

ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОКИНЕТИКИ И НЕЙРОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ НОВОГО ПРОИЗВОДНОГО 4-ФЕНИЛПИРРОЛИДИНОНА-2 В МОДЕЛИ ИШЕМИЧЕСКОГО ИНСУЛЬТА НА ЖИВОТНЫХ

Д. А. Борозденко [✉], Д. Н. Ляхман, Я. В. Голубев, Д. В. Тарасенко, Н. М. Киселева, Вад. В. Негребецкий

Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва, Россия

Разработка методов медикаментозной терапии и реабилитации в разных периодах ишемического поражения головного мозга в настоящее время является актуальной проблемой. Целью исследования было изучить фармакокинетику и антиишемическое действие нового производного 4-фенилпирролидинона-2 на крысах. Для изучения фармакокинетики крысам линии *Wistar* однократно вводили вещество в дозе 250 мг/кг, затем оценивали его распределение в плазме и коре головного мозга. Установлен период полувыведения ($T_{1/2}$), 83,2 мин. Время нахождения вещества в тканях головного мозга составило 24 ч. Для оценки антиишемического действия проводили моделирование инсульта методом эндovasкулярной транзиторной окклюзии средней мозговой артерии, препарат вводили внутривенно в течение 5 дней в двух дозах, 250 и 125 мг/кг. Затем определяли размер очага поражения (с помощью МРТ), степень неврологического дефицита, локомоторную и исследовательскую активность. Исследуемое вещество значимо снижало неврологический дефицит у модельных животных по сравнению с контрольной группой (1,72 vs 4,4; $p < 0,05$). Влияние на очаг ишемии по МРТ было незначительным, а ориентировочно-исследовательское поведение под воздействием производного 4-фенилпирролидинона-2 значимо активизировалось («норковая камера», горизонтальная активность $12,1 \pm 6,8$, $22,5 \pm 10,5$; $p < 0,05$). Полученные данные позволяют сделать вывод, что исследуемое вещество проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), накапливается в коре головного мозга, способствуя коррекции неврологического дефицита и повышая исследовательскую активность у животных в модели ишемического инсульта.

Ключевые слова: нейропротекторная активность, фармакокинетика, инсульт, 4-фенилпирролидинон-2, модели ишемического инсульта

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н. И. Пирогова на 2018–2020 гг., № гос. регистрации НИР АААА-А18-118051590108-1.

Благодарности: А. Г. Камкин, д. м. н., заведующему кафедрой физиологии МБФ, заведующему научно-исследовательской лабораторией электрофизиологии НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова, за возможность использовать оборудование Научно-образовательного центра по исследованию молекулярных и клеточных механизмов гипоксии и ишемии; М. А. Абакумову, к. х. н., доценту кафедры медицинских нанобиотехнологий МБФ за помощь в моделировании и проведении МРТ-сканирования, интерпретации результатов.

Вклад авторов: Д. А. Борозденко — работа с животными, сбор, обработка и анализ первичных данных, написание статьи; Д. Н. Ляхман — работа с животными, проведение функциональных тестов; Я. В. Голубев — анализ концентраций вещества; Д. В. Тарасенко — синтез вещества; Н. М. Киселева — дизайн исследования, научное руководство, работа со статьями; Вад. В. Негребецкий — дизайн исследования, научное руководство.

Соблюдение этических стандартов: все процедуры с животными рассмотрены и утверждены комиссией по уходу и использованию животных РНИМУ имени Н. И. Пирогова (протокол № 48/2018 от 13.06.2018 г.). Условия содержания животных и работы с ними соответствовали принципам Хельсинкской декларации о гуманном отношении к животным, директиве Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых для научных целей, «Правилам лабораторной практики в Российской Федерации», утвержденным приказом Министерства здравоохранения РФ № 708н от 23.08.2010 г.

✉ **Для корреспонденции:** Денис Андреевич Борозденко
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; borozdenko@phystech.edu

Статья получена: 28.01.2020 **Статья принята к печати:** 11.02.2020 **Опубликована онлайн:** 22.02.2020

DOI: 10.24075/vrgmu.2020.010

STUDY OF THE NEW 4-PHENYLPYRROLIDINONE-2 DERIVATIVE PHARMACOKINETICS AND NEUROPROTECTIVE EFFECT IN THE ISCHEMIC STROKE ANIMAL MODEL

Borozdenko DA [✉], Lyakhmun DN, Golubev YaV, Tarasenko DV, Kiseleva NM, Negrebetsky VadV

Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russia

The development of methods of drug therapy and rehabilitation in different periods of ischemic cerebral lesion is currently an urgent problem. Our study was aimed to investigate the pharmacokinetics and anti-ischemic effect of the new 4-phenylpyrrolidone-2 derivative in rats. To study the drug pharmacokinetics, the *Wistar* rats were once administered with the substance at a dose of 250 mg/kg, then, the substance distribution in blood and cerebral cortex was evaluated. Elimination half-life value was determined, which was 83.2 min. The substance remained in the brain tissue for 24 hours. To assess the anti-ischemic effect, the stroke was modeled by endovasculature middle brain artery transition occlusion, and the drug was administered intravenously for 5 days at two doses, 250 and 125 mg/kg. After that the lesion focus volume was evaluated by MRI, as well as the neurological deficit severity, locomotor and explorative behavior. The studied drug significantly decreased the neurological deficit in model animals compared to control group (1.72 vs 4.4, $p < 0.05$). According to the MRI data, the effect on the ischemic focus was negligible, while the explorative behavior significantly increased under the influence of the 4-phenylpyrrolidone-2 derivative (hole board test, horizontal activity 12.1 ± 6.8 , 22.5 ± 10.5 , $p < 0.05$). The data obtained allow us to conclude that the studied substance penetrates the blood-brain barrier (BBB), and accumulates in the brain tissue promoting the neurological deficit correction and increasing the explorative behavior in the ischemic stroke model animals.

Keywords: neuroprotective activity, pharmacokinetics, stroke, 4-phenylpyrrolidone-2, ischemic stroke models

Funding: the study was performed as a part of the 2018–2020 Pirogov Russian National Research Medical University public assignment, R&D registration № АААА-А18-118051590108-1.

