критерием ulcerогенности считали наличие проявлений, соответствующих 2 баллам и выше.

Влияние на моторику желудочно-кишечного тракта оценивали в опытах на крысах (n=6). Животные не получали пищи в течение 17-22 часов, питье не ограничивалось. Через 60 минут после перорального введения исследуемого соединения Г-104 30 мг/кг и препаратов сравнения Кеторолак 0,85 мг/кг и Трамадол 4,29 мг/кг крысам в желудок вводили взвесь (5% суспензия) черного активированного угля. Учитывали консистенцию и скорость/время выхода активированного угля в сравнении с контрольной группой и препаратами сравнения [Гацура В.В., 1974].

2.3.10 Оценка противокашлевого эффекта

Оценку противокашлевого действия исследуемого соединения Г-104 проводили на классической модели кашля у морских свинок, индуцированного лимонной кислотой [Гацура В.В., 1974; Утешев Д.Б., 2012]. Эксперимент проводился на морских свинках без учета половой принадлежности массой 400-500 грамм (n=8). Перед началом исследования (за 14 – 16 часов до исследования), животных лишали корма. Морскую свинку помещали в затравочную камеру, и в течение 5 минут с помощью парового ингалятора ингалировали аэрозоль 20% раствора лимонной кислоты.

Эксперимент состоял из 2 этапов. На первом этапе животных индивидуально тестировали по интенсивности реакции на лимонную кислоту за день до введения испытуемого вещества. В исследование были отобраны интенсивно кашляющие морские свинки (в среднем 10 – 20 кашлевых приступов в течение 5 минут). На втором этапе (на следующий день) испытывали собственно противокашлевые свойства изучаемого вещества. Для этого животным за 60 минут до индукции кашля вводилось исследуемое соединение Г-104. После этого морскую свинку подвергали воздействию 20% раствора лимонной кислоты и подсчитывали количество приступов кашля в течение 5 минут.

2.4. Определение острой токсичности

Изучение острой токсичности проводилось согласно стандартным методикам, приведенным в действующем Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Арзамасцев Е.В., 2012]. Исследуемое соединение Г-104 вводили перорально через металлический атравматичный зонд в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксоу, медленно погружая зонд до желудка. Для достижения больших доз соединение Г-104 вводили животным многократно с интервалами 30 минут. Общее время введения не превышало 6 часов. Для исследования острой токсичности была выбрана доза 2000 мг/кг, как рекомендованная к исследованию, и дозы, меньше и больше 2000 мг/кг. Период наблюдения составил 14 суток [Арзамасцев Е.В., 2012]. Каждую дозу соединения Г-104 вводили экспериментальным группам по 5 (крысы) и 5 (морские свинки) животных обоего пола из расчёта на массу тела.

2.4.1. Экспериментальные группы животных при исследовании острой токсичности соединения Г-104

Таблица 2.4.1.1. - Дизайн исследования острой токсичности соединения Г-104 при пероральном введении на крысах и морских свинках

№ группы	Пол	Количество животных (М/ F)	Исследуемое ЛС	Доза ЛС мг/кг		Режим введения
				Разовая	Суммарная	
<i>КРЫСЫ</i>						
1	М/Ф	5/5	Г-104	1000	1000	Перорально, однократно
2	М/Ф	5/5	Г-104	2000	2000	
3	М/Ф	5/5	Г-104	3000	3000	
4	М/Ф	5/5	Г-104	4000	4000	
5	М/Ф	5/5	Г-104	6000	6000	
<i>МОРСКИЕ СВИНКИ</i>						
1	М/Ф	5/5	Г-104	1000	1000	Перорально, однократно
2	М/Ф	5/5	Г-104	2000	2000	
3	М/Ф	5/5	Г-104	3000	3000	
4	М/Ф	5/5	Г-104	4000	4000	
5	М/Ф	5/5	Г-104	6000	6000	

2.4.2. Оценка интегральных показателей

Оценку влияния введения соединения Г-104 при исследовании острой токсичности на интегральные показатели проводили согласно действующему Руководству [Арзамасцев Е.В., 2012]:

2.4.2.1 Оценка влияния на массу тела животных. Животных взвешивали при формировании групп, перед введением лекарственного соединения (фон), а также на 2, 7, 10 и 14 сутки после введения при исследовании острой токсичности соединения Г-104.

2.4.2.2. Оценка влияния на потребление корма и воды. Ежедневно оценивали влияние острого введения соединения Г-104 на потребление корма и воды экспериментальными животными.

2.4.3. Изучение клинической картины интоксикации при исследовании острой токсичности

При изучении острой токсичности на фоне введения соединения Г-104 отмечали проявление и выраженность патологических признаков: наличия аномальных поз, аномальных движений, самотравмирования, тремора, судорог, синдрома Штраубе [Белозерцева И., 2015]. При наличии изменений фиксировали сроки их обратимости.

2.4.4. Изучение влияния на гематологические и биохимические показатели крови

Кровь для гематологических исследований забирали в дни проведения плановой аутопсии у обоих видов животных (морские свинки и крысы) из сердца, собирали в пробирки с ЭДТА в количестве 0,2 мл и тщательно перемешивали. Общий клинический анализ проводили на гематологическом анализаторе Abacus 2000 (Diatron, Австрия) непосредственно после взятия проб по параметрам:

- Количество эритроцитов (RBC), (10^{12} /л)
- Количество лейкоцитов (WBC), (10^9 /л)
- Концентрация гемоглобина (HGB), (г/л)
- Гематокрит (HCT), (%)
- Количество тромбоцитов (PLT), (10^9 /л)

Среднее содержание гемоглобина в клетке (MCH), (pg)
Средняя концентрация гемоглобина в клетке (MCHC), (г/л).

Кровь для биохимического исследования забирали в дни проведения плановой аутопсии из сердца в количестве 5 мл (морские свинки) и 3 мл (крысы) в пластиковые пробирки без антикоагулянта. В сыворотке крови определяли следующие биохимические показатели:

- Общий белок, г/л
- Альбумины, г/л
- Холестерин, ммоль /л
- Триглицериды, ммоль/л
- Билирубин общий, мкмоль/л
- Глюкоза, ммоль/л
- Мочевина, ммоль/л
- Креатинин, мкмоль/л
 - Активность аспаратаминотрансферазы (АсТ), Ед/л
 - Активность аланинаминотрансферазы (АлТ), Ед/л
 - Активность щелочной фосфатазы (ЩФ), Ед/л.

2.4.5. Патоморфологические исследования при изучении острой токсичности

Эвтаназия. Эвтаназию крыс и морских свинок осуществляли через 14 дней после исследования острой токсичности соединения Г-104 путем помещения животных в камеру, содержащую пары этилового эфира для наркоза.

Патологоанатомические исследования

Для оценки повреждающего действия соединения Г-104 на внутренние органы и ткани каждое животное было подвергнуто аутопсии. При аутопсии детально исследовали внешнее состояние тела, полость черепа, грудную и брюшную полости с органами и тканями, шею с органами и тканями. У всех животных, подвергнутых эвтаназии, были извлечены и взвешены следующие внутренние органы: тимус, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, надпочечники, поджелудочная железа, желудок, головной мозг.

2.5. Разработка лекарственной формы соединения Г-104

В качестве разрабатываемой лекарственной формы были выбраны твердые желатиновые капсулы. Использовали капсулы твердые желатиновые «Кони Снеп»

производства Капсуджель, отделение Пфайзер, Бельгия, которые отвечают требованиям НД 42-10132-05. Состав капсул твёрдых желатиновых № 0 желтого цвета с крышечками желтого цвета: желатин, вода, титана диоксид, краситель солнечный закат желтый, краситель хинолиновый желтый.

Улучшение технологических свойств соединения Г-104 проводили путем добавления вспомогательных веществ: натрий карбоксиметилцеллюлозы (На-КМЦ), гидроксипропилцеллюлозы (ГПЦ), гидоксиэтилцеллюлозы (ГЭЦ) метилцеллюлозы-100 (МЦ-100). К стандартной навеске субстанции Г-104 добавляли растворы указанных вспомогательных веществ (3%-5%) до достижения необходимой консистенции. После чего полученную массу высушивали в вакуум-сушильном шкафу при температуре 60°. Грануляты просеивали через сито с диаметром отверстий 1 мм.

Основными показателями, оказывающими влияние на технологический процесс заполнения готовых желатиновых капсул, являются *сыпучесть* (с вибрацией и без вибрации), *насыпная плотность* (с уплотнением и без уплотнения), *угол естественного откоса*, которые оценивались у изучаемой субстанции Г-104 и гранулятов на ее основе.

Фракционный (гранулометрический) состав субстанции определяли по стандартной методике ГФ XIII изд., методом ситового анализа, просеиванием 100,0 порошка через систему сит с различным диаметром отверстий.

Насыпную плотность определяли стандартным методом путем свободной засыпки и засыпки с уплотнением вибрацией материала (с помощью устройства для вибрационного уплотнения порошков) в определенный объем с последующим взвешиванием.

Сыпучесть материала оценивали по скорости высыпания субстанции или гранулята из виброворонки серийного прибора ВП-12А с диаметром выпускаемого отверстия 12 мм с вибрацией и без вибрации.

Угол естественного откоса определяли с помощью угломера после высыпания материала из виброворонки серийного прибора ВП-12А. При интерпретации результатов экспериментов учитывали то, что угол естественного

откоса для хорошо сыпучих материалов должен изменяться в пределах от 25° до 30°, для связных материалов от 60° до 70°.

У полученных капсул, содержащих фармацевтические композиции соединения Г-104, оценивали технологические параметры: *распадаемость, однородность массы дозированных лекарственных форм, стабильность.*

Распадаемость оценивали согласно требованиям Государственной фармакопеи (ГФ) XIII «Общая фармакопейная статья (ОФС).1.4.1.0005.15 Капсулы», указывающей, что капсулы должны распадаться в воде за 30 минут и требованиям ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул».

Показатель «*Однородность массы дозированных лекарственных форм*» изучали согласно ГФ XIII «ОФС.1.4.2.0009.15. Однородность массы дозированных лекарственных форм», учитывая, что для капсул, содержащих более 300 мг действующего вещества допустимо отклонение 7,5%.

Изучение *стабильности* проводили в естественных условиях в сухом, защищенном от света месте при температуре 25±2 С° и относительной влажности не более 60%. согласно ГФ XIII «ОФС.1.1.0009.15. Сроки годности лекарственных средств».

2.6. Изучение фармакокинетики и фармакодинамики субстанции и фармацевтических композиций соединения Г-104

2.6.1 Регламент эксперимента

Лабораторные животные. Изучение фармакокинетики соединения Г-104 проводили на белых нелинейных крысах одного пола (n=35).

Биологический материал. Важнейшим элементом фармакокинетического изучения фармакологического средства является исследование динамики изменения его концентрации в крови, поэтому в качестве биоматериала была выбрана плазма крови. Фармакокинетику соединения Г-104 исследовали исходя из предполагаемого пути введения для клинических исследований – перорального, в виде раствора в воде очищенной.

Режим введения и дозы. Фармакокинетику соединения Г-104 исследовали при однократном введении через определенные временные интервалы (таблица 2.6.1). Согласно предварительным результатам, ЭД₅₀ исследуемого соединения Г-104 для крыс при пероральном пути введения на разных моделях боли составила 30 мг/кг. Поэтому для исследования была выбрана доза 30 мг/кг, которая отражала желаемый фармакологический эффект без признаков побочного действия. Соединение Г-104 вводили в виде субстанции и в составе фармацевтических композиций в смеси со вспомогательными веществами (На-КМЦ, ГЭЦ, ГПЦ, МЦ).

Таблица 2.6.1 – Схема отбора проб при пероральном пути введения

Точка	P0	P1	P2	P3	P3	P5	P6	P7
Время от момента введения	0,0	0,5	1,0	2,0	4,0	6,0	8,0	24,0

Методы количественного определения соединения Г-104

Количественное определение соединения Г-104 в плазме крови крыс проводили по разработанной и валидированной нами методике методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (Приложение Б).

2.6.2 Анализ фармакокинетических и фармакодинамических данных

Исходя из полученных данных, были построены фармакокинетические кривые, по которым анализировали:

1) Площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» (AUC), которая является основным фармакокинетическим параметром и характеризует биологическую доступность лекарственного средства.

$$AUC = \frac{C_1}{2} \Delta t_1 + \frac{C_1 + C_2}{2} \Delta t_2 + \frac{C_2 + C_3}{2} \Delta t_3 \dots + AUC_{\text{ост}},$$

$$\text{где } AUC_{\text{ост}} = \frac{C_{\text{посл}}}{K_{e1}}$$

c – концентрация в соответствующей временной точке t, мкг/мл; t – временная точка

2) Константа элиминации (K_{el}), характеризующая снижение концентрации препарата на конечном (моноэкспоненциальном) участке

фармакокинетической кривой: $K_{el} = \frac{\ln \frac{C_{max}}{C_{посл}}}{T_{посл} - T_{max}}$ (час⁻¹), где

C_{max} и T_{max} – максимальная концентрация и время ее достижения,

$C_{посл}$ и $T_{посл}$ – последнее значение концентрации и время её определения.

3) Период полувыведения ($T_{1/2}$), отражающий время, в течение которого концентрация ЛВ в крови снижается вдвое: $T_{1/2} = \frac{0,693}{K_{el}}$ (час).

Фармакодинамику соединения Г-104 в составе фармацевтических композиций изучали в тесте отведения хвоста от луча света, латентный период болевой реакции оценивали на протяжении 10 часов от момента перорального введения фармацевтических композиций через 4, 8 и 10 часов с целью подтверждения пролонгирования обезболивающего действия.

2.7 Статистическая обработка данных

Статистическая оценка проводилась по стандартным методам [Гланц С., 1998]. Для всех количественных данных было вычислено групповое среднее арифметическое (M) и стандартная ошибка среднего (m), которое представлено в итоговых таблицах. Статистический анализ проводился с использованием программы Statistica, ver.6.0. Достоверность отличий между двумя группами оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента, между тремя и более группами данных оценивалась сравнением средних с применением однофакторного дисперсионного анализа при нормальном распределении данных, либо с применением непараметрического критерия Крускала – Уоллиса, в зависимости от характера распределения величин параметров в группе. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. Исследование обезболивающей активности соединения Г-104 при пероральном способе введения

Применяемые в настоящее время в медицинской практике болеутоляющие средства различаются по фармакологическим свойствам и механизму действия. В зависимости от ведущего механизма, лежащего в основе развития боли, болевые синдромы, как было указано выше, подразделяются на три основные группы: соматогенные (ноцицептивные), неврогенные и психогенные. На данном этапе работы для оценки анальгетического действия соединения Г-104 нами были выбраны модели боли, имитирующие соматогенные болевые синдромы. В качестве источников болевого раздражения были использованы термические, механические стимулы, и химические вещества (альгогены).

3.1 Изучение обезболивающей активности и расчет ЭД₅₀ соединения Г-104 на экспериментальных моделях боли

Расчет ЭД₅₀ соединения Г-104 на модели отведения хвоста от луча света

Для эксперимента были выбраны дозы 20, 30 и 50 мг/кг. Указанные дозы вводили перорально группам нелинейных крыс (три группы по 8 животных) за 60 минут до нанесения термического раздражения основания хвоста (Tail-flick Analgesia Meter (ИТС Inc/ Life Science, США). Максимальное время экспозиции составляло 20 секунд. Регистрировали латентный период наступления болевой реакции. С использованием расчетных и графических методов [Беленький М.Л., 1968] было найдено значение ЭД₅₀ соединения Г-104 для крыс при пероральном введении на модели отведения хвоста от луча света, которое составило 30 (21÷40) мг/кг.

Расчет ЭД₅₀ соединения Г-104 на модели дозированного механического раздражения основания хвоста крыс с помощью зажима (метод Гаффнера)

Для эксперимента были выбраны дозы 20, 30, 50 мг/кг, которые вводились перорально группам, состоящим из 8 экспериментальных животных. Спустя 60

минут от момента введения соединения Г-104 на основание хвоста крысы накладывался зажим и регистрировались оборонительные реакции по 4-х балльной шкале, согласно методике (п. 2.2.1.2). Рассчитывали среднее количество баллов в группе. В ходе расчетов была заполнена соответствующая рабочая таблица, по содержанию которой был построен график [Беленький М.Л., 1968], и было найдено значение ЭД₅₀ соединения Г-104 для крыс при пероральном введении на модели дозированного механического раздражения основания хвоста, которое составило 25 (19÷39) мг/кг.

Расчет ЭД₅₀ соединения Г-104 на модели формалиновой гипералгезии

Для расчета ЭД₅₀ на модели формалиновой гипералгезии в эксперименте были выбраны дозы 20, 30, 50 мг/кг. Указанные дозы вводились перорально группам животных (n=8). Через 60 минут после введения соединения Г-104 крысам вводился 5% раствор формалина в объеме 50 мкл под подошвенный апоневроз. На протяжении следующих 50 минут регистрировали количество болевых реакций. Для расчета ЭД₅₀ использовалось суммарное количество болевых реакций без дифференцирования на фазы (временные отрезки 0-10 и 30-50 минут). В ходе расчетов была заполнена соответствующая рабочая таблица и построен график [Беленький М.Л., 1968], с использованием которого было найдено значение ЭД₅₀ соединения Г-104 на модели формалиновой гипералгезии, которое составило 27 (16÷46) мг/кг.

Расчет ЭД₅₀ соединения Г-104 на модели уксусных корчей

Для эксперимента были выбраны дозы 20, 30, 50 мг/кг, которые вводили перорально крысам за 60 минут до внутрибрюшинного введения 0,75% раствора уксусной кислоты (0,5 мл на крысу). Каждая экспериментальная группа состояла из 8 животных.

После введения раствора уксусной кислоты подсчитывали количество корчей на протяжении 20 минут. В ходе расчетов была заполнена

соответствующая рабочая таблица, по содержанию которой был построен график [Беленький М.Л., 1968]. С использованием расчетных методов и полученного графика, было найдено значение ЭД₅₀ соединения Г-104 для крыс при пероральном введении на модели укусных корчей, которое составило 28 (18÷43) мг/кг.

Для дальнейшего изучения обезболивающего действия соединения Г-104 использовалась доза 30 мг/кг как близкая к полученным значениям ЭД₅₀.

3.2. Расчет условного терапевтического индекса соединения Г-104

Для оценки широты терапевтического действия изучаемого соединения был рассчитан условный терапевтический индекс и проведена его сравнительная оценка с референтными препаратами. Терапевтический индекс (ТИ) – отношение средней летальной дозы к средней эффективной дозе $ТИ = ЛД_{50} / ЭД_{50}$. По литературным данным ЛД₅₀ Кеторолака при пероральном введении мышам составляет 200 мг/кг [Rooks W.H., 1982], ЛД₅₀ Трамадола при пероральном введении крысам составляет 228 мг/кг [Goldenthal E.I., 1972]. Для расчета терапевтического индекса Кеторолака был сделан пересчет дозы для крысы 0, 85 мг/кг, на дозу для мыши с использованием общепринятых коэффициентов межвидового пересчета [Хабриев Р.У., 2005], исходя из чего была получена терапевтическая доза Кеторолака для мыши, которая составила 1,71 мг/кг.

Терапевтический индекс для Кеторолака составил $\frac{200 \text{ мг/кг}}{1,71 \text{ мг/кг}} = 116,96$

Терапевтический индекс для Трамадола составил $\frac{228 \text{ мг/кг}}{4,29 \text{ мг/кг}} = 53,15$

Для соединения Г-104 была оценена острая токсичность (подробная информация представлена в главе 5). ЛД₅₀ рассчитать не удалось ввиду отсутствия

гибели животных. Максимальная введенная доза составила 6000 мг/кг и была взята за основу при расчете терапевтического индекса.

Терапевтическая доза, полученная в экспериментальных исследованиях, составила 30 мг/кг. ТИ для соединения Г-104 равен
$$\frac{6000 \text{ мг/кг}}{30 \text{ мг/кг}} = 200$$

При сравнении терапевтических индексов препаратов Кеторолак, Трамадол и соединения Г-104 установлено, что соединение Г-104 обладает наибольшим ТИ, равным 200 и как следствие, меньшей токсичностью (таблица 3.2.1).

Таблица 3.2.1 – Сводная таблица терапевтических индексов

Препарат /Соединение	Кеторолак	Трамадол	Соединение Г-104
Терапевтический индекс	116,96	53,15	200,00*

* За LD_{50} принята доза, не вызвавшая гибели ни одного животного.

Таким образом, соединение Г-104 превосходит референтные препараты Кеторолак и Трамадол по условному терапевтическому индексу в 1,7 и 3,8 раза соответственно.

3.3. Оценка анальгетического действия соединения Г-104 на модели термической боли

Изучение обезболивающего действия соединения Г-104 на модели отведения хвоста от луча света в сравнении с препаратами Кеторолак и Трамадол

Сравнительное исследование проводили на нелинейных крысах. Соединение Г-104 (30 мг/кг) (n=8) и препараты сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг) (n=8) и Трамадол (4,29 мг/кг) (n=8) вводили перорально за 60 минут до нанесения термического раздражения. Регистрировали латентный период реакции отведения хвоста (время избавления от болевого раздражителя). Результаты сравнительного изучения обезболивающего действия исследуемого соединения Г-104 представлены на рисунке 2.

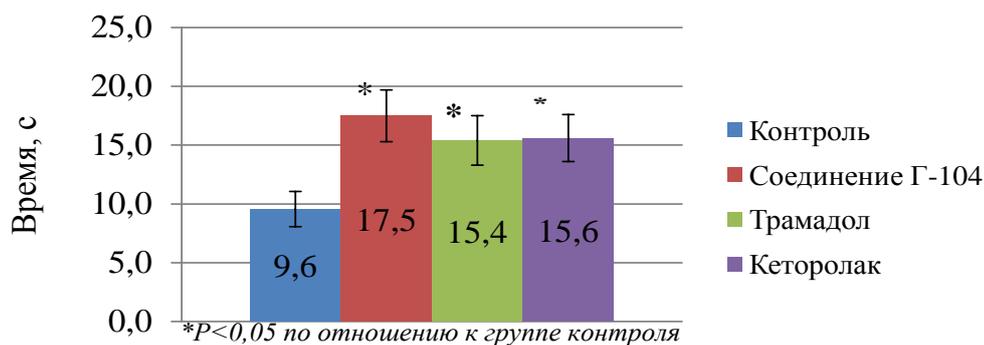


Рисунок 2. –Анальгетическое действие соединения Г-104 (30 мг/кг, n/o) на модели отведения хвоста от луча света в сравнении с препаратами Кеторолак (0,85 мг/кг, n/o) и Трамадол (4,29 мг/кг, n/o).

Как следует из полученных данных, латентный период наступления болевой реакции на фоне введения изучаемого соединения Г-104 в 1,8 раза превышает значения контрольной группы, что свидетельствует о выраженном анальгетическом действии. Полученные результаты были сопоставимы со значениями препаратов сравнения Кеторолаком и Трамадалом.

3.4 Исследование анальгетической активности соединения Г-104 на модели механической соматической боли

Изучение обезболивающего действия соединения Г-104 на модели дозированного механического раздражения основания хвоста крыс с помощью зажима (метод Гаффнера) в сравнении с препаратами Кеторолак и Трамадол

В эксперименте использовали белых нелинейных крыс. Исследуемое соединение Г-104 (30 мг/кг) (n=8) и препараты сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг) (n=8) и Трамадол (4,29 мг/кг) (n=8) вводили перорально за 60 минут до наложения зажима. Двигательную реакцию оценивали в баллах. В группе, получавшей соединение Г-104 в дозе 30 мг/кг, болевая реакция на раздражение основания хвоста была значительно менее выраженной, что отразилось в статистически значимом снижении количества баллов (в экспериментальной группе средний балл в 1,8 раза меньше, чем в контрольной группе). Полученный результат анальгетического действия соединения Г-104

сопоставим с количеством баллов экспериментальных групп, получавших препараты сравнения Кеторолак и Трамадол (таблица 3.4.1).

Таблица 3.4.1 – Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) на болевую чувствительность в тесте дозированного механического раздражения основания хвоста крыс в сравнении с Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о).

Экспериментальная группа	Количество баллов (M±m)
Соединение Г-104 (30 мг/кг) (n=8)	1,4±0,5*
Кеторолак (0,85 мг/кг) (n=8)	1,4±0,5*
Трамадол (4,29 мг/кг) (n=8)	1,5±0,3*
Контроль (n=8)	2,5±0,5

**p<0,05 по отношению к данным контрольной группы*

3.5 Оценка анальгетического действия соединения Г-104 на моделях боли, вызванной альгогенами

Химические методы основаны на изменении чувствительности С-полимодалных ноцицепторов в присутствии медиаторов воспаления или при изменении рН. Формалиновый тест имитирует реакции, развивающиеся при операционных кожных разрезах. Первая фаза реакции развивается сразу и характеризуется воздействием на первичные афференты боли, вторая фаза отставлена во времени и является болью, вызванной воспалительной реакцией. Метод укусных корчей может рассматриваться как модель перитонита [Воронина Т.А., 2012].

3.5.1 Оценка анальгетического действия соединения Г-104 на модели соматической боли, вызванной альгогенами (формалиновая гипералгезия)

Изучение обезболивающего действия соединения Г-104 на модели формалиновой гипералгезии в сравнении с препаратами Кеторолак и Трамадол

Исследуемое соединение Г-104, препараты сравнения Кеторолак и Трамадол вводили крысам перорально в дозах 30 мг/кг (n=8), 0,85 мг/кг (n=8) и 4,29 мг/кг (n=8) соответственно за 60 минут до введения формалина.

