

ФГБОУ ВО ЯРОСЛАВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РФ

На правах рукописи

КИСЕЛЕВ АЛЕКСЕЙ ВИТАЛЬЕВИЧ

МОДУЛЯЦИЯ АМРА-РЕЦЕПТОРОВ В ТЕРАПИИ КОГНИТИВНЫХ НАРУШЕНИЙ

3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология

Диссертация на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант: академик РАН,
д.м.н., профессор
Хохлов Александр Леонидович

Ярославль 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	17
1.1 Нейрофизиология памяти.....	17
1.2 Строение лимбической системы.....	18
1.3 Круг Джеймса Пейпеца.....	19
1.4 Длительная потенцияция (ДП; Long-term potentiation; LTP).....	22
1.5 Нейрогенез гиппокампа.....	25
1.6 Роль CREB в усилении долговременной синаптической пластичности и увеличении возбудимости нейронов.....	28
1.7 Роль дендритных шипиков в нейрональной пластичности.....	31
1.8 Структура и функция дендритных шипиков.....	32
1.9 Глутаматергическая система - семейства рецепторов AMPA и NMDA.....	34
1.10 Синаптогенез.....	36
1.11 Пути нейропротекции при патологических состояниях мозга.....	38
1.11.1 Потенциаторы AMPA-рецепторов.....	40
1.11.2 Возможные стратегии лечения для повышения нейропластичности.....	48
1.11.3 Экзогенные факторы роста.....	49
1.11.4 Моноклональные антитела.....	50
1.11.5 Усиление дофаминергической нейротрансмиссии.....	50
1.11.6 Электростимуляция мозга.....	51
1.11.7 Реорганизации мозга, путем прорастания и перестройки нейронных клеток.....	52
1.11.8 Эндогенный нейрогенез или трансплантированные нейральные стволовые клетки.....	52
1.11.9 Ампакиновая терапия	53
Заключение	56
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	58
2.1 Доклинические исследования на лабораторных животных.....	59
2.1.1 Реагенты и животные.....	59
2.1.2 Изучение специфической фармакологической активности.....	59
2.1.3 Исследование токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция.....	61
2.1.4 Фармакокинетические исследования.....	64
2.1.5 Изучение фармакодинамики гидроксиникотиноилглутамат кальция.....	65
2.2 Клинические исследования на здоровых добровольцах и пациентах.....	67
2.2.1 Изучение фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамата кальция на здоровых добрровольцах.	67

2.2.2 Изучение безопасности применения гидроксиникотиноилглутамата кальция на добровольцах и пациентах.....	72
2.2.3 Оценка эффективности применения гидроксиникотиноилглутамата кальция на пациентах	77
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	86
3.1 Доклинические исследования на лабораторных животных.....	86
3.1.1 Исследование специфической фармакологической активности.....	86
3.1.1.1 Влияние гидроксиникотиноилглутамат кальция на обучение условному рефлексу активного избегания.....	86
3.1.1.2 Влияние гидроксиникотиноилглутамата кальция на обучение условному питьевому рефлексу в Т-образном лабиринте.....	86
3.1.1.3 Антиамнестический эффект гидроксиникотиноилглутамата кальция на модели амнезии условной реакции пассивного избегания, вызванной скополамином.....	87
3.1.2 Исследование токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция	88
3.1.2.1 Исследование острой токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция.....	88
3.1.2.2 Исследование переносимости субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутривенном введении кроликам.....	91
3.1.2.3 Изучение токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутрижелудочном введении в условиях трехмесячного хронического эксперимента на крысах	93
3.1.2.4 Исследование токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутримышечном введении кроликам в условиях 1-месячного хронического эксперимента.....	100
3.1.2.5 Изучение токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутривенном введении кроликам в условиях 2-недельного субхронического эксперимента.....	106
3.1.2.6 Исследование мутагенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция	111
3.1.2.7 Исследование эмбриотоксических и тератогенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция.....	116
3.1.2.8 Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на репродуктивную функцию крыс	120
3.1.2.9 Исследование алергизирующих свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция.....	122
3.1.3 Исследование фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция	124
3.1.4 Изучение фармакодинамики гидроксиникотиноилглутамата кальция.....	142
3.1.4.1 Исследования влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на нейродегенеративные изменения при остром локальном геморрагическом инсульте.....	142
3.1.4.2 Исследование вытеснения гидроксиникотиноил глутаматом кальция высокоаффинных лигандов из активных центров нейрорецепторов in vitro	148

3.1.4.3 Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера – пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа.....	151
3.1.4.4 Исследование механизма действия гидроксиникотиноилглутамата кальция: роль глутаматергической системы в антиамнестическом эффекте.....	152
3.2 Клинические исследования на здоровых добровольцах и пациентах.....	155
3.2.1 Изучение фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция на здоровых добровольцах.	155
3.2.2 Изучение безопасности применения гидроксиникотиноилглутамат кальция на здоровых добровольцах и пациентах.....	159
3.2.3 Оценка эффективности применения гидроксиникотиноилглутамата кальция.....	172
3.2.3.1 Оценка влияния на симптомы депрессии.....	174
3.2.3.2 Оценка влияния на психическое здоровье по шкале SF-36.....	175
3.2.3.3 Оценка влияния на концентрацию серотонина в крови добровольцев.....	176
3.2.3.4 Оценка влияния на сон.....	177
3.2.3.5 Оценка влияния на когнитивные функции.....	178
3.3 Концепция применения модуляторов АМРА-рецепторов для терапии когнитивных нарушений	183
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	185
ВЫВОДЫ.....	195
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	196
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	196
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	201
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	229

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Когнитивные нарушения представляют собой одну из самых серьезных медицинских и социальных проблем современности. Они затрагивают миллионы людей по всему миру, вызывая ухудшение качества жизни и утрату трудоспособности. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), к 2030 году число людей, страдающих от различного рода деменций, может достигнуть 75 миллионов. Согласно европейским эпидемиологическим исследованиям, деменция наблюдается у 6–7 % лиц старше 65 лет, а умеренное когнитивное расстройство встречается в 2–3 раза чаще среди 10–17 % пожилых лиц. Одна из причин увеличения числа лиц с когнитивными расстройствами – это постарение населения. Известно, что с возрастом когнитивные функции ослабевают, вместе с тем возраст неизменно ассоциируется с ростом риска как сосудистых заболеваний головного мозга, так и нейродегенеративных. Наложение этих процессов на инволюционные изменения значительно снижает церебральный резерв и способствует прогрессирующему снижению когнитивных функций. Цереброваскулярные расстройства приводят к значительным затратам на здравоохранение и оказывают колоссальное влияние на семьи и общества в целом [255, 304].

Цереброваскулярные расстройства, включая инсульты и хроническое нарушение мозгового кровообращения, возникают в результате нарушения кровоснабжения мозга. В зависимости от типа инсульта, последствия могут варьироваться от легкой слабости до полной потери функций. По данным Всемирной организации здравоохранения, цереброваскулярные болезни являются второй причиной смерти в мире. Цереброваскулярные расстройства представляют собой значительную проблему: по оценкам, ежегодно около 15 миллионов человек по всему миру переносят инсульт, и примерно 5 миллионов остаются с постоянными нарушениями [84,313]. Эти цифры подчеркивают важность разработки стратегий для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями и помощи пострадавшим.

Экономические последствия также весьма значительны и многогранны. Затраты бюджета на здравоохранение, а также дополнительные расходы, ассоциированные с низкой производительностью труда и дополнительные социальные выплаты, являются значимой частью расходов экономик всех стран. Эти факторы приводят к увеличению нагрузки на государственные бюджеты и частные финансовые институты, что требует большого внимания к их управлению и оптимизации. [255,298,304]. В связи с этим, значительное внимание исследователей и практикующих врачей сосредоточено на поиске эффективных методов улучшения когнитивных процессов у данной категории пациентов. Ноотропные и нейропротективные препараты зарекомендовали себя как потенциальные средства, способные улучшать когнитивные функции и защищать нейроны от повреждений. Однако существующие

препараты зачастую обладают ограниченной эффективностью и могут провоцировать нежелательные побочные эффекты, что делает необходимым дальнейшее изучение их влияния на когнитивные процессы. Концепция нейропротекции получила значительное признание за последние десятилетия. «Нейропротекция» определяется как «защита нейронов» и является стратегией, используемой для потенциальной защиты мозга при ряде различных цереброваскулярных состояний, таких как хроническое нарушение мозгового кровообращения, черепно-мозговая травма и ишемический инсульт [229]. На сегодняшний день более 1000 нейропротективных агентов показали многообещающие результаты в доклинических моделях. Однако применение этих нейропротективных агентов не увенчалось успехом в клинических условиях. Более 200 клинических испытаний нейропротекторов были завершены или продолжаются, но ни один из нейропротективных агентов не достиг успеха [106]. Это создает необходимость в поиске новых подходов к лечению когнитивных расстройств. Для проявления терапевтического эффекта ноотропам часто требуются длительные курсы, что важно для пациентов, требующих незамедлительной терапии.

Множество исследований показывает важное значение влияния на глутаматергические нейроны. Исследования по изменению активности AMPA и NMDA рецепторов демонстрируют положительные результаты в терапии когнитивных нарушений [100,237]. Поиск новых соединений влияющих на синаптическую передачу сигнала становится важным направлением в неврологии. Влияние на прогрессирование когнитивных нарушений помогает не только замедлить прогрессирование болезней, но и улучшает качество жизни пациентов. Данная область фармакологии считается одной из самых значимых и перспективных.

Степень разработанности темы исследования

Один из основных механизмов возникновения когнитивных нарушений это эксайтотоксичность. Передача сигнала между глутаматергическими нейронами осуществляется через рецепторы глутамата, главным образом через NMDA-рецепторы. Избыточное содержание глутамата в синаптической щели приводит к повреждению и смерти клеток. Подобные проявления могут наблюдаться при различных патологических состояниях, включая инсульт, гипоксию, ишемию, депрессию, нарушения сна и другие. Также они характерны для хронических нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и другие. Все эти состояния имеют общие патологические характеристики, включая постепенную и избирательную потерю нейронов, в основном из-за сверхактивации рецепторов глутамата [301].

Большинство синапсов глутаматергической системы имеют как AMPA-, так и NMDA-рецепторы, которые работают совместно: AMPA-рецепторы обеспечивают быструю начальную передачу сигнала, в то время как NMDA-рецепторам необходима эта начальная деполяризация

для активации и реагирования на глутамат. Этот кооперативный эффект критически важен для таких процессов, как обучение и память, а также для развития некоторых неврологических расстройств.

В течение многих лет предпринимаются интенсивные усилия по поиску и разработке фармакологических средств для лечения когнитивных нарушений. Эти фармакологические средства позволили добиться определённого успеха на этапе доклинических исследований на животных моделях неврологических расстройств, однако более 30 клинических испытаний на людях потерпели неудачу [111].

Один из подходов направлен на прерывание быстрых механизмов некротической гибели нейронов. Для этого применяют препараты, которые эффективно останавливают глутамат-кальциевый каскад, препятствуют проникновению ионов кальция в клетки и тем самым предотвращают их избыточное накопление. Путем стабилизации специфических глутаматергических рецепторов, прерывается нарастание глутаматного выброса и подавляется глутаматная эксайтотоксичность. Понимание того, как эти рецепторы взаимодействуют с нейромодуляторами, имеет решающее значение для разработки таргетной терапии когнитивных нарушений [116,164,195,217,248,296].

Множество клинических испытаний подтвердили их эффективность в замедлении нейродегенеративных заболеваний [163,308]. Агонисты и антагонисты рецепторов, включая метаботропные глутаматные рецепторы (mGluR1 и mGluR5), рецепторы серотонина 1A и ангиотензина AT1, являются важной частью нейропротекторной стратегии [272,284]. Например, активация рецепторов серотонина 1A может помочь улучшить настроение и когнитивные функции, а также снизить риски развития депрессии. Несмотря на то, что данные агонисты и антагонисты демонстрируют многообещающие нейропротекторные свойства в доклинических исследованиях, воздействуя на нейровоспаление и окислительный стресс, однако, многие из них не прошли клинические испытания из-за проблем с переносом результатов с лабораторных исследований на человеческий организм [65,277]. В последние годы особое внимание уделяется ампакинам — соединениям, которые модулируют активность глутаматных рецепторов типа AMPA и могут оказывать положительное влияние на когнитивные функции [30,37]. За последние 30 лет было описано несколько классов потенциаторов AMPA-рецепторов. Эти молекулы связываются с аллостерическими участками AMPA-рецепторов, замедляют десенсibilизацию и тем самым усиливают сигнализацию через рецепторы. Некоторые агенты, потенцирующие AMPA-рецепторы, были изучены на моделях грызунов и в настоящее время проходят клинические испытания. Сложность исследования этих агентов обусловлена наличием множества подтипов AMPA-рецепторов, на которые молекулы могут действовать по-разному, а

также распределением AMPA-рецепторов и трудностями изучения когнитивных функций у интактных грызунов [30,37,73].

Модуляция рецепторов AMPA может быть терапевтическим средством улучшения памяти при лечении неврологических заболеваний [295,299]. За последние 20 лет было описано несколько положительных модуляторов рецепторов AMPA [226,263]. Эти агенты связываются с аллостерическими участками на рецепторах AMPA и усиливают сигнализацию посредством медленной десенсibilизации и/или дезактивации рецептора [114,299]. Согласно исследованиям, опубликованным в [126,130], усиление притока кальция (Ca^{2+}) в нейрон увеличивает амплитуду и/или продолжительность возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП). Это связано с тем, что более высокая концентрация кальция может усиливать эффекты рецепторов глутамата, что приводит к более крупным и продолжительным ВПСП и, таким образом, усиливают синаптические реакции. Было показано, что некоторые потенциаторы рецепторов AMPA облегчают память в ряде поведенческих исследований и обращают вспять возрастное ухудшение памяти у животных. Однако, при чрезмерной активации, вызванной, например, избыточным высвобождением глутамата, AMPA-рецепторы могут способствовать кальциевому перегрузу клетки, что ведет к нейрональной гибели [83,129,242,288]. В контексте терапевтических стратегий, это означает, что необходимо разрабатывать препараты, которые могут модулировать (например, блокировать или снижать чувствительность) AMPA-рецепторы, чтобы предотвратить или уменьшить их чрезмерную активацию, и тем самым защитить нейроны от гибели. При этом важно учитывать, что AMPA-рецепторы являются важными для нормальной синаптической передачи, поэтому модуляция должна быть тонко настроена. Например, NMDA-рецепторы также участвуют в синаптической передаче, но они активируются при более высоких значениях мембранного потенциала, чем AMPA-рецепторы. Поэтому, воздействуя на AMPA-рецепторы, можно избирательно модулировать функцию синапса, не затрагивая NMDA-рецепторы [83].

В настоящее время синтезировано достаточно много положительных модуляторов AMPA-рецепторов. Такие соединения, как Ампакин CX516, продемонстрировали когнитивно-усиливающую активность в модели кратковременной памяти, улучшении обонятельного обучения и обращении вспять возрастного дефицита памяти у крыс [126,130]. IDRA-21 продемонстрировал положительное влияние на способность к отсроченному сопоставлению у молодых и старых обезьян [72]. Однако, CX516 не продемонстрировал значимого эффекта при когнитивных нарушениях, шизофрении и болезни Альцгеймера. CX 717 продемонстрировал предварительную, незначительную эффективность у пациентов с СДВГ и у пациентов с угнетением дыхания. CX 691 (фарампатор) не показал значимой эффективности у пациентов с депрессией. По многим ампакинам, которые были выведены на клиническую стадию исследований, в настоящее время, получены только отрицательные результаты [242].

В рамках комплексных исследований специфической активности и фармакодинамических характеристик гидроксиникотиноилглутамата кальция (ГНГК) были выявлены его выраженные ноотропные и антидепрессивные свойства. ГНГК демонстрирует достоверное противоинсультное действие на моделях как ишемического, так и геморрагического инсультов. Кроме того, нейропротективные свойства ГНГК проявляются в условиях моделей естественного и искусственного старения. В соответствии с существующими данными ГНГК обладает широким спектром биологической активности [13,14,18,36].

Ноотропные эффекты ГНГК могут быть обусловлены его взаимодействием с различными глутаматными рецепторами, включая AMPA и NMDA подтипы глутаматных рецепторов. В широком диапазоне доз (5, 10, 20, 50 мг/кг) ГНГК существенно снижает летальность, неврологический дефицит и нарушения когнитивных функций у животных, перенесших инсульт. ГНГК демонстрирует значительное положительное воздействие на улучшение процессов памяти, координации движений и стимулирует исследовательскую активность. ГНГК не вызывает побочных эффектов, характерных для традиционных седативных и миорелаксантных препаратов, что делает его уникальным в своем классе. [13,14,18,36]. Исследование фармакологических свойств препарата при введении дозы 10 мг/кг, выявило значительный защитный эффект в отношении неврологического дефицита и повышения выживаемости животных. ГНГК снижает нарушения поведения, вызванные этанолом, в тесте открытого поля. Полученные данные позволяют сделать вывод о комплексном влиянии препарата на нейрофизиологические механизмы, что требует дальнейшего детального изучения для определения его терапевтического потенциала и изучения побочных эффектов [13,14,18,36].

Анализ нейропротективных свойств ГНГК и его способности модулировать функцию AMPA рецепторов указывает на перспективность его использования в качестве нового модулятора для терапии когнитивных нарушений. Разработка и дальнейшие исследования данного соединения могут стать ключевым этапом в создании концепции терапии когнитивных нарушений с помощью модуляции AMPA рецепторов.

Цель и задачи исследования

Оценка терапевтического потенциала модуляторов AMPA-рецепторов в коррекции когнитивных нарушений при хронической ишемии головного мозга.

Задачи исследования

1. В экспериментах *in vivo* исследовать специфическую фармакологическую активность гидроксиникотиноилглутамата кальция на модели ноотропной активности и модели антиамнестической активности.
2. В экспериментах *in vivo* изучить токсичность гидроксиникотиноилглутамата кальция на моделях: острой токсичности, хронической токсичности, мутагенности,

эмбриотоксичности и тератогенности, иммунотоксичности, аллергизирующих свойств, влияния на репродуктивную функцию.

3. Исследовать фармакокинетику гидроксиникотиноилглутамата кальция у лабораторных животных при внутривенном и внутримышечном введении, оценить проникновение в орган мишень, время полувыведения и элиминацию.

4. Изучить фармакодинамику гидроксиникотиноилглутамата кальция на модели связывания лигандов с активными центрами нейрорецепторов, модели геморрагического инсульта, модели нейронной активности в срезах гиппокампа, модели амнезии условного рефлекса пассивного избегания, вызванного максимальным электрошоком.

5. Провести изучение фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамата кальция на здоровых добровольцах.

6. Оценить безопасность применения гидроксиникотиноилглутамата кальция у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения и добровольцев.

7. Оценить эффективность терапии когнитивных нарушений, антидепрессивный эффект и влияние на сон гидроксиникотиноилглутамата кальция у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения.

8. На основании полученных данных разработать концепцию применения модуляторов AMPA-рецепторов для терапии когнитивных нарушений.

Научная новизна работы

Впервые продемонстрирована возможность применения нового класса препаратов – ампакинов для улучшения памяти у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения.

Впервые произведен синтез оригинального соединения гидроксиникотиноилглутамата кальция. Полученное соединение отличается от предшественника достаточной растворимостью, позволяющей разработать готовую лекарственную форму в виде раствора для внутривенного введения. В процессе отработки технологии синтеза была разработана новая схема получения гидроксиникотиноилглутамата кальция позволившая значительно повысить качество итогового соединения и снизить возможные нежелательные реакции применения данного соединения, что описано в патенте № 2016110707 от 23.03.2016г.

Впервые изучен механизм действия представителя нового класса ампакинов гидроксиникотиноилглутамат кальция. Установлено связывание соединения с AMPA подтипом глутаматных рецепторов, за счет оценки уровня вытеснения радиоактивно меченного лиганда. Подтверждено ускорение передачи нервного импульса в срезах CA1 области гиппокампа, связанное с воздействием на AMPA рецепторы. Установлено, что гидроксиникотиноилглутамат кальция (40 мг/кг, внутривенно) ослабляет вызванную электрошоком амнезию, и этот

эффект ингибируется блокатором глутаматных рецепторов АМРА/каинатного подтипов соединением DNQX (10 мг/кг, внутривенно).

Впервые было установлено ноотропное действие гидроксиникотиноилглутамата кальция на модели условного рефлекса активного избегания. Показано, что гидроксиникотиноилглутамат кальция оптимизировал обучение крыс в условиях челночной камеры: под его влиянием время рефлекса на 5-й день обучения составило $37,0 \pm 6,1$, а в группе контрольных животных этот показатель был равен $47,0 \pm 5,2$ ($p \leq 0,05$). Данный тест позволил впервые показать наличие положительного действия у данного соединения на процесс обучения.

Впервые была изучена фармакокинетика гидроксиникотиноилглутамата кальция на крысах и кроликах, а также на здоровых добровольцах.

Впервые в полном объеме была изучена безопасность применения гидроксиникотиноилглутамата кальция в доклинических исследованиях. Впервые подтверждено что препарат не обладает мутагенными, аллергизирующими и иммунотоксическими свойствами, а также эмбриотоксичностью и тератогенностью, не влияет на репродуктивную функцию животных. На основании полученного значения LD50 – 1995 мг/кг соединение отнесено к 5 классу токсичности (малотоксичные вещества).

Впервые подтверждена безопасность применения у пациентов и добровольцев. Выявленные статистические различия по жизненно важным показателям и лабораторным данным не превышают таковые в группе плацебо. Частота возникновения НЯ у пациентов из основной и контрольной групп достоверно не различалась.

Впервые продемонстрированы антидепрессивный эффект и влияние на сон для гидроксиникотиноилглутамата кальция. Улучшение в оценке по Питтсбургскому индексу качества сна составило 47%. По шкале MADRS препарат достоверно снизил проявление симптомов депрессии на 40%.

Впервые в рамках проведения клинического исследования подтверждена эффективность применения нового представителя класса ампакинов гидроксиникотиноилглутамата кальция в терапии когнитивных нарушений у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения. Продемонстрировано улучшение по шкале MoCA на 61,29% превышающее результат группы плацебо. Результаты исследования свидетельствуют о перспективности использования данного соединения в качестве терапевтического агента в данной клинической области.

Теоретическая и практическая значимость работы

Проведенная работа имеет фундаментальное и прикладное значение как для фармакологии, так и для клинической медицины. Теоретическая значимость проведенного исследования заключается в создании инновационного подхода к разработке нового класса лекарственных

средств, механизм действия которых обусловлен модуляцией AMPA рецепторов и может быть использован для терапии ряда неврологических заболеваний. Впервые представлены данные масштабного исследования нового соединения включающие в себя полные данные по безопасности, специфической фармакологической активности, фармакокинетике, и клинической эффективности. Полученные данные существенно расширяют возможность терапии когнитивных нарушений у пациентов с хроническими нарушениями мозгового кровообращения. Впервые была подтверждена эффективность и безопасность в улучшении когнитивных функций у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения препаратом гидроксиникотиноилглутамат кальция. Созданы теоретические и практические наработки для дальнейших исследований эффективности применения ампакинов в терапии различных неврологических заболеваний. Полученные данные проливают свет на механизм действия ампакинов и открывают возможности поиска и разработки новых перспективных препаратов, воздействующих на глутаматергическую систему.

Практическая значимость проведенного исследования для системы здравоохранения заключается в новом понимании значимости взаимосвязи ХНМК и когнитивной дисфункции и новых возможностях терапии когнитивных нарушений. Лекарственный препарат Ампассе, раствор для внутривенного введения 5мг/мл созданный на основе модулятора AMPA-рецепторов зарегистрирован и применяется на всей территории Российской Федерации. На основании данных, полученных в результате данного исследования, были разработаны и зарегистрированы:

- Патент «Способ получения N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты». Федеральная служба по интеллектуальной собственности №2612253 дата 03 марта 2017г;
- Регистрационное удостоверение лекарственного препарата для медицинского применения ЛП 006394 от 06.08.2020г. «Ампассе раствор для внутривенного введения 5мг/мл»;

Теоретические аспекты и практические результаты данного исследования используются в клинической практике на территории Российской Федерации.

Степень достоверности и апробации результатов

Исследования основывались на теоретическом анализе научной проблемы. Дизайн экспериментов включал контрольные и экспериментальные группы, соответствующие задачам. Достоверность результатов обеспечивалась использованием валидных методов, репрезентативных выборок и адекватных критериев оценки распределения данных, что позволяло применять описательные статистики и статистический анализ. Экспериментальные данные проверялись на сходимость и воспроизводимость.

Основные положения диссертации были представлены и обсуждены на российских и международных конференциях:

32nd The European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, 7–10 сентября 2019 года, Копенгаген, Дания.

34th The European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, 2–5 октября 2021 года, Лиссабон, Португалия.

36th The European College of Neuropsychopharmacology (ECNP) Congress, 7–10 октября 2023 года, Барселона, Испания.

Сборник статей VIII Международной научно-практической конференции «Современные проблемы науки, общества и образования», Пенза, 20 июня 2025 года.

XXVII Всероссийский конгресс с международным участием «Давиденковские чтения», 18–19 сентября 2025 года, Санкт-Петербург.

Результаты апробированы на расширенном заседании кафедры фармакологии и клинической фармакологии Ярославского Государственного Медицинского Университета, 16 сентября 2025 года, Ярославль.

Результаты апробированы на совместном заседании кафедр Ярославского Государственного Медицинского Университета, 16 октября 2025 года, Ярославль.

II Национальный Конгресс «Спортивная медицина, повышение двигательной активности - основа здоровья нации», 13-14 ноября 2025 года, Москва

Методология и методы исследования

Методология данной работы основана на стандартизированных подходах к научным разработкам, описанным в отечественных и международных методических рекомендациях. Объектом настоящего исследования являлся процесс воздействия модулятора AMPA рецепторов на глутаматные рецепторы на уровнях от клеток до целого организма на различных видах животных и человеке. Предметом исследования являлись психологические шкалы, тесты и результаты прямых экспериментов, полученные в ходе работы. Эмпирической базой исследования служили: статистические данные, доклинических фармакологических, фармакокинетических и токсикологических исследований; 214 индивидуальных регистрационных карт пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения; 60 индивидуальных регистрационных карт здоровых добровольцев.