Acknowledgements: to Kamkin AG PhD, head of the department of Physiology of the Faculty of Biomedicine, head of the laboratory of Electrophysiology of the Institute of Translational Medicine of Pirogov Russian National Research Medical University for the opportunity to use the equipment of the Scientific and Educational Center for the study of molecular and cellular mechanisms of hypoxia and ischemia; to Abakumov MA PhD, associate professor of the department of Medical Nanobiotechnology of the Faculty of Biomedicine, for his assistance in modelling, MRI scanning and interpretation of the results.

Author contribution: Borozdenko DA — working with animals, primary data acquisition and analysis, manuscript writing; Lyakhmun DN — working with animals, functional testing; Golubev YaV — substance concentration analysis; Tarasenko DV — synthesis of substance; Kiseleva NM — study design, study management, manuscript preparation; Negrebetsky VadV — study design, study management.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Animal Care and Use Committee of Pirogov Russian National Research Medical University (protocol № 48/2018 dated June 13, 2018). The animals were treated in strict compliance with the Declaration of Helsinki, Directive 2010/63/EU of the European Parliament and the Council (September 22, 2010) on the protection of animals used for scientific purposes, and Good Laboratory Practice guidelines established by the Order 708n of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation (August 23, 2010).

✉ **Correspondence should be addressed:** Denis A. Borozdenko
Ostrovityanova, 1, Moscow, 117997; borozdenko@phystech.edu

Received: 28.01.2020 **Accepted:** 11.02.2020 **Published online:** 22.02.2020

DOI: 10.24075/brsmu.2020.010

Инсульт занимает второе место в структуре смертности в России, по количеству случаев следуя за инфарктом миокарда. По данным Всемирной организации здравоохранения инвалидами становятся 70–80% выживших после инсульта пациентов [1–2]. Только тромболитическая терапия имеет доказанную фармакологическую эффективность в остром периоде ишемического инсульта, но для нее существует целый спектр ограничений в применении, главным из которых является узкий временной интервал. Лишь 5% пациентов с острым ишемическим инсультом получают тромболитическую терапию [1]. Восстановительная терапия охватывает гораздо более широкий временной интервал, измеряемый неделями и месяцами, поэтому многие исследователи ведут разработку лекарственных препаратов именно в контексте восстановительной медицины.

В последние годы как в России, так и за рубежом появился ряд инновационных разработок по указанной тематике [3–5].

В отделе медицинской химии и токсикологии НИИ трансляционной медицины РНИМУ им. Н. И. Пирогова было синтезировано новое соединение, содержащее в качестве фармакофорного фрагмента производное 4-фенилпирролидинона-2 (лабораторный шифр VRF_11) [6], которое, по данным исследований *in silico* [7], потенциально способно проявлять антиишемическую, ноотропную и цитопротекторную активность.

В ходе исследования был установлен профиль безопасности вещества. Для подтверждения данных об антиишемической активности нового соединения было необходимо установить режим дозирования и определить основные фармакокинетические параметры.

Целью настоящего исследования было изучить фармакокинетику VRF_11 и подобрать наиболее эффективный режим дозирования для коррекции неврологической симптоматики в модели фокальной церебральной ишемии головного мозга крыс.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на 85 половозрелых крысах-самцах линии *Wistar* массой 220 ± 12 г на момент начала исследования. Крысы были получены из питомника филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животных содержали в конвенциональном виварии РНИМУ им. Н. И. Пирогова с автоматической сменой дневного и ночного периода (08:00–20:00 — «день», 20:00–08:00 — «ночь»), как минимум 12-кратной сменой воздушного объема комнаты в течение часа, оптимальной температурой 20–24 °C и влажностью 45–65%. Для кормления животных использовали полнорационный сухой гранулированный комбикорм «Чара» для лабораторных животных

(«Ассортимент-Агро»; Россия; ветеринарное свидетельство ф. 3 250 № 3828680, декларация соответствия № РОСС RU.ПН88.Д07428, срок действия до 27.05.2021), который давали *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Животных поили водой, очищенной в соответствии с ГОСТ 51232-98. Воду в стандартных поилках со стальными крышками-носиками давали *ad libitum*. В качестве подстилки использовали обеспыленный подстилочный материал Rehofix (JRS; Германия).

Проводили две серии экспериментов.

В первой серии исследовали фармакокинетику соединения VRF_11, которое вводили в виде раствора 200 мг/мл, внутривенно, в хвостовую вену иглой 0,4 × 8 мм (27G), соблюдая правила асептики и антисептики (в дозе 250 мг/кг). Определяли концентрацию вещества в плазме крови и ткани головного мозга в разных временных точках. Забор крови осуществляли через 15, 30, 60, 120, 240 мин, 8, 12, 24 и 48 ч из хвостовой вены в объеме 100–150 мкл (в пробирки с ЭДТА). Для изучения накопления VRF_11 в головном мозге крыс подвергали эвтаназии в CO₂-боксе, после чего препарировали сердечную мышцу, вставляли канюли и промывали тушку 1 л холодного раствора NaCl (0,9%). Головной мозг извлекали, выделяли кору больших полушарий. Выделенную структуру замораживали и хранили при температуре –80 °C, плазму также замораживали и хранили при –30 °C.

В соответствии с рекомендациями по изучению фармакокинетики [8] были сформированы группы животных, по 6 особей в каждой (табл. 1).

Концентрации VRF_11 в образцах плазмы и мозга крыс определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Спектрофотометрический детектор SPD-20A (Shimadzu; Япония) использовали для определения концентраций VRF_11 в диапазоне 10 мкг/мл–1 мг/мл, а масс-спектрометрический детектор LC/MS 8030/8040 (Shimadzu; Япония) — для определения концентраций VRF_11 в диапазоне 10 нг/мл–10 мкг/мл. Калибровочные кривые с диапазоном концентраций VRF_11 от 20 до 1000 мкг и от 10 нг до 50 мкг были построены с использованием сток растворов VRF_11 и плазмы интактных животных.