При анализе полученных результатов была обнаружена способность соединения Г-104 купировать как острую боль, уменьшая число болевых паттернов «сокращение/встряхивание» на 48,2% в фазу I при сравнении с данными контрольной группы, так и тоническую боль, уменьшая количество болевых актов на 69,0% в фазу II в сравнении с количеством болевых реакции в группе контроля. При этом обезболивающее действие было сопоставимо с препаратами Кеторолаком и Трамадолом в I фазу и совпадало с Кеторолаком и незначительно уступало Трамадолу в II фазу (Рисунок 3).

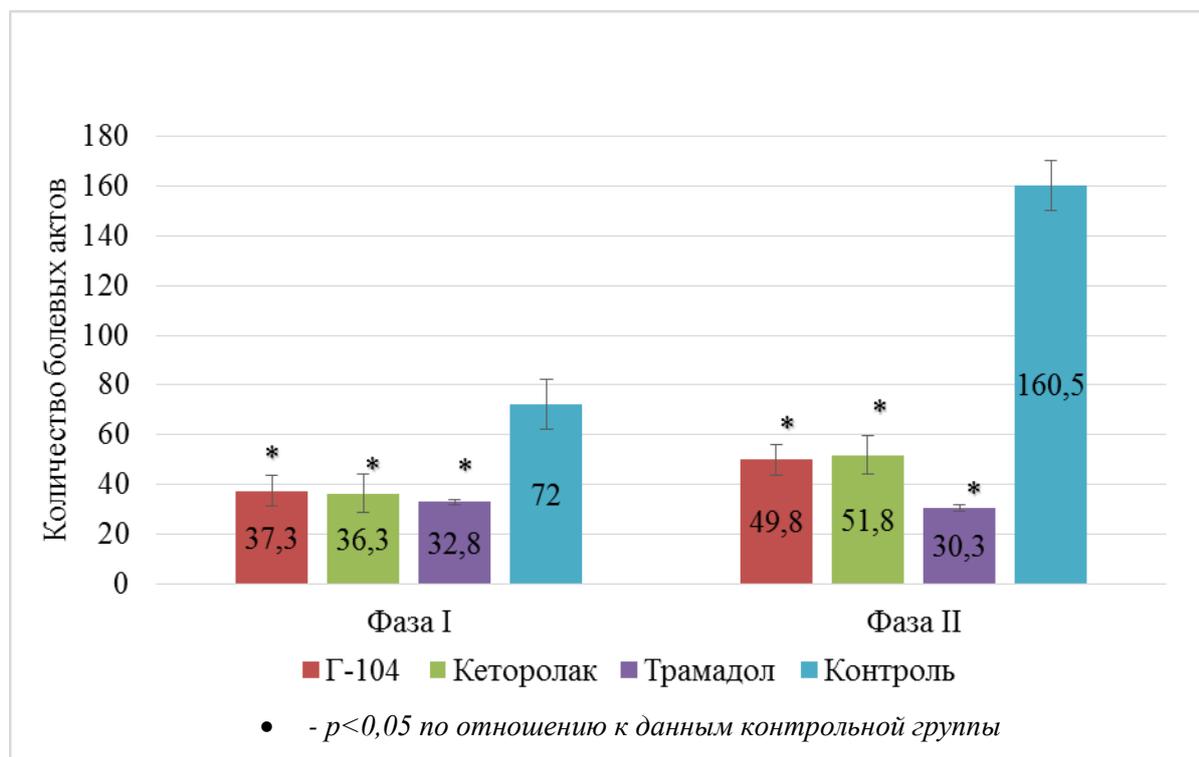


Рисунок 3. Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг) и референтных препаратов Кеторолак (0,85 мг/кг) и Трамадол (4,29 мг/кг) при пероральном введении на болевую чувствительность в тесте формалиновой гипералгезии.

3.5.2 Оценка анальгетического действия соединения Г-104 на модели висцеральной боли, вызванной альгогенами (тест уксусных корчей)

Изучение обезболивающего действия соединения Г-104 на модели уксусных корчей в сравнении с препаратами Кеторолак и Трамадол

Исследуемое соединение Г-104 (30 мг/кг) и препараты сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг) и Трамадол (4,29 мг/кг) вводили белым крысам ($n=8$ в

каждой группе) перорально за 60 минут до введения 0,75% раствора уксусной кислоты согласно методике, приведенной выше. Результаты сравнительного изучения анальгетического действия соединения Г-104 в тесте уксусных корчей представлены на рисунке 4.

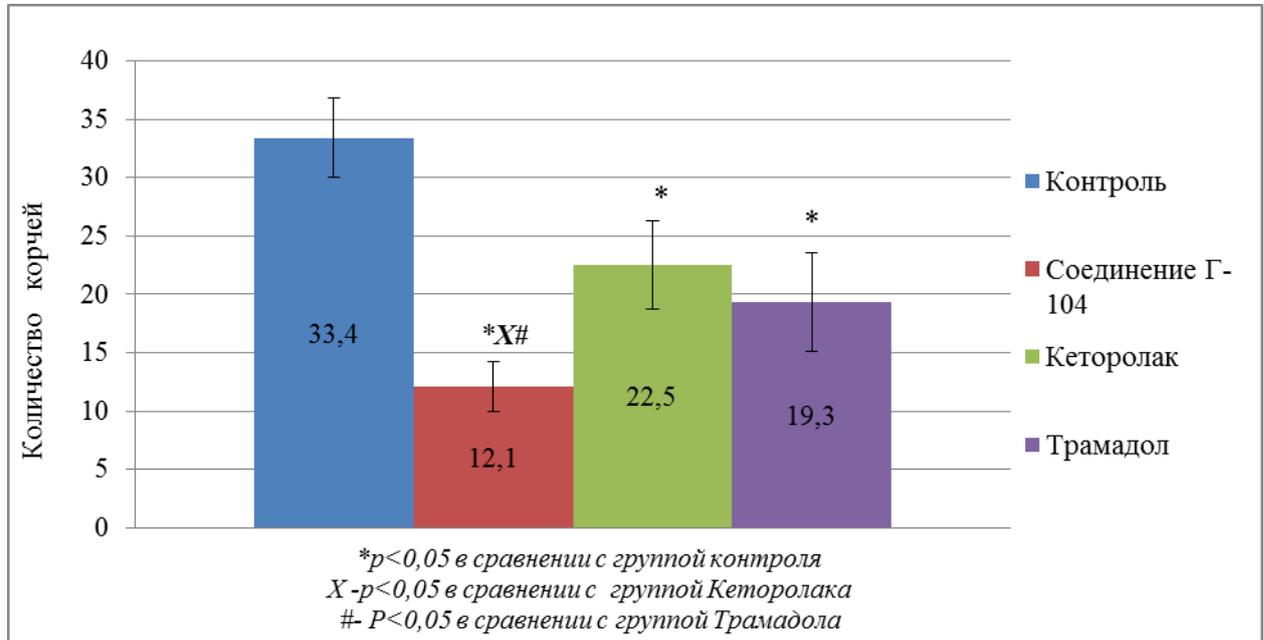


Рисунок 4. Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) при пероральном введении крысам на болевую чувствительность в тесте уксусных корчей в сравнении с Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о).

Количество болевых реакций (корчей) на фоне введения соединения Г-104 было в 2,8 раза меньше, чем в контрольной группе животных, что указывает на выраженное обезболивающее действие изучаемого соединения. Анальгетический эффект соединения Г-104 при этом, статистически значимо превышал обезболивающее действие препаратов сравнения Кеторолак и Трамадол в 1,9 и 1,6 раза соответственно.

3.6. Изучение механизма обезболивающего действия соединения Г-104

На первом этапе было исследовано участие опиоидной системы в реализации анальгетического эффекта соединения Г-104. Было показано отсутствие изменений в латентном периоде наступления реакции отдергивания хвоста (времени избавления от болевого раздражителя) (таблица 3.6.1) и сопоставимое количество болевых реакций (корчей) (таблица 3.6.2) после

введения соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о, n=8, крысы) как на фоне предварительно введенного полного антагониста опиоидных рецепторов налоксона (1 мг/кг, п/к), так и без него. Полученные результаты указывают на отсутствие вовлеченности опиоидной системы в реализацию анальгетического эффекта соединения Г-104.

Таблица 3.6.1 - Анальгетическая активность соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) в тесте отведения хвоста от луча света на фоне предварительного введения налоксона (1 мг/кг, п/к)

Экспериментальные группы	Время избавления от болевого раздражения, с
Соединение Г-104 (30 мг/кг) (n=8)	17,67 ± 2,32*
Соединение Г-104 (30 мг/кг) на фоне налоксона (1 мг/кг (n=8)	17,50 ± 1,21**
Контроль (n=8)	9,43 ± 1,02

* - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольной группе, отличия статистически значимы

** - $p > 0,05$ по отношению к группе, получавшей соединение Г-104, отличия статистически не значимы.

Таблица 3.6.2. - Анальгетическая активность соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) в тесте укусных корчей на фоне предварительного введения налоксона (1 мг/кг, п/к)

Экспериментальные группы	Количество корчей за 20 минут
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) (n=8)	12,0 ± 2,1*
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) на фоне налоксона (1 мг/кг, п/к) (n=8)	10,8 ± 3,5**
Контроль (n=8)	33,4 ± 3,4

* - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольной группе, отличия статистически значимы.

** - $p > 0,05$ по отношению к группе, получавшей соединение Г-104, отличия статистически не значимы. Статистический анализ проведен с использованием *t*-коэффициента Стьюдента

Для установления участия серотонинергической системы в предполагаемом механизме действия изучаемого соединения Г-104 были использованы антагонист серотониновых 5HT-2 рецепторов метисергид (1 мг/кг,

внутрибрюшинно), и ингибитор синтеза серотонина парахлорфенилаланин (150 мг/кг, внутрибрюшинно, 3 дня). Данные дозы веществ и курс введения парахлорфенилаланина широко используются для экспериментального истощения серотониновой системы [Aydin T.H., 2016; Maleki N., 2005; Lee J.H., 2014]. Было изучено обезболивающее действие соединения Г-104 на фоне предварительно введенных метисергида и парахлорфенилаланина на модели отведения хвоста от луча света согласно выше описанной методике (Глава 2, п.2.2.1).

После введения данных веществ было обнаружено статистически значимое снижение анальгетической активности изучаемого соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о), которое выразилось в отсутствии статистически значимых отличий в латентном периоде отведения хвоста между контрольной группой, получавшей воду очищенную и группами, получившими соединение Г-104 с предварительным введением метисергида (1 мг/кг, в/б) и парахлорфенилаланина (150 мг/кг, в/б) (таблица 3.6.3).

Таблица 3.6.3. – Анальгетическая активность соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) в тесте отведения хвоста от луча света у крыс на фоне предварительного введения метисергида (1 мг/кг, в/б) и парахлорфенилаланина (150 мг/кг, в/б)

Экспериментальные группы	Время избавления от болевого раздражения, с
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) (n=8)	15,4 ± 1,1*
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) на фоне метисергида (1 мг/кг, в/б) (n=8)	6,5 ± 1,2
Соединение Г-104(30 мг/кг, п/о) на фоне парахлорфенилаланина (150 мг/кг, в/б) (n=8)	8,7 ± 0,9
Контроль (n=8)	7,2 ± 1,2

* - $p \leq 0,05$ по отношению к контрольной группе, отличия статистически значимы.

Наличие холинергического компонента в анальгетическом механизме действия соединения Г-104 оценивали при термическом болевом воздействии в тесте отведение хвоста от луча света согласно выше приведенной методике (п.2.2.1). М-холиноблокатор атропин вводили в дозе 1 мг/кг в/м, достаточной для блокады периферических и центральных холинорецепторов. О наличии

холинергического компонента в механизме действия исследуемого соединения Г-104 судили по достоверному изменению обезболивающего действия, проявляющегося в изменении латентного периода наступления болевой реакции.

Таблица 3.6.4 – Анальгетическая активность соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) на фоне предварительно введенного блокатора М-холинорецепторов атропина (1 мг/кг, в/м) в тесте отведения хвоста от луча света

Экспериментальные группы	Время избавления от болевого раздражения, с
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о)	15,4±0,9*
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) на фоне атропина (1 мг/кг, в/м)	14,6 ±0,8*
Контроль	8,2±0,4

* $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля с использованием t -коэффициента Стьюдента.

При одновременном введении холиноблокатора атропина и изучаемого соединения Г-104 изменений в латентном периоде наступления болевой реакции не отмечено, что указывает на отсутствие влияния холинергической системы на обезболивающий эффект соединения Г-104.

Наличие дофаминергического компонента в механизме анальгетического действия соединения Г-104 оценивали по изменению порога болевой чувствительности в тесте отведения хвоста от луча света на фоне введения галоперидола (0,05 мг/кг, внутривенно), вызывая специфическое блокирование дофаминовых рецепторов.

Таблица 3.6.5 - Анальгетическая активность соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) на фоне предварительно введенного галоперидола (0,05 мг/кг, в/б) в тесте отведения хвоста от луча света

Экспериментальные группы	Время избавления от болевого раздражения, с
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о)	14,4±0,7*
Соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) на фоне галоперидола (0,05 мг/кг, в/б)	14,1±0,9*
Контроль	6,9±0,5

Латентный период наступления болевой реакции отведения хвоста от луча света после введения соединения Г-104 на фоне предварительно введенного блокатора дофаминовых рецепторов галоперидола был сопоставим с латентным периодом после введения соединения Г-104, что позволяет сделать вывод о том, что дофаминэргическая система не принимает участие в механизме анальгетического действия соединения Г-104.

Таким образом, совокупность полученных результатов позволяет полагать о вовлечении серотонинэргической системы в реализацию обезболивающего эффекта соединения Г-104.

3.7. Заключение

Изучение анальгетической активности исследуемого соединения Г-104 было проведено на моделях соматической боли с использованием термических (модель отведения хвоста от луча света), механических (модель дозированного механического раздражения основания хвоста крыс с помощью зажима) и химических агентов (модель формалиновой гипералгезии, модель уксусных корчей).

Предварительные исследования, включающие в себя пероральное введение изучаемого соединения Г-104 в широком диапазоне доз (20, 30 и 50 мг/кг) и последующую оценку анальгетического действия позволили установить, что средняя эффективная доза ($ЭД_{50}$) в тестах отведения хвоста от луча света, дозированного механического раздражения основания хвоста крыс с помощью зажима (метод Гаффнера), формалиновой гипералгезии, уксусных корчей была равна 30 (21÷40) мг/кг, 25 (19÷39) мг/кг, 27 (16÷46) мг/кг и 28 (18÷43) мг/кг соответственно. В последующем, ввиду близости полученных значений $ЭД_{50}$, обезболивающее действие соединения Г-104 изучалось в дозе 30 мг/кг перорально.

При оценке широты терапевтического действия было установлено, что соединение Г-104 превосходит референтные препараты Кеторолак и Трамадол по условному терапевтическому индексу в 1,7 и 3,8 раза соответственно.

Выраженная анальгетическая активность изучаемого соединения была подтверждена в тесте отведения хвоста от луча света. Значение латентного периода наступления болевой реакции на фоне введенного соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) в 1,8 раза превысило значение контрольной группы, и было сопоставимо с препаратами сравнения Кеторолаком (0,85 мг/кг) и Трамадолом (4,29 мг/кг).

При введении соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг перорально на модели зажима основания хвоста обнаружено статистически значимое снижение выраженности болевых реакций ($1,4 \pm 0,5$ балла) в сравнении с контрольной группой животных ($2,5 \pm 0,5$ балла) и, таким образом, показано наличие обезболивающего действия, сопоставимое с препаратами Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) ($1,4 \pm 0,5$ балла) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о) ($1,5 \pm 0,3$ балла).

В I фазу теста формалиновой гипералгезии, имитирующую острую боль, у соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) был обнаружен анальгетический эффект, при этом снижение количества болевых актов на фоне введенного соединения Г-104 было сопоставимо с препаратами Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о) (уменьшение болевых актов на 48,2%, 49,6% и 55,0 % соответственно). В фазу II тонической боли соединение Г-104 оказывало обезболивающее действие, сопоставимое с Кеторолаком и незначительно уступало по этому показателю Трамадолу (уменьшение количества болевых реакций в сравнении с контрольной группой животных на 69,0%, 67,7% и 81,1 % соответственно).

Выраженное обезболивающее действие изучаемого соединения Г-104 было обнаружено на модели укусных корчей, имитирующей висцеральные болевые реакции. Предварительное пероральное введение соединения Г-104 (30 мг/кг) белым крысам статистически значимо уменьшало число болевых реакций, вызванных внутрибрюшинным введением 0,75% раствора уксусной кислоты в

сравнении с контрольной группой животных в 2,8 раза. Анальгетическое действие соединения Г-104 на модели висцеральной боли укусные корчи превосходило препараты сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадол (4,29 мг/кг, п/о) в 1,9 и 1,6 раза соответственно.

Снижение обезболивающего эффекта соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) в тесте отведения хвоста от луча света на фоне введения антагониста 5HT-2 серотониновых рецепторов метисергида (1 мг/кг, в/б) и ингибитора синтеза серотонина параклорфенилаланина (150 мг/кг, в/б) позволило предположить участие серотонинэргической системы в механизме анальгетического действия соединения Г-104. С использованием полного антагониста опиоидных рецепторов налоксона (1 мг/кг, п/к) было установлено отсутствие вовлеченности опиоидной системы в реализацию анальгетического действия изучаемого соединения Г-104. Изменений в обезболивающем эффекте соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) на модели отдергивания хвоста от луча света на фоне предварительно введенных атропина (1 мг/кг, в/м) и галоперидола (0,05 мг/кг, в/б) не отмечено, что указывает на отсутствие холинергического и дофаминергического компонентов в механизме анальгетического действия соединения Г-104.

Таким образом, соединение Г-104 проявляет анальгетические свойства на различных экспериментальных моделях, воспроизводящих соматические боли. При этом на модели укусных корчей было продемонстрировано высокое обезболивающее действие соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о), превосходящее Кеторолак (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадол (4,29 мг/кг, п/о) в 1,9 и 1,6 раза соответственно. На моделях отведения хвоста от луча света, модели дозированного механического раздражения основания хвоста крыс с помощью зажима и модели формалиновой гипералгезии обезболивающее действие соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) сопоставимо с препаратами сравнения Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о). При этом предполагается реализация обезболивающего действия соединения Г-104 путем вовлеченности серотонинергической системы.

ГЛАВА 4. Оценка сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для анальгетиков. Изучение дополнительных свойств соединения Г-104

С целью всестороннего изучения влияния на органы и системы организма и установления возможных побочных эффектов изучаемого соединения Г-104 было проведено детальное фармакотоксикологическое исследование, включающее в себя оценку состояния центральной нервной системы, сердечно-сосудистой и дыхательной систем, желудочно-кишечный тракт. Кроме того, было проведено изучение противокашлевой активности в качестве предполагаемого дополнительного сопутствующего эффекта.

4.1 Изучение влияния соединения Г-104 на дыхательный центр

Влияние на частоту и объем дыхания проводили на ненаркотизированных крысах (n=8). Графическую регистрацию дыхательных движений производили с помощью системы PowerLab 4/35 и компьютерной программы LabChart 8. Регистрацию проводили до введения (фон) и спустя 60 минут после перорального приема соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг. Результаты изучения представлены в таблице 4.1.1.

Таблица 4.1.1 – Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) на частоту и глубину дыхательных движений белых нелинейных крыс

Показатели/группа	Частота дыхательных движений/мин	Амплитуда, мВ
Фон (n=8)	168,0 ± 12,1	108,3±18,3
Соединение Г-104 (30 мг/кг) (n=8)	166,8 ± 7,2	106,0±17,2

p>0,05 при сравнении с фоновыми показателями в обоих анализируемых случаях

Как следует из таблицы 4.1.1 соединение Г-104 в дозе 30 мг/кг перорально не оказывает влияния на глубину и частоту дыхательных движений белых нелинейных крыс. Частота и амплитуда дыхательных движений после введения соединения Г-104 достоверно не изменилась в сравнении с фоновыми показателями ($p>0,05$). Случаев патологических форм дыхания (дыхание Чейн-

Стокса, Кусмауля, Биота, агональное) не зарегистрировано. Угнетения и остановок дыхания под действием соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) не отмечено.

4.2. Оценка толерантности к обезболивающему действию соединения Г-104

При изучении толерантности к анальгетическому действию соединение Г-104 вводили крысам (n=8) перорально в течение 28 дней в дозе 30 мг/кг. После окончания введения на 28 день оценивали изменение анальгетической активности в тестах болевой чувствительности (тест отведения хвоста от луча света, тест укусные корчи). Результаты представлены в таблицах 4.2.1 – 4.2.2.

Таблица 4.2.1 – Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) при 28-дневном введении на развитие толерантности к анальгетическому эффекту в тесте отведения хвоста от луча света

Тест болевой чувствительности	Латентный период наступления болевой реакции (с)		
	Фон	После однократного введения	На 28-й день введения
Отведение хвоста от луча света (n=8)	5,81±0,56	11,13±1,11*	13,06±2,04*

* $p < 0,05$ в сравнении с фоновыми значениями с использованием *t*-критерия Стьюдента

Таблица 4.2.2 – Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) при 28-дневном введении на развитие толерантности к анальгетическому эффекту в тесте укусные корчи

Экспериментальная группа животных	Число корчей (фон)	Число корчей (после 28 дней введения)
Контроль (n=8)	33,4±3,4	32,4±2,4
Соединение Г-104, 30 мг/кг (n=8)	12,0±2,1*	12,5±3,2*

* $p < 0,05$ в сравнении с показателями контрольной группы

Латентный период наступления болевой реакции в тесте отведение хвоста от луча света, а так же число корчей после 28 дней введения соединения Г-104 статистически значимо не отличались от значений, полученных после однократного введения соединения Г-104. Указанные показатели превышали

фоновые значения, как при однократном, так и курсовом введении, в 1,9-2,3 раза в тесте отведения хвоста от луча света и в 2,8 раза в тесте укусыные корчи. Данные факты позволяют сделать заключение о том, что соединение Г-104 в дозе 30 мг/кг, перорально при 28 дневном курсовом введении не вызывает развитие толерантности к анальгетическому эффекту в тестах отведения хвоста от луча света и укусыные корчи.

4.3 Изучение синдрома отмены

Оценку синдрома отмены проводили без провокации налоксоном [Воронина Т.А., 2012]. Изучаемое соединение Г-104 (30 мг/кг) вводили белым крысам (n=8) в течение 28 дней 1 раз в день перорально. Для проведения сравнительной оценки была создана контрольная группа животных, которым на протяжении 28 дней вводилась вода очищенная в эквивалентных количествах. На второй день после отмены соединения Г-104 регистрировали следующие признаки синдрома отмены: прыжки, тремор по типу «барабанного боя», скрежет зубами, встряхивание головой, пилоэрекция, птоз, судороги, вокализация, ринорея, диспноэ, носовое кровотечение. В ходе исследования ни один из указанных признаков у экспериментальных животных на фоне отмены соединения Г-104 зарегистрирован не был.

Кроме того, развитие гиперальгезии является так же одним из критериев синдрома отмены [Воронина Т.А., 2012]. На рисунке 5 приведены данные по оценке порога болевой чувствительности в тесте отведения хвоста от луча света. После однократного введения соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг латентный период болевой реакции, при начальных фоновых значениях $5,8 \pm 0,6$ секунды статистически значимо увеличился в 2 раза и составил $11,1 \pm 1,1$ секунды. После отмены введения соединения Г-104 время наступления болевой реакции составило $5,8 \pm 0,3$ секунды, что сопоставимо с фоновыми показателями. Данные результаты свидетельствуют об отсутствии развития гиперальгезии при отмене соединения Г-104.

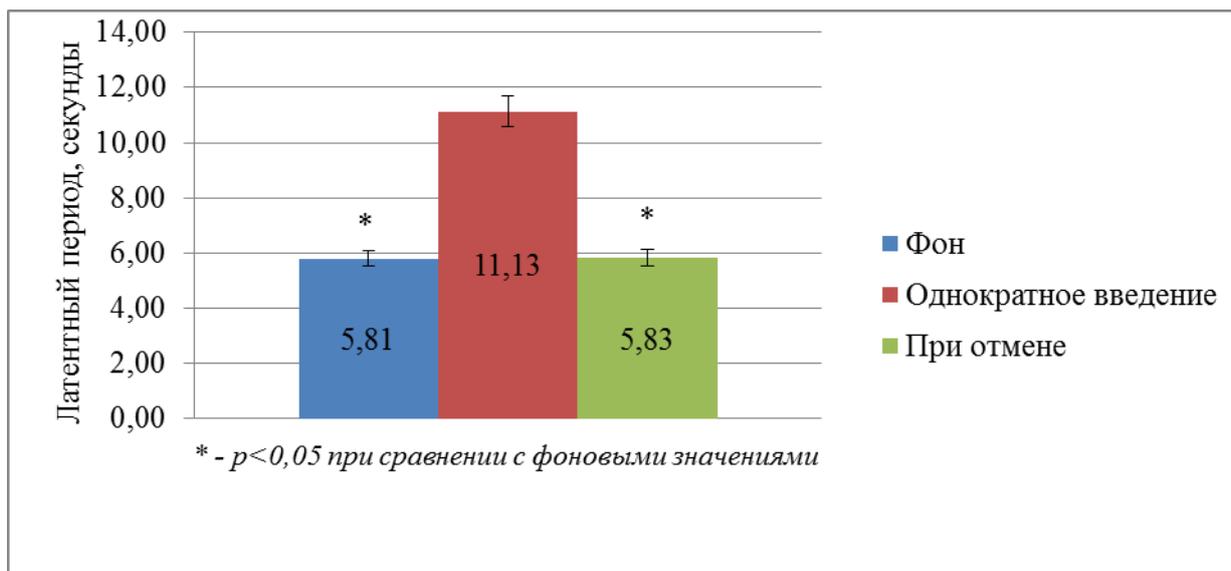


Рисунок 5. Оценка болевой чувствительности после отмены соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг после 28 дней перорального введения без провокации налоксоном

Таким образом, согласно полученным результатам, после отмены соединения Г-104, вводимого в дозе 30 мг/кг в течение 28 дней перорально, специфических признаков синдрома отмены, гиперальгезии не наблюдается, что позволяет сделать вывод об отсутствии у исследуемого соединения Г-104 способности вызывать физическую зависимость и синдром отмены при прекращении приема соединения.