Исследование состояло из доклинической и клинической частей. В доклинической части изучались фармакокинетика препарата и его токсикологические свойства исследование фармакодинамики, а также специфической фармакологической активности гидроксиникотиноил глутамата. Расчет доз и способов введения фармацевтических субстанций основан на данных, полученных в экспериментах по оценке эффективности, с последующим пересчетом для вида животного или человека, в соответствии с утвержденной для данного вида пересчета методологией.

Дизайн экспериментальных исследований планировался в соответствии с методическими рекомендациями по проведению доклинических и клинических исследований с одобрением локальных этических комитетов и этического комитета Минздрава РФ. Основные задачи по изучению фармакокинетики включали проверку гипотезы о линейности фармакокинетики гидроксиникотиноил глутамата кальция, оценку способности препарата достигать мозга и органов элиминации (печень, почки), характера его элиминации, прогнозирование фармакокинетики при многократном введении, оценку возможности межвидовой экстраполяции фармакокинетических данных.

Токсикологическое исследование включало изучение острой токсичности и переносимости препарата у лабораторных животных, хронической и субхронической токсичности субстанции и готовой лекарственной формы на крысах и кроликах, а также оценку мутагенных, эмбриотоксических, тератогенных, аллергических, иммунотоксических свойств и влияния на репродуктивную функцию.

Клиническая часть включала исследования по изучению фармакокинетики, безопасности и оценки эффективности. Нозология «Хроническое нарушение мозгового кровообращения» была выбрана как имеющая высокую социальную значимость в России и в мире. Методологической основой исследования служили принципы персонафицированной медицины; рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ); нормативно-правовые акты, регулирующие фармацевтическую деятельность в РФ и стандарты оказания медицинской помощи пациентам с хроническим нарушением мозгового кровообращения; исследования российских и зарубежных ученых. В первой части изучена фармакокинетика препарата у здоровых добровольцев. Во второй части оценивалась безопасность препарата в дозах 5, 10 или 25 мг при внутривенном введении пациентам с хроническим нарушением мозгового кровообращения, вызванным артериальной гипертензией и/или атеросклерозом. В третьей части изучалась эффективность препарата в дозах 5, 10 или 25 мг при внутривенном введении по влиянию на когнитивные функции по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA), по влиянию на уровень депрессии, оцененной по шкале MADRS, по влиянию на концентрацию серотонина, по влиянию на Питтсбургский индекс качества сна, по сравнению с группой плацебо.

Положения, выносимые на защиту

1. В экспериментальных моделях оригинальное соединение гидроксиникотиноилглутамат кальция демонстрирует выраженный антиамнестический эффект, превосходящий препарат сравнения пирацетам.
2. ГНГК представляет собой малотоксичное соединение класса ампакинов с линейной фармакокинетикой в терапевтическом диапазоне доз и обладающее способностью проникать через гематоэнцефалический барьер.

3. Молекулярный механизм действия препарата опосредован его взаимодействием с АМРА глутаматными рецепторами, что обуславливает его антиамнестические свойства, подтвержденные на различных моделях.
4. Клинические исследования подтверждают безопасность и хорошую переносимость гидроксиникотиноилглутамата кальция при внутривенном введении в диапазоне доз 10-50 мг.
5. Гидроксиникотиноилглутамат кальция продемонстрировал статистически значимую эффективность в улучшении когнитивных функций у пациентов с хроническими нарушениями мозгового кровообращения в дозе 25мг, превосходя эффект плацебо на 61,29% ($p < 0,001$) по шкале MoCA. Препарат снижает симптомы депрессии и улучшает качество сна.
6. Выявленный комплекс фармакологических эффектов гидроксиникотиноилглутамата кальция позволил сформировать концепцию применения ампакинов для терапии когнитивных нарушений у пациентов.

Личный вклад автора

Автором определена цель, сформулированы задачи и разработан общий дизайн исследования, проанализирован большой объем научной литературы по теме диссертационной работы. Автором обосновано применение экспериментальных моделей и методов изучения механизма фармакологического действия гидроксиникотиноилглутамата кальция. Автор непосредственно проводил экспериментальное изучение специфической фармакологической активности препарата. Автор принимал участие в разработке планов по изучению фармакокинетики и токсикологии и принимал участие в анализе их результатов и составлении отчетов. Автор провел визуализацию и обобщение экспериментальных данных для публикаций и рукописи диссертации.

Соответствие паспорту специальности

В работе проведено изучение механизма действия гидроксиникотиноилглутамата кальция на модели связывания лигандов с активными центрами нейрорецепторов, модели геморрагического инсульта, модели нейронной активности в срезах гиппокампа, модели амнезии условного рефлекса пассивного избегания, вызванного максимальным электрошоком. Проведено изучение фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамата кальция. Проведено доклиническое изучение безопасности фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамата кальция. Проведено изучение токсичности при однократном и многократном введении, включая оценку специфической токсичности и нежелательных побочных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на репродуктивную функцию, аллергизирующее действие и иммунотоксичность). Проведено изучение клинической эффективности гидроксиникотиноилглутамата кальция у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения в двойном слепом, рандомизированном, плацебоконтролируемом

исследовании. Таким образом, диссертационная работа соответствует пунктам паспорта специальности 3.3.6. Фармакология, клиническая фармакология: п.5— Исследование механизмов действия фармакологических веществ в экспериментах на животных, на изолированных органах и тканях, а также на культурах клеток; п.6 — Изучение фармакодинамики, фармакокинетики и метаболизма лекарственных средств. Установление связей между дозами, концентрациями и эффективностью лекарственных средств. Экстраполяция полученных данных с биологических моделей на человека; п.7 — Экспериментальное (доклиническое) изучение безопасности лекарственных средств. Изучение токсичности при однократном и многократном введении, включая оценку специфической токсичности и нежелательных побочных эффектов (мутагенность, эмбриотоксичность, тератогенность, влияние на репродуктивную функцию, аллергизирующее действие, иммунотоксичность и канцерогенность); п.13 — Изучение клинической эффективности лекарственных средств у пациентов с различными заболеваниями в открытых, двойных слепых, рандомизированных, сравнительных и/или плацебо-контролируемых исследованиях.

Публикации

Основные положения диссертации опубликованы в 16 печатных работах, в том числе 2 работы в изданиях из перечня RSCI/BAK, 13 работ – в изданиях, индексируемых в международной базе данных Scopus. По теме диссертационного исследования получен 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации

Диссертация содержит следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, выводы, приложение и список литературы. Работа изложена на 269 страницах машинописного текста, содержит 82 таблицы и 33 рисунка. Библиографический указатель включает 317 источников (43 отечественных и 274 зарубежных источников).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Нейрофизиология памяти

Нейрофизиология памяти — это сложная и многогранная область, которая охватывает множество аспектов, от нервных структур до физиологических механизмов памяти. Генотипическая (врождённая) память и фенотипическая память представляют собой два важных типа памяти, которые взаимосвязаны и влияют на наше обучение и восприятие информации. Понимание этих процессов помогает нам лучше осознать, как работает наш мозг и как мы можем улучшить свои способности к запоминанию и обучению.

Память — это один из основных процессов, обеспечивающих функционирование человеческого мозга. Она позволяет нам сохранять, обрабатывать и воспроизводить информацию, полученную из окружающего мира. Нейрофизиология памяти изучает нервные структуры и физиологические механизмы, которые лежат в основе этих процессов. Память часто используется как синоним знания. Таким образом, все формы мозговой активности, которые увеличивают базу знаний человека, можно условно назвать памятью. В повседневном языке мы называем памятью то, что мы помним и, таким образом, «имеем в виду» и можем сознательно сообщать другим. Ранние мыслители в области психологии пытались очертить различные формы памяти с точки зрения человеческого разума [258]. В настоящее время известно, что существуют различные виды памяти, которые поддерживаются различными системами мозга. Эти системы памяти по-разному зависят от гиппокампа и связанных с ним структур в парагиппокампальной извилине, а также от миндалевидного тела, полосатого тела, мозжечка и неокортекса. Ранняя таксономия делила память на вербальную декларативную (или явную) и недеklarативную (или неявную) формы [259]. Декларативные воспоминания представляют собой сознательные воспоминания о фактах, людях и событиях. Процедурные же воспоминания связаны с навыками, такими как вождение автомобиля, езда на велосипеде или игра на пианино. Декларативные воспоминания зависят от работы медиальной височной доли мозга, в частности гиппокампа. В то же время процедурные воспоминания критически зависят от мозжечка. Несмотря на эти различия, воспоминания часто оказываются сложными и формируются на основе опыта, включающего взаимодействие нескольких систем памяти. Хотя невербальные формы недоступны сознательному воспоминанию и поддерживают различные потребности организма, они могут влиять на поведение, решения и даже умственную жизнь [275]. В последние два десятилетия нейробиологи активно изучали биологические процессы, которые лежат в основе создания и сохранения воспоминаний. В большинстве исследований, изучали память, зависящую от функции височной доли. Исследования на генетическом, молекулярном, электрофизиологическом и анатомическом уровнях показали, что молекулярные изменения на посттрансляционном, трансляционном и транскрипционном уровнях играют ключевую роль в

формировании долговременной памяти. Эти изменения включают в себя как общие механизмы долговременной пластичности, такие как экспрессия генов, синтез новых белков, временные зависимости пластичности (*spike-timing-dependent plasticity, STDP*), изменение плотности NMDA- и AMPA-рецепторов на постсинаптических мембранах и изменение хемореактивных свойств мембран нейронов, которые наблюдаются в различных областях мозга и при различных парадигмах, связанных с долговременными изменениями, так и специфические механизмы, характерные для определенных областей мозга и популяций клеток. [77]. Ведущие теории о роли в механизмах памяти гиппокампальной системы в значительной степени основаны на двух впечатляющих открытиях: резком ухудшении памяти после удаления гиппокампа и связанных с ним структур [102], и наблюдении, что спайки нейронов гиппокампа достоверно варьируются в зависимости от пространственного положения животного (поэтому нейроны гиппокампа называются клетками места) [255].

1.2 Строение лимбической системы

Лимбическая система головного мозга — комплекс анатомически и функционально связанных между собой структур от коры больших полушарий до среднего мозга. Данная совокупность структур мозга, обычно располагается латеральнее таламуса, под корой головного мозга и над стволом мозга. В 1878 году Поль Брок был первым, кто назвал эту общую область мозга «le grand lobe limbique». Позже, в 1949 году, американский врач и нейробиолог Пол Д. Маклин назвал ее лимбической долей, хотя сейчас для отдельных структур, входящих в эту область, используется более современная терминология. В конечном итоге стало ясно, что эта область связана с эмоциональными, запоминающими и мотивационными процессами, которые соединяются с другими частями мозга. К лимбической системе принято относить: некоторые ядра нервных клеток, расположенные в передней области таламуса, гипоталамус, расположенные глубоко в задней части среднего мозга, клеточное скопление, крупной формы, под названием миндалевидное ядро (миндалина) и гиппокамп, приближающиеся к соседству с миндалиной. Клинически некоторые специфические расстройства возникают, когда части лимбической системы страдают от поражения. Хотя полное понимание лимбической системы далеко от завершения, достижения в области нейронауки все же обеспечили лучшее понимание роли, которую играют отдельные компоненты лимбической системы, и дали некоторое представление об их многочисленных связях [84,304]. Сегодня, в настоящее время, пока еще нет полного описания лимбической системы, как, собственно говоря, нет пока четкого, окончательного мнения о ее границах. Однако, благодаря достижениям нейробиологов было выяснено, что структуры, входящие в лимбическую систему, находятся в общей области, которая граничит с полушарием головного мозга и стволом мозга, латеральнее таламуса, под корой

головного мозга, но выше ствола мозга. Исследуя эмбриологическое происхождение возможно разделить, в настоящее время, определенные основные структуры лимбической системы. Показано, что мезэнцефальные компоненты происходят из зрительных, слуховых и соматосенсорных входов, обрабатываемых в этой области, а диэнцефальные компоненты — это гипоталамус, передние таламические ядра и габенулярная спайка. Конечные мозговые компоненты содержат корковые и подкорковые области; которые являются обонятельными луковицами, гиппокампом, парагиппокампальной извилиной, сводом, столбами свода, сосцевидным телом, прозрачной перегородкой, миндалевидным телом, поясной извилиной, энторинальной корой [313]. Хотя изначально предполагалось, что лимбическая система является единственной неврологической системой, участвующей в регуляции эмоций, сейчас ее считают лишь одной частью мозга, регулирующей висцеральные, автономные процессы. В 1982 году Мишкин продемонстрировал, что стимуляция сенсорных областей коры высшего порядка активирует кортико-лимбико-таламокортикальный контур, участвующий в функции памяти обезьян [298]. В последние годы было выявлено несколько дополнительных связей лимбических волокон с использованием методов диффузионно-взвешенной визуализации (DWI). Эквивалентная связь волокон всех этих путей была задокументирована в исследованиях по препарированию у приматов. Некоторые из этих волоконных трактов включают амигдалофугальный тракт (АФТ), амигдалоталамический тракт (АТТ), терминальную полосу (ST), дорсальный таламогипоталамический тракт (DTH), мозжечково-гипоталамические тракты и теменно-затылочно-гипоталамический тракт (РОНТ). За последние несколько лет методы диффузионно-взвешенной трактографии выявили дополнительную связность лимбических волокон, которая включает несколько схем в уже известную сложную лимбическую сеть [255]. Установлено, что лимбическая система участвует в различных процессах, связанных с познанием; включая пространственную память, обучение, мотивацию, эмоциональную обработку и социальную обработку [84].

1.3 Круг Джеймса Пейпеца

В 1937 году нейроанатом Пейпец опубликовал работу, описывающую анатомическую структуру, которая включала ряд ядер и путей центральной нервной системы, которые важны в аспектах памяти и эмоций. Знакомство с этой цепью Пейпеца позволяет клиницистам последовательно обдумывать общую анатомическую основу памяти и анализировать, какие части участвуют в различных аспектах функции памяти. Пейпец предполагал, что нейронные пути соединяют гиппокамп с лимбической системой, показывая на то, что воспоминания, которые хранятся в гиппокампе, имеют сложное эмоциональное содержание. Скорее всего этим

можно объяснить, почему мы чаще вспоминаем счастливые или грустные моменты жизни легче, чем «рутинные» повседневные события [304].

Эмоции занимают огромную роль в человеческой жизни. Они помогают людям адаптироваться к меняющейся окружающей среде и влияют на процесс принятия решений, социализацию и здоровье. Эмоции служат основой для формирования отношений между людьми, проявления творчества и выражения мнений. Осознание своего собственного внутреннего эмоционального состояния позволяет нам лучше понимать себя и взаимодействовать с окружающими нас людьми. Следовательно, изучение круга Пейпеца важно не только с научной стороны, но и в рамках практического применения в психологии и психиатрии, для помощи людям в управлении своими эмоциями и улучшении качества жизни.

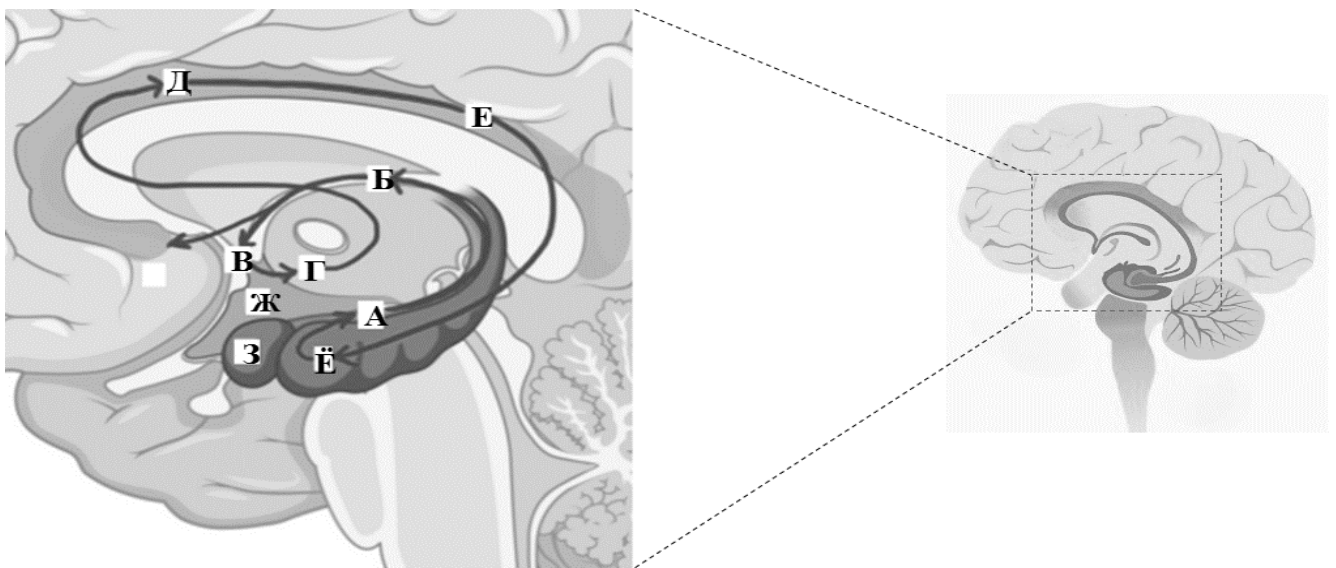


Рисунок 1 - Круг Джеймса Пейпеца и его структура. Начинается в гиппокампе (А) и продолжается в своде (Б), чтобы достичь мамиллярного тела (В), а затем через мамиллотамический тракт продолжается до переднего ядра таламуса (Г). Оттуда она соединяется с поясной извилиной (Д) посредством передних таламических волокон. Поясная извилина (Е) проходит вокруг мозолистого тела, чтобы достичь энторинальной коры (Ё), которая проецируется на гиппокамп (А), замыкая круг. (З) – область перегородки; (Ж) - гипоталамус. Сигналы из корковых ассоциативных зон поступают в гиппокамп через поясную извилину (цингулум) и парагиппокампальную извилину. После обработки в гиппокампе сигналы передаются в гипоталамус (сосцевидное тело) через свод. Последний этап этой цепи для связи с корой использует сосцевидно-таламические волокна. Они передают сигналы из гипоталамуса в переднее ядро таламуса

Переднее ядро таламуса имеет волокна, связывающие его с поясной извилиной [255].

Круг Джеймса Пейпеца представляет собой сеть структур мозга, которые связаны друг с другом для фиксации и создания эмоционального опыта. Основные компоненты этого круга:

1. Гиппокамп — фиксирует новые воспоминания и обрабатывает эмоциональную информацию
2. Парагиппокампальная кора (извилина) — обрабатывает и объединяет информацию, позволяет связывать эмоции с конкретными воспоминаниями и событиями
3. Центральная часть миндалевидного тела (амигдала) — регулирование эмоциональных реакций, особенно страха и тревоги, оценка угроз и соответствующие реакции организма
4. Префронтальная кора — отвечает за саморегуляцию и контроль эмоций, позволяет осознанно управлять эмоциональными состояниями
5. Таламус — обрабатывает сенсорные сигналы и передачу их в кору головного мозга, осуществляет интеграцию эмоциональной информации.

Круг Пейпеца тесно связан с лимбической системой, которая отвечает за эмоциональные процессы и формирование памяти. Данный отдел мозга позволяет нам связывать новые эмоции с событиями, что формирует индивидуальный эмоциональный опыт. Эта связь между кругом Пейпеца и лимбической системой демонстрирует насколько важно непрерывное взаимодействие между отделами мозга для формирования эмоциональных реакций и принятия решений. Изучение круга Пейпеца необходимо для понимания того, как мозг управляет нашими эмоциями и как это можно использовать в терапевтических воздействиях. Джеймс Пейпец, Пол Яковлев и Пол Маклин объединили префронтальную кору, перегородку, миндалины и передние височные доли в лимбическую систему. За последние несколько лет методы, диффузионно-взвешенной трактографии выявили дополнительную связанность лимбических волокон, которая включает несколько схем в уже известную сложную лимбическую сеть. Используя метод диффузионно-взвешенной визуализации (DWI), было показано, что круг Пейпеца состоит из лобно-теменной связи с парагиппокампальной извилиной/гиппокампальными образованиями через поясную ямку, гиппокампальных образований с мамиллярными телами через свод, мамиллярных тел с таламусом через мамиллоталамический тракт и таламуса с лобно-теменными долями и поясной ямкой через таламокортикальные волокна (ТС) [229]. В 1948 году Павел Яковлев описал дополнительный лимбический контур, расположенный базолатеральнее контура Джеймса Пейпеца (1937) и включающий орбитофронтальную кору, миндалевидное тело и дорсомедиальное ядро таламуса (Модель Яковлева) и связал этот базолатеральный контур с эмоциями [106]. Орбитофронтальная и поясная извилины \Leftrightarrow височная верхушка \Leftrightarrow миндалевидное тело \Rightarrow медиодорсальный таламус \Leftrightarrow орбитофронтальная и поясная извилины. В дальнейшем Пол Маклин интегрировал модели Пейпеца и Яковлева как часть лимбической

системы и далее модифицировал, и расширил схему Пейпеца, включив префронтальную кору, перегородку и миндалины как часть лимбической системы. Эта модель была принята и почти не изменилась с тех пор [100,106].

Круг Джеймса Пейпеца играет важную роль в формировании и регуляции эмоциональных реакций. Круг Пейпеца это сеть взаимосвязанных структур, которые обрабатывают и интерпретируют эмоциональную информацию. Круг активируется в ответ на стрессовые события или эмоционально ситуации и формирует ответные реакции.

Применение функциональной магнитно-резонансной томографии (фМРТ) показало как активируются области круга Пейпеца при стимуляции эмоций, такие как радость, страх и гнев. В результате исследования по демонстрации угроз обнаружили повышенную активность в миндалевидном теле и гиппокампе, что подтверждает их участие в эмоциональной регуляции [14,237].

Круг Джеймса Пейпеца не просто анатомическая структура, а система способная к изменению и адаптации. Она активно участвует в нашем эмоциональном опыте, обеспечивая быструю реакцию на окружающую действительность. Система позволяет принимать обоснованные решения, основанные на эмоциональной памяти. Изучение этой системы, имеет большое значение для понимания психических расстройств и для разработки новых препаратов в психологии и психиатрии.

Суммируя все вышесказанное, можно утверждать, что круг Джеймса Пейпеца не только расширяет наше понимание эмоциональных процессов, но и открывает новые горизонты для терапии психических расстройств. Терапия, основанная на понимании анатомии эмоций, может существенно повысить качество жизни пациентов и помочь им справляться с эмоциональными трудностями.

1.4 Длительная потенция (ДП; Long-term potentiation; LTP)

Длительная потенция (ДП) — это один из ключевых механизмов синаптической пластичности, который играет огромную роль в формировании и хранении памяти. Впервые концепция ДП была предложена в 1973 году, когда исследователи выяснили, что повторная стимуляция определенных нейронных цепей приводит к устойчивому увеличению их активности [36]. Этот механизм подразумевает, что синапсы становятся более эффективными в передаче сигнала, что в свою очередь способствует улучшению нейронной коммуникации. Процесс ДП начинается с активации рецепторов на мембране в ответ на высвобождение нейромедиаторов, таких как глутамат. В то время как LTP широко изучалась на клеточном и молекулярном уровне у лабораторных животных [18], однако LTP до недавнего времени не была показана у здорового человека. LTP была продемонстрирована у людей в изолированной корковой ткани, полученной

от пациентов, перенесших операцию, в частности из гиппокампа [13] и височной доли [276], где она демонстрирует свойства, идентичные наблюдаемым у животных. В исследованиях на животных LTP индуцируется высокочастотной электрической стимуляцией (HFS или тетанус) афферентов. LTP характеризуется быстрым и длительным усилением постсинаптического ответа в глутаматных синапсах корковых нейронов как на уровне отдельных клеток, так и в популяциях. Высокая частота стимуляции (HFS) вызывает увеличение возбудимости дендритных шипиков на постсинаптическом нейроне. В этом процессе ключевую роль играют NMDA-рецепторы (NMDAR), которые в обычных условиях находятся в неактивном состоянии, а также потенциал-зависимые кальциевые каналы. Когда рецептор активируется, он позволяет входить кальцию в постсинаптическую клетку. Увеличение концентрации кальция инициирует каскад молекулярных изменений, который приводит к вставке большего количества рецепторов глутамата AMPA (подтип рецепторов, который всегда активен) в постсинаптическую мембрану и увеличению ионной проводимости существующих рецепторов AMPA, что приводит к более сильным постсинаптическим возбуждающим реакциям [76,258,276], в том числе активацию киназ, таких как СаМКII, аденилатциклаза (АС) и протеинфосфатаза 2В, также называемая кальциневрином, которые запускают процессы, приводящие к увеличению количества и функции глутаматных рецепторов на мембране [102]. СаМКII фосфорилирует ионные каналы рецепторов глутамата типа AMPA [56], вызывая изменение свойств каналов [96]. СаМКII фосфорилирует молекулы, необходимые для синтеза белка L-LTP [241]. Кальциневрин противодействует действиям СаМКII, дефосфорилируя рецепторы AMPA [183]. АС производит цАМФ, который активирует протеинкиназу А (РКА). РКА фосфорилирует ряд мишеней, включая каналы рецепторов AMPA, увеличивая количество таких рецепторов в синапсе [110]. Данный механизм приводит к повышению чувствительности синапса и усилению сигнала [152].