Определение концентрации VRF_11 в диапазоне 10 мкг/мл – 1 мг/мл

Для определения концентрации препарата в плазме крови животных проводили следующую пробоподготовку. К 100 мкл плазмы крови животных добавляли 300 мкл ацетонитрила, содержащего 0,5% муравьиной кислоты. После перемешивания и центрифугирования на центрифуге CM-50 (ELMI; Латвия) на скорости 12499 об./мин в

Таблица 1. Дизайн эксперимента по изучению фармакокинетики VRF_11 при однократном внутривенном введении

№ группы	Отбор плазмы	Кора больших полушарий
1	15 мин; 240 мин	240 мин
2	60 мин; 24 ч	24 ч
3	30 мин; 8 ч	8 ч
4	48 ч	
5	120 мин; 12 ч	
6		30 мин
7		120 мин

Таблица 2. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после однократного внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, мкг/мл)

Временная точка/№	1	2	3	4	5	6	M	SD
15 мин	666,38	780,89	559,36	297,84	282,59	488,92	512,67	198,69
30 мин	567,99	787,9	418,5	202,09	500,19	700,3	529,49	208,71
60 мин	533,68	185,1	335,35	285,98	415,33	602,91	393,06	156,43
120 мин	60,59	10,43	42,91	50,26	18,39	32,52	35,84	19,14

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение.

течение 3 мин производили отбор надосадочной жидкости с ее последующим упариванием на вакуумном роторном испарителе SpeedVac Savant SPD 1010 (Thermo Scientific; США) при комнатной температуре в течение 2 ч. Полученный сухой остаток повторно растворяли в 200 мкл подвижной фазы. Для приготовления подвижной фазы в 850 мл деионизированной воды растворяли 1,36 г дигидроортофосфата калия (KH_2PO_4). К полученному раствору добавляли 1,625 мл диэтиламина и 150 мл ацетонитрила. Условия хроматографирования: элюирование в изократическом режиме; применение аналитической колонки NUCLEODUR C_{18} ec 250/4.6 (Macherey-Nagel; Германия) с зернением 5 мкм; температура колонки — $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1$; скорость потока элюента — 0,8 мл/мин, объем раствора на вкол — 10 мкл; рабочая длина волны — 220 нм.

Определение концентраций VRF_11 в диапазоне 10 нг/мл – 10 мкг/мл

Для определения концентрации препарата в плазме крови животных проводили следующую пробоподготовку. К 100 мкл плазмы крови животных добавляли 300 мкл ацетонитрила, содержащего 0,5% муравьиной кислоты. После перемешивания и центрифугирования (условия центрифугирования аналогичны описанным выше) супернатант упаривали на вакуумном роторном испарителе (условия описаны выше) и повторно растворяли в 200 мкл элюента. Условия хроматографирования: аналитическая колонка Discovery® C18 HPLC Column (Supelco/Sigma-Aldrich; США) с зернением 5 мкм, $L \times I.D.$ 15 см \times 4,6 мм; температура колонки — $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1$; скорость потока элюента — 0,8 мл/мин; объем раствора на вкол — 10 мкл. Механизм анализа — ионизация распылением в электрическом поле (ESI). Температура линии десольватации (DL) составляла $250 \text{ }^\circ\text{C}$, нагревательного блока — $400 \text{ }^\circ\text{C}$. Скорость потока распыляющего газа — 2 л/мин, осушающего газа — 15 л/мин. Напряжение на капилляре — 4,5 кВ. Давление газа для соударительной диссоциации (CID) составляло 60 кПа.

Для определения концентрации VRF_11 в ткани головного мозга к 70–100 мг мозга животных добавляли 1,5 мл ацетонитрила, содержащего 0,5% муравьиной

кислоты, и гомогенизировали в стеклянном ручном гомогенизаторе в течение 3 мин. Полученную взвесь дважды центрифугировали (условия центрифугирования аналогичны описанным выше). Затем надосадочную жидкость упаривали на вакуумном центрифужном испарителе (условия описаны выше). К сухому остатку добавляли 300 мкл смеси деионизированной воды с ацетонитрилом в соотношении 100 : 5 и интенсивно перемешивали в течение 5 мин. Затем центрифугировали (условия описаны выше). Супернатант анализировали. Подвижная фаза состояла из смеси 700 мл деионизированной воды, 3,5 мл муравьиной кислоты и 300 мл ацетонитрила. Условия хроматографирования: элюирование в изократическом режиме; аналитическая колонка Discovery® C18 HPLC Column (Supelco/Sigma-Aldrich; США) с зернением 5 мкм, 150/4,6; температура колонки — $40 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1$; скорость потока элюента — 0,8 мл/мин; объем раствора на вкол — 10 мкл. Метод ионизации — ионизация распылением в электрическом поле. Температура линии десольватации (DL) блока составляла $250 \text{ }^\circ\text{C}$, нагревательного блока — $400 \text{ }^\circ\text{C}$. Скорость потока распыляющего газа — 2 л/мин, осушающего газа — 15 л/мин. Напряжение на капилляре — 4,5 кВ. Давление газа для соударительной диссоциации (CID) составляло 60 кПа. Обработку и анализ полученных результатов проводили с использованием программного обеспечения LabSolution ver. 5.80 (Shimadzu; Япония) и Borgia 1.03 (Наука Плюс; Россия), а также приложений Microsoft Excel (Microsoft; США) и Statistica 12 (Statsoft; США).

Во второй серии экспериментов у крыс моделировали инфаркт мозга и исследовали влияние VRF_11 в дозах 250 и 125 мг/кг на неврологическую симптоматику и поведение.

Экспериментальный инфаркт мозга моделировали путем эндovasкулярной транзиторной окклюзии средней мозговой артерии по модифицированному методу Коидзуми [9, 10] с последующей реперфузией. Срок окклюзии среднемозговой артерии составлял 90 мин.

Были сформированы следующие группы животных, в каждой группе было по 8 особей.