4.4 Исследование аддиктивного потенциала соединения Г-104

Для оценки возможного аддиктивного потенциала была использована условно-рефлекторная реакция предпочтения места (УРМП) в черно-белой камере [Звартау Э.Э., 2001]. Тестирование выработки условного рефлекса на место проводили через 72 часа после последнего обусловливания согласно выше описанной методике (п.2.3.4). Из камеры вынималась перегородка между отсеками и в течение 15 минут крысы свободно исследовали экспериментальную камеру. Регистрировали время нахождения в отсеках. Результаты исследования, представленные в таблице 4.4.1, указывают на то, что время нахождения в камере, ассоциированной с приемом соединения Г-104, достоверно не отличалось от времени нахождения в камере, ассоциированной с приемом растворителя воды

очищенной, что говорит об отсутствии у соединения Г-104 вторично-подкрепляющих свойств и позволяет предположить отсутствие риска возникновения психической зависимости.

Таблица 4.4.1 – Оценка аддиктивного потенциала соединения Г-104 в тесте УРПМ

	Время нахождения в отсеке, ассоциированном с соответствующим веществом, секунды	
	Вещество	Растворитель (вода очищенная)
Соединение Г-104 (30 мг/кг) (n=8)	475,4±75,2	457,0±74,5
Контроль (n=8)	420,0±83,1	480,8±67,1

4.5. Оценка влияния соединения Г-104 на спонтанную двигательную активность и эмоциональность

Влияние соединения Г-104 на спонтанную двигательную активность оценивалось в диапазоне доз от 30 мг/кг до 300 мг/кг перорально в установке «открытое поле» на нелинейных крысах в сравнении с препаратами Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о). Результаты, представленные в таблице 4.5.1, говорят о том, что соединение Г-104 после введения в дозах 30, 150 и 300 мг/кг не изменяет количество пересеченных квадратов, вертикальных стоек и число заглядываний в отверстия, что указывает на отсутствие изменений в горизонтальной двигательной, вертикальной двигательной и в исследовательской активностях. Полученные результаты позволяют утверждать отсутствие седативного действия. Влияния препаратов сравнения Кеторолак 0,85 мг/кг и Трамадол 4,29 мг/кг на спонтанную двигательную активность крыс в установке «открытое поле» после введения так же не выявлено (таблица 4.5.2). Эмоциональность оценивалась по изменению параметров груминг, количество актов дефекации, и латентному времени начала движения экспериментальных животных. Изменений в эмоциональности крыс под влиянием соединения Г-104 в дозах 30, 150 и 300 мг/кг перорально, так же как и под влиянием препаратов

сравнения Кеторолака (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадола (4,29 мг/кг, п/о) не отмечено (таблицы 4.5.1 – 4.5.2).

Таблица 4.5.1 – Сравнительное изучение влияния соединения Г-104 на спонтанную двигательную активность и эмоциональность белых крыс ($M \pm m$)

Показатель	Экспериментальная группа животных и исследуемая доза							
	30 мг/кг (n=8)		150 мг/кг (n=8)		300 мг/кг (n=8)		Контроль (n=8)	
	Фон	После введения	Фон	После введения	Фон	После введения	Фон	После введения
Латентный период								
<i>первого движения</i>	13,6±4,2	19,6±3,5	21,0±4,2	16,8±3,8	19,3±4,5	23,4±9,3	20,2±6,5	29,0±8,0
Горизонтальная активность								
<i>количество пересеченных квадратов</i>	24,4±1,4	19,4±4,7	26,6±4,2	26,3±6,8	17,1±2,5	26,9±5,9	22,8±8,2	21,9±3,9
Вертикальная активность								
<i>количество стоек</i>	11,8±0,9	9,9±1,6	12,6±1,7	11,5±1,5	14,0±1,3	11,1±1,2	10,6±2,0	8,6±1,8
Количество заглядываний	2,8±0,6	1,3±0,3	1,6±0,3	0,9±0,2	2,0±0,4	1,6±0,4	1,5±0,4	0,7±0,3
Грумминг	2,0±0,4	2,4±0,9	2,1±0,6	3,6±0,7	2,9±0,4	3,1±0,7	3,6±0,8	4,5±0,3
Акты дефекации	0,0±0,0	0,1±0,1	0,8±0,2	0,5±0,3	0,3±0,2	0,0±0,0	0,0±0,0	0,4±0,2

Статистически значимых отличий с использованием однофакторного дисперсионного анализа не выявлено. Во всех анализируемых случаях $p > 0,05$ при сравнении результатов с фоновыми значениями соответствующей группы.

Таблица 4.5.2 – Влияние препаратов сравнения Трамадол и Кеторолак на спонтанную двигательную активность и эмоциональность белых крыс ($M \pm m$)

Показатель	Экспериментальная группа животных, доза					
	Трамадол, 4,29 мг/кг, п/о		Кеторолак, 0,85 мг/кг, п/о		Контроль	
	Фон	После введения	Фон	После введения	Фон	После введения
Латентный период						
<i>первого движения</i>	31,8±8,3	24,7±7,9	57,8±16,6	40,7±21,1	40,8±14,5	29,0±18,0
Горизонтальная активность						
<i>количество пересеченных квадратов</i>	13,5±2,5	15,0±2,5	20,8±6,5	18,3±4,6	22,8±8,2	21,9±3,9
Вертикальная активность						
<i>количество стоек</i>	9,8±1,5	9,0±2,3	9,5±1,5	9,0±0,6	10,6±2,0	8,6±1,8
Количество заглядываний	1,8±0,5	0,0±0,0	0,3±0,3	0,8±0,5	1,5±0,4	0,7±0,3
Грумминг	5,8±2,9	6,3±3,3	1,3±0,3	1,5±1,3	3,6±0,8	5,0±0,3
Количество актов дефекации	0,8±0,8	0,3±0,3	1,0±1,0	1,5±1,2	0,0±0,0	0,4±0,2

Статистически значимых отличий не выявлено. Во всех анализируемых случаях $p > 0,05$ при сравнении результатов после введения с фоновыми значениями соответствующей группы.

4.6 Влияние соединения Г-104 на координацию и мышечный тонус в тестах «горизонтальная проволока» и «Ротарод»

Проведенная оценка влияния на мышечный тонус показала, что животные, получавшие соединение Г-104 в дозе 30 мг/кг, п/о, удерживались всеми четырьмя лапами на горизонтально натянутой проволоке в течение 5 секунд. В то же время, у 100% животных, получавших препарат сравнения Трамадол, наблюдались мышечные нарушения, что проявлялось снижением времени удерживания на горизонтально натянутой проволоке и фиксированием не всеми четырьмя лапами.

Оценку влияния на координацию движений проводили после перорального введения исследуемого соединения Г-104 (30 мг/кг) и препаратов сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг) и Трамадол (4,29 мг/кг) на установке вращающегося стержня для крыс (Аппаратно-программный комплекс Ротарод, Нейроботикс, Россия). Стержень вращали со скоростью 5 оборотов в минуту в течение 2 минут. Неспособность животных удержать равновесие в течение 2 минут рассматривали как нарушение координации движения. Фиксировали время нахождения на стержне и пройденный путь. Результаты тестирования представлены в таблице 4.6.1.

Таблица 4.6.1 – Влияние введения соединения Г-104(30 мг/кг, п/о) и препаратов сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадол(4,29 мг/кг, п/о) на координацию движений белых крыс

Препарат/соединение	Время удерживания равновесия, с	Пройденный путь, см
Соединение Г-104, 30 мг/кг (n=8)	128,4±1,6	224,7±5,2
Кеторолак 0,85 мг/кг (n=8)	135,3±3,4	226,7±8,0
Трамадол, 4,29 мг/кг (n=8)	123,4±1,6	223,4±4,6
Контроль (n=8)	131,4±2,8	225,7±6,0

Статистически значимых отличий между группами с использованием однофакторного дисперсионного анализа не установлено. Во всех анализируемых случаях $p > 0,05$ при сравнении группы соединения Г-104 как с группой контроля, так и с препаратами сравнения.

Введение соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг не вызвало изменений в длительности удерживания животных на вращающемся стержне и величине пройденного пути. Полученные результаты не имеют статистически значимых отличий от результатов животных из групп, получавших препараты сравнения Трамадол (4,29 мг/кг, п/о) и Кеторолак (0,85 мг/кг, п/о) и от значений животных контрольной группы. Вызванная двигательная активность и координация движений нелинейных белых крыс не изменяются на фоне введенного соединения Г-104.

4.7 Оценка влияния соединения Г-104 на рефлекторную деятельность

Реакция вздрагивания на резкий звук у всех экспериментальных животных на фоне введения соединения Г-104 30 мг/кг, (n=8), 150 мг/кг (n=8) и 300 мг/кг (n=8) была сохранена. На громкий хлопок руками крысы реагировали замиранием, вытягиванием задних и сгибанием передних конечностей, при этом глаза животного были закрыты, а уши прижаты назад.

Координационный тест выполнялся животными всех экспериментальных групп. При подбрасывании животных вверх ногами с высоты 40 см на мягкую поверхность, они переворачивались во время падения и приземлялись на четыре лапы.

Крысу укладывали на спину. Когда голова фиксировалась рукой, переворачивание начиналось с задних конечностей, тем самым рефлекс переворачивания был сохранен также у всех животных.

Реакция постановки лапы на опору, заключающаяся в немедленном подтягивании спущенной с края стола лапы обратно на поверхность присутствовала у крыс всех экспериментальных групп.

Сохранение реакции на резкий звук говорит об отсутствии влияния соединения Г-104 на продолговатый мозг. Варолиев мост и средний мозг также не были подвергнуты изменениям после введения Г-104, о чем свидетельствует

выполнение всеми животными координационного теста и рефлекторного переворачивания.

Соединение Г-104 не оказывает токсического действия на кору головного мозга, на что указывает сохранение реакции постановки лапы на опору во всех экспериментальных группах.

4.8 Изучение влияния соединения Г-104 на сердечно-сосудистую систему

Оценку влияния на сердечно-сосудистую систему проводили путем регистрации ЭКГ у ненаркотизированных крыс с помощью прибора «Физиобелт» (ООО «Медицинские компьютерные системы», Россия). Регистрацию проводили до введения вещества и через 60 минут после перорального введения соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг. Экспериментальная группа животных состояла из 8 крыс. Результаты измерений отражены в таблице 4.8.1.

Таблица 4.8.1 – Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг) на параметры ЭКГ у ненаркотизированных нелинейных белых крыс

Параметр	До введения соединения Г-104 (фон) (n=8)	После введения соединения Г-104 (n=8)
<i>Величина зубцов(мВ)</i>		
Зубец Р	0,40±0,03	0,46±0,07
Зубец R	3,12±0,49	2,37±0,40
Зубец S	1,09±0,23	1,12±0,11
Зубец Т	0,52±0,06	0,59±0,09
<i>Длительности интервалов(с)</i>		
Интервал PQ	0,040±0,004	0,034±0,004
Интервал QR	0,010±0,001	0,011±0,001
Комплекс QRS	0,027±0,002	0,028±0,002
Интервал QT	0,051±0,004	0,063±0,005
Интервал RR	0,125±0,002	0,122±0,002
Интервал TP	0,029±0,003	0,032±0,003
ЧСС	481,7±9,1	491,7±8,8

Статистически значимых отличий между фоновыми значениями и значениями, полученными после введения соединения Г-104 (30 мг/кг) с использованием t-коэффициента Стьюдента не обнаружено. Во всех случаях $p > 0,05$.

Анализ электрокардиограмм показал следующее [Чазов Е.И., 1992]:

- Зубец Р отражает возбуждение предсердий. Анализ ритма предсердий показал регулярность интервалов Р-Р, зубцы Р имели нормальную форму,

фоновое значение величины Р находилось в интервале $0,40 \pm 0,03$ мВ, значение на фоне введенного соединения Г-104 $0,46 \pm 0,07$ мВ.

- Анализ соотношения между ритмом предсердий и желудочков показал, что зубцы Р предшествовали каждому комплексу QRS, интервал P-Q стабилен и его фоновое значение находилось в пределах $0,040 \pm 0,004$ с, после приема соединения Г-104 $0,034 \pm 0,004$ с. Таким образом, источником ритма как при измерении фоновых значений, так и на фоне соединения Г-104 являлся синусовый узел.
- Анализ ритма желудочков позволил выявить стабильность и регулярность интервалов R-R, фоновое значение которых лежало в пределах $0,125 \pm 0,002$ с, после введения соединения Г-104 $0,122 \pm 0,002$ с. Оценка формы комплекса QRS показала, что зубец Q отсутствовал во всех анализируемых ЭКГ, что является нормой для данного вида животных [Западнюк И.П., 1983], амплитуда зубца R находилась в интервале $3,12 \pm 0,49$ мВ, а зубца S в интервале $1,09 \pm 0,23$ мВ, ширина комплекса QRS составляла $0,027 \pm 0,002$ с при получении исходных значений, а на фоне приема соединения Г-104 составляли амплитуда зубца R $2,37 \pm 0,40$ мВ, зубца S в интервале $1,12 \pm 0,11$ мВ, ширина комплекса QRS составляла $0,028 \pm 0,002$ с.
- Анализ конечной части желудочкового комплекса показал отсутствие сегмента ST, восходящая часть зубца S сразу же переходила в зубец T. Фоновые значения величины зубца S составили $1,09 \pm 0,23$ мВ, зубца T – $0,52 \pm 0,06$ мВ, величины интервала TP $0,029 \pm 0,003$ с, интервала QT $0,051 \pm 0,004$ с. На фоне введенного соединения Г-104 значения величины зубца S составили $1,12 \pm 0,11$ мВ, зубца T – $0,59 \pm 0,09$ мВ, величины интервала TP $0,032 \pm 0,003$ с, интервала QT $0,063 \pm 0,005$ с.

Статистически значимых отличий между фоновыми значениями и значениями после введения исследуемого соединения Г-104 не обнаружено, что позволяет утверждать отсутствие влияния соединения Г-104 на сердечную деятельность.

4.9 Исследование ulcerогенного действия и влияния на моторику желудочно-кишечного тракта соединения Г-104

Исследование ulcerогенного действия проводили на крысах согласно приведенной выше методике. По истечении периода введения соединения Г-104 в дозах 30 мг/кг (n=8), 150 мг/кг (n=8) и 300 мг/кг (n=8) животные подвергались эвтаназии, желудок и часть пищевода выделялись и детально исследовались на предмет обнаружения повреждений. Оценку ulcerогенного действия проводили по 4-х бальной шкале [Шварц Г.Я., 2012].

Детальное макроскопическое исследование слизистой желудка белых нелинейных крыс не выявило каких-либо видимых повреждений, что соответствует 0 баллам по указанной шкале. Это позволило сделать вывод об отсутствии ulcerогенного действия у исследуемого соединения Г-104. Гистологическое исследование слизистой желудка показало отсутствие влияния исследуемого соединения Г-104, вводимого в дозах 30, 150 и 300 мг/кг на состояние слизистой оболочки желудка¹.

Исследование моторики желудочно-кишечного тракта на фоне введения соединения Г-104 показало, что изучаемое соединение Г-104 (30 мг/кг, п/о) не оказывает влияния на моторику желудочно-кишечного тракта. Время выхода болюсов и их консистенция были сопоставимы с показателями контрольной группы животных. Препараты сравнения (Кеторолак 0,85 мг/кг, п/о) и Трамадол (4,29 мг/кг, п/о) изменяют моторику желудочно-кишечного тракта, при этом Кеторолак значительно ее замедляет. Возможность изменения моторики желудочно-кишечного-тракта и консистенции кала на фоне Трамадола была показана в ряде исследований ранее [Lagard С., 2016; Fitzgerald К.Т., 2016], что подтвердилось в полученных результатах: уменьшение времени выхода болюсов приблизительно в 2 раза и консистенция кала в форме диареи.

¹Выражаем благодарность за проведение гистологических исследований сотрудникам отдела морфологических и патофизиологических исследований ЦНИЛ ПГМУ им. ак. Е.А. Вагнера Минздрава России, зав. отделом, д.м.н. П.В. Косаревой, с.н.с. к.м.н. В.П. Хоринко, ст. лаб. М.О. Кариповой.

Таблица 4.9.1 – Сравнительное изучение влияния исследуемого соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) на моторику желудочно-кишечного тракта

Экспериментальная группа	Время выхода первого болюса с активированным углем	Консистенция кала	Среднее количество болюсов на 1 животное за 6 часов
Соединение Г-104 (30 мг/кг) (n=6)	5 часов 10 мин.	Нормальная	1,67±0,33
Кеторолак (0,85 мг/кг) (n=6)	<i>За 6 часов наблюдения актов дефекации не зарегистрировано</i>		
Трамадол (4,29 мг/кг) (n=6)	2 ч. 30 мин.*	Диарея	2,25±0,75
Контроль (n=6)	5 ч. 00 мин.	Нормальная	1,13±0,32

* $p < 0,05$ при сравнении с группой контроля с использованием *t*-критерия Стьюдента

4.10 Оценка противокашлевого действия соединения Г-104

Оценку предполагаемого противокашлевого действия проводили на модели кашля у морских свинок, индуцированного лимонной кислотой. Эксперимент проводился на морских свинках (n=8) согласно стандартной методике, приведенной выше, предполагающей сравнение с фоновыми значениями одних и тех же животных без использования контрольной группы. Результаты исследования, представленные в таблице 4.10.1 свидетельствуют о сопоставимости частоты кашлевых движений до и на фоне введенного соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о), что в свою очередь, позволяет сделать вывод об отсутствии у исследуемого соединения противокашлевой активности.

Таблица 4.10.1 – Влияние соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) на количество кашлевых движений на модели кашля, вызванного лимонной кислотой у морских свинок

Соединение	Количество приступов кашля	
	До введения (фон)	После введения
Г-104, 30 мг/кг, п/о (n=8)	13,0±1,3	10,0±1,9

Статистически значимых отличий между фоновыми значениями и значениями, полученными после введения соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) с использованием *t*-коэффициента Стьюдента не обнаружено ($p > 0,05$).

4.11 Заключение

Оценка сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для анальгетиков и изучение дополнительных свойств соединения Г-104 позволило установить, что соединение Г-104 не вызывает респираторной депрессии, частота и амплитуда дыхательных движений на фоне введения соединения Г-104 достоверно не изменяются. Латентный период болевой реакции в тесте отдергивания хвоста от луча света после однократного введения, равный $11,13 \pm 1,11$ секунды, был сопоставим с латентным периодом после 28-дневного введения соединения Г-104 ($13,06 \pm 2,04$ секунды), что свидетельствует об отсутствии толерантности к обезболивающему действию. Доминантных и рецессивных признаков синдрома отмены (прыжки, тремор по типу «барабанного боя» и т.д.), изменений в пороге болевой чувствительности при отмене соединения Г-104, вторично-подкрепляющих свойств в тесте УРПМ не было зафиксировано, что является хорошим прогностическим признаком минимального риска возникновения физической зависимости и аддикции. Исследуемое соединение Г-104 не вызывает изменений в спонтанной (в тесте «открытое поле») и стимулируемой (в установке «Ротарод») двигательной активности, не вызывает седации, не влияет на рефлекторную активность, координацию и мышечный тонус. После введения соединения Г-104 в возрастающих дозах 30, 150 и 300 мг/кг ульцерогенного действия на слизистую оболочку желудка белых крыс не установлено. Скорость выхода болюсов с активированным углем после введения соединения Г-104 была сопоставима с контрольной группой, что позволяет сделать вывод об отсутствии изменений в моторике желудочно-кишечного тракта, в отличие от препаратов сравнения Кеторолака (замедление моторики) и Трамадола (усиление моторики и изменение консистенции кала). Влияния на сердечно-сосудистую систему в результате сравнения фоновых показателей со значениями, полученными после приема соединения Г-104, не выявлено. Противокашлевый эффект у изучаемого соединения Г-104 не обнаружен.

ГЛАВА 5. Исследование острой токсичности соединения Г-104

Острая токсичность — токсикометрическая характеристика фармакологического вещества или лекарственного препарата, выражающая его способность вызывать гибель животных при однократном введении [Арзамасцев Е.В., 2012]. Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации. Исследуемое соединение Г-104 вводили перорально через металлический атравматичный зонд в возрастающих дозах по Литчфилду-Уилкоксону, медленно погружая зонд до желудка. Период наблюдения составил 14 суток [Арзамасцев Е.В., 2012]. Каждую дозу соединения Г-104 вводили экспериментальным группам животных по 5 (крысы) и 5 (морские свинки) животных обоего пола из расчёта на массу тела.

5.1. Токсикометрия

Зависимые от доз летальные эффекты исследуемого соединения Г-104 представлены в таблицах 5.1.1 и 5.1.2.

Таблица 5.1.1 – Летальные эффекты (пало/всего) при пероральном введении соединения Г-104 крысам

Соединение /Доза, мг/кг	1000	2000	3000	4000	6000
Соединение Г-104 (самцы)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Соединение Г-104 (самки)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Таблица 5.1.2 – Летальные эффекты (пало/всего) при пероральном введении соединения Г-104 морским свинкам

Соединение /Доза, мг/кг	1000	2000	3000	4000	6000
Соединение Г-104 (самцы)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Соединение Г-104 (самки)	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эффекты от введения соединения Г-104 крысам и морским свинкам не зависят от половой

принадлежности животных. Исходя из этого, данные были объединены без учета пола (таблица 5.1.3).

Таблица 5.1.3 – Сводная таблица изучения острой токсичности соединения Г-104

Соединение / Доза, вид животных, пало/всего	1000	2000	3000	4000	6000
Соединение Г-104 (крысы)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Соединение Г-104 (морские свинки)	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10

Как следует из таблицы 5.1.3, при определении острой токсичности исследуемое соединение Г-104 проявило низкую токсичность. Для крыс и морских свинок показатель ЛД₅₀ рассчитать не удалось ввиду отсутствия дозы, вызывающей смерть животных. Максимальная введенная доза составила 6000 мг/кг перорально.

5.2. Влияние острого введения соединения Г-104 на потребление пищи и воды, массу тела экспериментальных животных

После введения соединения Г-104 в диапазоне доз до 6000 мг/кг значительного изменения в потреблении пищи и воды крысами отмечено не было. При наблюдении за морскими свинками отмечено снижение потребления пищи на протяжении первых двух суток после введения соединения Г-104 в дозе 6000 мг/кг. Результаты измерения массы тела животных, переживших интоксикацию в дозах, которые могли бы вызвать летальные эффекты (2000 мг/кг и 6000 мг/кг) представлены в таблицах 5.2.1 и 5.2.2.

Таблица 5.2.1. – Влияние острого введения исследуемого соединения Г-104 на массу тела крыс

Дни	Группы (М ± m, граммы)					
	Контроль		2000 мг/кг		6000 мг/кг	
	М	F	М	F	М	F
Фон	181,5±5,8	184,2±11,9	185,3±3,6	182,5±8,2	185,7±14,1	189,7±18,8
2-й день	190,8±3,0	183,8±11,5	185,5±3,3	185,0±7,1	186,7±12,8	190,0±18,4
7-й день	195,0±8,4*	186,4±12,5	192,8±8,9	190,8±10,4	187,0±16,0	188,3±18,1
10-й день	203,8±7,6*	191,4±13,5*	201,7±13,6*	197,7±7,6*	188,2±13,4	192,0±19,2
14-й день	204,3±13,8*	198,8±15,9*	209,4±12,3*	204,5±9,1*	196,8±13,0*	200,5±20,7*

** $p < 0,05$ при сравнении с фоновыми значениями внутри группы*

Прирост массы тела экспериментальных животных в течение всего срока наблюдения был отмечен как в контрольной группе, так и в группах животных (крыс), получивших соединение Г-104 в токсических дозах 2000 мг/кг и 6000 мг/кг.

Анализ динамики массы тела морских свинок показал отсутствие значимых изменений в течение срока наблюдения (14 дней) как в группе испытуемых животных, так и в контрольной группе (таблица 5.2.2).

Таблица 5.2.2. –Влияние острого введения исследуемого соединения Г-104 в дозе 6000 мг/кг на массу тела морских свинок.

Время наблюдения	Группы животных ($M \pm m$, граммы)	
	Контроль	6000 мг/кг
	Без учета пола	Без учета пола
Фон	597,8±44,2	553,50±13,44
2-й день	594,5±46,1	559,00±32,53
7-й день	598,3±39,5	551,00±35,36
14-й день	600,9±36,5	569,00±33,94

$p > 0,05$ во всех анализируемых случаях

Таким образом, анализ полученных данных показал отсутствие влияния соединения Г-104 в токсических дозах на массу тела экспериментальных животных. Снижения массы тела, одного из признаков токсического воздействия на организм, не было зафиксировано ни в одной группе, напротив, было отмечено увеличение массы тела на протяжении всего периода наблюдения.