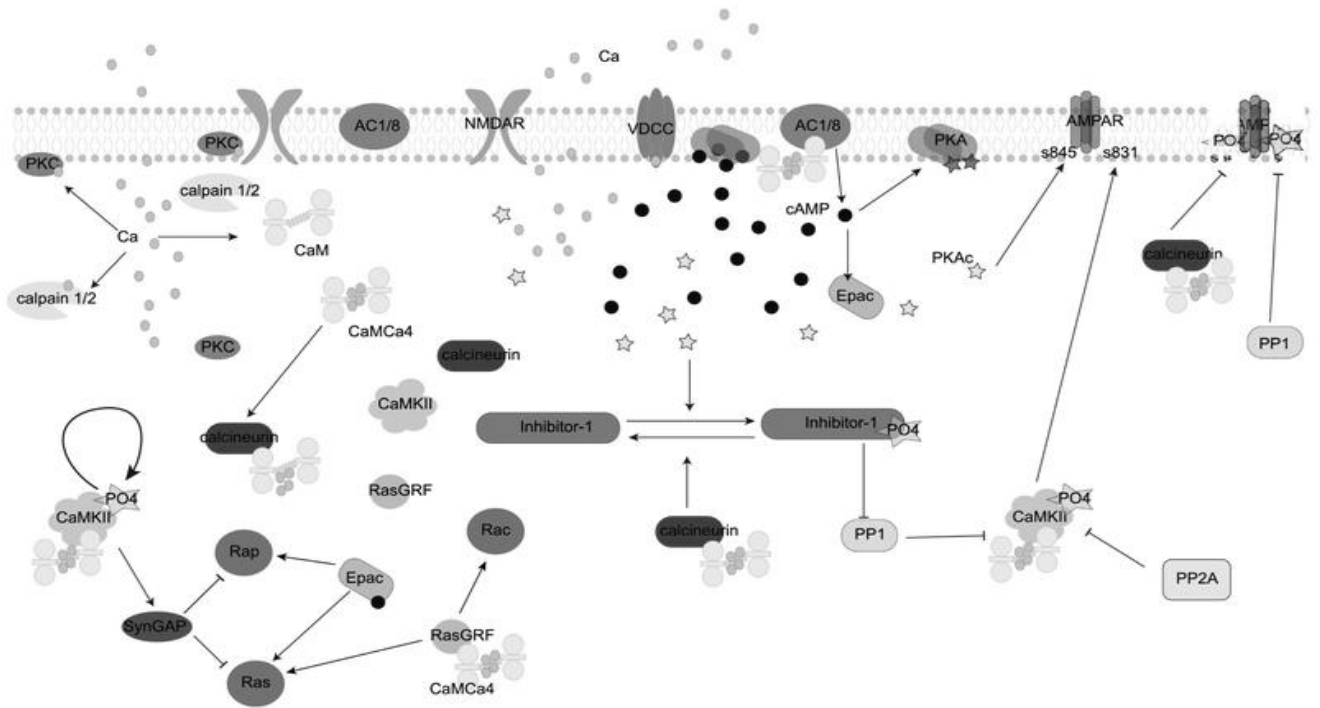


Рисунок 2 - Кальций активирует несколько ключевых молекул, важных для синаптической пластичности. Кальций связывается с кальмодулином, кальпаином и PKC. Кальций-кальмодулин активирует аденилатциклазу (AC1/8), CaMKII, RasGRF и кальциневрин. Аденилатциклаза активируется рецепторами с Gs, после этого производит цАМФ, который активирует PKA и Epac. Как RasGRF, так и Epac активируют мономерные белки, связывающие GTP. CaMKII, PKA и PKC фосфорилируют рецепторы AMPA, тогда как протеинфосфатаза 1 (PP1) и кальциневрин (протеинфосфатаза 2B) дефосфорилируют рецепторы AMPA. PKAc: каталитическая субъединица PKA, протеинкиназа II типа, зависимая от кальция (CaMKII), аденилатциклаза (AC), протеинфосфатаза 1 (PP1), DARPP-32 - фосфопротеин 32 кДа, регулируемый дофамином и цАМФ, PP2A — гетеротримерная протеинфосфатаза, PP1 - протеинфосфатаза 1 (белковая фосфатаза 1), Ras-GRF1 — фактор обмена гуаниновых нуклеотидов, Ras – ГТФаза, малые G-белки (малые ГТФазы). Ras-GRF1 опосредует активацию RAS через белок кальмодулин, связанный с Ca^{2+} , CaMCa4 – кальмодулин с его 4 сайтами связывания кальция [152]

В настоящее время, известно, что четыре различных гена (GluR1, GluR2, GluR3 и GluR4) кодируют субъединицы AMPAR [143]. GluR1, GluR4 и GluR2L (длинная форма сплайсинга GluR2) имеют длинный цитоплазматический карбоксиконцевой хвост (с-хвост), в то время как GluR2, GluR3 и GluR4с (короткая форма сплайсинга GluR4) имеют короткие и структурно схожие с-хвосты. Пирамидальные нейроны гиппокампа зрелых крыс экспрессируют в основном GluR1, -2 и -3 [315], которые образуют каналы, состоящие из четырех субъединиц с предпочтительной конфигурацией двух идентичных гетеродимеров [196]: GluR1/2 и GluR2/3 [290]. Правила синаптического трафика AMPAR, как предполагается, зависят от состава

субъединиц: (1) синаптическое усиление включает зависимое от активности добавление длиннохвостых (например, содержащих GluR1) AMPAR к синапсам; (2) синаптическое ослабление происходит посредством зависимого от активности эндоцитоза либо длиннохвостых, либо короткохвостых AMPAR из синапсов; (3) короткохвостые AMPAR постоянно перемещаются в синапсы независимо от активности и без изменения синаптической силы [87].

ДП считается одним из основных механизмов, лежащих в основе обучения и памяти. Например, исследования показывают, что ДП происходит в гиппокампе — области мозга, отвечающей за формирование новых воспоминаний. Эксперименты на животных, такие как мыши и крысы, продемонстрировали, что блокирование ДП затрудняет запоминание информации и обучение в новых условиях. Например, мыши, у которых нарушены механизмы ДП, показывают снижение способности обучаться в лабиринтах или запоминать новые экспозиции [94,206,207].

Понимание механизмов ДП крайне важно не только для изучения фундаментальных аспектов нейробиологии и психологии, но и для создания эффективных терапевтических методов при разнообразных нейродегенеративных и психиатрических заболеваниях. Например, в настоящее время проводятся исследования, в ходе которых изучается как нарушения в процессе ДП могут быть связаны с болезнью Альцгеймера и депрессией [91,155,247]. Применение соединений, способствующих усилению ДП, потенциально может использоваться в лечении когнитивных нарушений.

Таким образом, длительная потенция представляет собой важный нейробиологический процесс, играющий ключевую роль в механизмах обучения и памяти. Исследования в области ДП открывают новые горизонты для понимания и терапии неврологических и психических расстройств, подчеркивая значимость этой области в нейробиологии. Прогресс в изучении ДП не только обогащает научные знания, но и предлагает практические приложения для улучшения качества жизни людей с когнитивными нарушениями.

1.5 Нейрогенез гиппокампа

Нейрогенез, процесс формирования новых нейронов, был ранее считался ограниченным только во время эмбрионального развития. В течение десятилетий научное сообщество признавало неизменность нейронной архитектуры взрослого мозга. Эту точку зрения можно проследить до начала двадцатого века, когда лауреат Нобелевской премии Сантьяго Рамон-и-Кахаль [264] резюмировал свою точку зрения следующим образом: «Во взрослых центрах нервные пути являются чем-то фиксированным и неизменным: все может умереть, ничто не может быть регенерировано». Спустя десятилетия пионерские исследования начали эмпирически демонстрировать существование нейрогенных ниш, из которых новые нейроны

генерируются на протяжении всей взрослой жизни у млекопитающих. Догма начала рушиться в 1960-х годах с идентификацией клеток мозга, генерируемых взрослыми особями, у грызунов [46]. Однако последние исследования показали, что нейрогенез продолжается и во взрослом мозге, особенно в гиппокампе — области, отвечающей за обучение, память и эмоциональную регуляцию. Это открытие принесло значительный вклад в наше понимание нейропластичности и возможности мозга к восстановлению и адаптации на протяжении жизни. Взрослый нейрогенез (AN) был обнаружен у многочисленных млекопитающих, включая человека и нечеловекообразных приматов [108].

Однако, он ранее был ограничен двумя небольшими зонами мозга. Первая из них — субвентрикулярная зона (SVZ), где формируются новые нейроны, которые затем мигрируют в обонятельную луковицу. Вторая зона — субгранулярная зона (SGZ), которая производит новые гранулярные нейроны (GN), являющиеся основными клетками зубчатой извилины (DG) гиппокампа. Последняя является основным и, возможно, уникальным источником AN в человеческом мозге [63]. Взрослый гиппокампальный нейрогенез (AHN) у людей был обнаружен в конце 1990-х годов и с тех пор подтвержден иммуногистохимическими идентификациями [67,205,269]. Кроме того, AN также была зарегистрирована в более незначительном количестве в нескольких других областях мозга, включая полосатое тело, средний мозг и неокортекс у разных видов млекопитающих [45,57,109].

Стволовые клетки в этой области гиппокампа способны к бесконечному делению и специализации в нейроны. Процесс нейрогенеза включает несколько этапов: пролиферация стволовых клеток, их дифференцировка в нейробласты, миграция новообразованных нейронов и интеграция в существующие нейронные сети гиппокампа [199].

В последние десятилетия неоднократно демонстрировалось, что процесс нейрогенеза в ЦНС взрослого человека находится под сильным влиянием различных стимулов. В 1995 году американские исследователи показали, что пренатальное недоедание, вызванное дефицитом белка, значительно изменяет профиль постнатального нейрогенеза в области гиппокампа у лабораторных животных и что этот процесс сохраняется даже при реабилитации питания после рождения [166]. В настоящее время несколько исследований подтвердили влияние питания и диеты на модуляцию нейрогенеза в гиппокампе. При этом диеты с высоким содержанием жиров и/или сахаров оказывают отрицательное влияние на нейрогенез, в то время как диеты, обогащенные биоактивными соединениями, такими как полиненасыщенные жирные кислоты и полифенолы, могут вызывать образование новых нейронов [125]. В 1997 году экспериментальные исследования показали повышенный нейрогенез в области гиппокампа у мышей, которые жили в обогащенной среде (среде, которая обеспечивает когнитивные, сенсорные и двигательные стимулы) по сравнению с мышами, которые жили в лабораторных

клетках [264]. Было замечено, что неприятные переживания (стресс) снижают производство новых нейронов, в то время как обогащающие переживания (обучение) увеличивают выживаемость новых клеток гиппокампа [170]. С клинической точки зрения, у людей, подвергшихся хроническому или травматическому стрессу, нейрогенез в гиппокампе нарушается вместе с другими областями мозга, участвующими в оценке и регуляции эмоций, что может привести к развитию аффективных расстройств [204].

Как мы видим, нейрогенез активно регулируется различными факторами, такими как физическая активность, стресс, образ жизни и факторы окружающей среды. Например, исследования показывают, что регулярная физическая активность стимулирует нейрогенез и способствует улучшению когнитивных функций [128,282]. Эксперименты на животных с использованием произвольных колесных клеток и беговых дорожек показали, что упражнения увеличивают пролиферацию нейронов в гиппокампе грызунов [99]. Упражнения вызывают изменения нейротрансмиттерных систем, таких как серотонин и ацетилхолин, и высвобождение таких факторов, как BDNF и IGF [128].

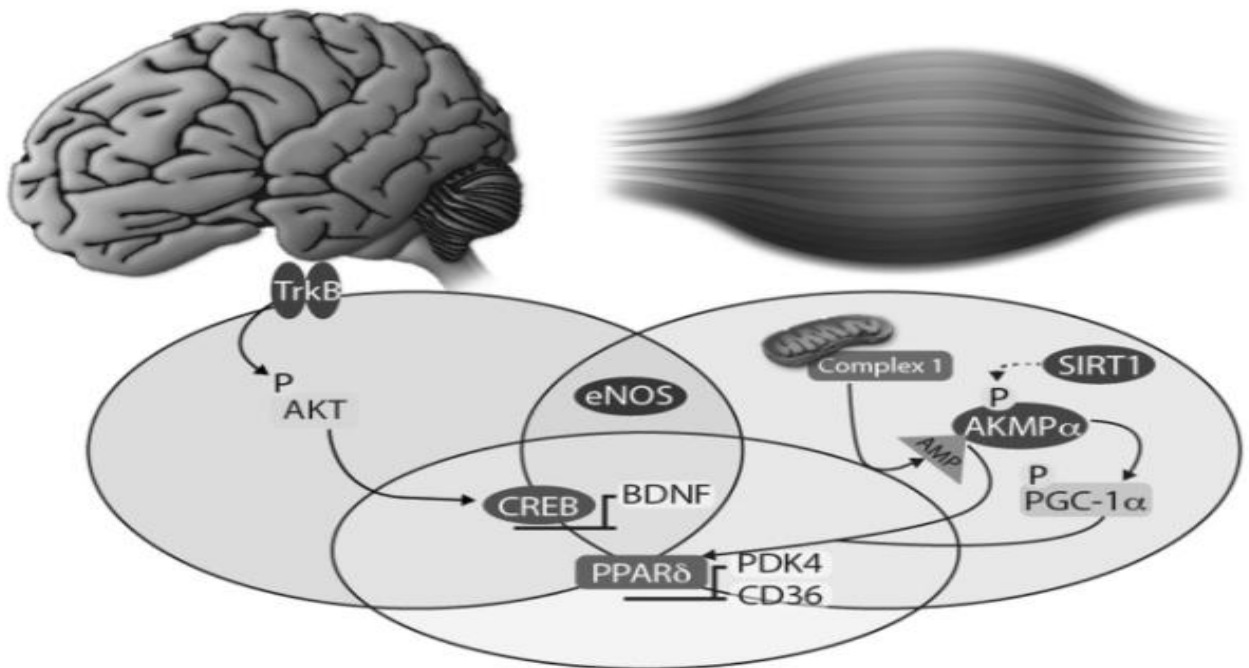


Рисунок 3 - Основные клеточные мишени, активируемых физической активностью. Увеличение концентрации AMP приводит к образованию комплекса AMP-AMPK на γ -субъединице, который активирует каталитическую α -субъединицу AMPK. AMPK является регулятором транскрипции, поскольку он напрямую фосфорилирует, среди прочего, PGC-1 α , активность которого модулирует митохондриальный биогенез. SIRT1 имеет решающее значение для последующей активации AMPK, способствуя деацетилированию AMPK-киназы (LKB1), которая, в свою очередь, активирует AMPK. Повышение клеточных уровней NAD^+ активирует SIRT1 и способствует активности PGC-1 α , играя важную роль в биогенезе митохондрий,

активированный PGC-1 α усиливает митохондриальный биогенез. PPAR δ - ядерный гормональный рецептор, который действует как транскрипционный регулятор более 100 генов и, таким образом, играет решающую роль в различных биологических процессах. Активированная синтаза оксида азота (NOS) влияет на вазодилатацию и ангиогенез в мозге и на периферии. Увеличивается экспрессия BDNF через путь TrkB-AKT-CREB. AKT, протеинкиназа B; BDNF, нейротрофический фактор мозга; CREB (cAMP response element-binding protein) транскрипционный фактор; PDK4 киназа пируватдегидрогеназы 4; CD36 скэвенджер-рецептор класса B.

Таким образом, нейрогенез в гиппокампе представляет собой сложный многоступенчатый процесс, регулируемый на различных уровнях – от внутриклеточных молекулярных механизмов до системных физиологических влияний. Исследования последних десятилетий убедительно доказали существование данного процесса преимущественно в отдельных областях головного мозга. Митохондриальный биогенез и взаимодействие митохондрий играют центральную роль в энергетическом обеспечении процесса нейрогенеза в гиппокампе. Этот, длящийся всю жизнь процесс, важен для поддержания функциональной пластичности. Он помогает разделить схожие воспоминания. Нарушение нейрогенеза приводит к когнитивным нарушениям, депрессии и развитию тревожности. На этот процесс могут влиять различные факторы, например: стресс, недостаток физических упражнений и неправильное питание.

Нейрогенез имеет значение и для регулирования эмоций. Исследования показывают, что улучшение нейрогенеза связано с улучшением состояния при депрессии и тревожных расстройствах. Данный факт был подтвержден в клинической практике и в экспериментах с животными [105]. До настоящего времени механизмы связи между нейрогенезом и эмоциональным состоянием недостаточно ясны.

1.6 Роль CREB в усилении долговременной синаптической пластичности и увеличении возбудимости нейронов

CREB (cAMP-response element-binding protein) представляет собой транскрипционный фактор, который играет ключевую роль в регуляции генетической экспрессии в ответ на различные сигналы. Первоначально CREB был идентифицирован в 1987 году как 43kDa, ядерный белок, который связывается с элементом ответа с AMP (CRE) гена соматостатина в клетках PC12. Дальнейшие исследования показали, что CREB является членом большой группы факторов транскрипции, называемой основным доменом лейциновой молнии (b-zip domain). Она включает фактор активации транскрипции 1 (ATF1) и модулятор элемента, реагирующего на цАМФ (CREM). CREB является важным компонентом механизмов обучения и памяти, а также синтетической пластичности, которые обеспечивают адаптацию нейронов к изменениям во

внешней среде [202]. CREB может быть организован в отдельные домены, которые позволяют ему димеризоваться, взаимодействовать с ДНК, кофакторами и базальным транскрипционным комплексом. На С-конце CREB расположен домен связывания ДНК bZIP, который связывается с CRE, и домен димеризации, который позволяет CREB гомо- и гетеродимеризоваться [62]. На N-конце CREB расположен домен, богатый глутамином 1 (Q1), за которым следует домен, индуцируемый киназой (KID), а затем домен Q2. Эти домены взаимодействуют с различными кофакторами, а также с компонентами базового транскрипционного комплекса [157]. Например, домены Q1 и Q2 взаимодействуют с фактором II 135, связанным с белком-связывающим ТАТА (TAFII135), который, в свою очередь, рекрутирует полимеразный комплекс и стимулирует транскрипцию [197].

Ключевое значение CREB заключается в его способности активировать генетические программы, которые необходимы для формирования долговременной потенциации (ДП) и других форм синаптической пластичности. Активация специфических рецепторов на мембране нейронов приводит к повышению уровня циклического аденозинмонофосфата (цАМФ), который активирует протеинкиназу А (РКА). Эта киназа фосфорилирует CREB, активируя его, что, запуская активацию генов, отвечающих за синтез белков, вовлеченных в структурные и функциональные изменения нейронов.

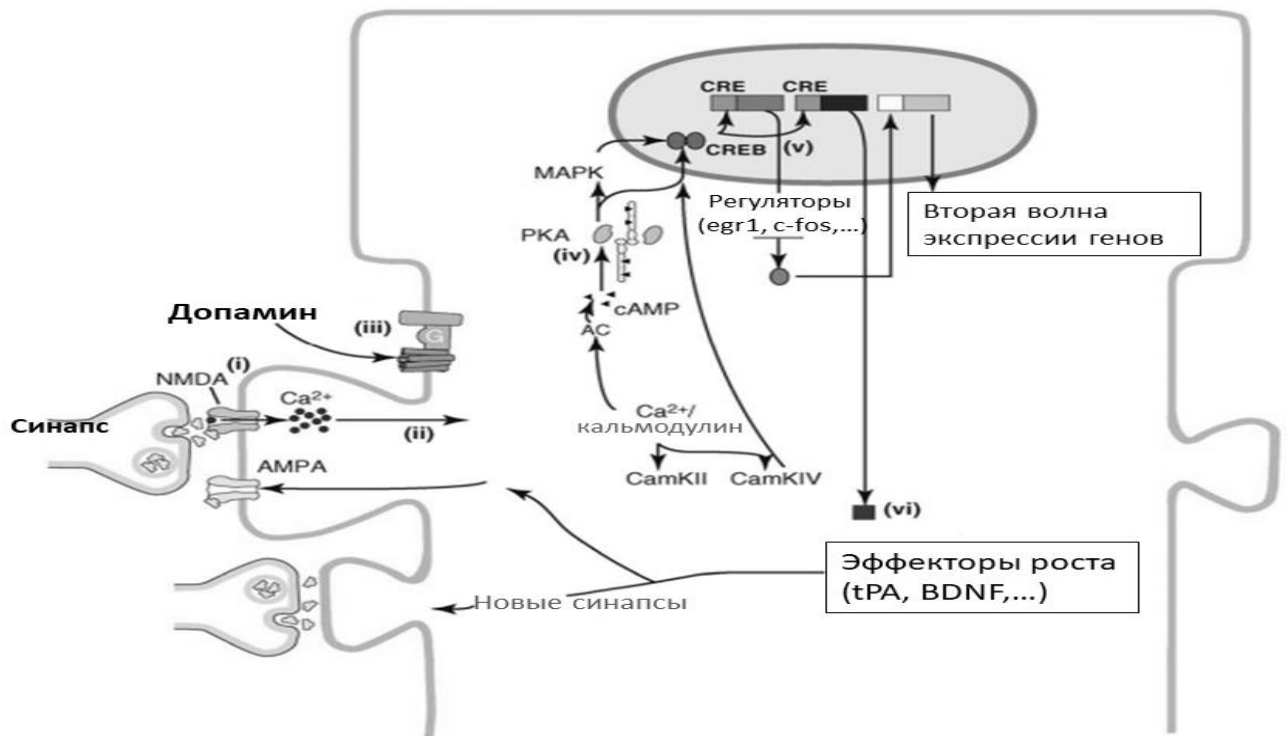


Рисунок 4 - Путь цАМФ и синаптическая пластичность: модель клеточной консолидации

В соответствии с одной из существующих теорий, обучение и сохранение памяти зависят от долговременных изменений в силе синаптических связей. Эти стабильные изменения могут длиться часы, дни или даже годы и, зависят от экспрессии генов de novo. Путь CREB был

определен как основной регулятор в этих процессах. В нейронах гиппокампа деполяризация мембраны приводит к увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} посредством NMDAR, что приводит к активации Ca^{2+} -кальмодулина и его целевой киназы CamKIV. Активация рецепторов, связанных с G-белком (GPCR), нейромедиаторами серотонин или дофамин, увеличивает внутриклеточный уровень цАМФ и активирует другую важную киназу CREB, PKA. Факторы роста, нейротрофины и другие стимулы также могут играть роль в активации этого пути. Считается, что программа транскрипции, инициируемая активацией CREB, обеспечивает строительные блоки, необходимые для стабилизации временного усиления синаптических связей, но его конкретный состав еще плохо определен. Исследования показывают, что применение речевых блокаторов, которые ингибируют активность CREB, приводит к подавлению долговременной потенциации и снижению способности к обучению. Активация CREB приводит к экспрессии генов, отвечающих за синтез и транспорт ионных каналов и рецепторов, таких как AMPA-рецепторы в синапсах. Увеличение числа активных рецепторов повышает постсинаптическую чувствительность к нейротрансмиттерам, что, в свою очередь, приводит к увеличению возбудимости нейронов [112].

Синтез белка является важным этапом для формирования долговременной памяти, и работа в ряде модельных систем четко установила основную роль транскрипции, опосредованной CREB/CRE, в этом процессе [252]. Было также показано, что CREB участвует в памяти страха, вызванной сигналом и контекстуальной памяти, пространственной памяти, обонятельной памяти, памяти условного отвращения к вкусу, а также памяти распознавания объектов и общества [178].

В качестве дополнительного подтверждения роли CREB в нейронной пластичности и памяти, мыши, экспрессирующие структурно активную форму CREB, мыши VP16-CREB, демонстрируют более низкий порог для индукции поздней фазы долговременной потенциации (L-LTP) в коллатеральном пути Шаффера и повышенную консолидацию контекстной и стимулированной памяти страха [55,281]. Кроме того, в гиппокампе дефосфорилирование CREB в Ser 133 связано с индукцией длительной депрессии (LTD) [267]. Эти данные, наряду с работой Imprey соавт, показывающей, что CRE-опосредованный трансмисмиттер активируется стимулами, которые вызывают обучение и память, раскрывают ключевую роль CREB в формировании памяти млекопитающих [148]. Han соавт показали, что множество нейронов, экспрессирующих CREB, может действовать как нейроны, кодирующие память. Направленное разрушение нейронов CREB привело к ухудшению памяти [133]. CREB регулирует синаптическую пластичность и возбудимость нейронов [314]. Литературные данные не полностью единообразны в отношении роли CREB в синаптической пластичности и формировании памяти.

Изменения уровня CREB может влиять на нейронную сеть в целом, регулируя понижение возбудимости в ответ на хроническую стимуляцию или депривацию. Данный эффект критически важен для адаптации нейронной активности. Повышение CREB в условиях стресса может быть связано с нейропластичностью и адаптацией к изменяющимся условиям, что позволяет организму эффективно реагировать на вызовы окружающей среды [245]. Исследование функции CREB в процессах долговременной синаптической пластичности открывает новые перспективы для разработки методов лечения неврологических заболеваний. Возможно создание препаратов, активирующих CREB, для улучшения когнитивных функций у пациентов с депрессией, тревожными расстройствами или нарушениями памяти. CREB представляет собой важный транскрипционный фактор, ответственный за усиление долговременной синаптической пластичности.

CREB усиливает долговременную пластичность нейронов через активацию транскрипции генов. В следствие этого активируется синтез новых белков, изменяющих синаптическую силу и возбудимость. Влияние на CREB обладает потенциалом для разработки инновационных препаратов, направленных на терапию когнитивных и эмоциональных нарушений.

1.7 Роль дендритных шипиков в нейрональной пластичности

Дендритные шипики это небольшие выступы на дендритах нейронов. Шипики были открыты более ста лет назад известным испанским анатомом Сантьяго Рамоном-и-Кахалем. Эти структуры диаметром 0.1-1 мкм служат местом контакта между нейронами, позволяя им обмениваться сигналами. Представляя, что его гистологические препараты все еще живы, Кахаль считал, что у живого животного шипики могут двигаться и изменяться, вырастая при активности и втягиваясь во время бездействия или сна. Подразумевалось, что физические движения шипиков могут соединять или разъединять нейроны. Одним из самых захватывающих недавних открытий стало то, что шипики не являются стабильными структурами, а постоянно движутся и испытывают морфологическую пластичность *in vivo* и *in vitro*. Они могут изменять свою форму и размеры в зависимости от активности нейронов и окружающей среды, что делает их ключевыми участниками процессов обучения и памяти [140]. Каждый нейрон может иметь сотни и даже тысячи дендритных шипиков, что увеличивает его возможности для связей с другими нейронами.

1.8 Структура и функция дендритных шипиков

Нейроны демонстрируют множество вариаций подтипов дендритных шипиков, основанных на их морфологических и физиологических свойствах, каждый из которых имеет уникальные предполагаемые функции. Нейроны, содержащие шипики («шипики»), обнаружены

во многих областях мозга, наиболее изученными из которых являются пирамидальные клетки коры головного мозга, средние шипиковые нейроны дорсального и вентрального полосатого тела, и клетки Пуркинье мозжечка.