1. Контрольная группа. Животным через 24 ч после реперфузии внутривенно вводили физиологический раствор 1 раз в сутки (5 дней).

Таблица 3. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, нг/мл)

Временная точка/№	1	2	3	4	5	6	M	SD
4 ч	295,99	809,40	659,03	190,36	727,0	567,02	541,47	246,66
8 ч	85,87	58,99	41,3	65,97	48,58	51,54	58,71	15,79
12 ч	2883,98	1718,41	3074,25	1045,94	2120,61	1955,05	2133,05	753,03
24 ч	147,47	126,16	114,34	93,21	105,18	97,93	114,05	20,18
48 ч	73,37	62,76	56,88	46,37	52,32	48,72	56,74	10,04

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение.

2. Опытная группа. Животным через 24 ч после реперфузии внутривенно вводили VRF_11 в дозе 125 мг/кг 1 раз в сутки (5 дней).

3. Опытная группа. Животным через 24 ч после реперфузии внутривенно вводили VRF_11 в дозе 250 мг/кг 1 раз в сутки (5 дней).

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) экспериментальных животных в динамике проводили на МР-томографе ClinScan (Bruker BioSpin; Германия) с индукцией магнитного поля 7 Тл. Для оценки объема очага инфаркта мозга МР-исследование выполняли на 1-е, 7-е, 14-е, 28-е сутки после окклюзии. МР-протокол предполагал получение T2-взвешенных изображений с синхронизацией по дыханию (TurboSpinEcho, Turbo Factor = 10, TR/TE = 5230/46 мс, размер воксела — 0.117*0.13*0.7 мм) в аксиальной проекции начиная с первых суток после моделирования инфаркта мозга. Объем очага инфаркта мозга в динамике измеряли с помощью программного пакета ImageJ (Wayne Rasband; США) по T2-взвешенным изображениям. На первом этапе измеряли площадь на каждом срезе, после чего рассчитывали общий объем очага по формуле $V = (S_1 + \dots + S_n) * (h + d)$, где S_1 — площадь первого среза, S_n — площадь среза n (мм²), h — толщина среза (мм); d — межсрезовый промежуток (мм) [11].

Поведенческие изменения у крыс оценивали в течение 4 недель после моделирования инсульта. Для выявления общих неврологических нарушений применяли неврологическую шкалу mNSS [12]. Моторные нарушения оценивали с помощью функциональных тестов: установок «Норковая камера» (OpenScience; Россия) и «Открытое поле» (OpenScience; Россия). Тест «Норковая камера» проводили на 10-е и 24-е сутки после инсульта [13]. Тест «Открытое поле» проводили на 16-е сутки. В тесте также оценивали ориентировочно-двигательную активность (по тем же параметрам). Кроме того, рассчитывали общий путь и скорость перемещений [14].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы Statistica 12.0 (Statsoft; США), используя непараметрический критерий Манна-Уитни, t -критерий Стьюдента для независимых выборок и описательные статистики с определением среднего арифметического, стандартного отклонения, стандартной

ошибки среднего. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование фармакокинетики VRF_11 при его внутривенном введении в дозе 250 мг/кг

В табл. 2 и 3 приведены значения концентрации VRF_11 в крови экспериментальных животных после однократного внутривенного введения. Все значения укладываются в калибровочную кривую.

Результаты исследования по измерению содержания VRF_11 в крови экспериментальных животных приведены на рис. 1.

Данные, представленные на рис. 1, удовлетворительно аппроксимируются в рамках одночастевой модели без всасывания, которую описывает уравнение вида:

$$C = A \times \exp(-at),$$

где C — концентрация исследуемой фармацевтической субстанции в крови экспериментальных животных, t — время после введения препаратов, A , a — константы процесса, описывающего фармакокинетическое уравнение, связанные с константами, характеризующими процессы распространения тестируемого препарата в организме.

В результате аппроксимации фармакокинетических данных с помощью приложения Borgia 1.03 было получено следующее уравнение:

$$C = 580,143 \times \exp(-0,00833 \times t).$$

В табл. 4 приведены показатели основных фармакокинетических параметров: C_{\max} , T_{\max} , $AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, $T_{1/2}$, Cl , V_d .

Накопление VRF_11 в коре головного мозга

В табл. 5 приведены значения концентрации VRF_11 в экстрактах гомогенатов коры головного мозга после его однократного внутривенного введения в дозе 250 мг/кг. Все значения укладываются в калибровочную кривую.

Таким образом, препарат VRF_11 проникает через ГЭБ, достигая максимальной концентрации через 30 мин