5.3. Изучение клинической картины интоксикации при исследовании острой токсичности соединения Г-104

Клиническая картина интоксикации у крыс и морских свинок под действием соединения Г-104 была следующей.

Позы всех животных были без особенностей. Тремора, аномальных движений, судорог, самотравмирования замечено не было. Осмотр в руках не выявил слезотечения, саливации, закрытия века, аномалии дыхательных

движений. Шерстный покров, цвет слизистых оболочек был без особенностей, пилоэрекция отсутствовала. Уринация была без особенностей. Дефекация приобрела характер диареи у 50 % крыс, получивших исследуемое соединение Г-104 в дозе 6000 мг/кг. У морских свинок после введения токсической дозы 6000 мг/кг отмечалось видимое угнетение двигательной активности. Все указанные изменения носили обратимый характер и полностью нивелировались к концу 14-дневного наблюдения за экспериментальными животными.

5.4. Макроскопическая (патоморфологическая) оценка влияния соединения Г-104 на внутренние органы

При вскрытии крыс и морских свинок по окончании исследования (через 14 дней от начала опыта) видимых морфологических изменений внутренних органов не установлено. Шерсть опытных животных имела опрятный вид, была блестящей, без очагов облысения.

При осмотре грудной и брюшной полостей нарушений в расположении внутренних органов не отмечалось. Щитовидная железа плотно прилежала к гортани, имела обычные размеры и плотность, розовато-красноватый цвет. Тимус имел треугольную форму, беловатый цвет и умеренно плотную консистенцию. Величина и форма сердца изменений не представляли. Мышца сердца была коричневатой, плотной. Поверхность легких имела бледно-розовую окраску, легкие спадались при вскрытии грудной клетки. Ткань на разрезе также имела однородную бледно-розовую окраску. Слизистая оболочка внелегочных бронхов была гладкой, блестящей, бледно-розовой.

Селезенка имела темно-вишневый цвет, гладкую поверхность и плотноватую консистенцию. Желудок имел обычную форму и размеры, просвет был незначительно заполнен пищевым содержимым. Слизистая тела желудка была бледно-розовой, блестящей, складчатой. Слизистая тонкой и толстой кишок была блестящей, гладкой. Поджелудочная железа была бледно-розовой, дольчатой. Величина и форма печени изменений не имели. Капсула печени была тонкой, прозрачной. Ткань печени имела коричневатый цвет и умеренно плотную

консистенцию. Величина и форма почек не отличались от контроля, капсула легко снималась. Поверхность органа была гладкой, однородной коричневато-серооливчатой окраски. На разрезе почек отчетливо различались корковое и мозговое вещество. Форма, размеры и плотность надпочечников, яичников или яичек не отличались от контроля. Оболочки головного мозга были тонкими, прозрачными.

После эвтаназии путем помещения животного в затравочную камеру, содержащую пары наркотического средства (этиловый эфир), у животных извлекали внутренние органы и определяли их массовый коэффициент (МК) по формуле: $МК = \text{масса органа (в граммах)} \times 1000 / \text{масса тела (в граммах)}$.

В таблицах 5.4.1. – 5.4.2 приведены массовые коэффициенты внутренних органов крыс и морских свинок, усредненные по группам.

Таблица 5.4.1 – Массовые коэффициенты органов белых крыс после перорального введения соединения Г-104 (г/кг массы тела)

Органы	Соединение Г-104				Контроль
	2000 мг/кг		6000 мг/кг		
	М	F	М	F	F/M
Печень	44,4±5,4	37,3±4,7	42,3±5,7	34,9±2,2	45,9±9,5
Сердце	4,0±0,5	4,0±0,2	3,6±0,3	3,7±0,2	3,4±0,0
Почки	7,9±0,7	7,2±1,3	7,2±0,2	6,6±0,4	7,5±0,4
Надпочечники	0,3±0,1	0,5±0,1	0,2±0,1	0,3±0,1	0,5±0,1
Легкие	8,5±1,0	7,7±1,4	5,8±0,1	5,8±1,2	6,9±0,2
Селезенка	4,7±0,5	4,5±0,7	3,3±0,7	3,8±0,8	5,5±0,5
Тимус	1,6±0,3	1,8±0,1	1,3±0,4	1,7±0,4	2,1±0,5
Поджелуд. железа	1,3±0,2	1,0±0,1	0,8±0,3	0,7±0,1	0,9±0,2
Головной мозг	9,6±0,1	10,1±1,2	7,5±1,7	6,7±0,8	7,3±1,8
Желудок	10,0±0,2	9,1±1,4	8,0±0,5	7,9±0,1	9,5±1,1

$p > 0,05$ во всех анализируемых случаях сравнения

Таблица 5.4.2. – Массовые коэффициенты (МК) органов морских свинок при пероральном введении соединения Г-104 в дозе 6000 мг/кг (г/кг массы тела)

Экспериментальные группы		
Органы	Соединение Г-104	Контроль
Печень	42,4±4,6	45,5±4,7
Сердце	2,7±0,6	2,6±0,8
Почки	7,0±1,4	7,6±1,2
Надпочечники	1,23±0,3	1,9±0,4
Легкие	6,9±0,1	7,7±0,6

Селезенка	1,0±0,1	1,2±0,5
Тимус	0,4±0,1	0,3±0,2
Головной мозг	6,5±0,6	4,0±0,7
Поджелудочная железа	3,6±1,1	2,1±0,5

p > 0,05 во всех анализируемых случаях сравнения

Увеличение массовых коэффициентов внутренних органов является одним из признаков наличия негативного влияния ксенобиотиков (в данном случае исследуемого соединения Г-104) на внутренние органы экспериментальных животных [Трахтенберг И.М., 1991]. Анализ величин массовых коэффициентов органов крыс и морских свинок при пероральном однократном введении токсических доз в «остром» опыте не выявил достоверных отличий в опытных группах животных в сравнении с контрольной группой по истечении рекомендованного 14-дневного наблюдения.

5.5. Влияние соединения Г-104 на показатели периферической крови

В таблице 5.5.1 приведены данные по влиянию соединения Г-104 на показатели периферической крови белых крыс. Анализ полученных данных показал отсутствие влияния введения соединения Г-104 в токсических дозах 2000 мг/кг и 6000 мг/кг на показатели периферической крови белых нелинейных крыс по истечении 14 дней [Арзамасцев Е.В., 2012]. Полученные значения укладывались в диапазон допустимых отклонений в сравнении с показателями животных (крыс) контрольной группы и литературными данными [Трахтенберг И.М., 1991].

Таблица 5.5.1 - Влияние соединения Г-104 на показатели периферической крови белых нелинейных крыс при изучении острой токсичности

	Экспериментальная группа и пол животных, (M ± m)					
	2000 мг/кг		6000 мг/кг		Контроль	
	M	F	M	F	M	F
Количество эритроцитов (RBC)(10*12/л)						
	8,3±0,2	7,6±0,2	8,7±0,9	7,7±1,0	7,6±0,4	7,3±0,2
Количество лейкоцитов (WBC)(10*9/л)						
	8,3±1,6	12,6±4,3	9,5±2,5	15,9±4,7	11,2±2,8	14,2±2,6
Концентрация гемоглобина (HGB)(г/л)						

	159,3±5,0	145,0±2,0	167,0±11,1	153,3±19,6	147,3±3,2	149,6±4,0
Гематокрит (HCT)(%)						
	46,0±2,1	40,9±1,3	49,2±3,7	43,3±6,2	42,9±1,9	43,6±1,9
Количество тромбоцитов (PLT)(10 ⁹ /л)						
	748,0±91,8	597,0±74,0	668,3±90,1	773,3±88,7	701,7±42,1	656,4±38,2
Среднее содержание гемоглобина в клетке (MCH)(pg)						
	19,2±0,4	19,2±0,3	19,1±1,0	19,9±0,2	19,8±0,9	19,2±0,5
Средняя концентрация гемоглобина в клетке (MCHC)(г/л)						
	346,7±7,5	355,0±6,2	340,7±5,5	355,0±7,0	343,7±7,1	341,4±6,1

p > 0,05 при сравнении всех экспериментальных групп с показателями контрольной группы

5.6 Оценка влияния соединения Г-104 на биохимические показатели крови при изучении острой токсичности

В таблице 5.6.1 представлены данные по влиянию соединения Г-104 на основные биохимические показатели крови белых крыс, в таблице 5.6.2 — на активность ферментов плазмы крови.

Анализ таблицы 5.6.1 указывает на отсутствие влияния соединения Г-104 в дозах 2000 мг/кг и 6000 мг/кг на основные биохимические показатели крови экспериментальных животных (белых крыс) по истечении рекомендуемого срока наблюдения (14 дней [Арзамасцев Е.В., 2012]). Из данных таблицы 5.6.2 следует, что соединение Г-104, в токсической дозе 6000 мг/кг, по истечении рекомендуемого срока наблюдения повышает уровень фермента АсТ во всех экспериментальных группах обоих полов и щелочной фосфатазы в группе самцов в токсической дозе 6000 мг/кг. Других изменений в биохимических и ферментативных показателях крови белых крыс после введения соединения Г-104 отмечено не было, отличия от показателей контрольной группы отсутствовали.

Таблица 5.6.1 – Влияние соединения Г-104 на биохимические показатели крови белых крыс

Параметры	Экспериментальная группа и пол животных (M±m)					
	2000 мг/кг		6000 мг/кг		Контроль	
	M	F	M	F	M	F
Общий белок, г/л						
	78,7±7,5	76,0±1,1	75,7±1,7	77,3±4,0	70,5±4,5	70,4±3,4
Альбумины, г/л						
	41,0±4,6	34,7±0,6	35,0±2,0	34,7±1,5	36,0±2,2	45,0±4,4

Холестерин, ммоль /л						
	2,2±0,6	1,2±0,2	1,7±0,2	1,4±0,3	1,2±0,3	2,2±0,2
Холестерин ЛПВП, ммоль/л						
	1,0±0,6	0,7±0,1	1,0±0,1	0,8±0,3	0,5±0,3	1,6±0,1
Триглицериды, ммоль/л						
	1,0±0,3	0,6±0,1	0,9±0,5	0,6±0,2	1,0±0,2	0,9±0,2
Билирубин общий, мкмоль/л						
	6,8±1,5	5,6±1,5	5,3±0,1	4,6±0,1	5,2±0,5	8,2±1,5
Глюкоза, ммоль/л						
	5,5±1,7	5,2±0,5	5,6±1,6	5,2±1,8	5,8±1,5	5,3±1,5
Мочевина, ммоль/л						
	2,7±0,1	3,0±0,3	5,2±0,5	7,6±1,1	6,4±0,5	6,5±0,5
Креатинин, мкмоль/л						
	72,3±2,8	78,5±3,7	69,6±10,3	69,8±3,5	74,8±1,5	78,5±0,4

p > 0,05 при сравнении всех экспериментальных групп с показателями контрольной группы

Таблица 5.6.2 – Влияние соединения Г-104 на активность ферментов плазмы крови белых крыс

Экспериментальная группа и пол животных					
2000 мг/кг (М ± m)		6000 мг/кг (М ± m)		Контроль (М ± m)	
М	Ф	М	Ф	М	Ф
АлАТ, U/L					
31,8±17,3	63,4±10,2	296,5±56,1*	108,5±8,5*	60,0 ±4,5	73,1 ±9,4
АсАТ, U/L					
390,9±67,6*	445,1±43,3*	325,7±44,0*	375,2±65,1*	110,2±6,9	134,3±9,8
Щелочная фосфатаза, U / L					
303,0±37,2	341,5±51,3	957,0±81,2*	361,7±41,9	352,8±26,0	315,0±35,5

* *p < 0,05 при сравнении с показателями группы контроля*

5.7. Заключение по результатам изучения острой токсичности

В результате изучения острой токсичности соединения Г-104 было установлено следующее.

При изучении острой токсичности значения ЛД₅₀ для крыс и морских свинок при пероральном пути введения из-за низкой токсичности установить не удалось. Максимальная введенная доза составила 6000 мг/кг, смертность животных отсутствовала.

Клиническая картина интоксикации, вызываемая соединением Г-104 у крыс характеризовалась отсутствием видимого угнетения со стороны центральной нервной системы. Прирост массы тела в экспериментальных группах был

сопоставим с контрольной группой животных. Видимых морфологических изменений внутренних органов не установлено, равно как и изменений в массовых коэффициентах внутренних органов. Параметры периферической крови (содержание эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокрит, уровень гемоглобина) после введения токсических доз соединения Г-104 не изменились.

При этом было установлено, что соединение Г-104, в токсических дозах 2000 мг/кг и 6000 мг/кг повышает уровень фермента АсТ в группах крыс обоих полов; увеличивает уровень щелочной фосфатазы в группе крыс самцов, получавших дозу 6000 мг/кг.

Интоксикация у морских свинок после введения токсической дозы 6000 мг/кг характеризовалась видимым угнетением двигательной активности и снижением потребления пищи на протяжении первых двух суток после введения. Снижения массы тела в экспериментальной группе морских свинок зафиксировано не было.

Таким образом, результаты токсикометрии, данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после острого введения позволяют отнести исследуемое соединение Г-104 к V классу практически нетоксичных веществ по классификации Hodge H., 1975 и IV классу опасности как малоопасное вещество согласно ГОСТ 12.1.007-76.

Крупные частицы, от 355 до 1400, мкм	4,7±0,8
Среднемелкие, от 355 до 180, мкм	7,1±0,3
Мелкие, от 180 до 125 мкм	31,7±1,5
Очень мелкие, от 125 до 90 мкм	51,5±2,2

Установлено, что субстанция Г-104 состоит из частиц мелкой и очень мелкой фракции (>80%), обладает удовлетворительной насыпной плотностью, не имеет сыпучести без вибрации и с вибрацией. Угол естественного откоса составил $45^\circ \pm 2^\circ$, что также подтверждает неудовлетворительную сыпучесть.

Учитывая, что от сыпучести зависит такой важный показатель качества как точность дозирования, была проведена коррекция технологических свойств субстанции Г-104, в состав которой были введены вспомогательных вещества. Кроме того, предполагалось пролонгирование фармакологического действия изучаемого соединения Г-104. Основываясь на данных литературы [Алексеев К.В., 2012; Abou el Ela Ael S, 2014], для увеличения продолжительности анальгетического действия нами были взяты в качестве связующих производные целлюлозы: натрий карбоксиметилцеллюлоза (Na - КМЦ) (3% раствор), гидроксипропилцеллюлоза (ГПЦ) (5% раствор), гидроксипропилцеллюлоза (ГЭЦ) (5 % раствор), метилцеллюлоза-100 (МЦ) (3 % раствор). В качестве антифрикционного вещества во всех композициях был использован магния стеарат. С использованием метода влажной грануляции были получены фармацевтические композиции, у которых определяли следующие параметры: сыпучесть с вибрацией/без вибрации, насыпная плотность с уплотнением/без уплотнения, угол естественного откоса. Анализ полученных данных, приведенных в таблице 6.1.2 показал, что все используемые вспомогательные вещества позволяют получить грануляты с удовлетворительными технологическими свойствами (хорошей сыпучестью и удовлетворительной насыпной плотностью), подтверждаемыми оптимальными значениями угла естественного откоса, что позволяет говорить о пригодности всех полученных фармацевтических композиций для капсулирования.

Таблица 6.1.2 - Технологические свойства фармацевтических композиций Г-104

Композиция	Связующее	Сыпучесть, кг×10 ⁻³ /с		Насыпная плотность, кг×10 ⁻³ /см ³		Угол естествен. откоса, °
		с вибрацией	без вибрации	с уплотнением	без уплотнения	
1	Na-КМЦ	7,40±0,32*	7,77±0,19*	0,566±0,002*	0,414±0,003	25°±2°
2	ГПЦ	8,20±0,24*	8,71±0,33*	0,522±0,003*	0,441±0,002	25°±3°
3	ГЭЦ	7,49±0,33*	7,87±0,32*	0,496±0,002*	0,392±0,004	26°±3°
4	МЦ-100	7,90±0,37*	8,34±0,32*	0,495±0,005*	0,436±0,003	29°±2°
	Г-104	0	0	0,735±0,006	0,418±0,015	45°±2°

* $p < 0,05$ при сравнении с параметрами субстанции Г-104 с использованием t -критерия Стьюдента

Известно, что далеко не все фармацевтические композиции, имеющие удовлетворительные технологические показатели, обладают высокой биологической доступностью и фармакологической активностью. В связи с этим дальнейшие исследования посвящены исследованию фармакокинетики и фармакодинамики разработанных нами фармацевтических композиций.

6.2 Изучение фармакокинетики фармацевтических композиций соединения Г-104 в сравнении с субстанцией при пероральном пути введения

Для изучения фармакокинетики соединения Г-104 нами была разработана методика количественного определения концентрации соединения Г-104 в плазме крови методом ВЭЖХ и проведена ее валидация, результаты которой приведены в приложении Б. Исследование фармакокинетики проводили на белых нелинейных крысах ($n=35$). Однократно вводили в желудок животных с помощью зонда субстанцию и фармацевтические композиции соединения Г-104 в дозе, равной ЭД₅₀ = 30 мг/кг соединения.

Забор крови и определение концентрации изучаемого соединения Г-104 проводили в 8 временных точках через 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 24,0 часа. Результаты измерения концентрации соединения Г-104 чистой субстанции и в составе фармацевтических композиций представлены в виде фармакокинетических кривых на рисунке 6.

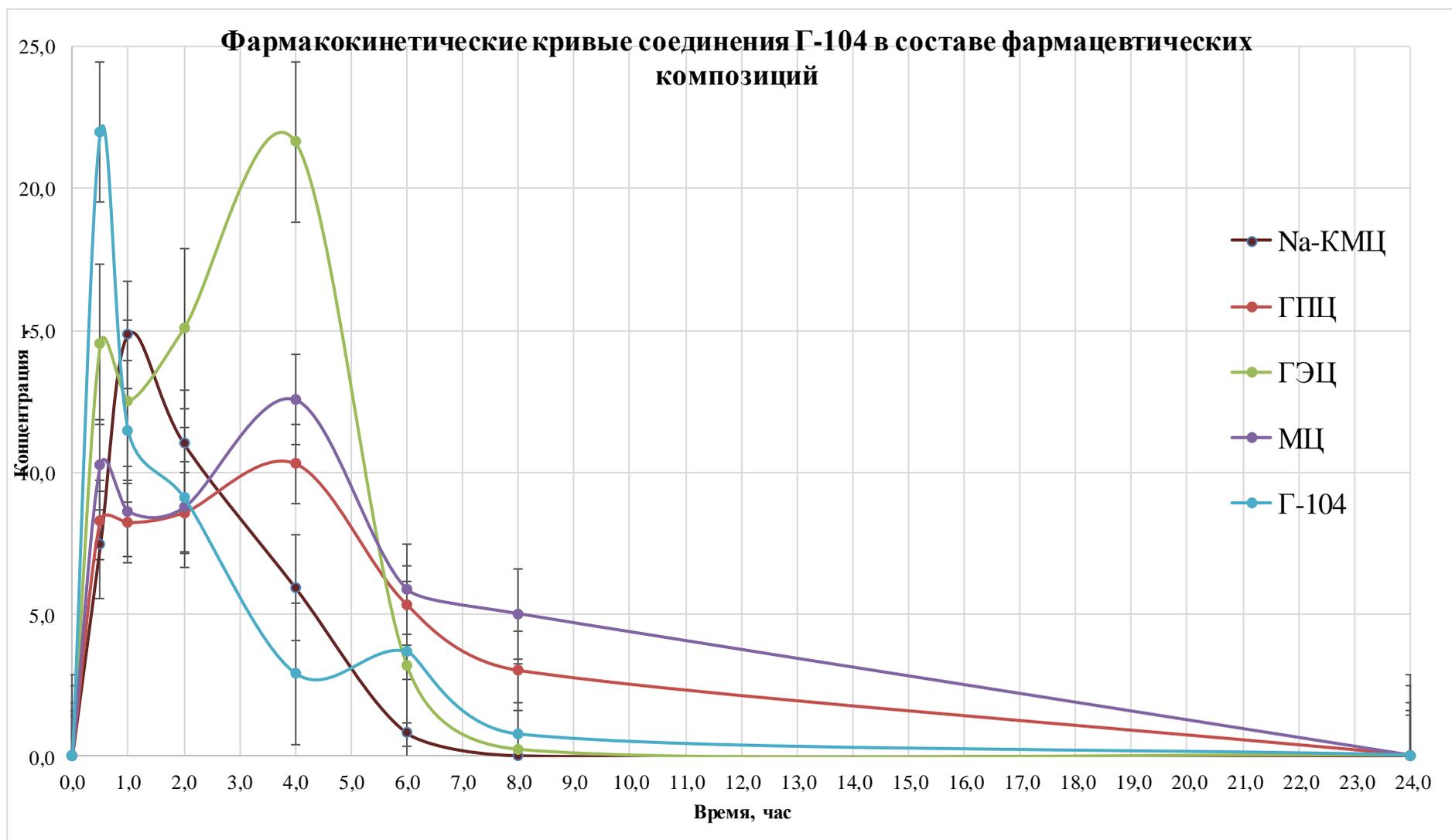


Рисунок 6. Фармакокинетические кривые соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о, крысы) в составе фармацевтических композиций

По полученным фармакокинетическим кривым были рассчитаны фармакокинетические параметры соединения Г-104 в смеси со вспомогательными веществами, которые приведены в таблице 6.2.2:

Таблица 6.2.2 - Фармакокинетические параметры субстанции соединения Г-104 и в смеси со вспомогательными веществами при пероральном пути введения.

Сводные параметры	Субстанция Г-104	Г-104+ Na-КМЦ	Г-104+ ГЭЦ	Г-104+ ГПЦ	Г-104+ МЦ
t max, час	0,5±0,1	1,0±0,3	4,0±0,5*	4,0±0,2*	4,0±0,3*
C max, мкг/мл	22,0±0,8	14,5±1,9	21,7±1,9	10,2±1,4*	12,6±1,6*
AUC _{0→∞} мкг*ч/мл	63,5±12,3	55,1±14,2	99,4±13,8*	107,1±11,0*	114,9±15,1*
Cmax/AUC _{0→∞}	0,41±0,10	0,27±0,02	0,29±0,04*	0,17±0,04*	0,21±0,08*
Kel	0,36±0,07	0,38±0,04	0,41±0,07	0,26±0,03*	0,27±0,14*
T _{1/2} , час	1,9 (1,2-2,9)	1,9 (1,5-2,6)	1,7 (0,5-2,0)	3,0 (2,6-5,4)*	2,7 (2,1-3,1)*

* $p < 0,05$ при сравнении с параметрами субстанции Г-104

При введении соединения Г-104 в составе фармацевтических композиций, содержащих ГПЦ и МЦ, обнаружено увеличение периода полувыведения (до 2,7 и 3,0 часа) и сопоставимое уменьшение константы элиминации (K_{el} соединения Г-104 равна 0,36, а в составе фармацевтических композиций с ГПЦ и МЦ K_{el} равна 0,26-0,27 соответственно). Одновременно отмечается повышение биодоступности в составе фармацевтических композиций с ГЭЦ, ГПЦ и МЦ (увеличение $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ практически в 2,0 раза с $63,5 \pm 12,3$ до $99,4 \pm 13,8$; $107,1 \pm 11,0$ и $114,9 \pm 15,1$ соответственно). Изменение фармакокинетических параметров при введении фармацевтической композиции, содержащей Na-КМЦ, не является достоверным по отношению к субстанции Г-104. Учитывая неоднозначное влияние вспомогательных веществ на фармакокинетические параметры соединения Г-104, представляло интерес изучить фармакодинамику фармацевтических композиций, содержащих ГЭЦ (гидроксиэтилцеллюлозу), ГПЦ (гидроксипропилцеллюлозу) и МЦ (метицеллюлозу), которые были выбраны для дальнейшего фармакодинамического исследования.

6.3 Изучение фармакодинамики фармацевтических композиций соединения Г-104 в сравнении с субстанцией при пероральном пути введения

Сравнение фармакодинамических свойств субстанции Г-104 и в смеси со вспомогательными веществами проводили на модели отведения хвоста от луча света на белых нелинейных крысах при пероральном введении в дозе 30 мг/кг по методике, приведенной в главе 2. Согласно фармакокинетической кривой на рисунке 6 соединение Г-104 спустя 8 часов после перорального введения отсутствует в плазме крови.

Фармакокинетический анализ кривых зависимости концентрации соединения Г-104 от времени (Рисунок 6) показал наличие соединения Г-104 в плазме крови спустя 8 часов в составе фармацевтических композиций, содержащих гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу и метилцеллюлозу. Для последующего фармакодинамического анализа на экспериментальных животных были выбраны фармацевтические композиции, содержащие ГЭЦ, ГПЦ и МЦ, которые вводили животным перорально, анальгетический эффект оценивался в динамике спустя 4, 8 и 10 часов от момента введения (таблица 6.3.1).