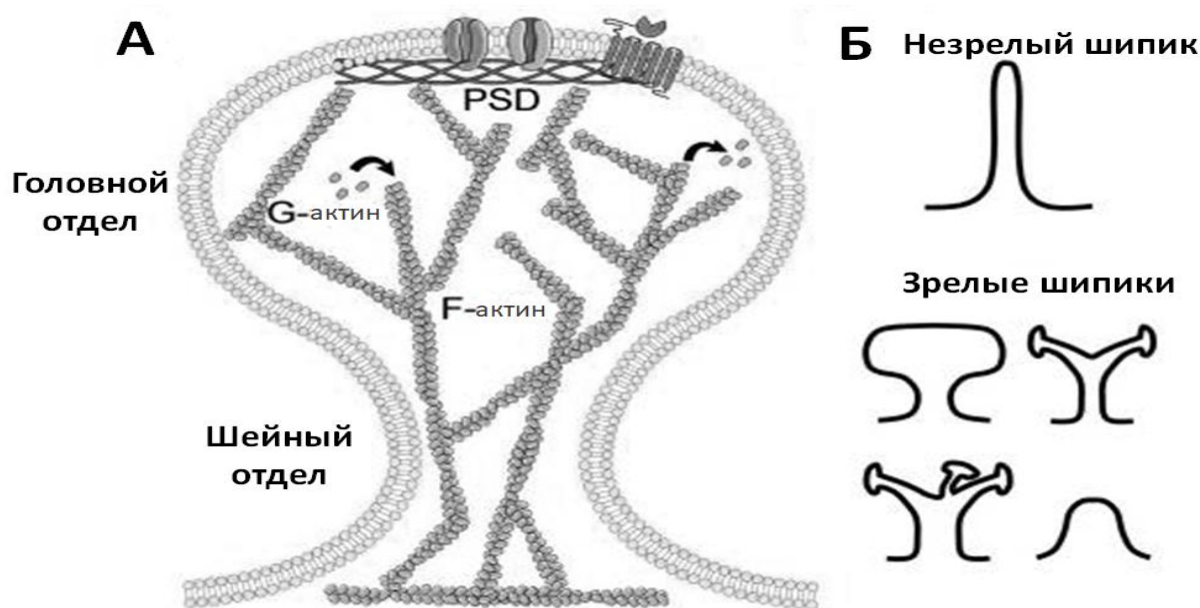


Рисунок 5 - А - Структура дендритного шипика. Шипики обычно имеют шейный и головной отделы, структура которых в значительной степени построена на актиновом цитоскелете. G-актин полимеризуется в F-актин, чтобы построить первичную структуру цитоскелета, и таким образом ремоделирует шипик вовремя синаптической пластичности. Этот процесс непрерывно меняет форму мозговых цепей и синаптических связей. В PSD связанные с мембраной белки постоянно вставляются или вытягиваются из мембраны, включая ионотропные и метаботропные рецепторы. Б - Дендритные шипики часто классифицируются по разным подтипам, некоторые из которых считаются незрелыми и похожими на филоподии, а другие считаются зрелыми с увеличенным диаметром головки относительно диаметра шейки, а также бифурцированной и/или многоветвистой морфологией [119]. Сокращения: PSD - постсинаптическая плотность; G-актин - глобулярный (мономерный) актин, F-актин - нитевидный актин.

Дендритные шипики во взрослых нейронах могут иметь простую или разветвленную морфологию, и на протяжении многих лет исследователи разрабатывали различные критерии для классификации шипиков по определенным категориям на основе их общей морфологии (в соответствии с рис. 5 Б). Некоторые типы шипиков являются сидячими по своей природе, лишены какого-либо различимого шейного аппарата и относительно короткими по длине (<0,5 мкм), которые часто называют «коротышками» [137,138]. Другие зрелые типы шипиков имеют ножку, содержащую головной аппарат, который шире, чем у шеи, часто называемые

«грибовидными» шипиками. Шипы, которые сохраняют этот отчетливый головной и шейный аппарат, но с гораздо более узкими диаметрами, часто называют «тонкими» шипиками. Реже зрелые шипики могут иметь два (раздвоенных) или более (многоветвистых) отростка с полностью функциональными головками, что позволяет, таким образом, нескольким возбуждающим синаптическим входам поступать на один шипик. Следует отметить, что помимо этих классических морфологий дендритных шипиков, другие дендритные специализации для получения входов включают более сложные архитектуры, такие как синаптические гребни, когтеобразные окончания клубочков, щеточные окончания и колючие и кораллиновые наросты. Тем не менее, возникновение этих структур, как правило, гораздо менее частое, чем возникновение простых дендритных шипиков [174]. Трансформация шипиков, происходящая во время обучения, способствует интеграции новой информации и облегчает последующее извлечение памяти. Более того, некоторые экспериментальные исследования показывают, что травмы или снижение количества дендритных шипиков негативно сказываются на процессах обучения и памяти, что указывает на их критическую роль в данных когнитивных функциях. В итоге, дендритные шипики не только влияют на качество синаптических соединений, но и формируют нейронные сети, отвечающие за наши способности к обучению и запоминанию [174].

Дендритные шипики играют ключевую роль в нейронной пластичности, выступая в качестве физических зон обучения и памяти, претерпевая структурные и функциональные изменения в ответ на нейронную активность. Их плотность, размер и форма могут быстро меняться, влияя на силу синаптических связей и эффективность коммуникации между нейронами. Эта динамическая ремоделировка, регулируемая биохимическими и цитоскелетными процессами, лежит в основе долгосрочных изменений в нейронных цепях.

1.9 Глутаматергическая система - семейства рецепторов AMPA и NMDA

Глутаминовая кислота (Glu) является основным возбуждающим нейромедиатором в ЦНС. Она представляет собой заменимую аминокислоту, которая не проникает через гематоэнцефалический барьер. Она синтезируется в митохондриях нейронов из глюкозы и нескольких предшественников. После синтеза Glu высвобождается в цитоплазму, где накапливается в синаптических пузырьках посредством процесса, зависящего от Mg^{2+} /АТФ. Распространение нервного импульса к окончанию аксона способствует высвобождению Glu из синапса посредством механизма, зависящего от внутриклеточного Ca^{2+} посредством экзоцитоза. В дальнейшем Glu может взаимодействовать со своими специфическими рецепторами. Глутамат является ионизированной формой глутаминовой кислоты. Он упаковывается в кальций-зависимые синаптические пузырьки с помощью везикулярных транспортеров глутамата (VGLUT) [61,113], и вскоре после этого комплексные белки SNARE (растворимый фактор,

чувствительный к N- этилмалеимиду — рецептор белка прикрепления) облегчают экзоцитоз глутамата в синаптическую щель [250], где он взаимодействует с ионотропными (iGluRs) и метаботропными (mGluRs) рецепторами.

Таким образом, глутамат осуществляет свою функцию через три класса ионотропных рецепторов глутамата, включая AMPAR (GluR1-4), NMDAR (NR1, NR2A-D, NR3A-B) и каинатные рецепторы (КА, GluR5–7, KA1-2), а также класс метаботропных рецепторов глутамата (mGluRs, mGluR1–8) [101,307]. Ионотропные рецепторы глутамата представляют собой ионные каналы, которые позволяют натрию, калию и кальцию поступать в клетку или из нее при стимуляции глутаматом. Открытие пор и последующий приток ионов приводит к изменению поляризации мембраны, а также к прямой активации внутриклеточных сигнальных путей. Вторая группа, «метаботропные рецепторы», представляет собой рецепторы, сопряженные с G-белком, которые оказывают свое действие косвенно через пути вторичных мессенджеров [101,307].

AMPA состоит из четырех гомологичных субъединиц (GluR1-4), которые собираются в различные гетеромерные тетрамеры. Во взрослом гиппокампе большинство AMPAR содержат субъединицы GluR1 или GluR3 в сочетании с GluR2, что обеспечивает непроницаемость для кальция [101,193]. NMDAR присутствует в мозге в основном в виде тетрамера, в котором две субъединицы являются обязательными глицин-связывающими субъединицами NR1, тогда как оставшиеся две обычно являются глутамат-связывающими субъединицами NR2. Субъединица NR1 играет особенно важную роль в нацеливании и транспорте NMDAR из места их сборки в эндоплазматическом ретикулуме к участкам на поверхности клетки. Каждая субъединица состоит из внеклеточного аминоконцевого и лигандсвязывающего домена, трех трансмембранных доменов, а также реентрибной поровой петли и внутриклеточного карбоксильно-концевого домена для всех рецепторов глутамата ионных каналов [144]. Субъединица NR1 связывает глицин или d -серин, а субъединица NR2A/B связывает глутамат. Активация NMDAR требует связывания как глицина (или d -серина), так и глутамата, а также одновременной деполяризации ионного канала рецепторами AMPA или каинатными рецепторами, что снимает блокировку Mg^{2+} . В этих условиях канал NMDAR откроется и позволит войти как Na^+ , так и Ca^{2+} и выйти K^+ . Внутри ионного канала были идентифицированы два дополнительных сайта связывания: сайт сигма (σ) (удерживающий Mg^{2+}) и сайт фенциклидина (PCP). Галлюциногенный препарат PCP и кетамин связывают сайт PCP и считаются неконкурентными антагонистами рецепторов, которые ингибируют функцию канала NMDAR. Несколько других эндогенных лигандов взаимодействуют с NMDAR на разных участках молекулы и могут оказывать модулирующее действие на его функцию. Эндогенный полиамин спермин взаимодействует с субъединицей NR2B NMDAR и потенцирует открытие канала; как это ни парадоксально, он (и другие полиамины) также может блокировать канал,

снижая его проводимость. Цинк также ингибирует NMDAR специфическим для подтипа образом; рецепторы, содержащие NR2A, ингибируются гораздо более низкими концентрациями цинка, чем те, которые содержат NR2B [203]. Таким образом, рецепторы NMDA демонстрируют наличие потенциал зависимого блока Mg^{2+} , высокую проницаемость для Ca^{2+} и требуют одновременного связывания коагонистов глицина и глутамата для активации. Эти отличительные особенности отличают рецепторы NMDA от рецепторов AMPA/каината (т. е. не-NMDA рецепторов) и оказывают глубокое влияние на их физиологические роли в ЦНС. Мощный приток Ca^{2+} , опосредованный NMDA-рецептором, в течение короткого периода времени может привести к долгосрочному потенцированию (LTP) синаптической эффективности, тогда как менее выраженный приток Ca^{2+} в течение более длительного периода времени может привести к долгосрочному угнетению (LTD) [287]. Из этого следует, что частота и длительность активации синаптического NMDA-рецептора может приводить либо к усилению, либо к ослаблению синаптической эффективности, что рассматривается как клеточный механизм, связанный с памятью и обучением [250].

Возбуждающая нейротрансмиссия модулируется через рецепторы глутамата, главным образом через NMDA-рецепторы, это имеет важные последствия для происхождения повреждения и смерти клеток. Подобные проявления могут наблюдаться при различных патологических состояниях, включая инсульт, гипоксию, ишемию, депрессию, нарушения сна и другие. Также они характерны для хронических нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, Паркинсона, Хантингтона и боковой амиотрофической склероз (БАС). Все эти состояния имеют общие патологические характеристики, включая постепенную и избирательную потерю нейронов, в основном из-за сверхактивации рецепторов глутамата. Хотя группы нейронов, которые в первую очередь поражаются, различаются в зависимости от заболевания, а причины гибели нейронов неизвестны, в следствии многофакторности патогенеза, сложности нейрональных механизмов, ограничения моделей исследования, гетерогенностью клеточных ответов и каскадным характером повреждения, сверхактивация рецепторов глутамата, которая обычно приводит к повышению концентрации Ca^{2+} в цитоплазме и образованию реактивных форм кислорода являются скорее промежуточными звеньями в цепи событий, а не первичными причинами. Эти факторы, по-видимому, играют очень важную роль в нейродегенерации и механизмах прогрессирующей гибели нейронов при таких заболеваниях, как, например, болезнь Альцгеймера и Хантингтона [301].

Таким образом, глутаматергическая система, использующая глутамат в качестве основного возбуждающего нейромедиатора, включает как AMPA-, так и NMDA-рецепторы. Большинство синапсов имеют оба типа рецепторов, которые работают совместно: AMPA-рецепторы обеспечивают быструю начальную передачу сигнала, в то время как NMDA-

рецепторам необходима эта начальная деполяризация для активации и реагирования на глутамат. Этот кооперативный эффект критически важен для таких процессов, как обучение и память, а также для развития некоторых неврологических расстройств.

1.10 Синаптогенез

Синаптогенез представляет собой фундаментальный процесс, который устанавливает точные связи между нейронами и поддерживает организацию нейронных цепей. Во время этого процесса закрепленные на мембране белки, называемые молекулами синаптической адгезии, играют важнейшую роль в начальном распознавании мишеней аксона и дендрита и дифференциации пресинаптических и постсинаптических специализаций [261]. С молекулярной точки зрения синаптогенез можно определить, как сборку сотен пре- и постсинаптических белков в очень сложную и определенную структуру зрелого синапса. Для правильного функционирования синапсов эти синаптические компоненты — синаптические везикулы (SV) и связанные с ними белки, глутаматные рецепторы, ионные каналы вместе с основными структурными компонентами активной зоны и PSD — должны транспортироваться и накапливаться в новых местах контакта между аксонами и дендритами с точным расчетом времени и в высшей степени организованным образом. Известно, что существуют механизмы для изменения или иммобилизации транспорта синаптических белков в определенных местах первоначального контакта, чтобы начать строить активную зону и PSD. Как пре-, так и постсинаптические белки присутствуют в нейронах до формирования синапсов, и многие из них можно наблюдать в виде дискретных кластеров в аксонах и дендритах (в соответствии с Рисунок 6) [246].

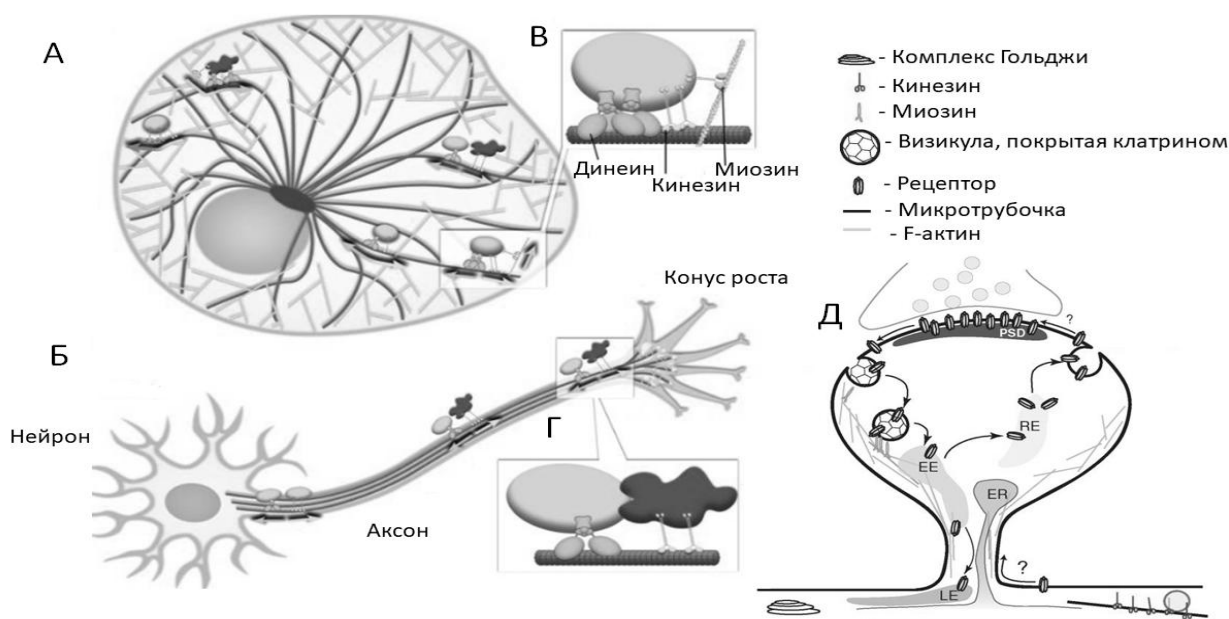


Рисунок 6 - Транспорт на основе микротрубочек и распределение, связывание и организация органелл. А. В устойчивой эукариотической клетке молекулярные моторы кинезин и динеин транспортируют груз на большие расстояния по радиально расположенным микротрубочкам. Актиновые филаменты (темные) плотнее вблизи периферии клетки и в первую очередь поддерживают транспортные события на короткие расстояния с помощью миозиновых моторов. Б. Архитектура цитоскелетного транспортного аппарата в нейроне в некоторой степени аналогична, с пучками микротрубочек, простирающимися от тела клетки в аксон и дендриты, и с актином, сосредоточенным в конусе роста на конце аксона. В. Органеллы часто перемещаются несколькими моторами, включая моторы противоположной полярности и на разных цитоскелетных дорожках. Г. Микротрубочки и актин также обеспечивают каркас, где могут происходить взаимодействия органелл, поскольку присоединение к нити ограничивает трехмерную диффузию органелл движением в одном измерении. Д. Модель локального постсинаптического трафика. Компоненты синапса либо диффундируют из синапса, либо активно транспортируются в эндоцитарные зоны, окружающие PSD, где они интернализуются и транспортируются в ранние эндосомы (EE) и сортируются либо в поздние эндосомы (LE) для деградации, либо в рециркулирующие эндосомы (RE) для возвращения на поверхность шипика.

Центральными органеллами, участвующими в секреторном пути, являются эндоплазматический ретикулум (ЭР), аппарат Гольджи и транс-сеть Гольджи (TGN). Белки, предназначенные для плазматической мембраны, попадают в просвет ЭР, поскольку они транслируются рибосомами, связанными с ЭР, где они складываются в свою правильную трехмерную структуру с помощью шаперонных белков, таких как BiP, кальнексин и кальретикулин [240]. Посттрансляционные модификации, включая N-гликозилирование и образование дисульфидных связей, также происходят в ER. Модифицированный груз, который готов перейти к следующему этапу секреторного пути, концентрируется в определенных местах выхода и покидает ER в пузырьках, покрытых COPII. Эти пузырьки сливаются с аппаратом Гольджи, где происходят дальнейшие модификации белка, включая гликозилирование и протеолиз. На финальном этапе белки собираются в комплексе Гольджи для транспортировки в цитоплазму или в плазматическую мембрану [89].

Синаптогенез это процесс создания и формирования новых синапсов. Синаптогенез происходит на протяжении всей жизни. Особенно быстро он протекает на ранних этапах развития мозга. Данный процесс необходим для формирования нейронных сетей, обучения, памяти и других функций. Синаптогенез включает в себя формирование пре- и постсинаптической мембраны, управляемой молекулярными сигналами.

1.11 Пути нейропротекции при патологических состояниях мозга

Поиск и разработка новых фармакологических средств для лечения нейродегенеративных патологий это постоянный процесс. Разработанные на данный момент препараты показали определённый успех на этапе доклинических исследований на моделях неврологических расстройств, однако более 30 клинических испытаний на людях потерпели неудачу. Это может быть связано как с концептуальными проблемами, так и с методологическими различиями между животными моделями и доклиническими и клиническими испытаниями на людях. Кроме того, факторы, связанные с фармакокинетикой, такие как скорость проникновения препарата в мозг животных и человека, и ограничения терапевтического окна, могут существенно различаться в животных моделях и у людей [111]. Пути нейропротекции при патологических состояниях мозга включают первичную и вторичную нейропротекцию.

Первичная нейропротекция направлена на прерывание быстрых механизмов некротической гибели нейронов. Для этого применяют препараты, которые эффективно останавливают глутамат-кальциевый каскад, препятствуют проникновению ионов кальция в клетки и тем самым предотвращают их избыточное накопление. Это позволяет прервать быстрые реакции глутамат-кальциевого каскада, которые приводят к повреждению нейронов. Это необходимо для коррекции дисбаланса возбуждающих и тормозных нейротрансмиттерных систем и активации естественных тормозных процессов. А также путем стабилизации специфические глутаматергические рецепторы, прерывая нарастание глутаматного выброса и подавляя глутаматную эксайтотоксичность. В нейропротекции, защите нейронов от повреждений участвуют разные типы рецепторов, которые взаимодействуют с нейромедиаторами и нейромодуляторами. В нейропротекции нейронов ключевую роль играют метаботропные глутаматные рецепторы mGluR1 и mGluR5, а также рецепторы серотонина 1A, ангиотензина AT1 и ноцицептина/орфарина. Кроме того, важны AMPAR (GluA1–4) и NMDA-рецепторы (GluN1, GluN2A–D и GluN3A–B). Изучение этих рецепторов в нейропротекции является сложной задачей, поскольку каждый тип рецепторов может оказывать как нейропротекторное, так и нейротоксическое действие в зависимости от конкретных обстоятельств и клеточного контекста (cellular context), поскольку в разных типах клеток одни и те же гены могут транскрибироваться и транслироваться с разной эффективностью, а факторы, такие как гормоны, цитокины и другие сигнальные молекулы в межклеточном веществе, могут изменять активность клеток. Понимание того, как эти рецепторы взаимодействуют с нейротрансмиттерами и нейромодуляторами, имеет решающее значение для разработки таргетной терапии неврологических расстройств [48,116,124,146,161,163,164,177,195,217,248,285,296,308].

Вторичная нейропротекция направлена на торможение отсроченных механизмов гибели нейронов и уменьшение выраженности отдалённых последствий ишемии, регулируя торможение местной воспалительной реакции, введением антагонистов провоспалительных цитокинов и молекул клеточной адгезии, влияя на нейропротекторные пути: PI3K-Akt, BDNF/CREB, Nrf2-Keap1, HIF, модуляция пути SUMO (small ubiquitin-like modifier; малый убиквитин-подобный модификатор), который участвует в модификации и регуляции белков. Однако, разработка вторичной нейропротекции находится на стадиях доклинических и клинических исследований 1 фазы [111,177,296,297].

Современная нейробиология выделяет несколько ключевых классов нейропротекторов, каждый из которых фокусируется на различных мишенях и механизмах действия. К основным классам нейропротекторов относятся ингибиторы витаминов и антиоксиданты, агонисты и антагонисты рецепторов, а также ингибиторы ацетилхолинэстеразы. Эти препараты направлены на защиту нейронов от повреждений, предотвращая последующее развитие различных неврологических заболеваний. Витамины и антиоксиданты, такие как витамин Е и витамин С, действуют на молекулярном уровне. Они уменьшают оксидативный стресс, который вызывает гибель нейронов. Витамины служат мощными защитниками, восстанавливая клеточный метаболизм и снижая процесс воспаления [137,138]. Клинические испытания подтвердили эффективность антиоксидантов в замедлении нейродегенеративных заболеваний [163,308].

Агонисты и антагонисты рецепторов, включая глутаматные рецепторы (mGluR1 и mGluR5), рецепторы серотонина 1A и ангиотензина AT1, являются важной частью нейропротекторной стратегии [272,284]. Эти соединения улучшают нейротрансдукцию и изменяют синаптическую активность, что позволяет улучшить функционирование нейронных сетей. Активация рецепторов серотонина 1A улучшает настроение и когнитивные функции, а также снижает риск развития депрессии. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы, такие как донипезил и ривастигмин, улучшают когнитивные функции у пациентов с болезнью Альцгеймера, блокируя расщепление ацетилхолина - нейромедиатора, отвечающего за память и обучение. Это ведет к повышению уровня ацетилхолина в синапсах и, как следствие, улучшению передачи сигнала между нейронами. Несмотря на то, что данные агонисты и антагонисты демонстрируют многообещающие нейропротекторные свойства в доклинических исследованиях, воздействуя на нейровоспаление и окислительный стресс, однако, многие из них не прошли клинические испытания из-за проблем с переносом результатов с лабораторных исследований на человеческий организм [65,277]. В последние годы особое внимание уделяется ампакинам — соединениям, которые модулируют активность глутаматных рецепторов типа AMPA и могут оказывать положительное влияние на когнитивные функции [30,37]. За последние 30 лет было описано несколько классов потенциаторов AMPA-рецепторов. Эти молекулы связываются с

аллостерическими участками AMPA-рецепторов, замедляют десенсibilизацию и тем самым усиливают сигнализацию через рецепторы. Некоторые агенты, потенцирующие AMPA-рецепторы, были изучены на моделях грызунов и в настоящее время проходят клинические испытания. Сложность исследования этих агентов обусловлена наличием множества подтипов AMPA-рецепторов, на которые молекулы могут действовать по-разному, а также распределением AMPA-рецепторов и трудностями изучения когнитивных функций у интактных грызунов [30,37,73].

Существуют различные пути возникновения неврологических заболеваний, на которые мы можем воздействовать с помощью различных нейропротекторов. В этом разделе мы более подробно рассмотрим механизмы действия отдельных классов нейропротекторов.

1.11.1 Потенциаторы AMPA-рецепторов

Глутамат и рецепторы глутамата, как уже упоминалось выше, играют ключевую роль в долговременной потенциации (LTP), процессе, который, как полагают, лежит в основе формирования памяти. Было показано, что антагонисты глутамата блокируют LTP и нарушают память как у грызунов, так и у людей. Исходя из этих данных, неудивительно, что усиление глутаматергической передачи было исследовано как средство улучшения когнитивных функций. Было показано, что рецепторы AMPA (альфа-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол пропионовая кислота) контролируют быструю синаптическую передачу. Рецепторы α -амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовой кислоты (AMPA) являются, вероятно, наиболее распространенным подтипом рецепторов глутамата в мозге. Они опосредуют большую часть быстрой возбуждающей передачи аминокислот в центральной нервной системе. Их активация, связанная с мембранным трафиком и фосфорилированием, играет важную роль в синаптической пластичности, которая необходима для обучения и памяти [90,293].

В последние два десятилетия регуляция функций белков и контроль их поведения аллостерическими модуляторами привлекли растущий интерес к поиску новых терапевтических средств. Возможность регуляции функций белков, вызывая соответствующие конформационные изменения путем связывания дополнительных участков (аллостерических), отличных от эндогенного участка активации (ортостерических), обеспечивает преимущества в виде более высокой селективности и лучшего модуляторного контроля.

Аллостерические модуляторы можно классифицировать на основе их влияния на функции и реакции белков как положительные аллостерические модуляторы (ПАМ) или отрицательные (негативные) аллостерические модуляторы (НАМ). ПАМ вызывают увеличение, а НАМ уменьшение реакции, вызванной эндогенными лигандами, действующими в ортостерических сайтах. Это подразумевает, что тонкая настройка сигнализации, запускаемой эндогенными

лигандами, может быть получена путем неинвазивного контроля белков малыми молекулами, действующими в аллостерических сайтах связывания (в соответствии с Рисунок 7).