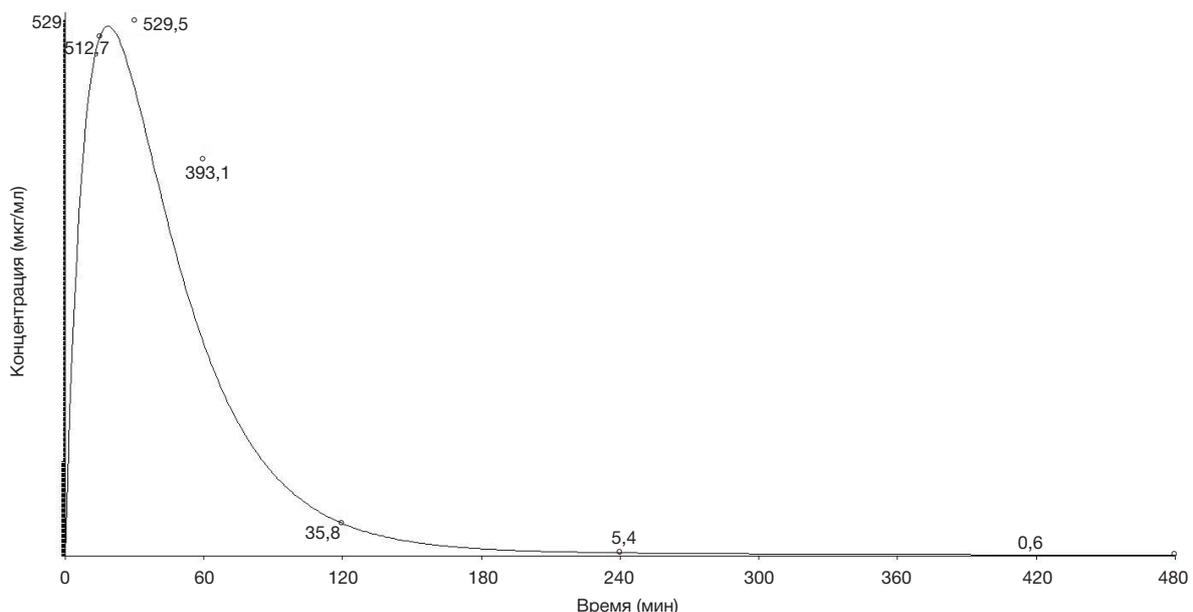


Рис. 1. Кинетика VRF_11 в плазме крови после однократного внутривенного введения в дозе 250 мг/кг

Таблица 4. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, мг/мл)

Параметр	VRF_11
C_{max} , мкг/мл	529
T_{max} , ч	0,5
$T_{1/2res}$, мин	83,2
$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$, мин \times нг/мл	69645,1
Cl, мл/мин	0,004
V_{d1} , мл	0,862

после введения. Через 24 ч после введения препарат еще обнаруживается в коре головного мозга крыс.

Контроль модели острой ишемии головного мозга, динамика объема инфаркта с течением времени

Исследование было проведено на 3 группах животных по 8 крыс в каждой. Через сутки после моделирования инфаркта мозга методом эндоваскулярной транзиторной окклюзии средней мозговой артерии животным проводили МРТ для контроля объема очага поражения. Оценка объема ишемического поражения показала, что моделирование было выполнено корректно. Две крысы с малым объемом очага были исключены из исследования (табл. 5). Крысам опытных групп после МРТ-подтверждения корректности процедуры в хвостовую вену вводили исследуемое вещество в дозах 125 и 250 мг/кг. Контрольным животным вводили соответствующий объем физиологического раствора тем же методом.

Результаты МРТ-сканирования в динамике на 1-е, 7-е, 14-е и 28-е сутки реперфузии показали, что изучаемое вещество в дозах 250 и 125 мг/кг не оказывало влияния на средний объем очага (в сравнении с контрольной группой, не получавшей VRF_11) (табл. 6). Объем очага инфаркта с течением времени достоверно снижался у всех групп животных к концу первого месяца относительно первых суток после ишемии.

Оценка неврологических нарушений

Оценку неврологического дефицита по шкале mNSS проводили на 1-е, 3-и и 5-е сутки реперфузии. Тестирование в первые сутки проводили до введения препаратов. Результаты оценки по неврологической шкале у животных, получивших VRF_11 в дозе 250 и 125 мг/кг, и контрольных животных значимо не отличались (табл. 6). Как видно из представленных данных (табл. 7), при сравнении неврологического дефицита на 1-е и 5-е сутки, животные из группы VRF_11 показали статистически значимые различия, тогда как у контрольных животных

таких различий не было. Следует отметить больший неврологический дефицит на первые сутки реперфузии у группы, получавшей VRF_11 в дозе 250 мг/кг, по сравнению с другими группами, тогда как МРТ-сканирование не выявило различий в объеме очага ишемии у животных.

Изучение поведенческих реакций

Исследование поведения в установке «Открытое поле», которое было проведено на 16-е сутки реперфузии, показало значимые различия в показателях времени замираний и груминга, а также количества посещений центральной зоны у животных, получавших VRF_11 в дозах 125 и 250 мг/кг, по сравнению с контрольной группой (табл. 8).

В тесте «Норковая камера» через 10 дней после моделирования ишемии наблюдали значимые различия между контрольной группой и группой животных, получавших внутривенные инъекции VRF_11 (125 мг/кг и 250 мг/кг) (рис. 2). Различия присутствовали в проявлениях горизонтальной (пересечение секторов $12,1 \pm 6,8$ $22,5 \pm 10,5$ ($p < 0,05$) и $20,2 \pm 14,7$ ($p < 0,07$)) и вертикальной активности (количество выполненных стоек $2 \pm 1,6$ $7,5 \pm 4,0$ ($p < 0,05$) и $7 \pm 12,1$ ($p < 0,07$)), времени замирания ($46,6 \pm 34,4$, $1,0 \pm 1,3$ ($p < 0,01$) и $24,1 \pm 21,9$ ($p < 0,05$)) (для контрольной группы, животных, получавших VRF_11 в дозе 125 мг/кг, и животных, получавших VRF_11 в дозе 250 мг/кг, соответственно). На 24-е сутки после реперфузии в тесте «Норковая камера» опытные животные демонстрировали большую ориентировочно-исследовательскую активность по сравнению с контрольной группой. Так, статистически значимые различия ($p < 0,05$) были отмечены для пересечения секторов (у животных, получавших инъекции физ. раствора, этот показатель составил $18 \pm 7,3$, у животных, получавших VRF_11 в дозировке 125 мг/кг, он был равен $31 \pm 16,5$ ($p < 0,03$), а у крыс, получавших VRF_11 в дозировке 250 мг/кг, — $26,3 \pm 12,5$ ($p < 0,05$)) и количества выполненных норок (5 ± 3 , $10,5 \pm 2,9$ ($p < 0,01$) и $8,6 \pm 2,9$ ($p < 0,05$) соответственно). Время замираний значимо снижалось только под воздействием VRF_11 в дозе 125 мг/кг ($22,9 \pm 22,8$ и $0,6 \pm 2,3$ ($p < 0,01$)).

Таблица 5. Содержание VRF_11 в крови экспериментальных животных после внутривенного введения в дозе 250 мг/кг ($n = 6$, нг/мл)

№	1	2	3	4	5	M	SD
0,5	1813,89	1167,11	2129,94	1566,63	2058,27	1747,17	392,69
2	354,12	396,38	363,63	407,07	380,50	380,34	22,01
4	260,34	233,58	289,16	218,68	250,97	250,54	26,88
8	144,54	158,01	171,49	126,96	140,43	148,29	17,05
24	20,63	23,0	18,34	17,37	18,84	19,64	2,22

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение.