Таблица 6.3.1 – Анальгетические свойства субстанции Г-104 и в составе фармацевтических композиций на модели отведения хвоста от луча света

Время от момента введения	Г-104 (n=8)	Г-104+ ГПЦ (n=8)	Г-104+ ГЭЦ (n=8)	Г-104+ МЦ (n=8)	Контроль (n=8)
4 часа	8,2±1,0	12,3±1,0*	15,3±0,9*	13,3±1,0*	7,9±0,8
8 часов	9,2±0,7	14,3±1,6*	8,4±0,8	11,2±1,8**	8,3±1,0
10 часов	7,4±0,8	7,9±1,1	8,3±0,7	9,3±1,0	8,4±0,9

* $p < 0,05$ и ** $p < 0,5$ при сравнении с группой контроля с использованием t -критерия Стьюдента

Спустя 4 часа от введения изучаемых фармацевтических композиций наиболее выраженный эффект обнаруживался у композиции, содержащей в своем составе ГЭЦ, при этом анальгетическое действие оказывали как композиция, содержащая ГПЦ, так и композиция, содержащая МЦ. Через 8 часов латентный период отдергивания хвоста от луча света после введения фармацевтической

композиции, содержащей ГПЦ статистически значимо и статистически незначимо после введения фармацевтической композиции, содержащей МЦ превышал показатель контрольной группы. Латентный период отдергивания хвоста от луча света спустя 8 часов после введения фармацевтической композиции, содержащей ГЭЦ был на уровне показателей контрольной группы. Через 10 часов от момента введения соединения Г-104 и фармацевтических композиций обезболивающий эффект отсутствовал во всех экспериментальных группах.

Таким образом, статистический анализ полученных данных с использованием t-критерия Стьюдента показал достоверное ($p < 0,05$) сохранение анальгетического эффекта спустя 8 часов после введения фармацевтической композиции, содержащей ГПЦ и статистически недостоверное ($p < 0,5$) после введения фармацевтической композиции, содержащей МЦ. На основании данных биологической доступности и анальгетической активности, было установлено, что фармацевтические композиции, содержащие в своем составе гидроксипропилцеллюлозу и метилцеллюлозу, обеспечивают повышение биодоступности и пролонгирование анальгетического действия изучаемого соединения Г-104, в связи с чем и были выбраны для расчета терапевтической дозы человека и расчета рационального размера капсул.

6.4 Расчет дозы соединения Г-104 для I фазы клинических исследований

Одним из основных этапов разработки нового лекарственного средства является I фаза клинических исследований. Целью данной фазы является установление переносимости, безопасности, наличия терапевтического действия, фармакокинетического и фармакодинамического профилей. При этом решающим фактором является определение максимальной рекомендованной начальной дозы (МРНД) и эффективной дозы для человека (ЭДЧ) [Гуськова Т.А., 2010, 2012].

В качестве основной была использована доза 30 мг/кг, так как она приблизительно равна ЭД₅₀ при оценке анальгетического эффекта на большинстве экспериментальных моделей болевой чувствительности, и введение данной дозы в течение хронического эксперимента не дало значимых токсических эффектов на

жизненно-важные органы и системы [Зенкова Е.А., 2016], что является определяющим при выборе дозы для I этапа клинических исследований на здоровых добровольцах [Гуськова Т.А., 2010].

Эффективная доза для человека (ЭДЧ) была рассчитана с использованием соответствующего коэффициента пересчета [Гуськова Т.А., 2012]:

$$\frac{\text{(Доза крысы} \times \text{Коэффициент крысы)}}{\text{Коэффициент человека}} = \frac{30 \text{ мг/кг} \times 6,5}{39} = 5 \text{ мг/кг}$$

Таким образом, в качестве максимальной рекомендованной начальной дозы, которая обладает обезболивающим эффектом и не вызывает токсических эффектов была выбрана доза 5 мг/кг. При пересчете на человека массой 70 кг средняя терапевтическая доза составила 350 мг.

6.5 Технологические параметры готовых лекарственных форм соединения Г-104. Выбор оптимального состава

Промышленность выпускает твердые капсулы 8 стандартных типоразмеров (Standart). Вместимость каждого размера изменяется в зависимости от вида вещества и его плотности. Для выбора соответствующего размера капсулы имеется таблица вместимости (таблица 6.5.1).

Таблица. 6.5.1 – Размер (номер) капсул

Номер	000	00	0	1	2	3	4	5
Средняя вместимость капсулы, мл	1,37	0,95	0,68	0,5	0,37	0,3	0,21	0,13

Предварительная средняя терапевтическая доза соединения Г-104 для человека была рассчитана равной 350 мг.

Используя параметр насыпной плотности с уплотнением, рассчитали объем, занимаемый фармацевтическими композициями соединение Г-104+ГПЦ и соединение Г-104+МЦ навеской 350 мг (таблица 6.5.2).

Таблица 6.5.2 – Рекомендуемый расчетный номер капсул

Состав фармацевтической композиции	Насыпная плотность, г/см ³	Занимаемый объем навески, см ³	Номер капсулы
Соединение Г-104 +ГПЦ	0,522	0,67	0
Соединение Г-104+МЦ	0,495	0,71	0-1

Наиболее подходящим типоразмером для расфасовки 350 мг субстанции является 0 номер капсул, вместимостью 0,68 мл.

Для капсул, содержащих фармацевтические композиции, полученные на основе соединения Г-104, были проведены испытания на *распадаемость, однородность массы дозированных лекарственных форм* согласно стандартным методикам ГФХП (ОФС.1.4.1.0005.15 «Капсулы», ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул», ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм»).

Согласно требованиям ОФС.1.4.1.0005.15 «Капсулы» капсулы должны распадаться в воде за 30 минут. Из таблицы 6.5.3. следует, что капсулы, содержащие ГПЦ распадаются за $19,4 \pm 0,9$ минуты, а содержащие МЦ за $30,2 \pm 1,3$ минуты.

Таблица 6.5.3 - Распадаемость капсул, содержащих различные фармацевтические композиции соединения Г-104

Состав	Соединение Г-104+ГПЦ (n=18)	Соединение Г-104+МЦ (n=18)
Время распадаемости (мин)	$19,4 \pm 0,9$	$30,2 \pm 1,3$

Средние массы 20 дозированных лекарственных форм соединения Г-104 для полученных фармацевтических композиций, допустимый интервал отклонений 7,5% и результаты испытаний приведены в таблице 6.5.4.

Таблица 6.5.4 – Оценка однородности массы дозированных лекарственных форм капсул, содержащих фармацевтические композиции соединения Г-104

Состав	Соединение Г-104 +ГПЦ	Соединение Г-104+МЦ
Средняя масса, грамм (n=20)	$0,356 \pm 0,02$	$0,352 \pm 0,02$
Интервал 7,5% (n=20)	$0,331 \div 0,380$	$0,327 \div 0,377$

Исходя из полученных фармакокинетических и фармакодинамических данных, выраженный пролонгированный обезболивающий эффект спустя 8 часов от начала введения сохраняется у фармацевтической композиции, содержащей в

качестве вспомогательного вещества гидроксипропилцеллюлозу (ГПЦ). Капсулы, содержащие ГПЦ, соответствуют требованиям теста распадаемости, в котором время распадаемости у данной фармацевтической композиции укладывается в 30 минутный рекомендуемый интервал, и удовлетворяют требованиям по параметру оценки однородности массы капсул.

Полученная лекарственная форма капсулы соединения Г-104, содержащие в качестве вспомогательного вещества ГПЦ, была испытана на стабильность. Определение срока годности проводили на трех сериях капсул, упакованных в банки полимерные с натягиваемой крышкой. Стабильность капсул изучали в соответствии ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» в естественных условиях в сухом, защищенном от света месте при температуре 25 ± 2 С° и относительной влажности не более 60%.

В процессе хранения серии разработанных капсул подвергались анализу по показателям: описание, подлинность, средняя масса и однородность по массе, распадаемость, однородность дозирования, посторонние примеси, микробиологическая чистота, количественное определение. Результаты представлены в Приложении В. В ходе изучения стабильности при хранении в естественных условиях, капсулы анализировали согласно ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств» в течение первого года хранения – через каждые три месяца, в течение второго года – через каждые 6 месяцев. При анализе результатов установлено, что средняя масса и однородность по массе капсул, распадаемость экспериментальных серий капсул соединения Г-104 в течение двух лет хранения находились в допустимых пределах. Полученные первые показатели приемлемости были меньше значения L1 и соответствовали требованиям ОФС.1.4.2.0008.15 «Однородность дозирования». Количественное содержание действующего вещества соединения Г-104 к концу срока наблюдения также находилось в допустимом интервале. Все полученные результаты позволяют утверждать, что капсулы, содержащие соединение Г-104 и в качестве вспомогательного вещества гидроксипропилцеллюлозу (ГПЦ) стабильны в течение 2 лет (время наблюдения).

6.6 Заключение

Оценка параметров сыпучести, насыпной плотности и угла естественного откоса показали неудовлетворительные технологические качества субстанции Г-104. Фармакокинетические исследования путем определения концентрации анализируемого соединения Г-104 в плазме белых лабораторных крыс позволили установить время достижения максимальной концентрации в крови, равное $0,5 \pm 0,1$ часа (30 ± 6 минут), и период полувыведения, равный 1,9 (1,2 – 2,9) часа, исходя из чего может быть сделан вывод о соединении Г-104 как быстро и короткодействующем. Для улучшения технологических параметров и технологического процесса, а также для оптимизации фармакокинетических параметров и пролонгирования действия соединения Г-104 были созданы фармацевтические композиции на основе производных целлюлозы. Изучение технологических параметров полученных фармацевтических композиций, позволило установить, что все полученные фармацевтические композиции обладают удовлетворительными технологическими параметрами (сыпучесть с вибрацией и без вибрации, насыпная плотность с уплотнением и без уплотнения). Дальнейшие фармакокинетические исследования определили содержание соединения Г-104 в крови спустя 8 часов от момента введения в составе фармацевтических композиций, содержащих гидроксипропилцеллюлозу и метилцеллюлозу. Полученные фармакокинетические данные согласуются с данными анальгетической активности. Оценка обезболивающего действия спустя 8 часов от момента введения соединения Г-104 указывает на сохранение анальгетического действия соединения Г-104 в составе фармацевтической композиции, содержащей гидроксипропилцеллюлозу (Г-104+ГПЦ). Недостоверное увеличение латентного периода наступления болевой реакции наблюдается также при введении фармацевтической композиции, содержащей соединение Г-104 и метилцеллюлозу (Г-104 +МЦ). При этом анальгетический эффект, биодоступность и другие фармакокинетические параметры были

предпочтительнее у фармацевтической композиции на основе гидроксипропилцеллюлозы. Таким образом, фармакокинетические и фармакодинамические исследования позволили выбрать оптимальный состав (соединение Г-104 + гидроксипропилцеллюлоза), обеспечивающий сохранение анальгетического эффекта до 8 часов включительно, предполагаемую дозировку для человека, равную 350 мг и соответствующий размер капсул (№0). Дальнейшие технологические исследования показали, что полученные капсулы отвечают требованиям по параметрам «Распадаемость» и «Однородность массы» согласно стандартным методикам ГФХП (ОФС.1.4.1.0005.15 «Капсулы», ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул», ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм») и сохраняют стабильность при испытании стабильности в течение 2 лет (время наблюдения) (ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств»).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фармакотерапия болевого синдрома является необходимым, а в случаях, когда речь идет о паллиативной медицине [Абузарова Г.Р., 2015], обязательным компонентом в схеме лечения. Достижение адекватного обезболивания с использованием фармакологических препаратов, как правило, сопровождается наличием побочных эффектов [De Conno F., 2008]. Поиск новых лекарственных средств, обладающих выраженным анальгетическим эффектом продолжается. При этом наряду с синтетическими производными различных групп [Спасов А.А., 2013], исследуются антиноцицептивные свойства алкалоидов [Wu Y., 2015; Montrucchio D., 2013]. Морфин - представитель изохинолиновых алкалоидов, обладает высокой обезболивающей активностью, известной более 200 лет [Орехов, А.П., 1955]. Современные работы [Ogiyama T., 2014; Voight E.A., 2014] также подтверждают наличие антиноцицептивных свойств у вновь выделенных природных и синтетических изохинолинов и изохинолиновых алкалоидов. В Институте Технической Химии УрО РАН под руководством профессора Шкляева Ю.В. был синтезирован ряд соединений. Скрининговые исследования выявили анальгетическую активность производного изохинолина – 6-(3,3-диметил-3,4-дигидро-изохинолин-1-ил) аминокснсановой кислоты под лабораторным шифром Г-104.

Углубленное исследование анальгетической активности соединения Г-104 позволило установить выраженный обезболивающий эффект на различных моделях боли с использованием термических, механических и химических агентов.

Предварительные исследования, включающие в себя пероральное введение изучаемого соединения Г-104 в широком диапазоне доз (20, 30 и 50 мг/кг) и последующую оценку анальгетического действия позволили установить, что средняя эффективная доза ($ЭД_{50}$) в тестах отведения хвоста от луча света, дозированного механического раздражения основания хвоста крыс с помощью зажима (метод Гаффнера), формалиновой гипералгезии, укусных корчей была равна 30 (21÷40) мг/кг, 25 (19÷39) мг/кг, 27 (16÷46) мг/кг и 28 (18÷43) мг/кг

соответственно. В последующем, ввиду близости полученных значений ЭД₅₀, обезболивающее действие соединения Г-104 изучалось в дозе 30 мг/кг перорально.

Экспериментальная модель отведения хвоста от луча света характеризующая спинальный уровень анальгезии, позволила установить высокий уровень обезболивающей активности исследуемого соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о), при этом латентный период наступления болевой реакции увеличился в 1,8 раза в сравнении с контрольной группой животных и был сопоставим с препаратами Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о). Полученные данные согласуются с результатами работ, в которых анальгетический эффект Кеторолака в тесте отведения хвоста от луча света увеличивает продолжительность латентного периода наступления болевой реакции в 1,6-2,2 раза [Tejwani, G.A., 2004; Abou el Ela Ael S, 2014].

Анальгетический эффект соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о), оцененный с использованием механического сдавливания основания хвоста был сопоставим с нестероидным противовоспалительным средством Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и анальгетиком со смешанным механизмом, включающем в себя как опиоидный, так и не опиоидный компоненты Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о), обезболивающее действие которых на экспериментальной модели механического сдавливания хвоста было продемонстрировано ранее [Sekhar, N.C., 2014].

Формалиновая гипералгезия является моделью с использованием альгогенов. Первая фаза реакции развивается сразу и характеризуется воздействием на первичные афференты боли, вторая фаза отставлена во времени и является болью, вызванной воспалительной реакцией [Воронина Т.А., 2012].

Число болевых паттернов «сокращение/встряхивание» уменьшилось после введения соединения Г-104 на 48,2% в фазу I и на 69,0% в фазу II в сравнении с количеством болевых реакции в группе контроля. Обезболивающее действие изучаемого соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) было сопоставимо с референтными препаратами Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадолом (4,29 мг/кг, п/о) в I фазу и совпадало с Кеторолаком (0,85 мг/кг, п/о) и незначительно уступало Трамадолу

(4,29 мг/кг, п/о) в II фазу. Полученные результаты согласуются с данными литературы. Несмотря на то, что для Кеторолака более предсказуем периферический противовоспалительный эффект, и как следствие, активность во II фазе ноцицептивного ответа, согласно ряду исследований, анальгетический эффект Кеторолака может проявляться также в I фазе формалиновой гипералгезии [Barreras-Espinoza I., 2016; Patiño-Camacho S., 2017]. Трамадол обладает способностью оказывать обезболивающее действие в I и II фазы ноцицептивной реакции [Déciga-Campos, M., 2016; Воронина Т.А., 2012].

В качестве модели, позволяющей оценить периферический анальгетический эффект соединения, была использована модель укусы корчи. Данная экспериментальная модель позволяет воспроизводить у лабораторных животных периферическую висцеральную боль, характеризующуюся ноющими, разлитыми и схваткообразными ощущениями, при этом оба препарата сравнения демонстрируют на данной модели высокую анальгетическую активность [Zapata-Morales J.R., 2016; Déciga-Campos, M., 2016]. Количество болевых реакций (корчей) на фоне введения соединения Г-104 (30 мг/кг, п/о) было в 2,8 раза меньше, чем в контрольной группе животных, что указывает на выраженное обезболивающее действие изучаемого соединения. Анальгетический эффект при этом, достоверно превышал обезболивающее действие препаратов сравнения Кеторолак (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадол (4,29 мг/кг, п/о) в 1,9 и 1,6 раза соответственно.

С использованием антагониста 5HT-2 рецепторов метисергида (1мг/кг в/б) и ингибитора синтеза серотонина параклорфенилаланина (150 мг/кг, в/б) было показано участие серотонинергической системы в реализации обезболивающего эффекта соединения Г-104, что хорошо согласуется с данными литературы о возможном наличии у производных изохинолина серотонинергических мишеней в механизме обезболивающего действия указанного класса соединений [Chłóń-Rzera, G., 2016; Mi G., 2017].

Одним из необходимых этапов углубленного изучения нового лекарственного соединения является оценка его токсичности. При этом

общеизвестно, что исследование острой токсичности позволяет установить переносимые, токсические и летальные дозы фармакологического вещества и причины наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации [Арзамасцев Е.В., 2012; Хабриев Р.У., 2005]. Однократное введение соединения Г-104 в дозе 6000 мг/кг и отсутствие гибели животных в течение 14 дней наблюдения позволило отнести его к V классу практически нетоксичных веществ по классификации Hodge H., 1975 и IV классу опасности как малоопасное вещество согласно ГОСТ 12.1.007-76.

Расчетным путем был установлен условный терапевтический индекс изучаемого соединения Г-104 равный 200, что превышает препараты сравнения Кеторолак и Трамадол в 1,7 и 3,8 раза соответственно.

Все известные на сегодняшний день лекарственные препараты в целом и анальгетики в частности, не лишены побочных эффектов [Чурюканов В., 2002]. При этом для группы наркотических анальгетиков к нежелательным эффектам относят способность вызывать лекарственную зависимость, эйфорию, привыкание, угнетение дыхательного центра и снижение моторики желудочно-кишечного тракта, а для группы нестероидных противовоспалительных средств основным побочным эффектом является ulcerогенный эффект.

Такой значимый побочный эффект наркотических анальгетиков как угнетение дыхания отсутствует у соединения Г-104. Влияния на амплитуду, ритм и частоту дыхательных движений не отмечено. Сравнение анальгетического действия соединения Г-104 после однократного введения с анальгетическим действием после 28 дней введения показало равнозначность полученных эффектов, что указывает на отсутствие толерантности к анальгетическому действию. Проведенное исследование позволяет полагать, что соединение Г-104 не проявляет фармакологических свойств, способствующих формированию как физической зависимости (в тестах толерантности и синдрома отмены без провокации налоксоном), так и аддикции (в тесте УРПМ).

В диапазоне доз 30 – 300 мг/кг при тестировании в установке «открытое поле» изменений поведения, вертикальной и горизонтальной двигательной

активности не отмечено, что указывает на отсутствие седативного эффекта. Все животные, помещенные в комплекс «Ротарод» удерживались в течение 2 минут на вращающемся стержне, что свидетельствует о ненарушенной координации движений. В дозе 30 мг/кг соединение Г-104 не влияет на тонус мышц белых крыс, у 100% животных, получавших препарат сравнения Трамадол, наблюдалось нарушение мышечного тонуса, что проявлялось снижением времени удерживания на горизонтально натянутой проволоке и согласуется с данными литературы [Lagard С., 2016]. Соединение Г-104 не проявило ulcerогенного действия при введении в диапазоне доз 30 – 300 мг/кг. Слизистая желудка, согласно результатам гистологического исследования, осталась без изменений.

Дополнительно было изучено влияние соединения Г-104 на сердечно-сосудистую систему. После перорального введения в дозе 30 мг/кг изменений сердечного ритма по данным ЭКГ, полученной от ненаркотизированных крыс, не установлено.

Помимо обезболивающего действия, наркотические анальгетики обладают выраженным противокашлевым эффектом. Противокашлевая активность соединения Г-104 была изучена на модели кашля, вызванного лимонной кислотой. Было установлено, что исследуемое соединение не обладает противокашлевой активностью. Количество актов кашля после введения соединения Г-104 в дозе 30 мг/кг перорально не изменилось в сравнении с фоновыми показаниями.

Разработка лекарственной формы включала в себя технологические, фармакокинетические и фармакодинамические исследования.

Оценка технологических параметров субстанции Г-104 показала, что она представляет из себя порошок, состоящий более чем на 80% из мелких и очень мелких кристаллов округлой формы. У анализируемой субстанции установлено отсутствие сыпучести и удовлетворительная насыпная плотность с уплотнением и без уплотнения ($0,418 \pm 0,015 \text{ кг} \times 10^{-3} / \text{см}^3$ и $0,735 \pm 0,006 \text{ кг} \times 10^{-3} / \text{см}^3$ соответственно). Для коррекции технологических параметров, с использованием метода влажной грануляции, в субстанцию были введены вспомогательные

вещества, производные целлюлозы (Na - КМЦ, ГПЦ, ГЭЦ и МЦ-100). Полученные на основе данных вспомогательных веществ фармацевтические композиции №1, №2, №3 и №4 соответственно, проявили значительно лучшую сыпучесть, при этом наибольшую ($8,20 \pm 0,24 \text{ кг} \times 10^{-3}/\text{с}$ с вибрацией и $8,71 \pm 0,33 \text{ кг} \times 10^{-3}/\text{с}$ без вибрации) проявила фармацевтическая композиция №2, состоящая из субстанции Г-104 и гидроксипропилцеллюлозы.

Исследование фармакокинетики соединения Г-104 и полученных на его основе фармацевтических композиций было проведено на белых нелинейных крысах. Наиболее выгодным фармакокинетическим профилем обладают фармацевтические композиции, содержащие гидроксипропилцеллюлозу (ГПЦ) и метилцеллюлозу (МЦ). При незначительном снижении скорости всасывания в сравнении с чистой субстанцией Г-104, указанные композиции удлиняют период полувыведения ($T_{1/2}$) соединения Г-104 практически в 1,5 раза, с одновременным увеличением биодоступности.

При исследовании фармакодинамики полученных фармацевтических композиций, было показано достоверное сохранение анальгетического эффекта спустя 8 часов от момента введения у фармацевтической композиции на основе ГПЦ. Эффект у чистой субстанции при этом отсутствовал.

Основной целью доклинических исследований нового потенциального лекарственного соединения является прогноз его безопасности для человека [Гуськова Т.А., 2010]. Для дальнейших клинических исследований был сделан предварительный расчет эффективной дозы для человека (ЭДЧ). С использованием коэффициентов пересчета, была получена доза 350 мг на человека.

Таким образом, на основании фармакокинетических и фармакодинамических исследований была выбрана фармацевтическая композиция, содержащая в своем составе гидроксипропилцеллюлозу, как обладающая наиболее приемлемыми фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами. Полученные результаты согласуются с

исследованиями анальгетической активности кеторолака, для которого при введении в состав лекарственного препарата гидроксипропилцеллюлозы была достигнута пролонгация анальгетического действия до 8 часов, подтвержденная на модели отдергивание хвоста от луча света [Abou el Ela Ael S, 2014]. Терапевтическая доза для человека фармацевтической композиции соединение Г-104 +гидроксипропилцеллюлоза составила 350 мг. С использованием параметра «насыпная плотность с уплотнением» был получен объем 0,67 мл, занимаемый данной массой, и выбран подходящий номер капсул «0». Полученные капсулы отвечают требованиям нормативной документации по параметрам «Распадаемость» и «Однородность массы дозированных лекарственных форм» согласно стандартным методикам ГФХП (ОФС.1.4.1.0005.15 «Капсулы», ОФС.1.4.2.0013.15 «Распадаемость таблеток и капсул», ОФС.1.4.2.0009.15 «Однородность массы дозированных лекарственных форм») и сохраняют стабильность при испытании стабильности в течение 2 лет (время наблюдения) (ОФС.1.1.0009.15 «Сроки годности лекарственных средств»).

ВЫВОДЫ

1. Соединение Г-104 при пероральном введении белым нелинейным крысам в дозе 30 мг/кг проявляет выраженное анальгетическое действие. При этом в тесте укусные корчи исследуемое вещество превосходит Кеторолак (0,85 мг/кг, п/о) и Трамадол (4,29 мг/кг, п/о) в 1,6 и 1,9 раза соответственно, и сопоставим с референтными препаратами на моделях механического раздражения основания хвоста, отведения хвоста от луча света, формалиновой гипералгезии, а также превосходит Кеторолак и Трамадол по условному терапевтическому индексу в 1,7 и 3,8 раза соответственно.
2. Соединение Г-104 не вызывает развитие респираторной депрессии, толерантности к обезболивающему эффекту, синдрома отмены, аддиктивного потенциала, седации, ульцерогенности. Изменений в рефлекторной деятельности, параметрах дыхательной и сердечно-сосудистой систем, желудочно-кишечного тракта на фоне введения соединения Г-104 не отмечено. Соединение Г-104 не обладает дополнительным противокашлевым действием, характерным для ряда анальгетиков.
3. По результатам изучения острой токсичности соединение Г-104 отнесено к V классу практически нетоксичных веществ и IV классу опасности как малоопасное вещество.
4. Фармацевтическая композиция, содержащая в своем составе соединение Г-104 и гидроксипропилцеллюлозу (ГПЦ) обладает наиболее оптимальным фармакокинетическим профилем и выраженным, пролонгированным до 8 часов, анальгетическим эффектом. Предполагаемая доза для человека составляет 350 мг, соответствующая навеска определяет 0 номер капсул.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамов, Ю.Б. Иммунные аспекты центральных механизмов боли / Ю.Б. Абрамов // Боль. – 2009. - №4 (25). – С. 2-7.
2. Абузарова, Г.Р. Обезболивание взрослых и детей при оказании медицинской помощи / Г.Р. Абузарова, Д.В. Невзорова, Э.В. Кумирова [и др.] // ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России. – М.: 2016. - С.23-24.
3. Абузарова, Г.Р., Фетисова, Е.В. Применение неопиоидного анальгетика катадолона у онкологических больных / Г.Р. Абузарова, Е.В. Фетисова // Хронические болевые синдромы: тез. докл. рос. науч.-практ. конф., Новосибирск, 23 – 25 мая 2007 г. – Новосибирск, 2007. – С. 235 – 237.
4. Алексеев К.В. Технология повышения биологической и фармацевтической доступности лекарственных веществ/ К.В. Алексеев, Н.В. Тихонова, Е.В. Блынская [и др.] // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – Т. 19. - № 4. –С. 44-47.
5. Анисимова, И.Е. Химико-токсикологическое значение НПВС и методы определения их в лекарственных формах и биологических материалах / И.Е. Анисимова // Вестник РУДН. – 2004. - №4. - С. 238-246.
6. Арзамасцев Е.В. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств / Е.В. Арзамасцев, И.В. березовская, О.Л. Верстакова // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С.13-25.
7. Арушанян, Э.Б. Обезболивающие свойства эпифизарного гормона мелатонина/ Э.Б. Арушанян // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. - Т.75, №8. – С.44-48.
8. Аутлов, С.А. Микрокристаллическая целлюлоза: структура, свойства и области применения (обзор) / С.А. Аутлов, Н.Г. Базарова, Е.Ю. Кушнир // Химия растительного сырья. – 2013. - № 3. – С.33-41.
9. Беленький, М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического

эффекта / М.Л. Беленький. - Л.:Изд-во АН Латв.ССР. - 1968. –С.71 – 82.