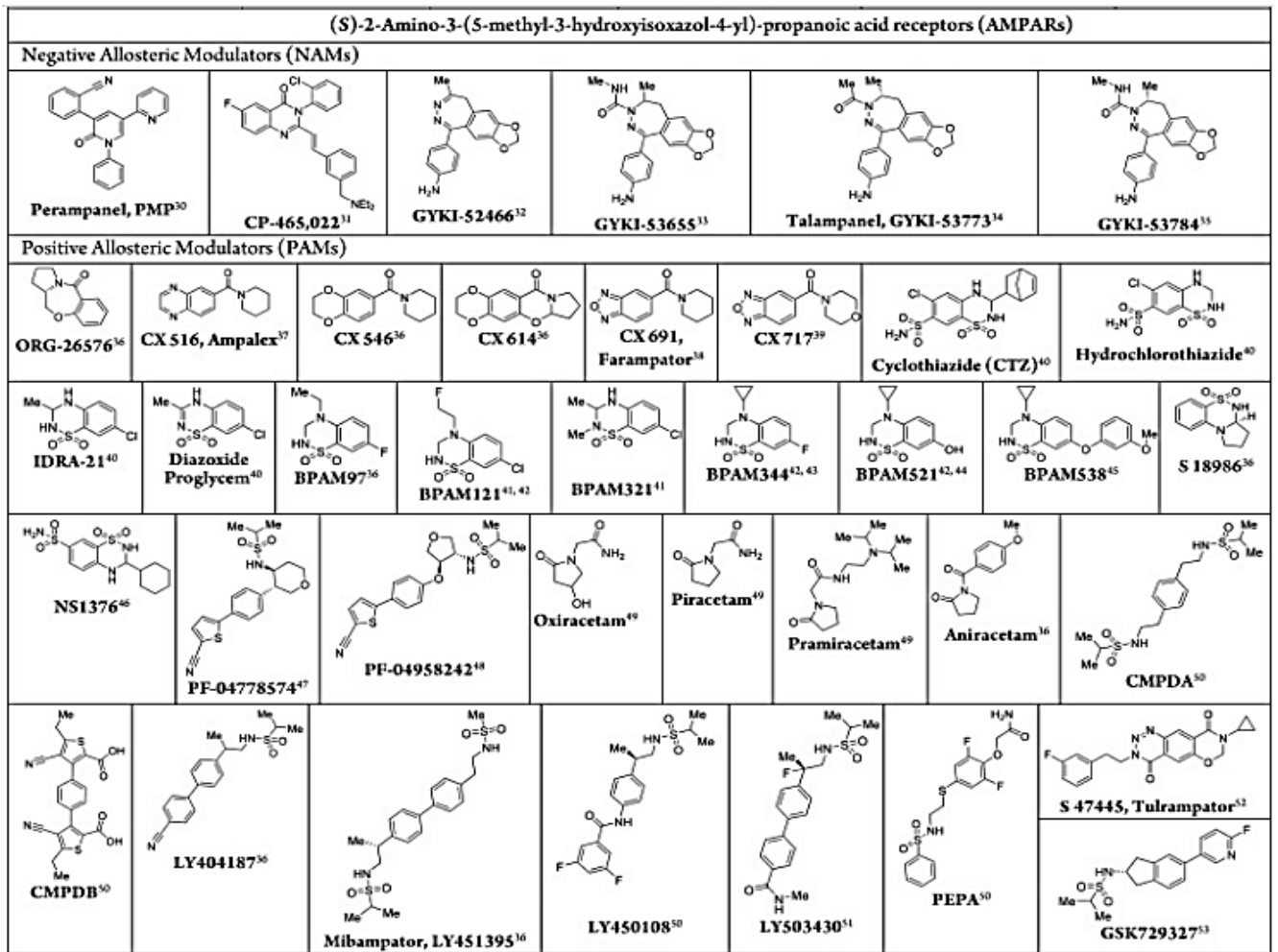


Рисунок 7 - Типичные аллостерические модуляторы iGluR.

Экзогенные положительные аллостерические модуляторы (ПАМ) усиливают функцию рецептора AMPA, связываясь с участками, отличными от глутаматного, тем самым усиливая реакцию рецептора на глутамат, в то время как экзогенные отрицательные аллостерические модуляторы (НАМ) снижают активность рецептора AMPA, связываясь с другим аллостерическим участком, что снижает реакцию рецептора на глутамат. Примерами ПАМ AMPA являются анирацетам и циклотиазид (СТЗ), которые стабилизируют открытое состояние рецептора или предотвращают десенситилизацию, в то время как НАМ, такие как перампанел и ГYKI-52466, воздействуют на линкерную область между лиганд-связывающим и трансмембранным доменами, ингибируя функцию рецептора (в соответствии с Рисунок 7) [225].

Модуляция рецепторов AMPA может быть терапевтическим средством улучшения памяти при лечении неврологических заболеваний [295,299]. За последние 20 лет было описано несколько положительных модуляторов рецепторов AMPA [226,263]. Эти агенты связываются с аллостерическими участками на рецепторах AMPA и усиливают сигнализацию посредством медленной десенситилизации и/или дезактивации рецептора [114,299]. Согласно исследованиям,

опубликованным в [126,130], усиление притока кальция (Ca^{2+}) в нейрон увеличивает амплитуду и/или продолжительность возбуждающих постсинаптических потенциалов (ВПСП). Это связано с тем, что более высокая концентрация кальция может усиливать эффекты рецепторов глутамата, что приводит к более крупным и продолжительным ВПСП и, таким образом, усиливают синаптические реакции. Было показано, что некоторые потенциаторы рецепторов AMPA облегчают память в ряде поведенческих исследований и обращают вспять возрастное ухудшение памяти у животных. Однако, при чрезмерной активации, вызванной, например, избыточным высвобождением глутамата, AMPA-рецепторы могут способствовать кальциевому перегрузу клетки, что ведет к нейрональной гибели [83,129,242,288]. В контексте терапевтических стратегий, это означает, что необходимо разрабатывать препараты, которые могут модулировать (например, блокировать или снижать чувствительность) AMPA-рецепторы, чтобы предотвратить или уменьшить их чрезмерную активацию, и тем самым защитить нейроны от гибели. При этом важно учитывать, что AMPA-рецепторы являются важными для нормальной синаптической передачи, поэтому модуляция должна быть тонко настроена. Например, NMDA-рецепторы также участвуют в синаптической передаче, но они активируются при более высоких значениях мембранного потенциала, чем AMPA-рецепторы. Поэтому, воздействуя на AMPA-рецепторы, можно избирательно модулировать функцию синапса, не затрагивая NMDA-рецепторы [83].

В настоящее время синтезировано достаточно много положительных модуляторов AMPA-рецепторов. Такие соединения, как Ампакин CX516, продемонстрировали когнитивно-усиливающую активность в отсроченной задаче несоответствия образцу, модели кратковременной памяти, улучшении обонятельного обучения и обращении вспять возрастного дефицита памяти у крыс [126,130]. IDRA-21 продемонстрировал положительное влияние на способность к отсроченному сопоставлению у молодых и старых обезьян [72]. Однако, CX516 не продемонстрировал значимого эффекта при когнитивных нарушениях, шизофрении и болезни Альцгеймера. CX 717 продемонстрировал предварительную, незначительную эффективность у пациентов с СДВГ и у пациентов с угнетением дыхания. CX 691 (фармапатор) не показал значимой эффективности у пациентов с депрессией. По многим ампакинам, которые были выведены на клиническую стадию исследований, в настоящее время, получены только отрицательные результаты [242].

Потенциаторы AMPA также проявляют нейротрофические и нейропротекторные свойства. Такие молекулы, как CX-546, LY392098 и LY404187, повышали уровни нейротрофического фактора мозга (BDNF) *in vitro* и *in vivo* [180,184,194], а соединение LY503430 оказывало нейропротекторное действие в трех моделях болезни Паркинсона на грызунах [214].

Большинство AMPAR-положительных аллостерических модуляторов можно разделить на четыре основные группы: бензамиды (включая анирацетам [149] и его производные, CX-

ампакины, такие как CX516 [175], CX614 [156], CX717 [234], CX929 [253] и Org 26576 [159]); бензотиадиазины (включая циклотиазид [302], IDRA-21 [316], S 18986 [64] и ВРАМ-97 [44]); биарилпропилсульфонамиды (включая LY404187 [238], LY451395 [317], (R,R)-2a и -2b или PIMSD [162], PEPA [251], а также CMPDA и CMPDB [268]), которые дублируют композиционные особенности первых двух классов; и 3-трифторметилпиразолы разработанные Уордом и др. [289] и Джеймисоном и др. [151] (в соответствии с Рисунок 7). Несмотря на то, что считается Ампакины самые сильные из аллостерических модуляторов АМРА, тем не менее показано, что биарилпропилсульфонамиды, типичными представителями которых являются LY392098 и LY404187, являются высокоселективными и очень мощными потенциаторами реакций, опосредованных АМРА-рецепторами (в соответствии с Рисунок 7). Оба соединения не проявляют селективности к каинатным, NMDA- и потенциалзависимым ионным каналам. Они хорошо проникают через гематоэнцефалический барьер, имеют внеклеточную область действия и увеличивают активность агониста рецептора примерно в 7 раз. Пороговые концентрации для наблюдаемых эффектов находятся в диапазоне 10–30 нМ, что делает эти соединения примерно в 1000 раз более эффективными, чем циклотиазид и соединения группы ампакинов, и поэтому в фармацевтической промышленности называются соединениями «высокого воздействия» [158]. Было показано, что функционально биарилпропилсульфонамиды потенцируют реакции в нейронах префронтальной коры как *in vitro*, так и *in vivo* [60], а также *in vivo* они увеличивают вероятность вызванного разряда потенциала действия в гиппокампе в ответ на стимуляцию глутаматных афферентов из вентрального субикулюма [158,168].

Основная роль рецепторов АМРА в синаптической пластичности и процессах памяти глубоко исследуется из-за быстрой кинетики и перемещения в синапсы [141]. Связывающие лиганды ядер рецепторов АМРА образуют димерные единицы в тетрамерной сборке [142], состоящей из гетеромерных или гомомерных комбинаций четырех различных субъединичных белков (GluA1-4) [172]. Присутствие субъединицы GluA2 приводит к снижению проницаемости кальция. Кроме того, каждая субъединица подвергается альтернативному сплайсингу и может быть выражена как варианты флип- или флоп-сплайсинга [142] с различными фармакологическими свойствами. Более того, варианты флип-сплайсинга десенсибилизируются примерно в четыре раза медленнее, чем варианты флоп [172]. Рецепторы АМРА обладают модульной структурой, включающей четыре домена в каждой субъединице: крупный внеклеточный N-концевой домен (NTD), лиганд-связывающий домен (LBD), ионный канал и внутриклеточный C-концевой домен, отвечающий за синаптическое нацеливание. Существует множество доказательств, подтверждающих, что внеклеточный участок рецептора АМРА, состоящий из LBD и NTD, играет ключевую роль в регуляции механизмов пропускания рецепторов, а также в кинетике и эффективности глутаматергической синаптической передачи

[142]. Исследования структуры и функций выявили, что положительные аллостерические модуляторы рецепторов AMPA (AMPA-ПАМ), обнаруженные на данный момент, связываются с общим аллостерическим карманом димеров LBD на границе двух субъединиц [136]. Эти модуляторы усиливают ответ на агонист, не оказывая прямого агонистического действия. Они работают либо за счет уменьшения десенсibilизации, при которой ионный канал рецептора закрывается, несмотря на продолжающееся связывание глутамата, либо за счет замедления дезактивации рецепторов после удаления глутамата [277]. AMPA-ПАМ также проявляют высокую чувствительность к вариантам сплайсинга субъединичных белков рецепторов AMPA, известных как флип или флоп [201]. В результате они стабилизируют рецептор AMPA в активной конформации после связывания с глутаматом, усиливая синаптические токи и способствуя синаптической передаче и пластичности [200]. Это позволяет AMPA-ПАМ облегчать индукцию и поддержание долговременной потенциации, важного механизма формирования памяти [291,292]. В поведенческих исследованиях на грызунах, обезьянах и людях было показано, что AMPA-ПАМ улучшают эпизодическую и пространственную рабочую память [201,194,195,196]. Кроме того, некоторые AMPA-ПАМ продемонстрировали нейропротекторные эффекты, связанные с высвобождением нейротрофического фактора мозга (BDNF), частично участвующего в синаптической пластичности [232]. Таким образом, среди нескольких описанных классов AMPA-ПАМ [309,310] были разработаны некоторые молекулы для лечения шизофрении, депрессии или когнитивных расстройств, связанных с болезнью Альцгеймера.

Новый положительный аллостерический модулятор S 47445 представляет собой впечатляющий модулятор рецепторов AMPA, который уже привлёк внимание исследователей и специалистов в области нейробиологии благодаря своим уникальным свойствам. S 47445 способен усиливать действие глутамата на рецепторы AMPA, что подтверждает его селективность. В отличие от других модуляторов, этот продукт не взаимодействует с NMDA и каинатными рецепторами, что делает перспективным его дальнейшие исследования.

Результаты доклинических экспериментов с использованием S 47445 подтверждают его нейропротекторные свойства и антиамнестические эффекты. При введении препарата взрослым грызунам наблюдалось заметное улучшение кратковременной и пространственной памяти. Эксперимент проводился в условиях естественного забывания и в модели Т-лабиринта. Использование S 47445 в качестве препарата, направленного на улучшение памяти и обучения у человека актуально из-за растущего числа возрастных заболеваний и когнитивных нарушений. Препарат повышает уровень нейротрофинов BDNF, NT-3 и NGF, которые важны для функционирования мозга.

Препарат S 47445 продемонстрировал достаточно высокую безопасность. Эксперименты не показали нейротоксичности при введении высоких доз. Препарат не вызвал негативных

побочных эффектов, таких как судороги или тремор. Этот факт подтверждает его потенциал для дальнейших клинических испытаний. Препарат S 47445 обладает разнообразными функциональными возможностями, что делает его ценным инструментом в области нейробиологии и психофармакологии. [136,172].

S 47445 не проявил нейропротекторного эффекта против глутамат-опосредованной эксайтотоксичности *in vitro*. Препарат S 47445 проходит вторую фазу клинических исследований в настоящее время при болезни Альцгеймера и большом депрессивном расстройстве.

Несмотря на положительные доклинические результаты, модулятор S 47445 AMPA-рецепторов как другие модуляторы столкнулись с трудностями в клинических испытаниях [227].

Недавно было показано, что возбуждающая синаптическая передача AMPAR модулируется вспомогательными субъединицами AMPAR, включая вспомогательные трансмембранные регуляторные белки AMPAR, также известные как TARP и корнишон-2/3 (CNIH-2/3), которые регулируют уровни белков AMPAR, фармакологию, транспорт и гейтирование. Они связываются с AMPA-рецепторами (AMPA), влияя на их транспорт и скорость деактивации рецепторов, то есть способствуют перемещению AMPAR в нужные участки клеточной мембраны. Они также замедляют деактивацию AMPAR в гетерологичных клетках (клетках, не являющихся нейронами). В нейронах они играют важную роль в синаптической передаче, избирательно воздействуя на AMPAR, содержащие GluA1. TARP можно разделить на типы I (γ -2, γ -3, γ -4 и γ -8) и II (γ -5 и γ -7) по гомологии последовательностей. В нейронах, особенно в гиппокампе, CNIH-2 и -3 играют ключевую роль в синаптической передаче. Показано, что они влияют на силу и скорость передачи, опосредованной AMPAR. CNIH-2 и -3 оказывают значительное влияние на GluA1-содержащие AMPAR. В частности, они воздействуют на гетеромеры GluA1A2 (тип AMPAR), но не на гетеромеры GluA2A3. Селективное действие CNIH-2/3 на GluA1 связано с их взаимодействием с другим белком, TARP γ -8, который, согласно исследованиям, предотвращает связывание CNIH с субъединицами, отличными от GluA1. У мышей, лишенных CNIH-2 и -3, наблюдается значительное снижение синаптической передачи в гиппокампе. Согласно научной литературе, это снижение обусловлено потерей поверхностных AMPAR, содержащих GluA1. Нейроны без CNIH-2/3 демонстрируют более быструю кинетику AMPAR, что означает более быструю деактивацию рецепторов. Это связано с более быстрой кинетикой оставшихся гетеромеров GluA2A3. Идентификация TARP и их различной региональной экспрессии в ЦНС дает возможность идентифицировать непрямые антагонисты AMPAR, избирательно воздействующие на определенные области мозга. Соответственно, TARP γ -2 высоко экспрессируется в мозжечке, который участвует в координации движений, в то время как TARP γ -8 высоко экспрессируется в гиппокампе, первичном локусе эпилептогенной активности. Особый интерес представляла очень низкая

экспрессия TARP γ -8 в мозжечке. Следовательно, выявление антагониста AMPAR, зависящего от TARP γ -8, может обеспечить противоэпилептический эффект без двигательных нарушений. Гардинье и соавторы [54] открыли соединение LY3130481/CERC-611, как мощный антагонист рекомбинантных AMPAR, содержащих γ -8, но не AMPAR, связанных с другими TARP/CNIH-2, или AMPAR без вспомогательных субъединиц. В соответствии с профилем экспрессии γ -8, селективный антагонист γ -8 (LY3130481/CERC-611) эффективно блокировал функции AMPAR в нейронах гиппокампа и коры, но не в нейронах Пуркинье мозжечка или красного ядра у грызунов [201]. В настоящее время изучение участков связывания TARP-зависимых аллостерических модуляторов остается серьезной проблемой. Сложности возникают из-за варибельности комплексов вспомогательных белков TARP с субъединицами AMPA-рецепторов. В некоторых случаях не до конца понятно, как эти вариации влияют на физиологию и какие физиологические эффекты они могут вызывать. Кроме того, взаимодействие субъединиц TARP с AMPA-рецепторами значительно влияет на проводимость ионного канала. Большинство известных в настоящее время лигандов представляют собой TARP γ -8-зависимые отрицательные аллостерические модуляторы AMPA-рецептора [200].

Исследования антагонистов AMPA-рецепторов в качестве нейропротекторов при инсульте, черепно-мозговой травме и нейродегенеративных заболеваниях были инициированы из-за гипотезы о нейротоксичности чрезмерной сигнализации глутамата. Опасения возникли на основе данных о том, что внутривенные инъекции циклотиазида приводили к летальным исходам или вызывали судороги, а внутримозговые инъекции провоцировали некротические поражения паренхимы. [200,291]. Эти попытки окончились неудачей так же как и при блокировании NMDA-рецепторов. Но, на основании этих попыток были получены интересные данные, которые позволяют продолжить изучение возможности ингибирования AMPA-рецепторов. [200,291]. Агонисты AMPA-рецепторов способны усиливать десенсibilизацию, но при этом они часто вызывают побочные эффекты, такие как судороги и нейротоксичность. В связи с этим более перспективной для клинического применения представляется разработка конкурентных антагонистов рецепторов.

ПАМ, мшенью которых являются AMPA рецепторы, находятся под пристальным вниманием вследствие их потенциала в качестве усилителей мнестических функций и являются важными молекулами для изучения мембранных изменений, которые лежат в основе дезактивации и десенсibilизации AMPA рецепторов. НАМ AMPA рецептора перампанел получил одобрение FDA в качестве дополнительной терапии при парциальных приступах и тонико-клонических приступах, резистентных к традиционной терапии. В настоящее время различают 3 класса антагонистов рецепторов AMPA. Данные о том, что рост количества рецепторов AMPA на дендритных шипиках вызывает синаптическую пластичность, которая

занимает важную роль в обучении и памяти, вызвали интерес к методам стимулирования активности этих рецепторов для улучшения памяти. [190,191]. Конкурентные *антагонисты 1 класса*, разработанные на основе хиноксалиндиона NBQX, блокировали как AMPA-, так и каинатные рецепторы. Исследования показали, что эти вещества обладают нейропротекторным эффектом в различных моделях острых черепно-мозговых травм у животных. [208]. Тем не менее, производные хиноксалиндиона сталкивались с серьезными фармацевтическими проблемами, что осложняло их клиническое применение. Среди этих проблем были низкая растворимость и склонность к образованию осадков в почках и других кислых средах организма. Неконкурентные *антагонисты 2 класса*, такие как GYKI-52466, обладают селективностью к рецепторам AMPA и демонстрируют улучшенные фармацевтические характеристики по сравнению с хиноксалиндионами. Однако их нейропротекторные свойства менее выражены. В ходе доклинических исследований антагонистов рецепторов AMPA были получены некоторые положительные клинические данные при мигрени и нейропатической боли, а также против симптомов бокового амиотрофического склероза [220,221]. К сожалению, ингибирование рецепторов AMPA также оказывало депрессивное действие на ЦНС в дозах терапевтического диапазона. Следующий тип AMPA-рецептора NAM был получен из хиназолинового противосудорожного средства, а синтетические усилия привели к получению CP-465,022. Это соединение ингибирует опосредованный AMPA-рецептором захват Ca^{2+} в нейронах с наномолярной эффективностью, проявляет эффективность в моделях судорог у животных [190-192]. Высокопроизводительный скрининг структурно новых NAM рецептора AMPA выявил новое соединение, примером которого является перампанел. Перампанел проявляет высокую эффективность в блокировании нейрональных AMPA-рецепторов на наномолярном уровне, при этом не оказывая заметного воздействия на NMDA- или каинатные рецепторы. Этот препарат взаимодействует с общим сайтом связывания на AMPA-рецепторах, аналогичным CP-465,022 и GYKI-53655, и ингибирует токи этих рецепторов примерно в 10 раз сильнее, чем GYKI-53655. [279]. Отрицательная аллостерическая модуляция работает за счет ограничения конформационных изменений, которые необходимы для открытия канала. Этот механизм стабилизирует закрытое состояние рецептора. [279]. *Третий класс* AMPA-рецепторов NAM был обнаружен путем выделения биоактивных компонентов кетогенной диеты, используемой для лечения резистентных к лекарственным препаратам эпилепсий. Формула кетогенной диеты на основе среднецепочечных триглицеридов содержит несколько жирных кислот, включая декановую кислоту, обладающую противосудорожной активностью [309]. Механизм противосудорожного действия декановой кислоты включает прямое ингибирование AMPA-рецепторов при относительно высоких миллимолярных концентрациях. Экспериментально был показан синергетический эффект перампанела и декановой кислоты в ходе ингибирования

рецептора AMPA при изучении судорог *in vitro* [54]. К сожалению, ингибирование рецепторов AMPA также оказывало депрессивное действие на ЦНС в дозах терапевтического диапазона [135]. Резюмируя все выше сказанное, можно заключить, что поскольку возбуждающая нейротрансмиссия играет ключевую роль в эпилептогенезе, ионотропные глутаматные рецепторы подтипа AMPA, которые опосредуют большую часть возбуждающей нейротрансмиссии и способствуют возникновению и распространению припадков, стали перспективными мишенями для терапии эпилепсии. Наиболее мощные и хорошо переносимые ингибиторы AMPA-рецепторов действуют по неконкурентному механизму, но многие из них вызывают неблагоприятные побочные эффекты.

Положительные аллостерические модуляторы ионотропных глутаматных рецепторов стали мишенью для лечения когнитивных нарушений и нарушений сна, а также психических заболеваний, таких как большое депрессивное расстройство. Растущие знания в области структурной и химической биологии, а также фармакологии, наряду с прогрессом в вычислительных методах и растущей доступностью ресурсов биоинформатики ускорят открытие новых аллостерических участков, поддающихся лекарственному воздействию, и разработку новых аллостерических модуляторов с более высокой эффективностью.

1.11.2 Возможные стратегии лечения для повышения нейропластичности

Реабилитация и восстановление нарушений памяти у людей с неврологическими заболеваниями, такими как инсульт, черепно-мозговая травма (ЧМТ) и ХНМК, зависят от нейропластичности и способности мозга к адаптации. Поиск в электронных базах данных выявил большое число исследований в которых изучаются несколько методов, нацеленных на нейропластичность. Основные это - когнитивная тренировка, часто в сочетании с неинвазивными методами стимуляции мозга, такими как транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) и транскраниальная стимуляция случайным шумом (TRNS), вмешательства на основе техники осознанности (Mindfulness), физическая активность и фармацевтические вмешательства. Результаты показывают, что эти методы лечения могут изменять нейропластичность и улучшать двигательные, умственные и сенсорные функции. Передовые подходы, такие как виртуальная реальность (VR) и интерфейсы мозг-компьютер (BCI), обещают повысить нейропластичность и способствовать реабилитации. Однако все еще необходимо решить множество проблем, включая потребность в индивидуализированном лечении и отсутствие определенных стандартов в данной области [176,262,305].

Фармацевтические вмешательства, в настоящее время играют решающую роль в нейропротекции, используя различные агенты для воздействия на конкретные механизмы нейронного повреждения. В данные агенты включают те, которые могут уменьшить вторичное

повреждение, гибель нейронов и размер поражения, в конечном итоге улучшая функциональные результаты. Эти соединения часто нацелены на метаболизм глюкозы и липидов, нейротрансмиттерные системы и нейровоспаление для улучшения когнитивных функций. Клинические испытания и исследования на животных продемонстрировали, что эти фармакологические подходы могут модулировать нейропластические механизмы.

1.11.3 Экзогенные факторы роста

Экзогенные факторы роста являются молекулами, которые могут быть введены в организм для стимуляции процессов, связанных с ростом, развитием и восстановлением нервной ткани. Они играют ключевую роль в нейропластичности, обеспечивая адаптацию и перестройку нейронных сетей в ответ на изменения в окружающей среде или после повреждений. Наиболее известные экзогенные факторы роста, которые изучают в контексте нейропластичности, включают нейротрофические факторы (НТФ), такие как нейротрофический фактор мозга (НТФБ; англ. BDNF), нейротрофический фактор, производимый глиальными клетками (ГФН) и другие. Эти факторы отвечают за поддержание выживаемости нейронов, их рост, дифференцировку и синаптическую пластичность.

Например, НТФБ, синтезируемый в мозге, способствует выживанию и росту нейронов в гиппокампе — области, играющей важную роль в памяти и обучении. Кроме того, он участвует в процессе синаптической пластичности, увеличивая количество синапсов и улучшая функциональную взаимосвязь между нейронами [185, 224].