Таблица 6. Размер очага ишемии в головном мозге в мм³ (M ± m; n = 8)

Сутки сканирования	Контроль (физ. раст.)		VRF_11, 125 мг/кг		VRF_11, 250 мг/кг	
	M	SD	M	SD	M	SD
1	131,14	24,60	133,25	33,16	133,66	23,72
7	111,79	24,04	107,53	33,38	115,91	20,75
14	100,43	20,63	93,64*	29,82	106,86	21,87
28	83,04*	15,63	81,6*	26,97	91,16*	20,67

Примечание: M — среднее значение для временной точки; SD — стандартное отклонение; * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений в пределах одной группы относительно первых суток).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на широкое применение эффективных препаратов для эндоваскулярной терапии, клинические исходы после острого церебрального ишемического инсульта остаются неудовлетворительными [15]. У большинства пациентов сохраняются моторные нарушения, снижаются когнитивные способности, у многих страдает психоэмоциональная сфера. Из-за вызываемых инсультом неврологических осложнений нейропротекция и постинсультная реабилитация в последнее время становятся все более актуальной темой [16].

Кафедра химии РНИМУ им. Н. И. Пирогова имеет богатый опыт работы с ноотропными препаратами [17, 18]. В настоящем исследовании было использовано перспективное вещество, производное 4-фенилпириролидинона-2 VRF_11, обладающее, по данным компьютерного моделирования, нейропротекторными свойствами.

Проведенные исследования фармакокинетики VRF_11 (табл. 4) позволяют говорить о том, что препарат проникает через ГЭБ и в течение суток сохраняется в коре головного мозга.

По своим фармакокинетическим показателям VRF_11 несколько отличается от известных препаратов ноотропного ряда, таких как пирацетам и фенотропил. Так, для пирацетама $T_{1/2}$ составляет 4–5 ч при внутривенном введении [19], а для фенотропила — 2,77 ч [20]. Молекулярная масса пирацетама равна 142 г/моль, фенотропила — 218 г/моль. Можно проследить тенденцию к уменьшению времени полувыведения с увеличением

молекулярной массы. Так, у VRF_11 с молекулярной массой 252 г/моль $T_{1/2}$ составляет 1,26 ч.

В ткани головного мозга VRF_11 сохраняется в течение суток. Именно по этой причине мы выбрали режим дозирования раз в сутки, чтобы избежать эффекта накопления в органе-мишени. Четкого мнения о режиме дозирования в литературе по метаболитным препаратам (и по ноотропам в частности) нет. Так, согласно официальной инструкции, пирацетам принимают до 3 раз в день, фенотропил — раз в день. Именно поэтому подбор режима дозирования в экспериментальных исследованиях новых соединений — это одна из самых сложных и времязатратных задач. Нами был выбран следующий алгоритм: пересчет по молекулярной массе с наиболее близкого изученного аналога (фенотропила). Необходимая доза фенотропила составляет 100 мг/кг. При пересчете с учетом молекулярной массы доза исследуемого вещества составила 125 мг/кг. Для того чтобы показать возможные дозозависимые эффекты, в исследовании использовали дозу, в 2 раза превышавшую расчетную (250 мг/кг).

При коррекции ишемического поражения доза в 125 мг/кг оказалась эффективнее дозы 250 мг/кг, о чем свидетельствовало большее снижение неврологического дефицита, усиление ориентировочно-исследовательского поведения в тестах «Норковая камера» и «Открытое поле». Согласно литературным данным, эффект пирацетама, напротив, достигается только при высоких концентрациях [21]. Наши наблюдения говорят о целесообразности изучить больший диапазон доз, так

Таблица 7. Оценка неврологического дефицита по шкале mNSS (M ± m; n = 8)

	Контроль		VRF_11 125 мг/кг		VRF_11 250 мг/кг	
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.
1-е сут.	5,43	3,55	6,8	3,6	9,1	2,75
3-и сут.	4,43	2,63	3,8	2,48	7,1	2,39
5-е сут.	3,71	2,81	2,4*	1,52	6,5*	2,14

Примечание: * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений в пределах одной группы относительно первых суток).

Таблица 8. Показатели активности в тесте «Открытое поле» на 16-е сутки реперфузии (M ± m; n = 8)

	Контроль		VRF_11 125 мг/кг		VRF_11 250 мг/кг	
	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.	Среднее	Ст. откл.
Пересечение секторов	35,83	9,133	40,87	12,04	42,33*	14,95
Центр	0,16	0,4	1,13*	1,13	1,33*	1,75
Замирание, время	36,83	33,73	9,37*	6,948	21,67	23,09
Грумлинг, время	29,167	22,75	10,62*	13,23	17,33	14,08

Примечание: * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений относительно контрольной группы).

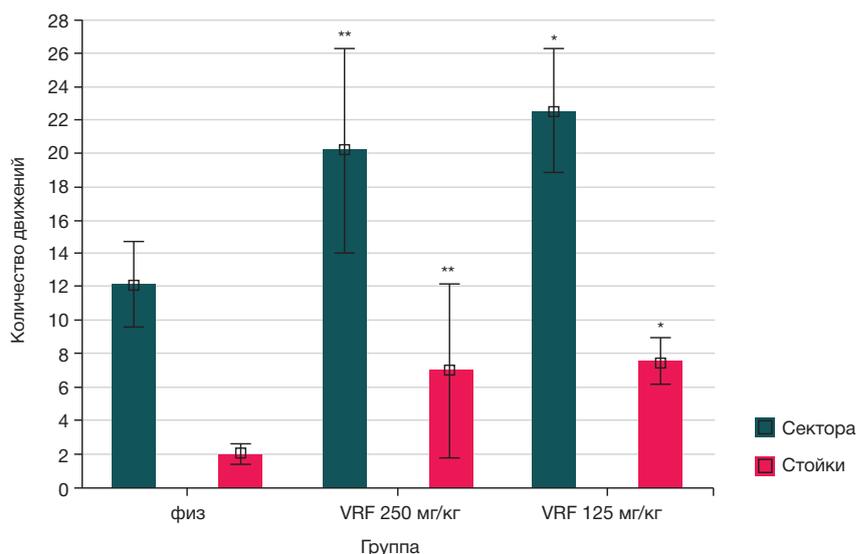


Рис. 2. * — $p < 0,05$ (сравнение средних значений относительно контрольной группы); ** — $p < 0,07$ (присутствует тенденция к значимым различиям при сравнении средних значений относительно контрольной группы). Поведение животных в тесте «Норковая камера» на 10-е сутки после моделирования ишемии

как разные дозы препарата могут не только влиять на его эффективность, но и приводить к противоположным фармакологическим эффектам [20].