10.Белозерцева, И. Вызванная морфином реакция Штрауба как модель спастичности у мышей: эффекты серотонинергических соединений / И. Белозерцева, О.А. Драволина, Э.Э. Звартау // Журнал неврологии и психиатрии. – 2015. - №4, Вып. 2. – С. 73-79.

11.Болевой синдром // Под ред. В.Л. Михайловича, Ю. Д. Игнатова. — Л.: Медицина, 1990. — 336 с.

12.Болезни сердца и сосудов. Руководство для врачей: В 4т. Т.1. Под ред. Е.И. Чазова. – М.: Медицина, 1992. – С. 230 – 280.

13.Бондаренко, Д. А. In vivo модели для изучения анальгетической активности / Д.А. Бондаренко, И.А. Дьяченко, Д.И. Скобцов // Биомедицина. - 2011. - №2. – С.84-94.

14.Боят, В. Лекарственные формы паклитаксела /В. Боят, Е. Оганесян, В.Ю. Балабаньян [и др.]. // Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8. - №3. –С. 37-42.

15.Брагин, Е.О. Нейрохимические механизмы регуляции болевой чувствительности: моногр. – М.: Изд-во УДН, 1991. – 248 с.

16.Буреш, Я. Материалы и основные эксперименты по изучению мозга и поведения/ Я. Буреш, О.Бурешова , Дж. П. Хьюстон // - М.: «Высшая школа», 1991. -С. 96-122.

17.Бывальцев, В.А. Использование шкал и анкет в вертебрологии / В.А. Бывальцев, Е.Г. Белых, В.А. Сороковиков [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии. – 2011. - №9, вып.2. – С.51 – 56.

18.Ваталев, А.А. Определение некоторых опиоидных и неопиоидных анальгетиков в биологических жидкостях / А.А. Ваталев // Вестник ВолгГМУ. – 2011. - вып.4(40). – С.89-92.

19.Вейн, А.М. Боль и обезболивание / А.М. Вейн, М.Я. Авруцкий - М.:Медицина, 1997. - 280 с.

20. Вихарев, Ю.Б. Противовоспалительная и анальгетическая активности производных 3,3-диалкил-3,4-дигидроизохинолинов и фенэтиламидов: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Вихарев Юрий Борисович - Томск, 2005. – 23 с.
21. Воронина, Т.А. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств / Т.А. Воронина, Л.С. Гузевых // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С.197-219.
22. Гаврилов, А.С. Фармацевтическая технология. Изготовление лекарственных препаратов: учебник / А.С. Гаврилов. - 2010. – 624 с.
23. Гацура, В.В. Методы первичного фармакологического исследования / В.В. Гацура – М.: Медицина, 1974. – С. 16- 85.
24. Гельфанд, Б.Р., Послеоперационная анальгезия / Б.Р. Гельфанд, П.А. Кириенко, Л.Ю. Черниенко // РМЖ. - 2003. - №12. - С. 707.
25. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / С. Гланц. Пер. с англ. Данилова Ю.А. - М., «Практика», 1998. – 459 с.
26. Глушков, В.А. Синтез, антиагрегационная и гипотензивная активность бензоаннелированных азабицикло [m.n.0] алканов / В.А. Глушков, О.Г. Стряпунина, Долженко А.В. [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2009. – Т. 43, №5. – С.14-17.
27. ГОСТ 12.1.007-76. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
28. Гуськова, Т.А. Доклиническое токсикологическое изучение лекарственных средств как гарантия безопасности проведения их клинических исследований / Т.А. Гуськова // Токсикологический вестник. – 2010. - №5(104). - С.2-5.
29. Гуськова, Т.А. Методические рекомендации по определению безопасной дозы лекарственного препарата для проведения I-фазы клинических исследований у взрослых волонтеров / Т.А. Гуськова, В.Г. Кукес, А.Н. Миронов // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С.854-865.
30. Гуцин, И.С. Производные диэтилдитиокарбаминовой кислоты как

потенциальные противоаллергические средства/ И.С. Гуцин, Т.А. Касымова, С.Я. Скачилова [и др.] // Иммунология. — 2003. - №5. – С.273.

31.Джелия, А.Б. Оценка иммунотоксичности лекарственного препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на макаках резус / А.Б. Джелия, Я. Устюгов, М. Кортава // Медицинская иммунология. – 2015. - Т. 17. - № 4. - С. 319-326.

32.Дмитриева, Е.В. Твердые пероральные лекарственные формы: изучение потребительских предпочтений пациентов (на примере антигипертензивных препаратов) / Е.В. Дмитриева, С.Н. Егорова // Медицинский альманах. – 2010. - №4 (13). - С.67-70.

33.Емшанова С.В. Фармацевтическая композиция для лечения сердца пролонгированного действия: пат. 2464018 Рос.Федерация / С.В.Емшанова, Н.И.Юрченко, Н.Б.Драгунова [и др.]; заявл.15.03.11; опубл. 20.10.2012. Бюл.29.

34.Егошина, Ю.А., Современные вспомогательные вещества в таблеточном производстве / Ю.А. Егошина, Л.А. Поцелуева // Успехи современного естествознания. – 2009. - №10. - С.30-33.

35.Жердев, В.П. Доклиническое изучение фармакокинетики нового анксиолитика дипептидной структуры ГБ-115 / В.П. Жердев, С.С. Бойко, Е.В. Блынская [и др.] // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2015. - №1. - С-52-59.

36.Зайцев, А.А. Фармакологический анализ опиоид- и адренергических механизмов регуляции гемодинамических ноцицептивных реакций // Нейрофармакологическая регуляция болевой чувствительности. - Л.: – 1984. – С.51 – 74.

37.Западнюк, И.П. Лабораторные животные, их разведение, содержание и использование в эксперименте/ И.П. Западнюк, В.И. Западнюк, Е.А. Захария. - Киев, 1983. – С.224 – 275.

38.Звартау, Э.Э. Экспериментальное доклиническое изучение аддиктивного потенциала фармакологических средств. Методические рекомендации № 2000/112 / Э.Э. Звартау, А.В. Кузьмин, А.Ю. Беспалов. – 2001. – С.4-6.

39. Зенкова Е.А. Вдовина Г.П., Бурлуцкая А.А., Данилова В.К. Исследование хронической токсичности соединения Г-104 - производного изохинолина и гексановой кислоты // Биофармацевтический журнал. – 2016. - №5. – с. 38-43.
40. Игнатов, Ю.Д. Нейрофармакологические аспекты боли: сб.науч.тр./под ред. Проф.Ю.Д. Игнатова. – Ленинград, 1982. – С. 44-61.
- 41.Исмаилова, Х.Ю. Индивидуальные особенности поведения: (моноаминергические механизмы) / Х.Ю. Исмаилова, Т.М. Агаев, Т.П. Семенова. – Баку: «Нурлан», 2007. – С.228.
- 42.Калуев, А. В. Проблемы изучения стрессорного поведения/ А.В. Калуев. - Киев, 1999. -С. 6—39.
- 43.Калюжный, Л.В. Физиологические механизмы регуляции болевой чувствительности / Л.В. Калюжный. – М.: Медицина, 1984. - 215 с.
- 44.Каприн, А.Д. Фармакотерапия хронического болевого синдрома у взрослых пациентов при оказании паллиативной медицинской помощи в стационарных и амбулаторно-поликлинических условиях. Методические рекомендации / А.Д. Каприн, Г.Р. Абузарова, В.Э. Хороненко. - М.: 2015. - С.11-15.
- 45.Каратеев, А.В. Кеторолак в клинической практике / А.В. Каратеев // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2011. - №4 – С. 81-89.
- 46.Карцев, В.Г. Биологическая активность и новые направления в химии изохинолиновых алкалоидов/ В.Г. Карцев //Химия и биологическая активность азотистых гетероциклов и алкалоидов: материалы Первой Междун. конф., Москва, 9-12 окт.. 2001г. – Москва,2001. - С .97-104.
- 47.Колик, Л.Г. Экспериментальное изучение антиноцицептивных свойств дипептида ГБ-115 при химической и термической стимуляции/ Л.Г. Колик, В.Н. Жуков, Гудашева Т.А. [и др.] // Бюллетень экспериментальной фармакологии и медицины. – 2012. - Т.153. - №4. –С.455-459.
- 48.Константинопольский, М.А. Дипептидный аналог нейротензина NT (8-13) дилепт повышает болевой порог и снижает выраженность синдрома отмены морфина у крыс /М.А. Константинопольски, И.В. Чернякова, В.С. Кудрин [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. - №10. - С.6-11.

49. Королева, Л.С. Средство для инактивации вирусов, обладающее одновременной рибонуклеазной, мембранолитической и противовирусной активностями: Патент 2399388; заявл. 17.12.2008; опубл. 20.09.2010. Электронная база патентов. -URL: <http://bd.patent.su/2399000-2399999/pat/servlet/servlet66b2.html> (дата обращения 02.12.2015).
50. Кукушкин, М.Л. Хроническая боль / М.Л. Кукушкин // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2010. - №3. - с.80-86.
51. Кукушкин, М.Л. Болевой синдром: патогенез, клиника, лечение /М.Л. Кукушкин, Г.Р. Табеева, Подчуфарова Е.В. – М.: ИМА-Пресс. - 2011. – С. 6.
52. Кулагина, И. Б. Влияние состояния тетродотоксинрезистентных натриевых каналов на электрическую активность ноцицептивного сенсорного волокна: модельное исследование / И.Б. Кулагина, В.А. Мякушко // Нейрофизиология. — 2011. — Т. 43. - № 1. - С.3-10.
53. Куличенко, А. Н. Сравнительное изучение фармакокинетики офлоксацина в свободной и нисомальной форме в эксперименте на белых мышах при введении per os /А.Н. Куличенко, М.Е. Михайлова, Д.А. Ковалев [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. - Вып. № 1-2. – Т.69. - С. 80-84.
54. Курьянов В.О. Угледод-аминокислотные конъюгаты: синтез и биологическая активность /В.О. Курьянов, Т.А.Чупахина, А.А. Шаповалова [и др.] // Ученые записки Таврического национального университета им. В. И. Вернадского. Серия «Биология, химия». - 2010. – Т.23(62). - № 2. - С. 238-243.
55. Лечение болевого синдрома у онкологических больных. Методические рекомендации. – Москва, 1990. – С. 4-7.
56. Миронов, Н.Ю. Ванилоидные рецепторы: структура, участие в регулировании функций организма, фармакология, терапевтический потенциал Н.Ю. Миронов, В.В. Чурюканов // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2006. –Т.69. - №5. - С. 55-69.
57. Михайловский, А.Г. Направленный синтез и сердечно-сосудистая активность производных изохинолина и фенантридина /А.Г. Михайловский, Б.Я. Сыропятов, А.В. Долженко [и др.] Химия и биологическая активность азотистых

гетероциклов и алкалоидов: матер. первой междунароод. конф., Москва, 9-12 окт. 2001. – Москва, 2001. – Т.1. - С.435-439.

58.Никенина, Е.В. Ноцицептивная чувствительность и лимфоцитарный индекс периферической крови у крыс с разной поведенческой активностью на модели воспалительной боли, вызванной введением полного адьюванта Фрейнда и бычьего сывороточного альбумина/ Е.В. Никенина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2012. - Т.153. - №5. – С.582 – 584.

59.Овечкин, А.М. Клинические рекомендации и алгоритмы для практикующих врачей / А.М. Овечкин, Н.М. Федоровский // Русский медицинский журнал, Дерматология. - 2007. – Т. 15. - № 6. –С.487.

60.Орехов, А.П. Химия алкалоидов / А.П. Орехов. – М.: Издательство академии наук СССР. – 1955. - С. 249-554.

61.Осипова, Н.А. Принципы применения анальгетических средств при острой и хронической боли / Н.А. Осипова, Г.Р. Абузарова, В.В. Петрова. - М.: ФГБУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Минздравсоцразвития России». - 2010. – 67с.

62.Перегуд, Д.И. Содержание мРНК субъединиц глутаматного рецептора NMDA–подтипа во фронтальной коре и стриатуме крыс при отмене морфина связано с выраженностью абстиненции / Д.И. Перегуд, А. А. Яковлев, М.Ю. Степаничев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - Т. 153, №6. - 2012. – С.812-815.

63.Петрявская, Н.В. Роль холинергического звена в функционировании адренергических и опиоидергических анальгетических механизмов/ Н.В. Петрявская // Нейрофармакологическая регуляция болевой чувствительности. - 1984. - Ленинград. – С.74 – 79.

64.Правила лабораторной практики. Приказ Минздрава РФ № 199 н от 01 апреля 2016г.

65. Раснецов, Л. Д. Гидратированные n-фуллерен-аминокислоты, способ их получения и фармацевтические композиции на их основе. [Электронный ресурс] / Л.Д. Раснецов, Я.Ю. Шварцман, О.Н. Суворова // Патент РФ № RU2458046С1,

Бюл. изобрет., № 22 (2012). - FindPatent – база данных патентов. – Режим доступа <http://www.findpatent.ru/patent/245/2458046.html>

66.Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. А.Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

67.Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /Под ред. Р. У. Хабриева. - М., ОАО «Издательство «Медицина», 2005. - 832 с.

68.Семенов, А.А. Очерк химии природных соединений / А.А. Семенов. - Новосибирск, «Наука». Сибирская издательская фирма РАН. – 2000. – С. 478 – 510.

69.Сиракян, С.Н. Синтез новых, конденсированных, биологически активных производных пирано[3,4-с] пиридинов и 5,6,7,8 – тетрагидроизохинолинов / С.Н. Сиракян, Е.Г. Пароникян, А.С. Норавян // Химия и биологическая активность азотистых гетероциклов и алкалоидов: материалы Первой Международ. конф., Москва, 9-12 окт.2001 г. – Москва, 2001. - С. 527-529.

70. Спасов, А.А. Анальгетические свойства производного морфолиноэтилимидазобензимидазола/ А.А. Спасов //Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. - Т.76. - №10. - С.15-18.

71.Степанова, Э.Ф. Микрокапсулы: перспективы использования в современной фармацевтической практике / Э.Ф.Степанова, М.Е. Ким, Мурзагулова К.Б. [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2014. - №5.

72.Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Нестероидные противовоспалительные средства: методическое пособие. – [НИИАХ СГМА, 2000-2009]. – URL: <http://www.antibiotic.ru/rus/all/metod/npvs/npvs.shtml> (дата обращения: 14.08.2015).

73. Ташмухамедов, Р. И. Биологически активные аминокислотные производные поли-N-винилпирролидона и их металлокомплексы: автореф. дис. ... док.хим.наук: 02.00.06 / Ташмухамедов Равшан Иркинович. – М.: 2007. – 45 С.

74.Теслев, А.А. Современные подходы в технологии лекарственных препаратов для лечения ишемической болезни сердца/ А.А. Теслев, В.В. Сорокин, И.Е.

- Каухова [и др.] // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. - № 11(154) – С.246-252.
- 75.Трахтенберг, И.М. Проблемы нормы в токсикологии/ под ред. проф. И.М. Трахтенберга. - М.: «Медицина», 1991. - 203 с.
- 76.Ульрих, Г. Э. Послеоперационное обезболивание у детей. Какие стандарты нам использовать? / Ульрих, Г. Э., Заболотский Д.В // Регионарная анестезия и лечение острой боли. – Т. IX. - №2. - 2015. – С.40-45.
- 77.Усанова, А.А. Влияние производных ацетилглутаминовой и аминокснгановой кислоты на процессы язвобразовання и перекисного окисления липидов в эксперименте / А.А. Усанова, М.В. Зорькин // Научные ведомости. Серия Медицина. Фармация. - 2015. - № 4 (201). – Вып. 29. - С.85-90.
- 78.Утешев Д.Б. Методические рекомендации по доклиническому изучению противокашлевых и муколитических лекарственных средств/ Д.Б. Утешев// Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. А.Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. –С.502-505.
- 79.Федотова, Ю.О. Эффекты новых аминокснганотных производных дофамина на тревожное поведение / Ю.О. Федотова // Экспериментальная и клиническая фармакология. –2012. - Т.75. - №6. – С.14-22.
- 80.Фирсов, А.А. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств / А.А. Фирсов, В.П. Жердев // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С.843-854.
- 81.Чиссов, В. И. Онкология: учебник с компакт-дискон / под ред. В.И. Чиссова, С.Л. Дарьяловой. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. - 560 с.
- 82.Чурюканов, В. Фармакология болеутоляющих средств / В. Чурюканов, М. Чурюканов // Врач. –2002. - №4. – С.29-33.
- 83.Черных, И.В. Разработка ВЭЖХ методики количественного определения этилметилгидроксипиридина сукцината в плазме крови крыс и кроликов / И.В.

- Черных, А.В. Шулькин, М.В. Гацанога [и др.] // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2015. - №1. - С.62-66.
84. Шварц, Г.Я. Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных средств / Г.Я. Шварц, Р.Д. Сюбаев // Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. / Под ред. А.Н. Миронова – М.: Гриф и К, 2012. –С.746-758.
- 85.Шкляев, Ю.В. Синтез алкалоидов изохинолинового ряда / Ю.В. Шкляев // Химия и компьютерное моделирование. Бутлеровские сообщения. - 2002. - №7. – С.21-34.
- 86.Шкляев, Ю.В. Синтез и химические свойства 1-функционально замещенных производных 3,4-дигидроизохинолинов / Ю.В. Шкляев, В.А. Глушков, Ю.В. Нифонтов // Химия и биологическая активность азотистых гетероциклов и алкалоидов: матер.перв. международ. конф., Москва, 9-12 октября, 2001. -Том 1. Москва, 2001. – С.593-597.
- 87.Юдин, М.А. Изучение характеристик токсичности при взаимодействии кофеина и кеторолака / М. А. Юдин, А. Ф. Курпякова, В. Н. Быков [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2012. - Т.75, №1. – С.27-29.
- 88.Юнусов, М.С. Биологическая активность алкалоидов / М.С. Юнусов // Материалы Первой Междунар.конф. «Химия и биологическая активность азотистых гетероциклов и алкалоидов». – М., 2001. - С. 203-209.
- 89.Ael S Abou El Ela. Ketorolac tromethamine floating beads for oral application: Characterization and in vitro/in vivo evaluation/ Ael S Abou El Ela, M.A. Hassan, D.A. El-Maraghy // Saudi Pharm. J. – 2014. - № 22(4) – P.349–359.
- 90.Ahn, K. Mechanistic and pharmacological characterization of PF-04457845: A highly potent and selective fatty acid amide hydrolase inhibitor that reduces inflammatory and noninflammatory pain/ K. Ahn, S.Smith, M.Liimatta // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2011. – Vol.338, №1. – P. 114-124.
- 91.Almansa, C. Selective sigma-1 receptor antagonists for the treatment of pain/ C. Almansa, J. Vela // Future Med Chem.– 2014. - №6(10). – P.1179-1199.

92. Angst, M. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review/ M. Angst, J. Clark // *Anesthesiology*. – 2006. - №104(3). –P.570-587.
93. Annemans, L. Pharmacoeconomic impact of adverse events of long-term opioid treatment for the management of persistent pain/ L. Annemans // *Clin Drug Investig.* – 2011. –№31 (2). –P.73-86.
94. Aydın T.H. Effect of subacute agomelatine treatment on painful diabetic neuropathy: involvement of catecholaminergic mechanisms / T.H.Aydın, Can Ö.D., Demir Özkay Ü., Turan N. // *Fundam Clin Pharmacol.* – 2016. - №30 (6). – P. 549-567.
95. Baptista-de-Souza, D. Serotonergic modulation in neuropathy induced by oxaliplatin: effect on the 5HT_{2C} receptor / D. Baptista-de-Souza, L. Di Cesare Mannelli, M. Zanardelli, L. Micheli // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. - №735. – P. 141-149.
96. Barr, G. Interactions between glia, the immune system and pain processes during early development / G. Barr, D. Hunter // *Dev. Psychobiol.* – 2014. -№56(8). – P.1698-1710.
97. Barreras-Espinoza, I. The Antinociceptive Effect of a Tapentadol-Ketorolac Combination in a Mouse Model of Trigeminal Pain is Mediated by Opioid Receptors and ATP-Sensitive K⁺ Channels / I. Barreras-Espinoza, J.A. Soto-Zambrano, N.Serafin-Higuera // *Drug. Dev. Res.* – 2017. - №78(1). – P. 63-70.
98. Beck, D. Discovery of potent indenoisoquinoline topoisomerase I poisons lacking the 3-nitro toxicophore/ D. Beck, M. Abdelmalak, W.Lv // *J. Med. Chem.* – 2015. -№58 (9). – P.3997-4015.
99. Behdad, S. Effect of oral low dose clonidine premedication on postoperative pain in patients undergoing abdominal hysterectomy: a randomized placebo controlled clinical trial / S.Behdad , V.Ayatollahi, A.G.Yazdi [et al.] // *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.* – 2013. - №117(4). – P.934-941.
100. Botting, R. Involvement of 5-hydroxytryptamine in the analgesic action of pethidine and morphine in mice/ R. Botting, A. Morinan // *Br. J. Pharmacol.* - 1982/ - №75(4). – P.579-585.
101. Cahill, C. Does the kappa opioid receptor system contribute to pain aversion? / C.M. Cahill, A.M.Taylor, C. Cook [et al.] // *Front. Pharmacol.*– 2014.- №5.–P.253. |

- 102.Cahlíková, L. Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors / L. Cahlíková, L. Hulová, M. Hrabínová // *Fitoterapia*. – 2015. - №103.– P.192-196.
- 103.Candiotti, K. Review of the effect of opioid-related side effects on the undertreatment of moderate to severe chronic non-cancer pain: tapentadol, a step toward a solution? / K. Candiotti, M. Gitlin // *Curr. Med. Res. Opin.* – 2010. - №26(7). – P.1677-1684.
- 104.Cassinelli, E.H. Ketorolac use for postoperative pain management following lumbar decompression surgery: a prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled trial/ E.H. Cassinelli, C.L. Dean, R.M.Garcia [et al.] // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2008. - №12. – P.1313-1337.
- 105.Castillo, J. The Aryne aza-Diels-Alder Reaction: Flexible Syntheses of Isoquinolines/ J. Castillo, J. Quiroga, R. Abonia // *Org. Lett.* – 2015. - №17(13). – P.3374-3377.
- 106.Cepeda M.S. Comparison of the risks of opioid abuse or dependence between tapentadol and oxycodone: results from a cohort study / M.S. Cepeda, D.Fife, Q. Ma [et al.] // *J Pain*. – 2013. -№14(10). –P.1227-1241.
- 107.Chaparro, L.E. Opioids compared with placebo or other treatments for chronic low back pain: an update of the Cochrane Review/ Chaparro L.E., Furlan A.D., A. Deshpande [et al.] // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2014. -№39(7). – P.556-563.
- 108.Chaparro, L. E. Opioids compared to placebo or other treatments for chronic low-back pain / L.E. Chaparro, A.D. Furlan, A. Deshpande [et al.] // *Cochrane Database Syst.Rev.* - 2013. - Aug 27;(8).
- 109.Chaudet, A. Impact of preoperative continuous femoral blockades on morphine consumption and morphine side effects in hip-fracture patients: A randomized, placebo-controlled study / A. Chaudet, G. Bouhours, E. Rineau [et al.] // *Anaesth. Crit. Care Pain Med.*– 2016. - №35(1). –P.37-43.
- 110.Chen, J. Efficacy and safety profile of celecoxib for treating advanced cancers: a meta-analysis of 11 randomized clinical trials / J. Chen, P. Shen, X.C. Zhang [et al.] // *Clin Ther.* – 2014. -№36(8). –P.1253-1263.