Экзогенные факторы роста могут использоваться в реабилитационных протоколах для максимизации восстановления после травм или операций на головном мозге, а также для повышения эффективности других методов лечения, таких как терапия стволовыми клетками. [85,107,186,218]. Однако, отмечаются и неудачные попытки применения различных нейропротективных агентов, включая факторы роста, в клинических испытаниях для лечения ишемического инсульта, показано расхождение между положительными результатами в доклинических моделях и отрицательными данными клинических испытаний инсулиноподобного фактора роста (IGF), показано ограниченное проникновение через гематоэнцефалический барьер [118].

1.11.4 Моноклональные антитела

Получение моноклональных антител (mAbs) было впервые описано в 1975 году, когда Келер и Мильштейн разработали методы их выделения из гибридомных клеток [171]. Возможность генерировать mAbs произвела революцию в исследовании антител и дала возможность в проведении клинических исследований. Моноклональные антитела это

специфические белковые молекулы, которые связываются с определенными антигенами. В последние годы они становятся все более актуальными в нейробиологии благодаря их потенциалу в терапии нейродегенеративных заболеваний.

Результаты клинических исследований демонстрируют, что моноклональные антитела могут быть успешными в терапии таких заболеваний, как рассеянный склероз, болезнь Альцгеймера и инсульт. Антитела против фактора некроза опухоли (ФНО), помогают снизить уровень воспаления и улучшают нейропластичность, что способствует восстановлению когнитивных функций у пациентов с рассеянным склерозом [121,150,254].

Моноклональные антитела представляют собой многообещающую стратегию в контексте нейропластичности. Требуются дальнейшие исследования для полного понимания их механизмов действия и оптимизации применения в клинической практике. Существуют определенные трудности для доставки моноклональных антител через гематоэнцефалический барьер [278]. Существуют неудачные клинические испытания как, например, испытание ингибитора VАСЕ1, демонстрирующее сложности при иммунизации против Аβ42, которая показало снижение уровня амилоида, но не предотвратило прогрессирование нейродегенерации [104, 145].

1.11.5 Усиление дофаминергической нейротрансмиссии

Дофамин (ДА) является ключевым нейротрансмиттером, участвующим во многих физиологических функциях. Основные это - двигательный контроль, модуляция аффективных и эмоциональных состояний, механизмы вознаграждения, подкрепление поведения и некоторые высшие когнитивные функции. Дофаминергическая система играет важную роль в регуляции различных функций мозга, включая мотивацию, обучение и память. Дисфункция дофаминергической передачи является основным нарушением при нескольких неврологических расстройствах, включая болезнь Паркинсона (БП), шизофрению, биполярное расстройство, синдром дефицита внимания и гиперактивности (СДВГ) и зависимость. [257].

Увеличение уровня дофамина активирует специфические сигнальные пути, которые стимулируют выработку нейротрофического фактора мозга (BDNF). Этот фактор помогает выживанию нейронов и их росту, а также увеличивает количество и силу синаптических связей. Исследования демонстрируют, что усиливающие дофаминергическую нейротрансмиссию препараты могут использоваться в терапии различных неврологических расстройств [127,182]. Некоторые исследования демонстрируют, что дофаминергическая терапия может улучшать одни когнитивные функции, но ухудшать другие. Например у пациентов с болезнью Паркинсона, дофамин демонстрирует двойственную роль, с которой он может быть как нейропротективным, так и нейротоксичным в зависимости от условий. Показано, что высокие концентрации дофамина

могут быть нейротоксичными из-за образования активных форм кислорода. [92,139]. Исследования показывают, что агонисты дофаминовых рецепторов, могут обладать нейропротективными свойствами [139]. Исследование на приматах показало, что дофаминергическая терапия не предотвращает прогрессирование нейродегенерации при болезни Паркинсона и может ухудшить течение болезни [81,300]. Анализ клинических испытаний, показал, что постоянная дофаминергическая стимуляция не обеспечивает долгосрочной нейропротекции [223].

1.11.6 Электростимуляция мозга

Электростимуляция мозга становится все более актуальной терапевтической стратегией в неврологии и психиатрии, благодаря своей способности инициировать и улучшать нейропластические процессы в различных областях мозга. Электростимуляция мозга включает в себя использование электрических сигналов для модуляции активности нейронов. Существует несколько методов электростимуляции, среди которых наиболее известны транскраниальная магнитная стимуляция (ТМС, Transcranial electrical stimulation, tES) и глубокая стимуляция мозга (ГСМ). Эти методы могут способствовать изменению синаптической передачи и увеличению уровня нейротрофических факторов. Одна из конкретных модальностей tES, транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS), показала многообещающие клинические результаты в различных приложениях. Например, катодная tDCS продемонстрировала ингибирующие эффекты, полезные при таких состояниях, как эпилепсия, при этом исследования документировали снижение частоты приступов и эпилептиформной активности как в краткосрочной перспективе (от нескольких минут до нескольких часов после стимуляции), так и в долгосрочной перспективе (дней после стимуляции) [249].

Существуют данные о том, что электростимуляция может оказывать как положительное, так и отрицательное влияние на нейропластические процессы даже у пожилых людей, у которых нейропластичность может быть снижена из-за возраста или несостоятельности. Исследование, проведенное Smith et al. показало, что транскраниальная стимуляция постоянным током (tDCS) не обеспечила никаких значимых функциональных улучшений при хронической церебральной ишемии. Несмотря на предварительные обнадеживающие результаты на животных моделях, длительное применение tDCS не продемонстрировало нейропротективных эффектов и не улучшило неврологические исходы по сравнению с плацебо-группой. Рандомизированное контролируемое исследование повторяющейся транскраниальной магнитной стимуляции (rTMS) при постинсультной реабилитации не выявило значимых нейропротективных эффектов. Исследование Yamada et al. продемонстрировало, что электрическая стимуляция мозга не смогла обратить патологические изменения в моделях болезни Альцгеймера [80,228,256,294].

Дальнейшие исследования в области электростимуляции мозга необходимы для более глубокого понимания механизмов действия и оптимизации методов для повышения нейропластичности. Важно выявить, какие параметры электрической стимуляции (интенсивность, частота, продолжительность) наилучшим образом активируют нейропластичность в различных условиях.

1.11.7 Реорганизации мозга путем прорастания и перестройки нейронных клеток

Реорганизация мозга — это динамический процесс, в ходе которого происходит прорастание, перестройка и адаптация нейронных клеток в ответ на новые условия, травмы или изменения в окружающей среде. Данный процесс имеет важное значение для нейропластичности и является ключевым механическим компонентом, отвечающим за адаптацию и функциональное восстановление мозга. Прорастание нейронов — это процесс, при котором предшественники нейронов (нейробласты) размножаются и дифференцируются в зрелые нейронные клетки. Эти клетки затем мигрируют в зоны, требующие обновлений или замены, например, после повреждений или в ответ на определенные стимулы. Важную роль в этом процессе играют нейротрофические факторы, такие как нейротрофический фактор мозга (BDNF), сиртуины и молекулы клеточной адгезии. Они способствуют выживанию, росту и дифференцировке нейронов, обеспечивая подходящую среду для их прорастания и формирования новых синаптических связей [236].

Перестройка нейронных клеток подразумевает изменение существующих нейронных связей в ответ на изменения в окружающей среде. Это может происходить в результате образования новых синапсов или удаления неактивных, или ненужных синапсов. Этот процесс называется синаптической пластичностью и включает в себя долговременную потенциацию (LTP) и долговременную депрессию (LDP), которые отвечают за укрепление и ослабление синаптических связей [233].

Изучение механизмов реорганизации мозга способствует созданию новых препаратов для пациентов с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера и Паркинсона. Восстановление нейропластичности и нейрогенеза может замедлить прогрессирование этих болезней.

В настоящее время проведенные исследования, демонстрируют не только положительные, но и отрицательные результаты в области синаптогенеза и перестройки при нейропротекции. [75,188,189,210,244,283].

1.11.8 Эндогенный нейрогенез или трансплантированные нейральные стволовые клетки

Проблема нейрогенеза стала одной из ключевых тем в нейробиологии и неврологии. Существуют два основных подхода к улучшению нейрогенеза. Первый это эндогенный нейрогенез, где организм использует собственные ресурсы для создания новых нейронов. Второй это трансплантация нейральных стволовых клеток, где используются стволовые клетки, введенные извне. Эндогенный нейрогенез — это процесс, при котором новый нейрон формируется и развивается из предшественников нейронов. Этот процесс происходит в некоторых областях мозга, таких как гиппокамп, и зависит от генетических, эпигенетических и экологических аспектов. Стимуляторами эндогенного нейрогенеза являются - активность, когнитивные тренировки и здоровый образ жизни. Эти факторы активируют выработку нейротрофических факторов, например, нейротрофического фактора мозга (BDNF) [165,273]. Исследования показали, что после инсульта наблюдается усиление эндогенного нейрогенеза но более 80% новообразованных нейронов погибают в течение нескольких недель. Они не достигают функциональной интеграции, несмотря на нейропротективную терапию. Мета-анализ показал, что терапия нейральными стволовыми клетками при инсульте часто приводит к неожиданным негативным последствиям, включая образование опухолей, аберрантную нейронную активность и ухудшение функциональных исходов [53,165,187].

1.11.9 Ампакиновая терапия

Ампакины представляют собой новые препараты, нацеленные на улучшение когнитивных функций. Ампакины способны усиливать возбуждающие моносинаптические реакции в головном мозге, что приводит к значительному улучшению передачи сигналов. На основании данных свойств предполагается, что ампакины могут сыграть важную роль в терапии нервно-психических расстройств, таких как депрессия, шизофрения и биполярное расстройство. Исследования на животных показали многообещающие результаты, подтверждая потенциал этих препаратов в клинике [167].

Ампакины оказывают свое действие в разных аспектах. Они снижают порог индукции долговременной потенциации (LTP) и способствуют выработке BDNF, который важен для синаптической пластичности и обучения. Ампакины могут быть востребованы у пациентов с ухудшением памяти и обучения. На основании данных предыдущих клинических испытаний препаратов, направленных на глутаматергическую сеть, можно смело ожидать дальнейших успехов в разработке ампакинов [82].

Некоторые исследования вызывают вопросы о надежности и эффективности ампакинов. Не все клинические испытания дали четкие, однозначные результаты, особенно в отношении CX717 и Org 26576 (Cortex Pharmaceuticals Product Pipeline (<http://www.cortexpharm.com/product/index.html>)) [227].

Ампакин CX717 от Cortex Pharmaceuticals способен существенно улучшать когнитивные функции. Результаты клинических испытаний на обученных обезьянах показывают значительное увеличение эффективности выполнения задач, связанных с памятью. Препарат продемонстрировал дозозависимые улучшения в когнитивной деятельности, что делает его перспективным в области нейрофармакологии. CX717 способен компенсировать негативные последствия недостатка сна, что актуально для людей сталкивающихся с хроническими нарушениями сна [234].

Проведенная нейровизуализация подтвердила увеличение метаболической активности мозга в ключевых областях, таких как префронтальная кора и гиппокамп. CX717 не только улучшает поведенческие показатели, но и влияет на физиологические процессы, связанные с когнитивными функциями. После 30–36 часов лишения сна препарат способен восстанавливать работоспособность до нормальных уровней. Такие результаты открывают перспективы для применения CX717 у пациентов с когнитивными нарушениями, вызванными стрессом или нарушениями сна [234,312].

Ампакин CX1837 продемонстрировал потенциал в области повышения производительности памяти и внимания у животных. Этот результат позволяет продолжить исследования применения данного препарата для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями, такими как болезнь Альцгеймера. Учитывая высокий запас безопасности и оптимизированные дозы, CX1837 может стать хорошим препаратом в арсенале нейропсихологической терапии [239].

Ампакины CX546 и CX-614 представляет собой перспективные препараты, которые показывают многообещающие результаты. Основное их действие заключается в потенцировании активности рецептора AMPA, что важно для выхода из анестезии у мышей. Исследования показали, что CX546 и CX-614 способствуют усилению нейронной активности. Это помогает предотвращать долгосрочные дефициты двигательного обучения, которые могут возникнуть после повторной неонатальной анестезии. Это открытие имеет важное значение для разработки методов поддержки и восстановления после хирургических вмешательств у младенцев и малолетних животных.

CX546 демонстрирует способность улучшать синаптические функции, нарушенные анестезией. Он способствует восстановлению уровня экспрессии субъединиц рецепторов NMDA и AMPA, которые снижаются в результате анестезии. Препарат улучшает нейронную активность, обусловленную двигательной тренировкой, и стимулирует перестройку дендритных шипиков, что является важным для усвоения новых навыков. Эти данные подтверждают, что CX546 может эффективно улучшить синаптическую пластичность, что положительно сказывается на обучении и памяти. CX-614 активирует локальную трансляцию мРНК (синтез нового белка) в дендритах,

следствие повышения уровня BDNF. В дальнейшем это увеличивает трансляцию белков, важных для синаптической пластичности, таких как ARC/Arg3.1 и CaMKIIalpha [160]. CX-546 и CX-614 вызывают снижение регуляции рецепторов после хронического приема, что ограничивает возможность их длительного использования. Эти вещества обладают низкой биодоступностью и активны только в очень высоких дозах – 1000 мг и более [79,311].

Ампакин CX929 продемонстрировал результаты в коррекции нарушений, связанных с синдромом Ангельмана. Данное фармакологическое средство эффективно устраняет дефицит долговременной потенциации (LTP), что является важно для успешного обучения и памяти. Мышам AS, которым вводился этот препарат, удалось достичь уровней LTP, сопоставимых с контрольными животными. Ампакин способствовал нормализации полимеризации актина в дендритных шипиках, что является важным условием для стабилизации LTP. Это открытие позволяет прогнозировать возможность воздействия на молекулярные механизмы обучения и памяти.

Результаты оценки долговременной памяти подтверждают эффективность ампакинов. Мышиные модели (нокауты материнского гена Ube3a: «мышей AS»), получавшие CX929, показали значительное совершенствование в эксперименте условно-рефлекторного страха. Это подтверждает восстановление когнитивных функций. Данные свидетельствуют о том, что потенциальное лечение может улучшать синаптическую пластичность и когнитивное развитие у страдающих синдромом Ангельмана. Использование ампакина CX929 может стать важным шагом к созданию терапии для пациентов с данным заболеванием [59].

Многочисленные исследования проведены отечественными исследователями по созданию АМРА модуляторов. Проведенный на базе химического факультета МГУ им. Ломоносова М.В. Лавровым М.И. и соавторами анализ показал, что структура АМРА-рецептора содержит два эквивалентных участка связывания для малых молекул. Компьютерное моделирование позволило создать лиганды, связывающиеся с обоими участками, что повышало их активность. Оптимизация 260 структур на основе 3,7-диазабицикло [3.3.1] нонана и 4,4'-бифенила позволила выявить потенциальные положительные модуляторы. В ходе работы были синтезированы 27 перспективных бивалентных лигандов и 14 новых моновалентных. Исследования на клетках показали высокую активность производных 3,7-диазабицикло [3.3.1] нонана (в 4–5 раз выше аналогов). На животных (цыплята, мыши) соединения продемонстрировали нейропротекторные свойства, улучшение памяти и когнитивных функций. Однако, были проведены неполные доклинические исследования и полученные соединения не вышли на 1 фазу клинических испытаний [8,123,198]. Другими перспективными соединениями являются производные N-никотиноиламинокислоты, а именно одно- и двухвалентных солей N-

(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты, обладающие выраженной антиамнестической и противогипоксической активностью [5,15,25,39].

Все эти факторы выделяют ампакины, такие как CX717, CX1837, CX546 и CX929 и отечественные соединения на основе нового производного биспидина, а также производные N-никотиноиламинокислоты, а именно одно- и двухвалентных солей N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты на фоне других когнитивных модуляторов и делают их многообещающими кандидатами для дальнейших исследований и клинического применения. Несмотря на положительные результаты в некоторых задачах, связанных с вниманием и концентрацией, многообещающее будущее ампакинов требует дальнейшего изучения. Важно оценить их влияние на разные аспекты здоровья, чтобы обеспечить безопасность и эффективность в их применении в клинической практике.

В настоящее время исследуются лекарства для терапии когнитивных нарушений и нейродегенеративных заболеваний. Нейропротекция существует первичная и вторичная. Первичная направлена на подавление гибели нейронов через блокирование глутаматно-кальциевого каскада влиянием на рецепторы mGluR1, mGluR5, 5-HT1A, AT1, ноцицептина и AMPA/NMDA. Вторичная нейропротекция направлена на снижение воспаления, используя антагонисты цитокинов, молекул клеточной адгезии и активацию сигнальных путей PI3K-Akt, BDNF/CREB, Nrf2-Keap1, NIF. Комплексный подход к нейропротекции предоставляет больше возможностей в лечении нейродегенеративных заболеваний.

Заключение

Нарушения когнитивных функций всё чаще встречаются в современном обществе. Травмы мозга, инсульты и нейродегенеративные заболевания оказывают серьезное влияние на качество и продолжительность жизни пациентов. Наличие разнообразных когнитивных расстройств требует расширение арсенала средств, способствующих нормализации этих функций. Существующие ноотропные препараты, такие как пирацетам, не всегда показывают высокую эффективность, что подчеркивает необходимость поиска более действенных решений.

Нейропротективные вещества так же обладают и недостатками. Современные препараты не всегда оказывают заметное влияние на мнестические функции. Такие вещества, как антиоксиданты и ингибиторы воспалительных процессов полезны, но часто недостаточно эффективны для лечения когнитивных нарушений [243]. Церебральные вазодилататоры могут вызывать нежелательные побочные эффекты, что делает их применение рискованным [230]. Кроме того, осложняет ситуацию и высокий уровень депрессии и нарушений сна у пациентов с ХНМК. Ампакиновая терапия действительно представляет собой одно из наиболее перспективных направлений коррекции когнитивных нарушений по сравнению с другими

подходами, поскольку усиливают глутаматергическую передачу физиологическим образом, не вызывая эксайтотоксичности, характерной для прямых агонистов, способствуют экспрессии нейротрофических факторов, особенно BDNF (нейротрофический фактор мозга), что активирует процессы нейропластичности и репарации, влияют на несколько ключевых звеньев нейропротекции одновременно, тем самым улучшая энергетический метаболизм нейронов, модулируют воспалительные реакции и активируют антиоксидантную защиту. Для данной группы препаратов характерно меньшее количество побочных эффектов по сравнению с прямыми активаторами глутаматных рецепторов благодаря их модулирующему, а не активирующему действию. Отмечается тройной механизм действия ампакинов: улучшение синаптической передачи, стимуляция экспрессии нейротрофических факторов и активация сигнальных путей, необходимых для долговременной потенциации [190-191]. Многочисленные исследования на животных моделях амнезии, черепно-мозговой травмы и нейродегенеративных заболеваний продемонстрировали высокую эффективность ампакинов [1,6,43,50,72,88]. В этом контексте поиск новых нейропротекторов, способных защищать нейроны от глутаматной токсичности и других патогенетических факторов, является актуальной задачей современной медицины.

Гидроксинокотиноилглутамат кальция как модификатор активности AMPA-рецепторов привлекает внимание благодаря своим потенциальным свойствам, что обуславливает необходимость детального изучения его фармакологических эффектов. Экспериментальные исследования фармакологической специфической активности соединения гидроксинокотиноилглутамат кальция показали, что он обладает выраженным ноотропным, противоинсультным, противоишемическим, нейропротективным, противогипоксическим, анксиолитическим видами действия. Ноотропные эффекты Гидроксинокотиноилглутамат кальция могут быть опосредованы взаимодействием с различными типами глутаматных рецепторов, включая mGluR1 и mGluR5. Отмечено, что в широком диапазоне доз 5,10,20,50 мг/кг гидроксинокотиноилглутамат кальция в значительной степени предотвращает у инсультных животных гибель, неврологический дефицит, нарушения обучения и памяти, улучшаются мнестические процессы, координация движений, ориентировочно-исследовательское поведение, отсутствуют побочные эффекты седативного и миорелаксантного характера [14,17,36]. Таким образом, антиамнестические свойства гидроксинокотиноилглутамата кальция и его активное участие в модуляции функции AMPA-рецепторов указывают на него как нового перспективного модулятора для терапии когнитивных нарушений при целом ряде заболеваний. Разработка и дальнейшее исследование этого соединения могут стать решающим шагом в борьбе с когнитивными нарушениями, предоставляя новые стратегии для защиты нейронов и восстановления мозговых функций.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Программа исследований включала следующие этапы:

1. Изучение специфической фармакологической активности гидроксиникотиноилглутамат кальция на моделях условного рефлекса активного избегания, модели условного рефлекса в Т образном лабиринте и амнезии условного рефлекса пассивного избегания вызванного скополамином. Исследование проведено в ФНКЦ Физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина на 200 мышах.

2. Изучение токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция на моделях: острой токсичности, хронической токсичности, мутагенности, эмбриотоксичности и тератогенности, иммунотоксичности, аллергизирующих свойств, влияния на репродуктивную функцию. Исследование проведено в НИИ экспериментальной кардиологии на 242 мышах линии BALB/c, 190 мышы-гибриды F₁ (СВАхС₅₇В1₆), 335 крысах Wistar, 30 пестрых морских свинках и 32 кроликах Шиншилла.

3. Изучение фармакокинетики на доклинических моделях. Исследование проведено в НИИНА им. Г.Ф. Гаузе РАМН на 40 крысах линии Вистар и 10 кроликах Шиншилла.

4. Изучение фармакодинамики гидроксиникотиноилглутамат кальция на модели связывания лигандов с активными центрами нейрорецепторов, модели геморрагического инсульта, модели нейронной активности в срезах гиппокампа, модели амнезии условного рефлекса пассивного избегания, вызванного максимальным электрошоком. Исследование проведено в ФНКЦ Физико-химической медицины им. Ю.М. Лопухина на 70 крысах и 110 мышах.

5. Изучение фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамата кальция на здоровых добровольцах. Исследование проведено в ФГБОУ ВО Ярославский государственный медицинский университет МЗ РФ на 20 добровольцах.

6. Изучение безопасности и переносимости гидроксиникотиноилглутамата кальция у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения. Исследование проведено в ФГБОУ ВПО «Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова», ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова МЗ РФ, МБУЗ ГКБ №34, ФКУЗ «Главный клинический госпиталь МВД России», НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД» на 124 пациентах.

7. Изучение эффективности в терапии когнитивных нарушений, снижение проявлений депрессии и влияние на коррекцию нарушений сна гидроксиникотиноилглутаматом кальция у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения. Исследование проведено в ГБОУ ВПО ПСПбГМУ им. И.П. Павлова МЗ РФ, МБУЗ ГКБ №34, ФКУЗ «Главный клинический госпиталь МВД России», НУЗ «НКЦ ОАО «РЖД», Многопрофильный

медицинский центр «ООО ОрКли», ФГБОУВО Новосибирский Государственный медицинский университет Минздрава России на 124 пациентах.

2.1 Доклинические исследования на лабораторных животных

2.1.1 Реагенты и животные

В ходе исследований вводили соль N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты парентерально двумя способами в воде для инъекций либо в 0,9% NaCl растворе. В качестве препарата сравнения применяли пирацетам. Все препараты вводили аналогично исследуемому веществу.

В исследовании применялись самцы белых беспородных крыс с массой тела от 180 до 220 граммов и мышей с массой от 18 до 22 граммов. Также использовались крысы инбредной линии Wistar (масса 200–230 граммов) белые мыши (18–22 г) и мыши линии C57Bl/6. Все экспериментальные животные содержались в условиях свободного доступа к полноценному рациону, состоящему из экструдированного брикетированного корма, соответствующего ГОСТ Р 50258-92, и питьевой воде. Условия содержания животных в виварии соответствовали правилам лабораторной практики (GLP) и требованиям Приказа МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

2.1.2 Изучение специфической фармакологической активности

Ноотропная активность

В исследовании были использованы крысы самцы линии Вистар весом 80-220 г. У животных вырабатывали навык двустороннего избегания в челночной камере в установке «Ugo Basile» (Италия). С целью выработки у животных условного рефлекса активного избегания (УРАИ) использовали методику «Shuttle-box» (или челночную камеру, оборудование фирмы Ugo Basil, Италия). Конструктивно установка состояла из прямоугольной камеры размером 20x40x16 см, разделенной пополам перегородкой с квадратным отверстием 7x7 см, через которое животное могло перемещаться из одной части в другую. В течение сеанса обучения крысе предъявляли по 20 сочетаний условного стимула с безусловным. Условным сигналом служил звук, после 10 с действия которого, через пол, предъявляли электроболовое раздражение, сила которого подбиралась индивидуально для каждого животного: при достаточной силе тока у крыс наблюдалась моторная активация. Переход животного в соседнее отделение приводил к выключению звука или комбинации звука и тока. Если в течение 10-ти сного болевого раздражения крыса не перебежала в соседнее отделение, звук и ток выключались автоматически. Минимальный интервал между сочетаниями составлял 40 с, максимальный - 60 с. Таким образом, изолированно звуковой сигнал действовал до 10 с, совместно условный и болевой раздражители

- действовали, также 10 с. Обучение осуществляли в двух вариантах: в течение одного сеанса обучения и 5 дней. В случае однократного обучения за один сеанс предъявляли 60 сочетаний звука и тока. Животное считалось обученным, если в течение 10 последовательных сочетаний перебежало в соседнее отделение до подачи тока. При обучении 5 дней в опытном сеансе давали 20 сочетаний. Избеганием считалось перебежка животного в соседний отдел после включения условного сигнала до подачи электроболевого раздражения. Критерием обученности животных условному рефлексу активного избегания считалось выполнение животным этого рефлекса 18 из 20 сочетаний. Ампассе (10/20/30 мг/кг, в/б) вводили ежедневно за 30 минут до обучения УРАИ в течение 6 последовательных дней.