Согласно результатам МРТ-сканирования, соединение VRF_11 не оказывает воздействия на размер очага поражения, однако достоверно снижает неврологическую симптоматику у крыс. Такое наблюдение ограничивает оценку исследуемого соединения как нейропротектора, но говорит о перспективе его возможного применения в ряду других реабилитационных препаратов. Наблюдение интересно с точки зрения изучения возможных механизмов действия VRF_11. Безусловно, на него мы будем опираться в наших дальнейших исследованиях по поиску конкретной мишени действия препарата.

ВЫВОДЫ

Расчет основных фармакокинетических параметров нового производного 4-фенилпирролидинона-2 (лабораторный шифр VRF_11) позволил прийти к следующим выводам.

1. Препарат VRF_11 проходит через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и накапливается в ткани головного мозга.
2. Максимальная концентрация препарата VRF_11 в исследованном временном диапазоне достигается через 0,5 ч после введения препарата.
3. Через 24 ч препарат VRF_11 в коре головного мозга находится на грани детектирования.
4. VRF_11 в дозе 125 мг/кг значительно корректирует неврологический дефицит, возникающий в результате моделирования фокальной ишемии у крыс.

Литература

1. Самородская И. В., Зайратьянц О. В., Перхов В. И., Андреев Е. М., Вайсман Д. Ш. Динамика показателей смертности населения от остро нарушения мозгового кровообращения в России и США за 15-летний период. Архив патологии. 2018; (2): 30–7.
2. The top 10 causes of death. World Health Organization 2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
3. Gupta S, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK. Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Exp Neurol*. 2017; (1): 25–37. DOI:10.1016/j.expneurol.2016.10.014.
4. Cramer SC. Drugs to enhance motor recovery after stroke. *Stroke*. 2015; 46 (10): 2998–3005 DOI:10.1161/STROKEAHA.115.007433.
5. Шакова Ф. М., Калинина Т. И., Гуляев М. В., Романова Г. А. Нейропротективный и антиамнестический эффекты комбинированной терапии при ишемическом повреждении префронтальной коры в эксперименте. Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2018; 62 (2): 39–45. DOI:10.25557/0031-2991.2018.02.39-45.
6. Негребцкий В. В., Крамарова Е. П., Шипов А. Г., Бауков Ю. И., Шмиголь Т. А., Киселева Н. М. Производное 4-фенилпирролидинона-2, содержащая его композиция с ноотропной активностью, способ их получения и способ лечения или профилактики нарушений нервной системы. Патентообладатель: ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России. Патент РФ № 2611623. 28.02.2017.
7. Filimonov DA, Druzhilovskiy DS, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Dmitriev AV, et al. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitation. *Biomed Chem Res Methods*. 2018; 1 (1): 4–8. DOI:10.18097/BMCRM00004.
8. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К, 2012; 944 с.
9. Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986; (8): 1–8.
10. Veinberg G, Vorona M, Zvejniece L, Viskersts R, Vavers E, Liepinsh E, et al. Synthesis and biological evaluation of 2-(5-methyl-4-phenyl-2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetamide stereoisomers as novel positive allosteric modulators of sigma-1 receptor. *Bioorganic Med Chem*. 2013; 21 (10): 2764–71. DOI:10.1016/j.bmc.2013.03.016.
11. Gubsky IL, Namestnikova DD, Cherkashova EA, Chekhonin VP, Baklaushev VP, Gubsky LV, et al. MRI Guiding of the Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats Aimed to Improve Stroke Modeling. *Transl Stroke Res*. 2018; 9 (4): 417–25.
12. Lu M, Chen J, Lu D, Yi L, Mahmood A, Chopp M. Global test statistics for treatment effect of stroke and traumatic brain injury in rats with administration of bone marrow stromal cells. *J Neurosci Methods [Internet]*. 2003; 128 (1–2):183–90.
13. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Д. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. Высшая школа. 1991. 32 (1):119–22.
14. Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I.

- Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013; 6 (3): 126–35. DOI:10.2478/intox-2013-0020.
- Goyal M, Menon BK, Van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. 2016; 387 (10029): 1723–31. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
 - Szelenberger R, Kostka J, Saluk-Bijak J, Miller E. Pharmacological Interventions and Rehabilitation Approach for Enhancing Brain Self-repair and Stroke Recovery. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2020; 18 (1): 51–64. DOI:10.2174/1570159X17666190726104139.
 - Шипов А. Г., Крамарова Е. П., Негребецкий В. В., Погожих С. А., Ахалкина В. И., Бауков Ю. И. Методы синтеза, молекулярная и кристаллическая структура фенотропила. *Вестник РГМУ*. 2006; (1): 56–61.
 - Голубицкий Г. В., Иванов В. М. Анализ сиропа Нооцетам методом градиентной высокоэффективной жидкостной хроматографии. *Вестник Московского университета. Химия*. 2009; 50 (3): 180–84.
 - Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения Пирацетам. Министерство здравоохранения РФ. Доступно по ссылке: [https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01\[2014\]_0.pdf](https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01[2014]_0.pdf)
 - Антонова М. И., Прокопов А. А., Ахалкина В. И., Берлянд А. С. Экспериментальная фармакокинетика фенотропила у крыс. *Химико-фармацевтический журнал*. 2003; 37 (11): 6–8.
 - Vostrikov VV. Place of piracetam in the modern practice of medicine. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther*. 2017; 15 (1): 14–25. DOI:10.17816/rcf15114-25.
 - Samorodskaja IV, Zajratjanc OV, Perhov VI, Andreev EM, Vajsman DSh. Dinamika pokazatelej smertnosti naselenija ot ostrogo narushenija mozgovogo krovoobrashhenija v Rossii i SShA za 15-letnij period. *Arhiv patologii*. 2018; 80 (2): 30–7. <https://doi.org/10.17116/patol201880230-37>
 - The top 10 causes of death. World Health Organization 2018. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
 - Gupta S, Sharma U, Jagannathan NR, Gupta YK. Neuroprotective effect of lercanidipine in middle cerebral artery occlusion model of stroke in rats. *Exp Neurol*. 2017; (1): 25–37. DOI:10.1016/j.expneurol.2016.10.014.
 - Cramer SC. Drugs to enhance motor recovery after stroke. *Stroke*. 2015; 46 (10): 2998–3005 DOI:10.1161/STROKEAHA.115.007433.
 - Shakova FM, Kalinina TI, Gulyaev MV, Romanova GA. Neyroprotektivnyy i antiannesticheskiy efekty kombinirovannoy terapii pri ishemicheskom povrezhdenii prefrontal'noy kory v eksperimente. *Patologicheskaya fiziologiya i eksperimental'naya terapiya*. 2018; 62 (2): 39–45. DOI:10.25557/0031-2991.2018.02.39-45.
 - Negrebeckij VV, Kramarova EP, Shipov AG, Baukov Jul, Shmigol TA, Kiseleva NM. Proizvodnoe 4-fenilpirrolidinona-2, soderzhashhaja ego kompozicija s nootropnoj aktivnost'ju, sposob ih poluchenija i sposob lechenija ili profilaktiki narushenij nervnoj sistemy. Patentobladatel': GBOU VPO RNIMU im. N.I. Pirogova Minzdrava Rossii. Patent RF № 2611623. 28.02.2017.
 - Filimonov DA, Druzhilovskiy DS, Lagunin AA, Glorizova TA, Rudik AV, Dmitriev AV, et al. Computer-aided prediction of biological activity spectra for chemical compounds: opportunities and limitation. *Biomed Chem Res Methods*. 2018; 1 (1): 4–8. DOI:10.18097/BMCRM00004.
 - Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskikh issledovanij lekarstvennyh sredstv. Chast'1. M.: Grif i K, 2012; 944 p.
 - Koizumi J. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. *Jpn J Stroke*. 1986; (8): 1–8.
 - Veinberg G, Vorona M, Zvejniece L, Vilskersts R, Vavers E, Liepinsh E, et al. Synthesis and biological evaluation of 2-(5-methyl-4-phenyl-2-oxopyrrolidin-1-yl)-acetamide stereoisomers as novel positive allosteric modulators of sigma-1 receptor. *Bioorganic Med Chem*. 2013; 21 (10): 2764–71. DOI:10.1016/j.bmc.2013.03.016.
 - Gubskiy IL, Namestnikova DD, Cherkashova EA, Chekhonin VP, Baklaushhev VP, Gubsky LV, et al. MRI Guiding of the middle cerebral artery occlusion in rats aimed to improve stroke modeling. *Transl Stroke Res*. 2018; 9 (4): 417–25.
 - Lu M, Chen J, Lu D, Yi L, Mahmood A, Chopp M. Global test statistics for treatment effect of stroke and traumatic brain injury in rats with administration of bone marrow stromal cells. *J Neurosci Methods* [Internet]. 2003; 128 (1–2): 183–90.
 - Buresh Ya, Bureshova O, Khyuston D P. Metodiki i osnovnye eksperimenty po izucheniyu mozga i povedeniya. *Vysschaya shkola*. 1991; 32 (1): 119–22.
 - Sestakova N, Puzserova A, Kluknavsky M, Bernatova I. Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: Methodological aspects and role of nitric oxide. *Interdisciplinary Toxicology*. 2013; 6 (3): 126–35. DOI:10.2478/intox-2013-0020.
 - Goyal M, Menon BK, Van Zwam WH, Dippel DWJ, Mitchell PJ, Demchuk AM, et al. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: A meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *Lancet*. 2016; 387 (10029): 1723–31. DOI:10.1016/S0140-6736(16)00163-X.
 - Szelenberger R, Kostka J, Saluk-Bijak J, Miller E. Pharmacological interventions and rehabilitation approach for enhancing brain self-repair and stroke recovery. *Curr Neuropharmacol* [Internet]. 2020; 18(1): 51–64. DOI:10.2174/1570159X17666190726104139.
 - Shipov AG, Kramarova EP, Negrebeckij VV, Pogozhikh SA, Akhalkina VI, Baukov Yul. Metody sinteza, molekulyarnaya i kristallicheskaya struktura fenotropila. *Vestnik RGMU*. 2006; (1): 56–61.
 - Golubitskiy GV, Ivanov VM. Analiz siropa Nootsetam metodom gradientnoy vysokoeffektivnoy zhidkostnoy khromatografii. *Vestnik Moskovskogo universiteta. Khimiya*. 2009; 50 (3): 180–4.
 - Instrukcija po primeneniju lekarstvennogo preparata dl medicinskogo primenija Piracetam. Ministerstvo zdravoohraneniya RF. Available at: [https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01\[2014\]_0.pdf](https://backgrls.pharmportal.ru/storage/instructions/%D0%A0_N000577_01/Instrlmg_0000061664/%D0%A0_N000577_01[2014]_0.pdf)
 - Antonova MI, Prokopov AA, Akhalkina VI, Berlyand AS. Eksperimental'naya farmakokinetika fenotropila u krysv. *Khimiko-farmatsevticheskiy zhurnal*. 2003; 37 (11): 6–8.
 - Vostrikov VV. Place of piracetam in the modern practice of medicine. *Rev Clin Pharmacol Drug Ther*. 2017; 15 (1): 14–25. DOI:10.17816/rcf15114-25.

References