111. Choi, S. Spinal sigma-1 receptors activate NADPH oxidase 2 leading to the induction of pain hypersensitivity in mice and mechanical allodynia in neuropathic rats/ S. Choi, D. Roh, S. Yoon // *Pharmacol. Res.* – 2013. - №74. – P.56-67.
112. Chu, L. Analgesic tolerance without demonstrable opioid-induced hyperalgesia: a double-blinded, randomized, placebo-controlled trial of sustained-release morphine for treatment of chronic nonradicular low-back pain /L.F. Chu, N. D'Arcy, C. Brady // *Pain.* – 2012. -№153(8). –P.1583-1592.
113. Chłoń-Rzepa, G. Aminoalkyl Derivatives of 8-Alkoxy-purine-2,6-diones: Multifunctional 5-HT_{1A} /5-HT₇ Receptor Ligands and PDE Inhibitors with Antidepressant Activity/G. Chłoń-Rzepa, A. Zagórska, P. Żmudzki // *Arch Pharm (Weinheim).* – 2016. - № 349(12). –P.889-903.
114. Classification of Chronic Pain, Second Edition (Revised) // IASP Bookstore: international Association for the Study of Pain. [Электронный ресурс] – URL:<http://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/Content>.
115. D'Amour, F. A method for determining loss of pain sensation / F. D'Amour, D. Smith // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 1941. - №72 (1). – P.74–78.
116. De Conno, F. The MERITO Study: a multicenter trial of the analgesic effect and tolerability of normal-release oral morphine during titration phase in patients with cancer pain / F. De Conno, C. Ripamonti, E. Fagnoni [et al.] // *Palliative Medicine.* - 2008.– №22.–P.214-221.
117. Déciga-Campos, M. Synergistic antinociceptive interaction between palmitoylethanolamide and tramadol in the mouse formalin test / M. Déciga-Campos, P.M. Ramírez-Marín, F. J. López-Muñoz // *Eur. J. Pharmacol.* – 2015. №15. –P.765-774.
118. Déciga-Campos, M. Isobolographic analysis of the antinociceptive interaction between ursolic acid and diclofenac or tramadol in mice / M. Déciga-Campos, A. Cortés, F. Pellicer [et all] // *Planta Med.* - 2014. - № 80(2-3). - P.139-145.
119. Deyo, R. Opioids for low back pain / R. Deyo, M. Von Korff, D. Duhkoop // *BMJ.* – 2015. - № 5. –P.350.

120. Donaldson, R. The multiple PDZ domain protein Mpdz/MUPP1 regulates opioid tolerance and opioid-induced hyperalgesia / R. Donaldson, Y. Sun, D.Y.Liang [et al.] // BMC Genomics. – 2016. -№29(17). –P.313.
121. Djouhri, L. A beta-fiber nociceptive primary afferent neurons: a review of incidence and properties in relation to other afferent A-fiber neurons in mammals / L. Djouhri, S. Lawson // Brain. Res. Rev. –2004. - №46(2). –P.131-145.
122. Dong, J. Proaporphine and aporphine alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Stephania epigaea*/ J. Dong, L. Cai, Y. Fang // Fitoterapia. – 2015.- №104.- P.102-107.
123. Desroches, J. Endocannabinoids decrease neuropathic pain-related behavior in mice through the activation of one or both peripheral CB₁ and CB₂ receptors / J. Desroches, S.Charron, J.Bouchard [et al.] // Neuropharmacology. – 2014. - №77. – P.441-452.
- 124.Desroches, J. Modulation of the anti-nociceptive effects of 2-arachidonoyl glycerol by peripherally administered FAAH and MGL inhibitors in a neuropathic pain model / J. Desroches, J. Guindon, C. Lambert [et al.] // Br. J. Pharmacol. –2008. -№155(6). – P.913-924.
- 125.Domer, F. Characterization of the analgesic activity of ketorolac in mice / F.Domer // Eur. J. Pharmacol. - 1990. - № 177(3). –P.127-135.
126. Fernández-Carvajal A. New strategies to develop novel pain therapies: Addressing thermoreceptors from different points of view (Review) / A. Fernández-Carvajal, G. Fernández-Ballester, L. Devesa // Pharmaceuticals. - 2011. – Vol. 5, №1, P.16-48.
- 127.Fischer, B.D. Increased efficacy of micro-opioid agonist-induced antinociception by metabotropic glutamate receptor antagonists in C57BL/6 mice: comparison with (-)-6-phosphonomethyl-deca-hydroisoquinoline-3-carboxylic acid (LY235959) / B.D. Fischer, L.L. Miller, F.E. Henry [et al.] // Psychopharmacology (Berl). – 2008. - 198(2). – P.271-278.
- 128.Fitzgerald, K.T., Selective serotonin reuptake inhibitor exposure / K.T. Fitzgerald, A.C. Bronstein // Top Companion Anim Med. - 2013 - №28(1). –P.13-17.

129. Floris, S. Efficacy of intravenous tramadol treatment for reducing pain during office diagnostic hysteroscopy / S. Floris, B. Piras, M. Orrù [et al.] // *Fertil Steril.* – 2007. - №87(1). –P.147-151.
130. Forrest, J.B. Одинаковая безопасность применения кеторолака, диклофенака и кетопрофена для купирования боли после обширных хирургических операций/ J.B. Forrest // *British Journal of Anaesthesia.* – 2002. - Vol. 88, № 2. – P.227-233.
131. Forrest, J.B. Ketorolac for postoperative pain management in children / J.B. Forrest, E.L.Heitlinger, S.Revell // *Drug Saf.* – 1997. - 16(5). – P.309-329.
132. Frampton, J. Tapentadol immediate release: a review of its use in the treatment of moderate to severe acute pain/ J. Frampton // *Drugs.* – 2010. - №70(13). –P.1719-1743.
133. Gao, F. Design, synthesis, and testing of an isoquinoline-3-carboxylic-based novel anti-tumor lead / F. Gao, H. Liu, L. Li [et al.] // *Bioorg. Med. Chem. Lett.*– 2015. - №25(20). – P.4434-4436.
134. Goldenthal, E.I. A compilation of LD50 values in newborn and adult animals/ E.I. Goldenthal // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 1971. - 18(1). P. -185-207.
135. Gong, C. A pH and redox dual stimuli-responsive poly(amino acid) derivative for controlled drug release / C. Gong, M. Shan, B. Li [et al.] // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* – 2016. - № 146. –P.396-405.
136. Gopalraju, P. Comparative study of intravenous Tramadol versus Ketorolac for preventing postoperative pain after third molar surgery--a prospective randomized study/ P. Gopalraju, R.M. Lalitha, K. Prasad [et al.] // *J. Craniomaxillofac Surg.* – 2014. - №42(5). –P.629-633.
137. Goyagi, T. Oral clonidine premedication enhances the quality of postoperative analgesia by intrathecal morphine / T. Goyagi, T. Nishikawa // *Anesth. Analg.* – 1996. - №82(6). –P.1192-1196.
138. Grond S. Clinical Pharmacology of Tramadol / S.Grond , A. Sablotzki // *Clinical Pharmacokinetics.* – 2004. – Vol. 43. - № 13. – P. 879–923.
139. Guindon, J. Peripheral antinociceptive effects of inhibitors of monoacylglycerol lipase in a rat model of inflammatory pain / J. Guindon, A. Guijarro, D. Piomelli // *British Journal of Pharmacology.*– 2011. – Vol.163, № 7.–P.1464-1478.

140. Hammock, B. Spinal synthesis of estrogen and concomitant signaling by membrane estrogen receptors regulate spinal κ - and μ -opioid receptor heterodimerization and female-specific spinal morphine antinociception / B. Hammock, N.Liu // *Journal of Neuroscience*. – 2011. – Vol.31, № 33.– P.11836-11845.
141. Hamza, M. Prospective Study of 3-Year Follow-Up of Low-Dose Intrathecal Opioids in the Management of Chronic Nonmalignant Pain/ M. Hamza, D. Doleys, M. Wells [et al.] // *Pain Med*. – 2012. -№13(10). – P.1304-1313.
142. Hartrick, C. Tapentadol immediate release for the relief of moderate-to-severe acute pain / C. Hartrick // *Expert Opin Pharmacother*. – 2009. -№10(16). –P.2687-2696.
143. Hassan, A. Role of oral tramadol 50 mg in reducing pain associated with outpatient hysteroscopy: A randomised double-blind placebo-controlled trial /A. Hassan, H.Haggag // *Aust. NZ. J. Obstet. Gynaecol.*– 2016. - №56(1). –P.102-106.
144. Heinl, C. Distinct mechanisms underlying pronociceptive effects of opioids / C. Heinl, R. Drdla-Schutting, D. Xanthos // *Journal of Neuroscience*.– 2011. –Vol. 31, № 46. - P. 16748-16756.
145. Hodge H. *Clinical Toxicology of Commercial Products. Acute Poisoning* / 122. H. Hodge. - Ed. IV, Baltimore, 1975. - 427 p.
146. Ibrahim, S. Naphthylisoquinoline alkaloids potential drug leads / S. Ibrahim, G. Mohamed // *Fitoterapia*. – 2015.- № 106. – P.194-225.
147. Inceoglu, B. Analgesia mediated by soluble epoxide hydrolase inhibitors is dependent on cAMP/ B. Inceoglu, K. Wagner, N. Schebb // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2011. – Vol.108. - №12. – P.5093-5097.
148. Jazayeri, S.M. Comparing the efficacy of intra-articular application of morphine and tramadol on postoperative pain after arthroscopic knee surgery/ S.M. Jazayeri, F. Mosaffa, M. Abbasian, H.R. Hosseinzadeh // *Anesth. Pain Med*. – 2012. - № 2(1).- P.28-31.
149. Jeong, Y. The spinal antinociceptive mechanism determined by systemic administration of BD1047 in zymosan-induced hyperalgesia in rats/ Y. Jeong, J. Son, Y. Kwon // *Brain Res Bull*. – 2015.- № 119. – P. 93-100.

150. Joshi, S.K. Additive antinociceptive effects of the selective Nav1.8 blocker A-803467 and selective TRPV1 antagonists in rat inflammatory and neuropathic pain models / S.K. Joshi, P. Honore, G. Hernandez // *J. Pain.* – 2009. - №10(3). – P. 306-315.
151. Kim, S. Chelidonine, a principal isoquinoline alkaloid of *Chelidonium majus*, attenuates eosinophilic airway inflammation by suppressing IL-4 and eotaxin-2 expression in asthmatic mice / S. Kim, J. Hong J., Y. Lee // *Pharmacol. Rep.* – 2015. - №67(6). – P.1168-1177.
152. Kostadinov, I.D. Experimental study on the role of 5-HT₂ serotonin receptors in the mechanism of anti-inflammatory and antihyperalgesic action of antidepressant fluoxetine / I.D. Kostadinov, D.P. Delev, M.A. Murdjeva, I.I. Kostadinova // *Folia Med (Plovdiv).* – 2014. - № 56(1). – P.43-49.
153. Lagard, C. Mechanisms of tramadol-related neurotoxicity in the rat: Does diazepam/tramadol combination play a worsening role in overdose? / C. Lagard, L. Chevillard, I. Malissin // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2016. - №310. – P.108-119.
154. Lee, B.S. Interaction of morphine and selective serotonin receptor inhibitors in rats experiencing inflammatory pain / B.S. Lee, I.G. Jun, S.H. Kim, J.Y. Park // *J. Korean Med Sci.* – 2012. - №27(4). – P.430-436.
155. Lee, J.H. Serotonergic mechanism of the relieving effect of bee venom acupuncture on oxaliplatin-induced neuropathic cold allodynia in rats / J.H. Lee, D.X. Li, H. Yoon, D. Go // *BMC Complement Altern Med.* – 2014. - №14. – P.471.
156. Lee, M. A comprehensive review of opioid-induced hyperalgesia / M. Lee, S.M. Silverman, H. Hansen [et al.] // *Pain Physician.* – 2011. - №14(2). – P.145-161.
157. Leite, F. Curine, an alkaloid isolated from *Chondrodendron platyphyllum* inhibits prostaglandin E₂ in experimental models of inflammation and pain / F. Leite, J. Ribeiro-Filho, H. Costa // *Planta Med.* – 2014. - №80(13). – P.1072-1078.
158. Leppert, W. Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain / W. Leppert // *Pharmacol. Rep.* – 2009. - №61(6). – P.978-992.
159. Li, Y. Pharmacokinetics and metabolism study of isoboldine, a major bioactive component from *Radix Linderae* in male rats by UPLC-MS/MS / Y. Li, R. Zeng, J. Chen // *J. Ethnopharmacol.* – 2015. - № 171. – P.154-160.

- 160.Liu, M. Gelsenicine from *Gelsemium elegans* attenuates neuropathic and inflammatory pain in mice / M. Liu, J. Shen, H. Liu [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2011. – № 34(12). – P.1877-1880.
- 161.Lutz, B. mTOR, a new potential target for chronic pain and opioid-induced tolerance and hyperalgesia / B.M. Lutz, S. Nia, M. Xiong [et al.] // *Mol. Pain.*– 2015. - №11. – P.32.
- 162.Malec D. Central action of narcotic analgesics. VI. Further studies on the participation of serotonin in the action of analgesics / D. Malec // *Pol. J. Pharmacol. Pharm.* – 1980. -№32(5). – P. 665-672.
- 163.Maleki N. Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema / N. Maleki, A.M.Nayebi, A. Garjani // *Int. Immunopharmacol.* – 2005. - № 5(12). – P.1723–1730.
- 164.Manchikanti, L. Effectiveness of long-term opioid therapy for chronic non-cancer pain / L. Manchikanti, R. Vallejo, K.N. Manchikanti [et al.] // *Pain Physician.* – 2011. - №14(2). –P.133-156.
- 165.Maslin, B. Safety Considerations in the Use of Ketorolac for Postoperative Pain / B. Maslin, L. Lipana, B. Roth // *Curr Drug Saf.* – 2016. - Jul 19. [Epub ahead of print]
166. Mayson, K. Premedication with low dose oral clonidine does not enhance postoperative analgesia of intrathecal morphine / K. Mayson, E.Gofton, K.Chambers [et al.] // *Can. J. Anaesth.* – 2000. - №47(8). –P.752-757.
- 167.Melzer, B. A divergent approach to benzyloisoquinoline-type and oxoaporphine alkaloids via regioselective direct ring metalation of alkoxy isoquinolines / B. Melzer, F. Bracher // *Org. Biomol.Chem.*–2015. - №13(28). –P.7664-7672.
- 168.Merker, M [Undesired side effects of tapentadol in comparison to oxycodone. A meta-analysis of randomized controlled comparative studies] / M. Merker, G.Dinges, T.Koch [et al.] // *Schmerz.* – 2012. -№26(1). –P.16-26.
- 169.Messing RB. Serotonin-containing neurons: their possible role in pain and analgesia / R.B. Messing, L.D. Lytle // *Pain.* - 1977. -№ 4(1). – P.1-21.
- 170.Mi, G. Levo-Tetrahydroberberrubine Produces Anxiolytic-Like Effects in Mice through the 5-HT1A Receptor /G. Mi, S. Liu, J. Zhang // *PLoS One.* – 2017. -№12(1).

171. Moon, J. Sigma-1 receptor-mediated increase in spinal p38 MAPK phosphorylation leads to the induction of mechanical allodynia in mice and neuropathic rats / J. Moon, D.Roh, S.Yoon // *Exp Neurol.* – 2013. - №247. – P.383-391.
172. Montrucchio, D. Plant derived aporphinic alkaloid S-(+)-dicentrine induces antinociceptive effect in both acute and chronic inflammatory pain models: evidence for a role of TRPA1 channels / D. Montrucchio, M.Córdova, A.Santos // *PLoS One.* – 2013. -№8(7).
173. Moulin, D.E. Chronic pain in Canada--prevalence, treatment, impact and the role of opioid analgesia/ D.E. Moulin, A.J.Clark, M. Speechley [et al.] // *Pain Res. Manag.* - 2002 . - №7(4). – P.179-184.
174. Nguyen, H. Expedient one-pot synthesis of indolo[3,2-c] isoquinolines via a base-promoted N-alkylation/tandem cyclization / H. Nguyen, J. Fettinger, M. Haddadin // *Tetrahedron Lett.* – 2015. - №56(40). – P.5429-5433.
175. Ogiyama, T. Discovery of novel tetrahydroisoquinoline derivatives as orally active N-type calcium channel blockers with high selectivity for hERG potassium channels/ T.Ogiyama, M. Inoue, S.Honda // *Bioorg. Med. Chem.*– 2014. -№22(24). – P.6899-6907.
176. Oofuvong, M. Single dose oral clonidine premedication does not enhance postoperative, single low dose epidural morphine analgesia in hysterectomy patients / M. Oofuvong, L. Chanvej, P. Thongsuksai // *J. Med. Assoc. Thai.* –2005. - №88(3). – P.358-363.
177. Patiño-Camacho, S.I. Low doses of tizanidine synergize the anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of ketorolac or naproxen while reducing of side effects / S.I. Patiño-Camacho, M. Déciga Campos, K. Beltrán-Villalobos // *Eur. J. Pharmacol.* – 2017. -№ 805. – P.51-57.
178. Plante, G. Opioids for cancer pain: the challenge of optimizing treatment / G. Plante, T. VanItallie // *Metabolism.*– 2010. – Vol.59.Suppl 1.–P.S47-S52.
179. Qiu, Q. Synthesis of carbamide derivatives bearing tetrahydroisoquinoline moieties and biological evaluation as analgesia drugs in mice / Q. Qiu, J.Wang, X.Deng [et al.] // *Arch.Pharm. (Weinheim).* – 2015. - №348(5). – P.347-352.

180. Rainer, T.H. Cost effectiveness analysis of intravenous ketorolac and morphine for treating pain after limb injury: double blind randomised controlled trial / T.H. Rainer, P. Jacobs, Y.C. Ng // *BMJ*. - 2000. - №321(7271). - P.1247-1251.
181. Rasakham, K. Sex differences in kappa opioid pharmacology / K. Rasakham, L. Liu-Chen // *Life Sci*. - 2011. - Vol.88. №1-2. - P.2-16.
182. Rauck, R. Intrathecal clonidine and adenosine: effects on pain and sensory processing in patients with chronic regional pain syndrome / R. Rauck, J. North, J. Eisenach // *Pain*. - 2015. - №156(1). - P.88-95.
183. Ren, K. Interactions between the immune and nervous systems in pain / K. Ren, R. Dubner // *Nat Med*. - 2010. - №16(11). - P.1267-1276.
184. Riley, J.L. Cognitive-affective and somatic side effects of morphine and pentazocine: side-effect profiles in healthy adults / J.L. Riley, B.A. Hastie, T.L. Glover [et al.] // *Pain Med*. - 2010. - №11(2). - P.195-206.
185. Rooks, W.H. The analgesic and anti-inflammatory profile of (+/-)-5-benzoyl-1,2-dihydro-3H-pyrrolo[1,2a] pyrrole-1-carboxylic acid (RS-37619) / W.H. Rooks, A.J. Tomolonis, P.J. Maloney // *Agents Actions*. - 1982. - 12(5-6). - P.684-690.
186. Schiene, K. Antinociceptive and antihyperalgesic effects of tapentadol in animal models of inflammatory pain / K. Schiene, J. De Vry, T.M. Tzschentke // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. - 2011. - Vol.339, № 2. - P.537-544.
187. Sekhar, N.C. Evaluation of antinociceptive activity of aqueous extract of bark of *Psidium guajava* in albino rats and albino mice / N.C. Sekhar, T. Jayasree, S. Ubedulla // *J. Clin. Diagn. Res*. - 2014. - № 8(9). - P.23-25.
188. Shen, C. Etanercept restores the antinociceptive effect of morphine and suppresses spinal neuroinflammation in morphine-tolerant rats / C. Shen, R. Tsai, M. Shih // *Anesthesia and Analgesia*. - 2011. - Vol.112, № 2. - P. 454-459.
189. Shonberg, J. Structure-activity study of N-((trans)-4-(2-(7-cyano-3,4-dihydroisoquinolin-2(1H)-yl)ethyl)cyclohexyl)-1H-indole-2-carboxamide (SB269652), a bitopic ligand that acts as a negative allosteric modulator of the dopamine D₂ receptor / J. Shonberg, C. Draper-Joyce, S. Mistry // *J. Med. Chem*. - 2015. - №58(13). - P.5287-5307.

190. Silverman, S. Opioid induced hyperalgesia: clinical implications for the pain practitioner / S. Silverman // *Pain Physician*. – 2009. -№12(3). –P.679-684.
191. Twersky, R.S. Ketorolac versus fentanyl for postoperative pain management in outpatients / R.S. Twersky, A. Lebovits, C. Williams // *Clin. J. Pain*. – 1995. - №11(2). –P.127-133.
192. Tejwani, G.A. Antagonism of antinociception produced by intrathecal clonidine by ketorolac in the rat: the role of the opioid system/ G.A. Tejwani , A.K. Rattan // *Anesth Analg*. – 2000. - № 90(5). – P.1152-1156.
193. Vadivelu, N. Ketorolac tromethamine - routes and clinical implications / N. Vadivelu, A.M. Gowda, R.D. Urman [et al.] // *Pain Pract*. – 2015. - №15(2). –P.175-193.
194. Viola, E. Adverse drug reactions associated with off-label use of ketorolac, with particular focus on elderly patients. An analysis of the Italian pharmacovigilance database and a population based study / E. Viola, G. Trifirò, Y. Ingrassiotta // *Expert Opin Drug Saf*. – 2016. -№15(sup2). – P.61-67.
195. Voight E. Discovery of (R)-1-(7-chloro-2,2-bis(fluoromethyl)chroman-4-yl)-3-(3-methylisoquinolin-5-yl) urea (A-1165442): a temperature-neutral transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) antagonist with analgesic efficacy/ E.Voight, A. Gomtsyan, J. Daanen // *J. Med. Chem*. – 2014. -№57(17). –P.7412-7424.
196. Xu, H. An efficient Trojan delivery of tetrandrine by poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(ε-caprolactone) (PVP-b-PCL) nanoparticles shows enhanced apoptotic induction of lung cancer cells and inhibition of its migration and invasion / H.Xu , Z.Hou, H. Zhang // *Int J Nanomedicine* – 2014. - №9. – P.231-242.
197. Xu, B. Combination of amino acid/dipeptide with ligustrazine-betulinic acid as antitumor agents / B.Xu, W.Q. Yan, X. Xu // *Eur. J. Med. Chem*. – 2017. -№ 21;130. – P.26-38.
198. Wei, Z. Norisoboldine, an Anti-arthritis alkaloid isolated from radix *Linderae*, attenuates osteoclast differentiation and inflammatory bone erosion in an aryl hydrocarbon receptor-dependent manner / Z.Wei, Q.Lv, Y.Xia. – *Int. J. Biol. Sci*. – 2015. -№11(9). –P.1113-1126.

199. Wheatley, R.G. Analgesic efficacy of ketorolac / R.G. Wheatley // *Acta Anaesthesiol Belg.* – 1996. - №47(3). – P.135-142.
200. Wilson, C. Gold(III) complexes of pyridyl- and isoquinolylamido ligands: structural, spectroscopic, and biological studies of a new class of dual topoisomerase I and II inhibitors / C.Wilson, A.Fagenson, W.Ruangpradit // *Inorg. Chem.*–2013. -№52(14). –P.7889-7906.
201. Woode, E. An isobolographic analysis of the antinociceptive effect of xylopic acid in combination with morphine or diclofenac / E. Woode, E. Ameyaw, W. Abotsi // *J. Basic Clin. Pharm.* – 2015. -№6(4). –P.103-108.
202. Woolf, C.J. Antinociceptive effect of peripheral segmental electrical stimulation in the rat / C. J. Woolf, D. Mitchell, G.D. Barrett // *Pain* – 1980. - № 8(2). – P.237-252.
203. Wu Y. Gelsemine alleviates both neuropathic pain and sleep disturbance in partial sciatic nerve ligation mice / Y. Wu, Y. Li, Y.Luo // *Acta Pharmacologica Sinica.* – 2015. -№36 (11). - P. 1308 – 1317.
204. Wu, G. Amino acids: metabolism, functions and nutrition/ G.Wu // *Amino Acids.* – 2009. – Vol.37.,N1. – P.1-17.
205. Zapata-Morales, J.R. Isobolographic analysis of the interaction between Tapentadol and Ketorolac in a mouse model of visceral pain/ J.R. Zapata-Morales, O.H.Aragon-Martinez , T.Adriana Soto-Castro[et all] // *Drug Dev Res.* – 2016. №77(4). –P.187-191.
206. Zhao, H. Antinociceptive effect of tetrandrine on LPS-induced hyperalgesia via the inhibition of IKK β phosphorylation and the COX-2/PGE $_2$ pathway in mice. / Zhao H., Luo F., Li H., [et al.] // *PLoS One.* 2014. - 9(4)
207. Zhang, Y. Behavioral and cellular pharmacology characterization of 17-cyclopropylmethyl-3,14 β -dihydroxy-4,5 α -epoxy-6 α -(isoquinoline-3'-carboxamido) morphinan (NAQ) as a mu opioid receptor selective ligand /Y. Zhang, A. Braithwaite, Y.Yuan // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. - №5;736. – P.124-130.
208. Zhang, Y.Q. Endogenous descending inhibitory/facilitatory system and serotonin (5-HT) modulating spinal nociceptive transmission/ Y.Q. Zhang, C.G. Wu // *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan.* – 2000.- №31(3). – P. 211-216.