Антиамнестическая активность

Для оценки использован тест «условная реакция пассивного избегания» (УРПИ), вырабатываемого в условиях стандартной автоматизированной установки (Passive Avoidance) фирмы Lafayette Instrument Co (США) в соответствии со стандартным протоколом. Конструктивно установка состоит из маленькой платформы, расположенной на расстоянии 1 м от пола, освещенной специальной лампой и соединенной с ней темной камеры с электродным полом. Крысу помещали на освещенную платформу перед входом в темную камеру установки хвостом к входному отверстию и животное, предпочитая темную камеру, быстро переходит в нее. С целью обучения крыса в темной камере получала однократное болевое раздражение электротоком (0,45 мА) через электродный пол и животное запоминало, что в темную камеру заходить опасно. Продолжительность раздражения определялась выбеганием животного из темной части установки в отсек, состоящий из ярко освещенной висячей платформы, присоединенной к темной камере с электрифицированным полом. В силу врожденного норкового рефлекса крыса при обучении заходила в темную камеру, где получала электроболевое раздражение. Оценку памяти проводили через 24 часа после обучения, регистрируя число животных, не зашедших в темную камеру в течение 180 с, а для зашедших - латентное время захода. Как показано ранее в многочисленных контрольных экспериментах на интактных крысах они обычно не заходят в опасную камеру или заходят в самом конце тестирования (средний латентный период составляет $145,0 \pm 10,1$ с). Тест на воспроизведение УРПИ осуществляли через 24 часа после обучения и проводили при повторном помещении животных в установку с регистрацией в течение 3 минут латентного периода первого захода крысы в темную экспериментальную камеру и количества животных, не зашедших в нее.

Для получения экспериментальной амнезии крысам за 15 минут до обучения УРПИ вводили в/б блокатор М-холинергических рецепторов - скополамин в дозе 2 мг/кг в/б, затем проводили процедуру обучения УРПИ и через 24 часа воспроизводили рефлекс.

2.1.3 Исследование токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция

Программа токсикологического исследования препарата «Гидроксиникотиноилглутамат кальция» включала оценку острой токсичности и переносимости при однократном введении, а также изучение субхронической и хронической токсичности субстанции и готовой лекарственной формы на крысах и кроликах. Кроме того, исследовались мутагенные, эмбриотоксические, тератогенные, аллержизирующие и иммунотоксические свойства препарата, а также его влияние на репродуктивную функцию. В ходе экспериментов были установлены показатели среднесмертельных доз (ЛД₅₀) при однократном внутривнутреннем, внутримышечном и внутривнутреннем введении мышам линии BALB/c и крысам Wistar. Для токсикологического исследования была подготовлена субстанция (белый, умеренно растворимый в воде порошок) и готовая лекарственная форма (стерильный раствор в ампулах 5 мг/мл, 5 мл). Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Изучение мутагенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция на микроорганизмах в тесте Эймса. В данном исследовании использовался тест Эймса, который представляет собой биологический анализ, использующий специфические штаммы бактерий *Salmonella typhimurium* для определения мутагенности гидроксиникотиноилглутамат кальция. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Исследования влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на доминантные летальные мутации в половых клетках мышей на способность вызывать генетические повреждения, приводящие к ранней эмбриональной гибели. Ключевыми показателями мутагенности препарата являются повышенная смертность плода и изменения в развитии половых клеток. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Исследование цитогенетической активности гидроксиникотиноилглутамат кальция методом регистрации хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей включало введение исследуемого препарата мышам с последующим исследованием клеток их костного мозга под микроскопом для выявления и количественной оценки любых индуцированных структурных хромосомных aberrаций, таких как разрывы или обмены, для определения мутагенного потенциала вещества. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Исследование эмбриотоксических и тератогенных свойств гидроксиникотиноилглутамата кальция было проведено в соответствии с рекомендациями Фармакологического Государственного Комитета Росздрава, изложенными в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005). Данные по данному разделу представлены в приложении А.

На 90 крысах линии Wistar изучено влияние препарата на репродуктивную функцию. Препарат вводили внутримышечно в дозе 6,7 мг/кг (10-кратная терапевтическая доза): самкам —

в течение 2 недель, самцам — 10 недель. После формирования пар в различных комбинациях (опыт/контроль) проводили оценку по двум направлениям: вскрытие части самок на 20-й день беременности для расчета индексов плодовитости, беременности, эмбриональной гибели и выявления патологий плода; и наблюдение за остальными самками до родов с последующей оценкой физического развития и выживаемости потомства до 21-го дня жизни. Дозировка: 6,7 мг/кг (в/м), 10-кратная терапевтическая доза. Схема введения: самкам — 2 недели (3–4 цикла), самцам — 10 недель (сперматогенез). Группы скрещивания: 1) Контроль♂ × Контроль♀; 2) Контроль♂ × Опыт♀; 3) Опыт♂ × Контроль♀.

Этапы и критерии оценки:

1. Антенатальный (вскрытие на 20-й день):

Подсчет желтых тел, мест имплантации, живых плодов и резорбций.

Расчет индексов плодовитости и беременности.

Расчет пред- и постимплантационной гибели.

Осмотр плодов на наличие аномалий.

2. Постнатальный (естественные роды):

Динамика веса беременных самок.

Характеристика родов и помета (количество, масса крысят).

Выживаемость и развитие потомства до 21-го дня. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Исследование алергизирующих свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция проведено в соответствии с рекомендациями ВОЗ [235] и “Методическими указаниями по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ” [271].

Исследование анафилактической активности гидроксиникотиноилглутамат кальция выполнено на 15 самцах морских свинок (масса тела 270–320 г), разделенных на 3 равные группы (n=5). Первая группа служила контролем (физиологический раствор), животным второй и третьей групп вводили препарат в дозах 3,35 мг/кг и 6,7 мг/кг соответственно. Указанные дозировки превышали высшую терапевтическую дозу (ВТД) для человека (0,67 мг/кг) в 5 и 10 раз. Сенсibilизацию проводили путем 5-кратного внутрибрюшинного введения препарата или растворителя (в контроле) через день. Введение разрешающей дозы осуществляли внутрибрюшинно на 14-е и 21-е сутки после окончания сенсibilизации. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Исследование реакции гиперчувствительности III типа выполнено на 15 самцах морских свинок с преобладанием белого окраса шерсти (масса тела 260–310 г). Животные были рандомизированы на 3 группы (n=5):

1. Контрольная группа (физиологический раствор);
2. Опытная группа 1 — препарат 3,35 мг/кг (5-кратная терапевтическая доза);
3. Опытная группа 2 — препарат 6,7 мг/кг (10-кратная терапевтическая доза).

Сенсибилизацию проводили путем 5-кратного внутримышечного введения препарата (или эквивалентного объема физраствора для контроля) с интервалом в 5 суток. На 10-й день после завершения сенсибилизации проводили провокационную пробу. На депилированном участке кожи спины (3×3 см) внутрикожно вводили 0,05 мл исследуемого препарата и, на расстоянии, 0,05 мл физиологического раствора (контроль). Оценка кожной реакции проводили визуально по шкале С.В. Суворова через 1, 4 и 24 часа после введения разрешающей дозы. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Для оценки аллергизирующих свойств гидроксиникотиноилглутамата кальция был использован тест измерения количества подколенного лимфоузла у мышей в ответ на антигенный раздражитель, известный как "popliteal lymph node assay" (PLNA) [97]. Этот метод часто используется в тестировании потенциального наличия аллергизирующих свойств лекарственных препаратов.

Оценка применения метода PLNA с в качестве теста для оценки аллергизирующего потенциала показало его высокую достоверность и валидность, так же можно отметить чрезвычайно низкую частоту ложноотрицательных результатов [231]. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Оценка потенциальных иммунотоксических эффектов гидроксиникотиноилглутамата кальция была проведена в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) [235] и [271].

Исследование влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на гуморальный иммунный ответ изучали с помощью метода определения числа антителообразующих клеток в селезенке по Ерне.

Воздействие гидроксиникотиноилглутамата кальция на клеточный иммунитет исследовали через реакцию гиперчувствительности замедленного типа. Кроме того, в соответствии с рекомендациями Рабочего совещания в Арлингтоне, изучали влияние препарата на клеточность селезенки в ответ на антигенный стимул [218]. Исследование влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на число антителообразующих клеток в селезенке использовали прямой метод локального гемолиза, который позволяет определить клетки, образующие иммуноглобулин М – антитела с высокой гемолитической активностью. Данные по данному разделу представлены в приложении А. Оценка влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на количество ядросодержащих клеток в селезенке мышей использовали 35 самцов мышей линии F1 (CBA × C57Bl/6), масса 18–20 г. Исследуемая модель: иммунизация

эритроцитами барана (ЭБ) внутривенно (5×10^8) клеток). Дизайн эксперимента: 7 групп по 5 животных. Препарат вводили внутрибрюшинно в дозах 6,7 мг/кг (10 ТД) и 13,4 мг/кг (20 ТД). Схема введения:

Группы 1 и 2: Введение за 24 ч до иммунизации (день «-1»).

Группы 3 и 4: Введение через 1 ч после иммунизации (день «0»).

Группы 5 и 6: Введение через 24 ч после иммунизации (день «+1»).

Группа 7 (Контроль): Физиологический раствор (день «+1»).

Оцениваемые показатели: На 4-е сутки после иммунизации животных забивали (цервикальная дислокация), извлекали селезенку и определяли клеточность (число ядродержащих клеток). Данные по данному разделу представлены в приложении А. Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) выполнено на 35 самцах мышей-гибридов F1 (СВА × С57В1/6) массой 18–20 г. Животные были рандомизированы на 7 групп (n=5). Иммунизацию (сенсibilизацию) проводили подкожным введением эритроцитов барана (ЭБ) в межлопаточную область в дозе 2×10^8 клеток/мышь.

Схема введения: препарат вводили внутрибрюшинно.

Группы 1, 2: Дозы 13,4 и 6,7 мг/кг за 24 ч до иммунизации (день «-1»).

Группы 3, 4: Дозы 13,4 и 6,7 мг/кг в день иммунизации (день «0»).

Группы 5, 6: Дозы 13,4 и 6,7 мг/кг через 24 ч после иммунизации (день «+1»).

Группа 7 (Контроль): Физраствор (день «+1»).

Методика воспроизведения ГЗТ:

1. Сенсibilизация (День 0): Подкожно в межлопаточную область, 2×10^8 ЭБ.

2. Разрешающая инъекция (День 5): Субплантарно.

Левая лапа (опыт): 50 мкл взвеси ЭБ (1×10^8 клеток).

Правая лапа (контроль): 50 мкл физраствора.

3. Оценка (День 6): Через 24 часа после разрешающей инъекции лапы ампутировали и взвешивали.

Расчет результатов: величину отека (индекс реакции) рассчитывали по формуле:

$$\text{ИР (\%)} = (\text{Масса опытной} - \text{Масса контрольной}) / \text{Масса контрольной} \times 100.$$

Данные по данному разделу представлены в приложении А.

2.1.4 Фармакокинетические исследования

Фармакокинетические исследования проходят через четыре стадии: введение, распределение, метаболизм и выведение исследуемого препарата. Исследуется взаимодействие организма с гидроксиникотиноилглутамат кальция в течение всего периода. Исследования на

животных включают исследования с участием позвоночных: крысы, кролики. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

Разделение компонентов плазмы крови животных проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) согласно методике, описанной в [42]. Данные по данному разделу представлены в приложении А.

2.1.5 Изучение фармакодинамики гидроксиникотиноилглутамат кальция

Изучение связывания субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция с рецепторами *in vitro*. Цель этого исследования состояла в изучении способности препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция вытеснять высокоаффинные лиганды нейрорецепторов или ферментов из мест связывания в соответствии с протоколами фирмы Eurofins (www.eurofins.com). Субстанция гидроксиникотиноилглутамат кальция была протестирована в нескольких концентрациях для определения концентрации полумаксимального ингибирования (IC50) или полумаксимальной эффективной концентрации (EC50). Связывание соединения рассчитывали, как % ингибирования связывания, радиоактивно меченного лиганда, специфичного для каждой мишени. Эффект ингибирования сложного фермента рассчитывали, как % ингибирования активности контрольного фермента. Эффект клеточного агониста рассчитывали, как % от контрольного ответа на известный эталонный агонист для каждой мишени и эффект клеточного антагониста рассчитывали, как % ингибирования ответа контрольного эталонного агониста для каждой мишени. Принято считать, что результаты, показывающие ингибирование (или стимуляцию для анализов, проводимых в базальных условиях) выше 50%, представляют достоверные эффекты тестируемых соединений. Результаты, показывающие ингибирование (или стимуляцию) между 25% и 50%, свидетельствуют о слабых и умеренных.

Результаты, показывающие ингибирование (или стимуляцию) ниже 25%, не считаются значимыми и в основном связаны с изменчивостью сигнала вокруг контрольного уровня. От низкого до умеренного отрицательные значения не имеют реального значения и связаны с изменчивостью сигнала вокруг контрольного уровня. Высоко отрицательные значения ($\geq 50\%$), которые иногда получают при высоких концентрациях тестируемых соединений, обычно относятся к неспецифическим эффектам тестируемых соединений в анализах. В редких случаях они могут указывать на аллостерический эффект испытуемого соединения.

Действие гидроксиникотиноилглутамат кальция на нейрональную активность в CA1 области гиппокампа крыс на срезах гиппокампа. Исследования проводились на срезах гиппокампа двадцати двух крыс-самцов линии Вистар, вес которых составлял от 150 до 200 граммов. Срезы толщиной 350 мкм готовили и инкубировали. Перфузионная среда (ACSF) имела

следующий состав в миллимолях: хлорид натрия — 126, хлорид калия — 3, сульфат магния — 1,2, дигидрофосфат натрия — 1,25, хлорид кальция — 2, гидрокарбонат натрия — 26, глюкоза — 10. Раствор насыщали газовой смесью, состоящей из 95% кислорода и 5% углекислого газа, и поддерживали рН на уровне 7,4 при температуре $34 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Скорость протока составляла 2 миллилитра в минуту. В течение одного часа срезы адаптировались к солевой среде, после чего начиналась регистрация исходных показателей. Суммарную электрическую активность регистрировали в поле CA1 с помощью одноканальных стеклянных микроэлектродов, заполненных раствором хлорида натрия с концентрацией 0,15 М. Электроды помещали в слой пирамидных клеток (*stratum pyramidale*) поля CA1 для записи популяционного спайка. Ортодромную электрическую стимуляцию проводили с помощью платиновых биполярных электродов, генерирующих прямоугольные импульсы длительностью 0,1 миллисекунды и амплитудой от 3 до 8 вольт. Электроды размещали в области коллатералей Шафера (*stratum radiatum*). Усиленные сигналы с частотой до 30 кГц поступали на аналого-цифровой преобразователь, а затем передавались на компьютер. Для оценки эпилептизации, вызванной аппликацией гидросиникотиноилглутамата кальция, осуществляли стимуляцию коллатералей Шафера с частотой 1 герц в течение 30 секунд (30 импульсов). Регистрировали первый и тридцатый популяционные спайки (ПС). Степень эпилептизации определяли по появлению дополнительных ПС и измеряли их амплитуду от пика до пика, аналогично контрольным ПС.

Изучение участия AMPA подтипа глутаматных рецепторов в механизме антиамнестического действия проводилось на модели амнезии УРПИ, вызванной максимальным электрошоком (МЭШ). Установлено, что DNQX (селективный блокатор AMPA-рецепторов) в дозе 10 мг/кг не оказывал влияние на обучение и воспроизведение УРПИ и не изменял амнезирующее действия МЭШ на рефлекс. Гидросиникотиноилглутамата кальция вводился одновременно с DNQX.

Изучение участия NMDA подтипа глутаматных рецепторов в механизме антиамнестического действия проводилось на модели амнезии УРПИ. Установлено, что введение МК-801 в дозе 0,1 мг/мг до обучения УРПИ вызывает у животных амнезию навыка. Это характеризуется значительным уменьшением латентного времени рефлекса при его воспроизведении, через 24 часа после обучения. При изучении влияния гидросиникотиноилглутамата кальция на амнезию УРПИ, вызванную МК-801 в дозе 0,1 препарат вводился через 30 минут после.

Статистические исследования. Статистическую обработку результатов проводили с использованием анализа ANOVA для определения достоверности значений при $p < 0,05$. Кроме того, в работе были использованы: метод U-test (Вилкоксона-Манна-Уитни), t-критерий Стьюдента (для выборок, соответствующих нормальному распределению), точный критерий

Фишера или критерий χ^2 (для выборочных долей вариант) при использовании компьютерной программы "Biostat".

2.2 Клинические исследования на здоровых добровольцах и пациентах

2.2.1 Изучение фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция на здоровых добровольцах

Этические и административные аспекты исследования. Перед началом исследования в Исследовательском центре от Независимого Этического Комитета (НЭК) было получено письменное одобрение Протокола, Информационного листа добровольца с Формой информированного согласия, Брошюры исследователя и Индивидуальной регистрационной карты. В ходе исследования документы не изменялись, поправки не вносились и не возникло необходимости повторного рассмотрения этих документов НЭК. В соответствии с Федеральным законом РФ № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и ГОСТ Р52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» при первом посещении клиники врачом-исследователем добровольцу предоставлялась информация об исследовании («Информационный листок добровольца» на русском языке). Исследование началось только после подписания добровольцами письменного согласия на участие в исследовании.

Дизайн исследования. Исследование выполнялось открытым методом в условиях стационара с последующим амбулаторным наблюдением с целью обеспечения безопасности добровольцев.

В исследовании изучена доза 25мг исследуемого препарата у 20 добровольцев, при внутривенном введении. Общая продолжительность исследования для добровольцев составила не более 42 дней и состояла из периода включения в исследование (визит V0), периода терапии (визит V1), и периода амбулаторного наблюдения (визиты V2 и V3). Длительность скрининга – до 14 дней, длительность периода введения препарата (госпитализации) – 3 дня, длительность амбулаторного наблюдения – 25 суток.

Исследуемая популяция. Выбор контингента испытуемых (здоровые добровольцы) обусловлен требованиями GCP и Федерального закона от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ "Об обращении лекарственных средств". Исследование носило описательный характер, поэтому определение размера выборки не было основано на каких-либо формальных статистических допущениях. В исследование включено 20 здоровых добровольцев. Данное количество является минимально достаточным для оценки и описания фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамата кальция. Добровольцы, в т.ч. дублиеры, были включены в исследование только после подписания информированного согласия и при условии соответствия критериям отбора. Добровольцы могли участвовать в исследовании только один раз.

Критерии включения и исключения.

Критерии включения:

1. пол: мужчины;
2. возраст 18 - 45 лет;
3. верифицированный диагноз «здоров»: отсутствие патологии со стороны желудочно-кишечного тракта, печени, почек, сердечно-сосудистой системы, ЦНС (предварительно проведенные стандартные клинико-лабораторные и инструментальные исследования не выявили клинически значимых отклонений от нормы);
4. отрицательные результаты анализов крови на ВИЧ, сифилис (RW), гепатит В (HBs-Ag) и гепатит С (HCV);
5. индекс массы тела (ИМТ) составляет $18 \leq \text{ИМТ} \leq 32$;
6. наличие письменного согласия добровольца на включение в исследование.

Критерии исключения:

1. отягощенный аллергологический анамнез;
2. лекарственная непереносимость;
3. хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови;
4. исходный уровень АД: $140/90 < \text{АД} < 90/60$ мм рт ст;
5. исходный уровень ЧСС: $55 < \text{ЧСС} < 90$ мм рт ст;
6. хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте (за исключением аппендэктомии);
7. острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до начала исследования;
8. регулярный прием лекарственных препаратов менее чем за 2 недели до начала исследования;
9. прием лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику, функцию печени и др. (барбитураты, омепразол, циметидин и т.д.), менее чем за 2 месяца до начала исследования;
10. донорская сдача крови (450 мл крови или плазмы и более) менее чем за 2 месяца до начала исследования;
11. участие в I фазе клинического испытания препаратов менее чем за 3 месяца до начала исследования;
12. прием более чем 10 ед. алкоголя в неделю (1 ед. алкоголя эквивалентна $\frac{1}{2}$ л пива, 200 мл вина или 50 мл спирта) или анамнестические сведения об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными препаратами;

13. курение более 10 сигарет в день;
14. обнаружение следовых количеств наркотиков в моче;
15. обнаружение следовых количеств паров этилового спирта в выдыхаемом воздухе;
16. неадекватное поведение;
17. возникновение заболевания (не связанного с исследуемым лекарственным средством, но во время исследования), для лечения которого необходимо назначение лекарственных средств, запрещенных в протоколе;
18. недопустимое по протоколу сопутствующее лечение;
19. нарушение требований Протокола: графика отбора проб (более 1 раза), режима исследования (употребление алкоголя, запрещенных продуктов и др.);
20. нарушение требований и условий стационара.

Обоснование выбора дозы и схемы отбора образцов. Рекомендуемая доза и метод введения были определены на основе результатов доклинических испытаний. Схема отбора образцов была разработана с учетом данных доклинических исследований о кривой "концентрация — время" препарата.

Рандомизация добровольцев. Данное исследование – открытого типа, не требующее рандомизации. Нумерация добровольных участников велась в порядке их введения в исследование (подписание Информированного согласия), закреплялся за добровольцем на весь период исследования и регистрировался в ИРК.

Сбор и первичная обработка биологического материала. Для забора крови у добровольных участников исследования применялись периферические внутривенные катетеры. Введение исследуемого препарата и взятие образцов крови проводились в сидячем положении. Экстремальных ситуаций, таких как ухудшение самочувствия, психические отклонения, желание участников выйти из исследования и других факторов, препятствующих взятию проб, не наблюдалось. Кровь объемом 5 мл отбиралась в пластиковые пробирки. На пробирки были нанесены обозначения с указанием кода и рандомизационного номера добровольца, номера протокола, визита и пробы, а также даты взятия образца. Время между получением крови и дальнейшими манипуляциями не превышало 10 минут. Плазма отделялась центрифугированием в течение 15 минут при скорости 3000 оборотов в минуту. Гемолиз отсутствовал. Плазма разделялась на две пробирки, которые замораживались при температуре не выше -35°C . Одна пробирка из каждой пары использовалась для определения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция, а вторая оставалась на ответственное хранение в криоцентре центре при температуре не выше -65°C до дальнейших распоряжений.

Экспериментально подтверждена стабильность концентрации гидроксиникотиноилглутамата кальция в плазме крови при температуре -35°C в течение одного

месяца. В контрольных образцах плазмы с известным содержанием гидроксиникотиноилглутамат кальция не наблюдалось изменения концентрации определяемого вещества в течение всего срока хранения. Все образцы были собраны в соответствии с протоколом. Выделение плазмы крови из образцов и последующее их хранение до анализа соответствовали требованиям протокола.

Аналитические методы определения гидроксиникотиноилглутамата. Концентрацию неизмененного гидроксиникотиноилглутамата кальция в плазме крови добровольцев определяли методом тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии.

Стандарты и реактивы. В работе использовали рабочий стандартный образец (PCO) гидроксиникотиноилглутамат кальция и PCO фенилэфрина гидрохлорида (BC, внутренний стандарт). Для приготовления подвижной фазы применяли муравьиную кислоту, формиат аммония, воду и ацетонитрил, соответствующий стандартам для масс-спектрометрии от производителя «Chromosolv» «Merck» (ФРГ). В процессе пробоподготовки использовали деионизированную воду, полученную на системе EASYpure II («Barnstead», США), а также этанол, соответствующий стандартам для высокоэффективной жидкостной хроматографии от производителя «Chromosolv» «Merck» (ФРГ). Матричные растворы исследуемой субстанции и внутреннего стандарта с концентрацией 0,1 мг/мл готовили в подвижной фазе. Последовательным разбавлением матричных растворов приготовили калибровочные растворы при использовании в качестве растворителя подвижной фазы.

Подготовка проб плазмы для анализа. В пробирку вместимостью 2,2 мл поместили 20 мкл 20 мкМ раствора внутреннего стандарта, 200 мкл плазмы и 600 мкл раствора ацетонитрил-этанол (50:50 V/V). Пробирку плотно закрыли, ее содержимое интенсивно перемешивали на вортексе в течение 3 мин, затем помещали в морозильную камеру и выдерживали при -45 °C в течение 12-15 часов. Образцы размораживали, затем центрифугировали в течение 5 мин при 13 тысяч об/мин. Раствор над осадком перелили в стеклянную пробирку, которую поместили в вакуумный шкаф VD 53 (Binder, ФРГ), подключенный к химической вакуумной станции PC 3012 Vario (Vacuubrand, ФРГ) и выпаривали досуха при 25 °C. Образцы хранили при -25 °C в плотно закупоренной пробирке. Перед анализом в каждую пробирку добавляли по 1000 мкл подвижной фазы и тщательно перемешивали в течение 10 мин, затем центрифугировали в течение 5 мин при 13 тысяч об/мин. Надосадочную жидкость переносили в отдельную стеклянную пробирку и анализировали методом жидкостной тандемной хромато-масс-спектрометрии.

Хромато-масс-спектрометрический анализ. Количественное определение гидроксиникотиноилглутамата кальция осуществлялось с помощью метода тандемной жидкостной хромато-масс-спектрометрии. Для этого использовался жидкостный хроматограф модели «Perkin Elmer 2000», произведённый компанией Perkin Elmer (США), оснащённый масс-

спектрометрическим детектором 3200 Q TRAP LC/MS/MS, который также был разработан компанией AB SCIEX (США).

Количественное определение гидросиникотиноилглутамат кальция. Концентрацию гидросиникотиноилглутамата кальция в исследуемых образцах определяли с помощью метода внутреннего стандарта, используя программное обеспечение «Analyst». Калибровочную кривую строили на основе данных анализа проб плазмы крови с добавлением известных количеств гидросиникотиноилглутамата кальция при постоянной концентрации внутреннего стандарта. Полученная зависимость оказалась линейной (Рисунок 8).