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

GLP	«GoodLaboratoryPractice» — «Надлежащая лабораторная практика»
F	Самки
M	Самцы
АлТ	Аланинаминотрансфераза
АсТ	Аспартатаминотрансфераза
ВСД	Высшая суточная доза
ГПЦ	Гидроксипропилцеллюлоза
ГЭЦ	Гидроксиэтилцеллюлоза
ЭД ₅₀	Среднеэффективная доза
ЖКТ	Желудочно-кишечный тракт
Na-КМЦ	Натрий-карбоксиметилцеллюлоза
ЛС	Лекарственное средство
ЛД ₅₀	Среднесмертельная доза
МК	Массовый коэффициент
МЦ	Метилцеллюлоза
п/о	Перорально
в/ж	Внутрижелудочно
в/б	Внутрибрюшинно
СОП	Стандартная операционная процедура
ЦНИЛ	Центральная научно-исследовательская лаборатория
ЧСС	Частота сердечных сокращений
ЩФ	Щелочная фосфатаза
ЭКГ	Электрокардиограмма

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)

Заключение Локального этического комитета

ЭКСПЕРТНАЯ ОЦЕНКА

клинического исследования, проводимого Земковой Еленой Андреевной
на тему Долгитимическое исследование соединений F-104 -
кандидатского анализа на основе глицеролидных
технологий и гексановой кислоты

Научный руководитель: проф. Г. П. Вдовина
Локальный этический комитет при ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава
России (далее - ЛЭК) в составе: - председателя ЛЭК Маслова Ю. Н., д.м.н., профессора, зав.
микробиологической лабораторией ЦНИЛ ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера;
- членов ЛЭК:

1. Гилевой О.С., д.м.н., профессора, зав. кафедрой терапевтической стоматологии и
пропедевтики стоматологических заболеваний ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера
Минздрава России;
2. Санаковой Л.П., д.м.н., доцента кафедры педиатрии ФДПО ФГБОУ ВО ПГМУ
им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России;
3. Смирновой Е.Н., д.м.н., профессора, зав. кафедрой эндокринологии ФГБОУ ВО ПГМУ
им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России;
4. Терехиной Н.А., д.м.н., профессора, зав. кафедрой биохимии ФГБОУ ВО ПГМУ
им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России;
5. Фельдблюм И.В., д.м.н., профессора, зав. кафедрой эпидемиологии с курсом гигиены и
эпидемиологии ФДПО ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России;
6. Ховаевой Я.Б., д.м.н., профессора, зав. кафедрой терапии и семейной медицины ФДПО
ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России;
7. Поздеевой О.В., главного врача стоматологической клиники ФГБОУ ВО ПГМУ
им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России;
8. Овчинниковой Е.В., юрисконсульта юридического отдела ФГБОУ ВО ПГМУ
им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России;

на своем заседании от « 22 » марта 2017 г. рассмотрел представленную заявку на
проведение долгитимических
исследований на лабораторных животных
и пришел к выводу, что данное исследование соответствует положениям Хельсинкской
декларации Всемирной медицинской ассоциации «Рекомендации для врачей, занимающихся
биомедицинскими исследованиями с участием людей» (Финляндия, 1964 г. с изменениями и
дополнениями, внесенными в Японии, 1975 г., Италии, 1983 г., Гонконге, 1989 г., ЮАР, 1996
г., Шотландии, 2000 г., США, 2002 г., Японии, 2004 г., Южной Кореи, 2008 г.), Конституции
РФ от 12.12.1993 г., ФЗ от 12.04.2010 № 61 «Об обращении лекарственных средств»,
Национальному стандарту РФ «Надлежащая клиническая практика» (GCP) ГОСТ Р 52379-
2005, ФЗ от 21.11.2011 № 323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской
Федерации» и иным нормативно-правовым документам, регламентирующим проведение
биомедицинских исследований с участием человека и животных.

Проведя экспертную оценку документов, представленных исследователем в ЛЭК и
перечисленных в заявке от « 21 » февраля 2017 г., Локальный этический комитет при
ФГБОУ ВО ПГМУ им. академика Е.А. Вагнера Минздрава России считает, что
представленное Е.А. Земковой экспериментальное иссле-
дование может быть проведено, так как не
противоречит вышеприведенным документам и законодательству РФ.

Председатель этического комитета,
д.м.н., профессор Маслов Ю.Н.

22.03.2017 г.

г. Пермь
протокол № 3

ПРИЛОЖЕНИЕ Б
(обязательное)

Валидация методики определения соединения Г-104 в плазме крови методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Методика пробоподготовки

В экстракционные пробирки помещали по 0,1 мл плазмы крови. Пробы депротенизировали добавлением 0,5 мл ацетонитрила, интенсивно перемешивали на перемешивающем устройстве в течение 5 минут. Для разделения фаз образцы центрифугировали при 5000 об/мин 15 минут. Супернатанты отделяли (снимали всю надосадочную жидкость). Полученное извлечение концентрировали упариванием в термостате при температуре 37 °С в течение 6 часов. Сухой остаток растворяли в 0,2 мл воды очищенной непосредственно перед ВЭЖХ анализом, отбирали 100 мкл пробы в пробирки к дозатору стеклянные, закрывали пробками и помещали в хроматограф.

Количественное определение проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Милихром А-02», рабочая колонка D2×75 мм с обращено-фазным сорбентом ProntoSIL– 120-5-C18 AQ, управляющая программа m-CHROM – Милихром А-02», комплект программного обеспечения «МультиХром для Windows» (ЗАО «Эконова», Россия).

Неподвижная фаза: колонка D2×75 мм с обращено-фазным сорбентом ProntoSIL - 120-5-C18 AQ #. *Подвижная фаза:* Элюент А 4,0МLiOCl₄ – 0,1МНСlO₄/ Н₂O1:19; Элюент Б – Ацетонитрил. *Скорость потока подвижной фазы:* 120 мкл/мин. *Режим элюирования:* градиентный 0 – 70% Ацетонитрил. *Объем вводимой пробы:* 5 мкл. *Детектирование:* 210,220,230,250,260,270,310,320 нм. *Температура:* 35°С. *Давление:* 2,3 – 4,5 мПа. *Время удерживания:* соединение Г-104 – 12,92 ± 0,78 мин.

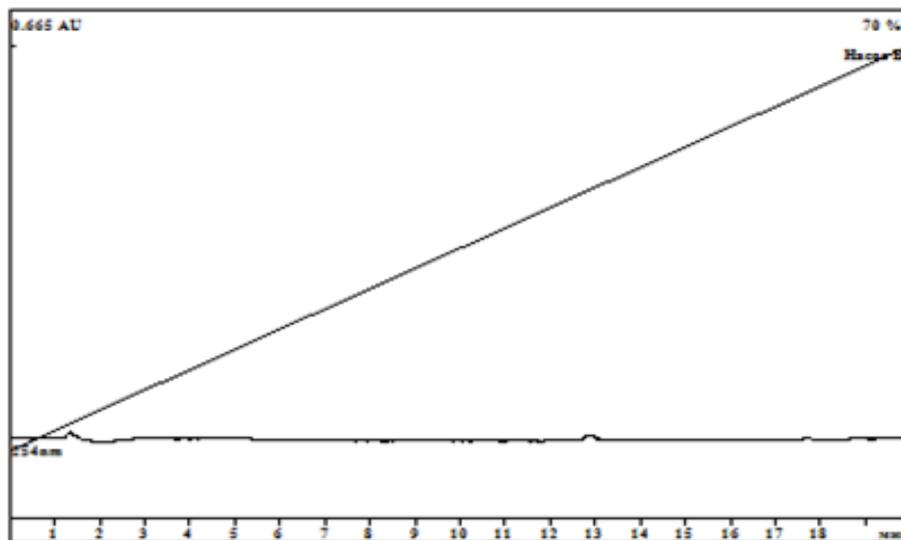
Разработанная методика была подвергнута процедуре валидации по следующим параметрам: селективность, линейность, правильность, прецизионность, предел количественного определения.

Для определения селективности проводили анализ следующих образцов:

- 1) чистой плазмы белых нелинейных крыс;
- 2) стандартного водного раствора соединения Г-104 в концентрации 3,5 мкг/мл;
- 3) модельной смеси образца чистой плазмы белых крыс с добавлением стандартного раствора соединения Г-104 в концентрации 3,5 мкг/мл.

На хроматограммах образцов чистой плазмы не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания соединения Г-104. Хроматограммы чистой плазмы и модельных смесей приведены на рисунках 7-9.

Дата: 25/03/2015 11:34:21* Автор отчета:
 Хроматограмма
 Дата запуска: 24/03/2015 15:06:01
 Файл: C:\M-Chrom\Data\GEXAN\15-03-24\15060030.CHW
 Дата записи:
 Метод: GEXAN.mtw
 Дата записи: 25/03/2015 11:31:28
 Оператор анализа: Зенкова Е.А.
 Номер анализа: 0
 ПРОБА: Образец чистой плазмы
 Пробирка №: 34
 Объем: 5.0 мкл
 Разведение: 1.00
 КОЛОНКА: ProntoSIL-120-5-C18 AQ #bd
 Размер: 2.0x75 мм
 Номер: 3584
 Серно: 5.0 мм
 ПОШЕВКАЯ ФАЗА: 4.0 M LiClO4 - 0.1M HClO4 (1:19)
 Агентовитол
 Комментарий
 Скорость подачи: 120.00 мкл/мин
 Температура: 35.0 C
 Давление: 6.2 MPa



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
 Метод расчета: Absolute concentration
 Стандарт: Нет
 Канал: 254nm
 Нормализация: 100.00

Нет пиков

ТАБЛИЦА КОМПОНЕНТОВ								
№	Удерж.	Синол	±0	Конц.	Индекс	Тип	Группа	Название
Нет пиков								

Отчет выдан программой Мультихром-СПЕКТР для Windows
 © 1993-2003 Amersand Ltd.

Рисунок 7. Хроматограмма чистой плазмы белых крыс

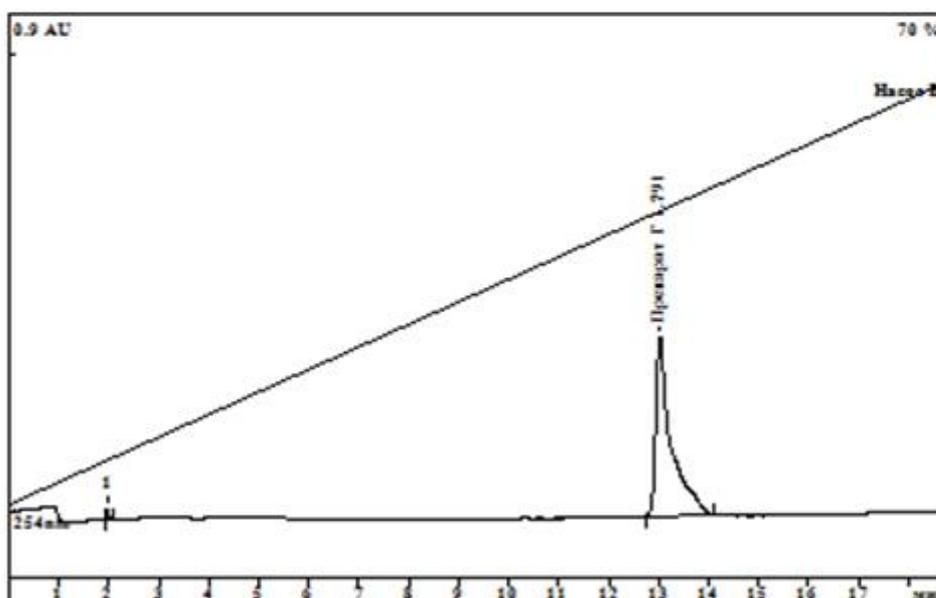
Дата: 25/03/2015 12:57:57\а Автор отчета:
 Хроматограмма
 Дата запуска: 21/03/2015 11:26:08
 Файл: C:\M-Chrom\Data\ГЕХАН\15-03-21\11260010.CHW
 Дата файла: КЭМЭМ!
 Метод: ГЕХАН.mtw
 Дата файла: 25/03/2015 12:00:38
 Оператор анализа: Замкова Е.А.
 Номер анализа: 0

 ПРОБА: Водный раствор препарата Г-104

 Пробирка №: 1
 Объем: 5.0 млл
 Разбавление: 1.00

 КОЛОНКА: ProntoSIL-120-5-C18 AQ #2d
 Размер: 2.0x75 мм
 Номер: 3584
 Размер: 5.0 мкм

 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА: 4,0 М LiClO4 - 0.1M HClO4 (1:19)
 Ацетонитрил
 Комментарий
 Скорость подачи: 120.00 млл/мин
 Температура: 35.0 С
 Давление: 4.9 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА
 Метод расчета: Absolute concentration
 Стандарт: Нет
 Канал: 254nm
 Нормализация: 100.00

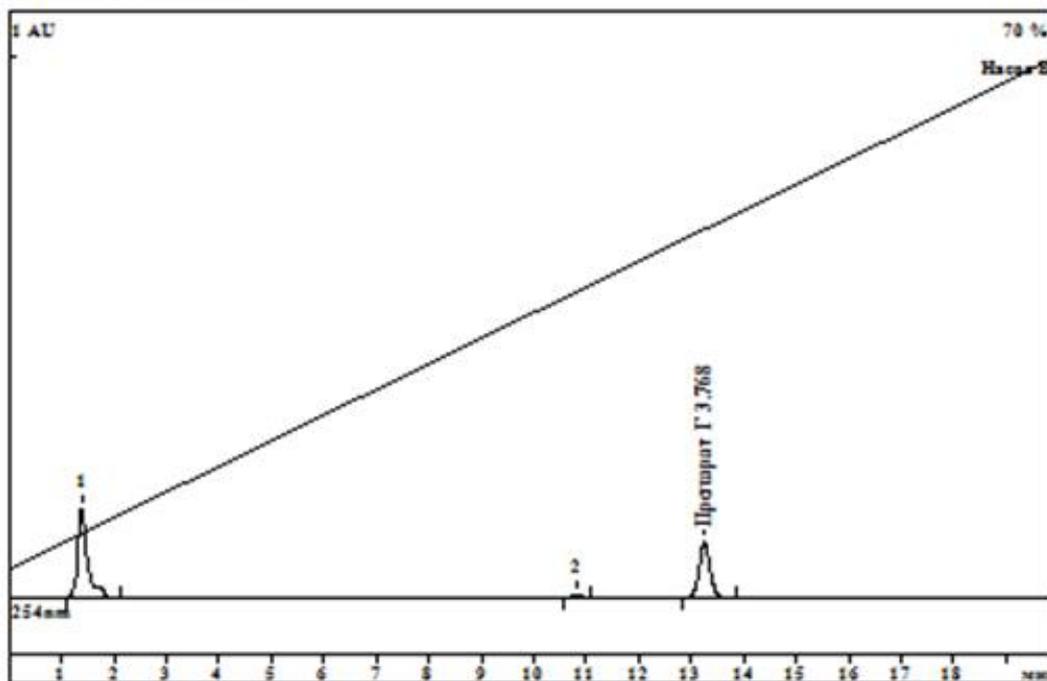
№	Время млл	Высота AU	Площадь AU*млл	ФО	Комп.	Комп. Названия %
2	1563.74	0.31	13.080	6.847	3.79	100.00 Препарат

ТАБЛИЦА КОМПОНЕНТОВ							
№	Удерж.	Окисл	ФО	Комп.	Идентиф.	Тип	Группа Названия
1	1550.89	5.0	6.847e+00	3.79	0.000	Э	0 Препарат Г

Отчет выдан программой МультиХром-СПЕКТР для Windows
 © 1993-2003 Amersand Ltd.

Рисунок 8. Хроматограмма водного раствора соединения Г-104 3,5 мкг/мл

Дата: 25/03/2015 12:26:23\з Автор отчета:
 Хроматограмма
 Дата запуска: 24/03/2015 17:48:26
 файл: C:\M-Chrom\Data\GEXAN\15-03-24\17480100.CHW
 Дата записи: Изменен!
 Метод: GEXAN.mtw
 Дата записи: 25/03/2015 11:55:36
 Оператор анализа: Земкова Е.А.
 Номер анализа: 0
 ПРОБА: Модельный раствор препарата Г-104 в плазме
 Пробирка №: 30
 Объем: 5.0 мкл
 Разведение: 1.00
 КОЛОНКА: ProntoSIL-120-5-C18 AQ #bd
 Размер: 2.0x75 мм
 Номер: 3584
 Серия: 5.0 мм
 ПОДВИЖНАЯ ФАЗА: 4.0 М LiClO4 - 0.1M HClO4 (1:19)
 Ацетонитрил
 Комментарий
 Скорость подачи: 120.00 мкл/мин
 Температура: 35.0 C
 Давление: 4.9 МПа



РЕЗУЛЬТАТЫ РАСЧЕТА

Метод расчета: Absolute concentration
 Стандарт: Нет
 Канал: 254nm
 Нормализация: 100.00

№	Время мкл	Высота AU	Площадь AU*мкл	±0	Комп.	Комп. %	Название
3	1590.11	0.09	2.751	6.847	3.77	100.00	Препарат Г

Рисунок 9. Хроматограмма модельной смеси образца чистой плазмы с прибавлением стандартного раствора соединения Г-104 в концентрации 3,5 мкг/мл.

Линейность

Для установления линейности методики (*calibration curve*) проанализированы 4 образца модельных смесей плазмы и водного раствора соединения Г-104 следующих концентраций: 0,3; 1,5; 4; 15 мкг/мл. Модельные растворы готовили путем разбавления стандартного раствора К (концентрация 200 мкг/мл) внесением соответствующей аликвоты в мерную колбу. Хроматографирование каждой пробы проводили 3 раза. На основании полученных значений программой «МультиХром» автоматически был построен калибровочный график и рассчитан коэффициент корреляции. Калибровочный график количественного определения соединения Г-104 в плазме крови приведен на рисунке 10. Коэффициент корреляции составил 0,996, что свидетельствует о линейности методики в указанном диапазоне.

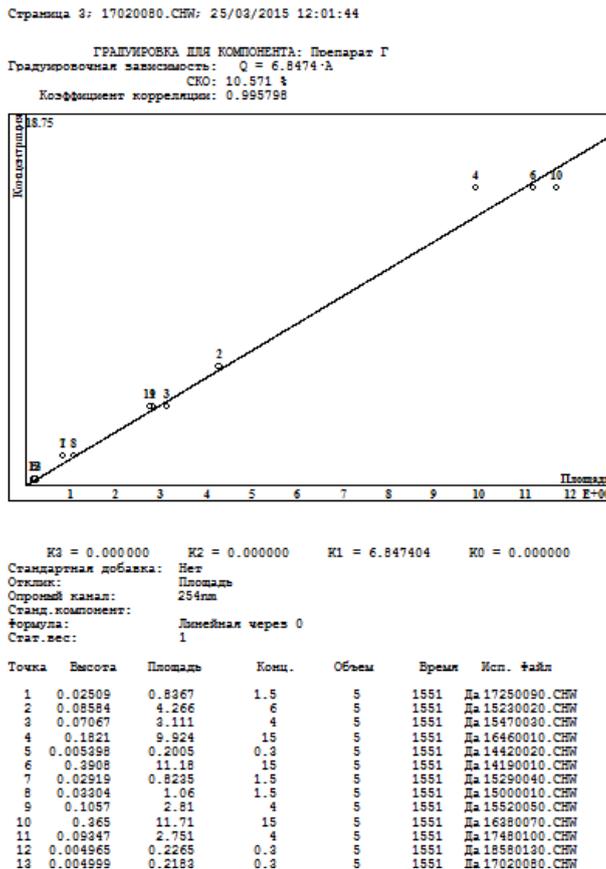


Рисунок 10. Градуировочная прямая концентрации соединения Г-104 в плазме крови белых крыс.

Основные валидационные характеристики методики приведены в таблице Б.1.

Таблица Б.1 - Основные валидационные характеристики методики определения соединения Г-104 в плазме крови

Валидационная характеристика	Концентрация образца	Результат	Критерий приемлемости	Вывод о соответствии
Селективность	1 – чистая плазма 2 – водный раствор соединения Г-104 3 – модельный раствор соединения Г-104 в плазме		На хроматограмме чистой плазмы не должно быть пиков со временем удерживания исследуемого лекарственного вещества	Соответствует
Линейность		Коэффициент корреляции $r^2=0.996$	Коэффициент корреляции $r^2>0.99$	Соответствует
Правильность Intra-day	0,3; 1,5; 4; 15 мкг/мл	Относительная погрешность составила 1,47%; 7,22%; 7,89%; 3,50%. соответственно	Относительная погрешность должна составлять не более 20% для нижнего диапазона линейности, и не более 15% для остальных точек	Соответствует
Правильность Inter-day	3 мкг/мл	Относительная погрешность составила 3,96 %; 2,22 %; 4,44 % 2,22 %.	Относительная погрешность должна составлять не более 20% для нижнего диапазона линейности, и не более 15% для остальных точек	Соответствует
Прецизионность Intra-day	0,3; 1,5; 4; 15 мкг/мл	Относительное стандартное отклонение составило 1,90%; 9,84%; 10,53%; 4,61%.	Относительное стандартное отклонение должно составлять не более 20% для нижнего диапазона линейности, и не более 15% для остальных точек	Соответствует
Прецизионность Inter-day	3 мкг/мл	Относительное стандартное отклонение составило 5,38 %; 3,33 % 6,67 %; 3,33 % соответственно	Относительное стандартное отклонение должно составлять не более 20% для нижнего диапазона линейности, и не более 15% для остальных точек	Соответствует
Предел количественного определения		0,3 – 25 мкг/мл	-	-

ПРИЛОЖЕНИЕ В
(обязательное)

Результаты исследования стабильности капсул соединения Г-104

№ серии	Срок хранения, месяц.	Описание	Подлинность	Средняя масса и однородность по массе, мг	Распадаемость	Однородность дозирования,	Микробиологическая чистота	Примеси	Количественное определение, мг
		Капсулы твердые желатиновые № 0 желтого цвета с крышечками желтого цвета.	Метод ВЭЖХ.	350,0 мг ± 26,3 От 323,7 мг до 376,3 мг	Не более 30 минут в воде очищенной	Первый показатель приемлемости AV (%) ≤15	Общее число аэробных микроорганизмов – не более 103 КОЕ в 1 г. Общее число дрожжевых и плесневых грибов – не более 102 КОЕ в 1 г. Отсутствие Escherichia coli в 1 г .	6-аминогексановая кислота не более 0,3% 3,3-диметил-3,4-дигидроизохинолин-1-он не более 0,05%	Метод ВЭЖХ От 340 мг до 360 мг
01 экспериментальная	0	Соответствует	Соответствует	352,0±16,3 мг	19,4±0,9 мин	1,98	Соответствует	Соответствует	342,0 ±5,5 мг
	3	Соответствует	Соответствует	353,0±20,3мг	20,3±0,8 мин	1,99	Соответствует	Соответствует	343,0 ±7,3 мг
	6	Соответствует	Соответствует	351,0±21,3мг	21,4±0,7 мин	1,97	Соответствует	Соответствует	350,0 ±5,4 мг
	9	Соответствует	Соответствует	351,0±22,3мг	20,4±0,9 мин	2,10	Соответствует	Соответствует	355,0 ±4,3 мг
	12	Соответствует	Соответствует	351,0±20,3мг	19,6±1,0 мин	2,20	Соответствует	Соответствует	345,0 ±10,2 мг
	18	Соответствует	Соответствует	353,0±17,4мг	21,4±0,9 мин	1,99	Соответствует	Соответствует	353,1 ±2,4 мг
	24	Соответствует	Соответствует	352,0±25,4мг	19,5±0,7 мин	2,10	Соответствует	Соответствует	350,0 ±5,0 мг

02 экспериментальная	0	Соответствует	Соответствует	349,0±11,3 мг	20,4±1,0 мин	2,30	Соответствует	Соответствует	351,0 ±4,5 мг
	3	Соответствует	Соответствует	348,0 ±18,3мг	20,5±1,1 мин	2,10	Соответствует	Соответствует	350,0 ±6,3 мг
	6	Соответствует	Соответствует	348,0 ±11,9мг	21,0±1,2 мин	2,20	Соответствует	Соответствует	351,0 ±6,4 мг
	9	Соответствует	Соответствует	347,0 ±12,3мг	20,5±0,9 мин	2,10	Соответствует	Соответствует	351,0 ±4,3 мг
	12	Соответствует	Соответствует	347,0 ±13,3мг	21,1±1,0 мин	2,30	Соответствует	Соответствует	352,0 ±9,2 мг
	18	Соответствует	Соответствует	347,0 ±17,4мг	20,9±0,9 мин	2,20	Соответствует	Соответствует	350,1 ±6,4 мг
	24	Соответствует	Соответствует	348,0 ±15,4мг	21,0±0,9 мин	2,30	Соответствует	Соответствует	350,0 ±4,0 мг
03 экспериментальная	0	Соответствует	Соответствует	350,0±8,3 мг	20,8±1,0 мин	2,15	Соответствует	Соответствует	353,0 ±1,5 мг
	3	Соответствует	Соответствует	351,0 ±9,3мг	20,7±1,1 мин	2,17	Соответствует	Соответствует	352,0 ±3,3 мг
	6	Соответствует	Соответствует	350,0 ±10,9мг	20,9±1,2 мин	2,22	Соответствует	Соответствует	353,3 ±4,4 мг
	9	Соответствует	Соответствует	350,0 ±8,3мг	20,9±0,9 мин	2,18	Соответствует	Соответствует	352,0 ±4,7 мг
	12	Соответствует	Соответствует	351,0 ±10,3мг	20,7±1,0 мин	2,20	Соответствует	Соответствует	353,1 ±9,2 мг
	18	Соответствует	Соответствует	351,0 ±10,4мг	21,1±0,8 мин	2,19	Соответствует	Соответствует	353,2 ±3,4 мг
	24	Соответствует	Соответствует	350,0 ±11,4мг	21,0±0,7 мин	2,21	Соответствует	Соответствует	351,0 ±4,4 мг