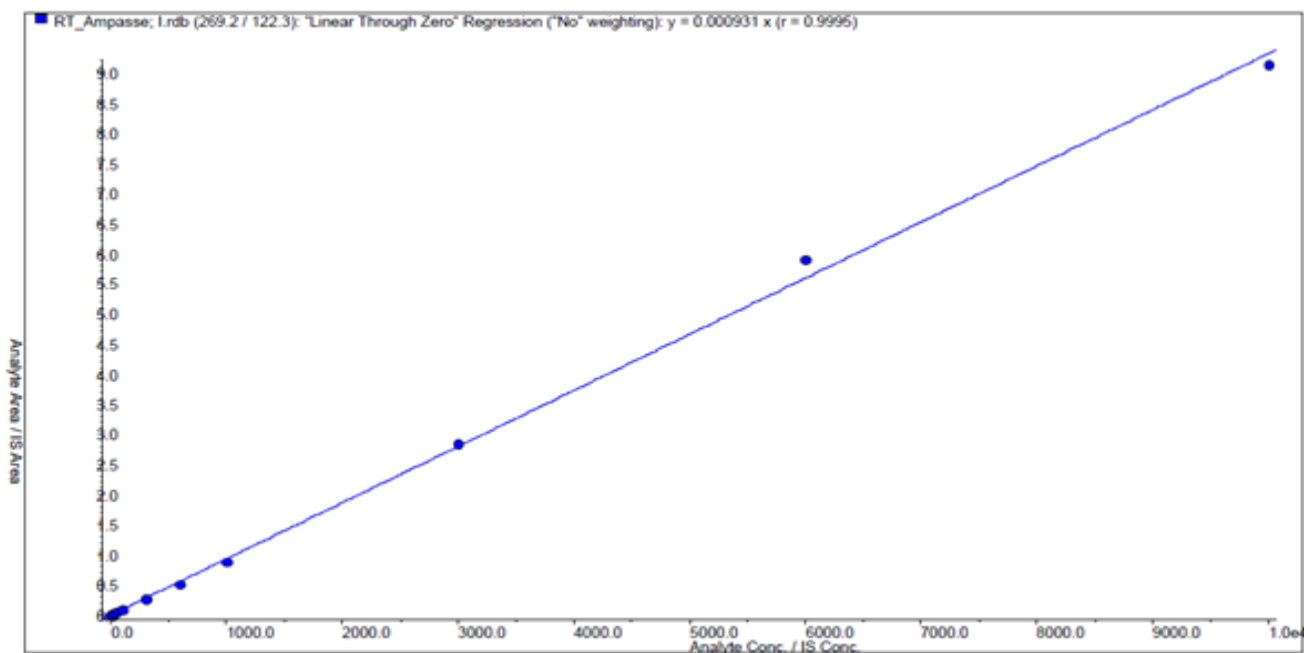


Рисунок 8 – Калибровочный график для определения гидросиникотиноилглутамат кальция

Метрологические характеристики метода определения гидросиникотиноилглутамат кальция приведены в приложении (Таблица ПВ-1). Валидация метода по показателю точность показало, что описанный метод является точным в интервале содержаний от 0,1 до 10 мкг/мл (Таблица ПВ-2). Стабильность калибровочной зависимости в ходе всего исследования подтверждалась после каждой серии из 60 испытуемых образцов (Таблица ПВ-3). На рис. ПВ-1 представлены типичные хроматограммы образцов плазмы, в которых не содержится гидросиникотиноилглутамат кальция. Также на этом рисунке показаны хроматограммы тех же образцов, но с добавлением различных количеств гидросиникотиноилглутамат кальция, включая уровень, соответствующий пределу количественного определения. На рис. ПВ-2 изображены типичные хроматограммы испытуемых образцов.

Расчет фармакокинетических параметров. Параметры фармакокинетики были рассчитаны с помощью программы “M-IND” методом, не зависящим от конкретной модели. Были определены следующие показатели:

C_0 – концентрация вещества в момент начала его введения;

C_{\max} – максимальное значение концентрации среди всех измеренных;

T_{\max} – время, когда концентрация достигла своего максимума, то есть время, в которое было зафиксировано максимальное значение;

AUC_{0-t} – площадь под кривой фармакокинетики за весь период наблюдения, рассчитанная методом трапеций;

$AUC_{0-\infty}$ – площадь под кривой до бесконечности, вычисленная через экстраполяцию данных. Формула для расчета: $AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/k_{el}$, где C_t и k_{el} – расчетные значения концентрации гидроксиникотиноилглутамината в последнем измерении и константы элиминации, определенные с помощью нелинейного регрессионного анализа на конечном участке кривой;

k_{el} – константа элиминации, оценивалась методом наименьших квадратов по значениям времени и логарифмов соответствующих концентраций ЛВ в крови, относящихся к прямолинейному в полулогарифмических координатах участку кривой;

T_{\max} – период полувыведения - $T_{\max} = 0,693 / k_{el}$;

CL - общий клиренс, определяющий способность организма к элиминации ЛВ, вычислялся следующим образом: $CL = D / AUC$ (где D – введенная доза);

V_{ss} - стационарный объем распределения, характеризующий в обобщенном виде способность ЛВ к распределению в организме: $V_{ss} = CL * MRT$.

V_0 - начальный объем распределения, отражающий способность распределения ЛВ в интенсивно перфузируемые органы: $V_0 = D/C_0$.

V_z - кинетический объем распределения (объем распределения в терминальной фазе кривой): $V_z = CL_{po} / k_{el}$

MRT - среднее время удержания ЛВ в организме;

MRT_0 - среднее время удержания в центральном пуле: $MRT_0 = V_0/CL$

Статистическая обработка результатов. Статистическая обработка и графическое оформление данных осуществлялись с использованием программных пакетов STATISTICA 6.0 и EXCELXP. Были рассчитаны все индивидуальные значения концентраций как в числовом, так и в графическом представлении, а также фармакокинетические параметры. Кроме того, были определены параметры описательной статистики.

2.2.2 Изучение безопасности применения гидроксиникотиноилглутамат кальция на добровольцах и пациентах

Этические и административные аспекты исследования. Исследование проводилось на основании разрешения на проведение клинических исследований № 280 от 23 мая 2014 года, выданным МЗ РФ.

Потенциальные участники были проинформированы о целях и методах исследования, применяемом лекарственном средстве и курсе лечения, существующих альтернативных методах лечения, возможных преимуществах и рисках, а также о возможных осложнениях и неудобствах, связанных с участием в исследовании.

На основании полученной информации потенциальные участники давали добровольное согласие на участие в исследовании. Согласие было получено без какого-либо принуждения. Врач-исследователь подробно объяснял потенциальным участникам всю необходимую информацию и затем проверял, всё ли они поняли. Все участники, принявшие участие в исследовании, дали письменное согласие на участие во второй фазе испытаний препарата. Письменная форма информированного согласия пациента или его законного представителя была одобрена локальными этическими комитетами клинических центров. Ни один участник не был включён в исследование принудительно.

Дизайн исследования. Исследование является рандомизированным двойным слепым плацебо-контролируемым поисковым.

Исследование осуществляется на фоне стационарного лечения. В исследовании предусмотрены следующие периоды:

- Скрининг (проводится максимум за 10 дней до Дня 1 — рандомизации);
- Визит 1 (на 1 день после введения).
- Визит 2 (на 8 день введения препарата).
- Визит 3 (на 16 день введения препарата);
- Визит 4 (на 30 день после последнего введения препарата, 46 день со дня первого введения);
- Визит 5 (на 90 день после последнего введения препарата, 106 день со дня первого введения).

Общая продолжительность исследования для пациента составила 3.5 месяца. Каждый пациент, получивший дозу исследуемого препарата, учитывался, как включенный в исследование. Имеющиеся на него данные были использованы при оценке эффективности и безопасности проводимой терапии.

Исследование проведено с участием 124 пациентов, рандомизированных в 2 группы:

- Группа I—62 пациентов в течение 15 дней получали плацебо внутривенно струйно медленно.

- Группа II — 62 пациентов в течение 15 дней получали препарат кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты в дозе 25 мг внутривенно струйно медленно.

Исследуемая популяция. Подлежат включению в исследование пациенты с установленным диагнозом: «хроническое нарушение мозгового кровообращения вследствие артериальной гипертензии и (или) атеросклероза магистральных артерий головы».

Анализ безопасности проводился в следующих популяциях пациентов:

1. Популяция всех включенных пациентов или ИТТ популяция (Intention-to-treat) - все пациенты, получившие хотя бы одну дозу исследуемого препарата. Данные, полученные от пациентов из ИТТ популяции, использовались как для анализа безопасности, так и для анализа эффективности;

2. РР популяция (Per Protocol) – все пациенты, полностью закончившие исследование без существенных отклонений от протокола. Данные, полученные от пациентов из РР популяции, использовались для анализа по основному критерию эффективности и для анализа по остальным критериям эффективности.

Обе популяции в настоящем исследовании совпадают, досрочно выбывших из исследования не было. В настоящем исследовании рандомизировано 124 пациентов, соответствующих критериям включения, подписавших и датировавших информированное согласие на участие в исследовании.

В соответствии со схемой рандомизации, пациенты были разделены на 2 группы.

В Группы 1-2 вошло по 62 пациентов.

В основной группе (n = 62; 20,97% мужчин, 79,03% женщин) средний возраст пациентов составил $60,90 \pm 6,48$ лет (от 50 до 75 лет), масса тела – $76,01 \pm 9,15$ кг, рост – $167,11 \pm 6,74$, ИМТ – $27,22 \pm 2,92$ кг/м². В контрольной группе (n = 62; 19,35% мужчин, 80,65% женщин) средний возраст пациентов составил $60,39 \pm 7,13$ лет (от 50 до 75 лет), масса тела – $77,48 \pm 10,18$ кг, рост – $167,85 \pm 6,05$, ИМТ – $27,52 \pm 3,69$ кг/м².

Критерии включения и исключения.

Критерии включения:

1. Наличие письменного Информированного согласия на участие в исследовании от пациента.
2. Пациенты обоего пола в возрасте от 50 до 75 лет.
3. Отрицательный результат анализа мочи на беременность у женщин репродуктивного возраста.
4. Артериальная гипертензия (с градацией на степени) и (или) атеросклероз магистральных артерий головы:
 - диагноз АГ соответствует общепринятым критериям и градациям на степени;

- подтверждение атеросклероза магистральных артерий головы результатами дуплексного сканирования магистральных артерий головы (сонные артерии, позвоночные артерии) с выявлением атеросклеротических бляшек во внутренних сонных артериях и определением степени стеноза по методу ECST.

5. Наличие признаков поражения вещества головного по данным нейровизуализации (МРТ головного мозга): «немые» лакунарные инфаркты без указания на острое развитие какой-либо очаговой неврологической симптоматики в анамнезе, лейкоареоз.

Критерии исключения из клинической или аналитической части исследования:

1. Инсульт, транзиторная ишемическая атака, преходящая слепота на один глаз в анамнезе.

2. Инфаркт миокарда в анамнезе.

3. Лейкоареоз и (или) «немые» лакунарные инфаркты при отсутствии артериальной гипертензии и (или) атеросклероза.

4. Амилоидная ангиопатия сосудов головного мозга.

5. Алкоголизм.

6. Фибрилляция предсердий.

7. Сахарный диабет.

8. Воспалительные и аутоиммунные заболевания с поражением сосудов головного мозга.

9. Нейродегенеративные заболевания с нарушением когнитивных функций (болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция, болезнь диффузных телец Леви, деменция при болезни Паркинсона, болезнь Гентингтона, наследственные болезни накопления и пр.).

10. Наследственные или генетические заболевания с поражением сосудов малого калибра, например, CADASIL, CARASIL, MELAS, болезнь Фабри и пр.

11. Применение пациентами на момент скрининга ингибиторов холинэстеразы, производных амантадина, мемантина, а также иных лекарственных препаратов, действие которых заявляется как метаболическое, нейропротективное, ноотропное и пр., а также нейролептиков, барбитуратов, транквилизаторов, психостимуляторов.

12. Заболевания печени и (или) почек, прочие заболевания, которые, по мнению исследователя, могут исказить результаты исследования.

13. Установленный кардиостимулятор, ферромагнитные или электронные имплантаты среднего уха, большие металлические имплантаты, ферромагнитные осколки, ферромагнитные аппараты Илизарова.

14. Не проведение на одном или более визитах какой-либо запланированной процедуры обследования

15. Одновременное участие пациента в другом клиническом исследовании.
16. Нарушения протокола, которые, по мнению исследователя, являлись значительными.
17. Возникновение сопутствующего заболевания или состояния, приводящего к длительным затруднениям при проведении какой-либо обязательной процедуры исследования, что способно, по мнению исследователя, оказать значимое влияние на объективность результатов при оценке состояния пациента.

Назначенное лечение.

Группа I — 62 пациентов в течение 15 дней получали плацебо внутривенно струйно медленно.

Группа II — 62 пациентов в течение 15 дней получали препарат гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 25 мг внутривенно струйно медленно.

В данном исследовании в качестве исследуемой терапии назначался препарат гидроксиникотиноилглутамат кальция, раствор для внутривенного введения, 5 мг/мл, в качестве препарата сравнения использовано плацебо. Препарат вводился по 25 мг внутривенно в течение 15 дней, одной из групп (Группа 1) вводился плацебо. В соответствии с дизайном, исследование было двойным слепым (то есть ни врач, ни субъект исследования не знали о применяемой терапии) с активным контролем, за исключением группы 5, в которой информация об использованном препарате была открыта. Некоторые пациенты принимали назначенные врачом препараты для лечения сопутствующих заболеваний, имевшиеся у них на момент включения в исследование. Исследователи следили за тем, чтобы при назначении препаратов сопутствующей терапии не применялись те, которые могли бы затруднить интерпретацию полученных в ходе исследования данных.

Исследуемые параметры безопасности, схема исследования.

Для оценки безопасности использовались традиционные параметры:

1. Оценка жизненно важных показателей путем измерения АД, ЧСС, ЧД и температуры тела на каждом визите.
2. Мониторинг состояния пациента после введения исследуемых препаратов осуществлялся измерением АД, ЧСС, ЧД и температуры тела, неврологического статуса во всех контрольных точках.
3. Лабораторная оценка: результаты лабораторных показателей (клинического и биохимического анализов крови, анализа мочи) оценивались на визите скрининга и визитах 2, 3, 4 и должны были регистрироваться, как нежелательные явления в том случае, если являлись клинически значимыми.
4. Инструментальная оценка осуществлялась путем проведения ЭКГ в 12 отведениях (в динамике) на визите скрининга и Визитах 2, 3, 4.

5. Клиническая оценка: на каждом визите и в контрольных точках должны были фиксироваться все нежелательные явления (НЯ) и серьезные нежелательные явления (СНЯ).

Статистические исследования. Статистический анализ проведен в полном соответствии с целями и задачами исследования, а также с учетом специфики обрабатываемых данных.

В ходе набора выявлялись сомнительные данные, касающиеся как незаполненных данных, так и их неточного заполнения. После согласования всех неточностей с исследователем, все вновь поступившие данные были внесены в итоговую таблицу, предназначенную для дальнейшего статистического анализа. Наполнение данных проводилось с использованием пакета MS Excel; статистический анализ – в пакете Statistica 8.0 (StatSoft, USA). Данные, собранные в ходе настоящего клинического исследования, были представлены различными шкалами, в основном, непрерывными величинами. С учетом основных целей исследования, основными инструментами анализа были описательная статистика, проверка гипотез с использованием статистических критериев, в соответствии с типом распределения, и графические представления. Статистические тесты применялись для двусторонней гипотезы. Для сравнения данных, распределенных по нормальному закону распределения, использовались параметрические критерии, для сравнения данных, распределенных по закону, отличному от нормального, использовались непараметрические критерии (ранговый критерий Манна-Уитни). Для всех количественных данных, имеющих отношение как к эффективности, так и к безопасности, выполнена проверка нормальности данных с помощью критерия Шапиро-Уилка, если результаты свидетельствуют об отсутствии нормальности распределения большинства переменных, в таких случаях для межгруппового сравнения количественных переменных между несвязанными группами использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. При проведении сравнительного анализа руководствовались традиционным подходом к выбору нулевой и альтернативной гипотез, а также уровня значимости.

2.2.3 Оценка эффективности применения гидроксиникотиноилглутамата кальция на пациентах

Этические и административные аспекты исследования. Данное исследование было проведено после соответствующей этической экспертизы Советом по этике. Разрешение на проведение клинического исследования № 653 от 14.12.2017 г. выдано Министерством здравоохранения РФ по результатам экспертизы документов, необходимых для получения разрешения на проведение исследования, и этической экспертизы, проводимых в порядке, установленном Федеральным законом от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ. Было получено соответствующее одобрение Совета по этике Министерства здравоохранения РФ комитетов (выписка из протокола № 159 от 21.11.2017 г.). До начала исследования Протокол исследования

был предоставлен в Совет по этике. Процедуры рассмотрения и одобрения исследования должны были соответствовать требованиям национального законодательства. Исследование проводилось в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации Всемирной медицинской ассоциации (в редакции 2008 г.), с правилами надлежащей клинической практики Международной конференции по гармонизации (ICH GCP), этическими принципами, изложенными в Директиве Европейского союза 2001/20/ЕС и требованиями национального законодательства Российской Федерации.

Перед включением в исследование пациенту или его родственникам предоставлялась устная информация и письменные материалы о задачах и методах проведения исследования, а также об ожидаемой пользе и возможном риске, связанных с участием в исследовании. Пациент или его родственники/опекуны предоставляли согласие на компьютерную обработку его данных и на публикацию информации, не позволяющей идентифицировать его личность.

Дизайн исследования.

Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое подтверждающее исследование эффективности и безопасности лекарственного препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция при его внутривенном введении у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения вследствие артериальной гипертензии и (или) атеросклероза магистральных артерий головы.

Исследование предусматривало:

- Период скрининга – максимально 10 дней;
- Период терапии, который длился 15 дней (госпитализация);
- Период наблюдения с оценкой эффективности и безопасности длился 12 недель (90 дней) после окончания введения исследуемого препарата.

Всего 124 пациента, соответствующих критериям включения, при отсутствии критериев невключения, были рандомизированы (в соотношении 1:1) в одну из следующих двух групп лечения:

- Группа I – 62 пациента в течение 15 дней получали гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 25 мг внутривенно струйно;
- Группа II – 62 пациента в течение 15 дней получали плацебо внутривенно струйно

В настоящем исследовании в качестве контроля использовалось плацебо. С этической точки зрения использование в настоящем исследовании плацебо приемлемо, поскольку на сегодняшний день отсутствуют устоявшиеся эффективные методы восстановления и замедления прогрессирования когнитивного дефицита, отмечающегося при хроническом нарушении мозгового кровообращения вследствие артериальной гипертензии и (или) атеросклероза магистральных артерий головы (т.е. т.н. дисциркуляторная энцефалопатия). Исследуемый

лекарственный препарат гидроксиникотиноилглутамат кальция тестировался именно для установления его способности замедлять нарастание/восстанавливать когнитивный дефицит. При этом протоколом предусматривалось, что пациент с хроническим нарушением мозгового кровообращения вследствие артериальной гипертензии и (или) атеросклероза магистральных артерий головы будет получать соответствующую терапию указанных состояний. Следует также отметить, что продолжительность исследования не превысила более 15 дней, т.е. исследование было краткосрочным и за этот срок какого-либо значимого усугубления когнитивных нарушений, развивавшихся в течение многих лет на фоне хронически протекающих заболеваний, не ожидалось.

Исследуемая популяция. В исследование планировалось рандомизировать 124 пациентов обоих полов в возрасте от 50 до 75 лет. В исследовании проанализированы данные 124 пациентов.

Демографические и антропометрические характеристики пациентов из основной и контрольной групп на момент включения в исследование были сопоставимы. В основной группе ($n = 62$; 20,97% мужчин, 79,03% женщин) средний возраст пациентов составил $60,90 \pm 6,48$ лет (от 50 до 75 лет), масса тела – $76,01 \pm 9,15$ кг, рост – $167,11 \pm 6,74$, ИМТ – $27,22 \pm 2,92$ кг/м². В контрольной группе ($n = 62$; 19,35% мужчин, 80,65% женщин) средний возраст пациентов составил $60,39 \pm 7,13$ лет (от 50 до 75 лет), масса тела – $77,48 \pm 10,18$ кг, рост – $167,85 \pm 6,05$, ИМТ – $27,52 \pm 3,69$ кг/м².

Распределение субъектов по группам представлено в Таблице 2. В исследовании проанализированы данные 124 пациентов, которые успешно завершили скрининг, рандомизацию и все этапы исследования. Пациентов, досрочно завершивших участие в исследовании, не было, в связи с чем во все исследуемые популяции (ITT, PP и Safety) вошло одинаковое количество участников ($n = 124$).

Популяции:

1. популяции всех включенных пациентов, получивших хотя бы одну дозу исследуемого препарата или плацебо (ITT);
2. популяции пациентов, завершивших исследование по протоколу (PP);
3. популяция рандомизированных пациентов, которые получили хотя бы одну дозу препарата (Safety).

Таблица 1 - Распределение пациентов

Распределение пациентов	Основная группа Количество пациентов (доля, %)	Контрольная группа Количество пациентов (доля, %)
Включено в исследование (скринировано)	124 (100,00%)	
Выбыло на этапе скрининга	0 (0,00%)	
Рандомизировано	62 (100,00%)	62 (100,00%)
Преждевременно выбыло	0 (0,00%)	
Популяция ITT	62 (100,00%)	62 (100,00%)
Популяция Safety	62 (100,00%)	62 (100,00%)
Популяция PP	62 (100,00%)	62 (100,00%)

Критерии включения и исключения.

Критерии включения:

1. Наличие письменного Информированного согласия на участие в исследовании от пациента;
2. Пациенты обоего пола в возрасте от 50 до 75 лет;
3. Отрицательный результат анализа мочи на беременность у женщин с сохраненным репродуктивным потенциалом;
4. Артериальная гипертензия (с градацией на степени) и (или) атеросклероз магистральных артерий головы:
 - диагноз АГ соответствовал общепринятым критериям и градациям на степени;
 - подтверждение атеросклероза магистральных артерий головы результатами дуплексного сканирования магистральных артерий головы (сонные артерии, позвоночные артерии) с выявлением атеросклеротических бляшек во внутренних сонных артериях и определением степени стеноза по методу ECST (Европейский метод определения степени стеноза бифуркации общей сонной артерии [European Carotid Surgery Method]).
5. Наличие признаков поражения вещества головного мозга по данным нейровизуализации (МРТ головного мозга): «немые» лакунарные инфаркты без указания на острое развитие какой-либо очаговой неврологической симптоматики в анамнезе, лейкоареоз;
6. Счет по шкале MoCA на скрининге и первом визите – не менее 19 и не более 23.
Нижняя граница счета по шкале MoCA, равная 19, была выбрана на том основании, что значения 18 и менее соответствуют деменции при болезни Альцгеймера [93].

Критерии исключения:

1. Инсульт, транзиторная ишемическая атака, преходящая слепота на один глаз в анамнезе;
2. Инфаркт миокарда в анамнезе;
3. Лейкоареоз и (или) «немые» лакунарные инфаркты при отсутствии артериальной гипертензии и (или) атеросклероза;
4. Амилоидная ангиопатия сосудов головного мозга;
5. Алкоголизм;
6. Фибрилляция предсердий;
7. Сахарный диабет;
8. Воспалительные и аутоиммунные заболевания с поражением сосудов головного мозга;
9. Нейродегенеративные заболевания с нарушением когнитивных функций (болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция, болезнь диффузных телец Леви, деменция при болезни Паркинсона, болезнь Гентингтона, наследственные болезни накопления и пр.);
10. Наследственные или генетические заболевания с поражением сосудов малого калибра, например, CADASIL, CARASIL, MELAS, болезнь Фабри и пр.;
11. Применение пациентами ингибиторов холинэстеразы, производных амантадина, мемантина, а также иных лекарственных препаратов, действие которых заявлялось как метаболическое, нейропротективное, ноотропное и пр., а также нейролептиков, барбитуратов, транквилизаторов, психостимуляторов;
12. Заболевания печени и (или) почек, прочие заболевания, которые, по мнению исследователя, могли исказить результаты исследования;
13. Одновременное участие пациента в другом клиническом исследовании.

Назначенное лечение.

Группа I – 62 пациента в течение 15 дней получали препарат гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 25 мг внутривенно струйно;

Группа II – 62 пациента в течение 15 дней получали плацебо внутривенно струйно.

На основании результатов доклинических токсикологических исследований, а также результатов изучения безопасности у здоровых добровольцев было установлено, что диапазон доз 5–50 мг/сут является безопасным. Кроме того, согласно результатам доклинических фармакодинамических исследований предполагалось, что диапазон доз 5–25 мг/сут будет проявлять ноотропную активность у человека. На основании результатов клинического исследования II фазы наибольшая клиническая активность обнаружена в дозе 25 мг, поэтому в настоящем клиническом исследовании планировалось исследовать дозу, равную 25 мг/сут. Полученные результаты клинического исследования II фазы показали, что полный

фармакологический эффект препарат проявил в течение 15 дней ежедневного внутривенного введения. На это время пациенты госпитализировались. Длительность применения, превышающая 15 дней, не была целесообразна из этических и медицинских соображений, поскольку переносимость внутривенных инъекций в более длительный период снижалась. Лечение артериальной гипертензии и атеросклероза магистральных артерий в основной и контрольной группах, в соответствии с тяжестью нарушения мозгового кровообращения осуществлялось согласно текущим стандартам [98].

Если сопутствующая патология не являлась критерием исключения пациента из исследования, то лечение сопутствующей патологии во время исследования проводилось по обычной схеме. При этом сопутствующие препараты не должны были относиться к неразрешенным Протоколом.

Оцениваемые показатели эффективности.

Оценка эффективности лекарственного препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция проводилась по нескольким критериям:

- Первичной конечной точкой эффективности являлась доля пациентов, для которых лечение было признано успешным по шкале MoCA, на 30 день после начала терапии. Успех терапии определялся как изменения счета по шкале MoCA по сравнению с исходными значениями (до начала терапии) на 2 балла на день оценки эффективности;
- Вторичной конечной точкой эффективности являлась изменения счета по опроснику здоровья SF-36V2 по сравнению с исходным значением (до начала терапии) на 30 день после начала терапии.

Выбранная первичная конечная точка эффективности, равная 2 баллам по шкале MoCA, основана на анализе результатов собственного клинического исследования II фазы и данных, описанных в литературе [147,265,286].

Процедуры исследования. Скрининг. Пациенты должны были выразить желание и быть способными предоставить письменное Информированное согласие до проведения любой процедуры скрининга.

До начала участия в исследование женщин с сохраненным репродуктивным потенциалом необходимо было информировать о важности предохранения от нежелательной беременности во время участия в исследовании, а также в течение трех месяцев после его окончания, и факторах потенциального риска наступления нежелательной беременности. Во время визита скрининга проводился сбор исходной информации о пациенте, включающей основные данные (возраст, пол, дата рождения, этническая принадлежность, масса тела, рост, курение, употребление алкоголя с указанием дозы в условных единицах); для женщин с сохраненным репродуктивным потенциалом – метод контрацепции или сроки периода менопаузы; диагноз основного

заболевания; данные о сопутствующей терапии с указанием начала применения, доз за 30 дней до скринингового периода; данные о наличии в анамнезе аллергических реакций. Проводился полный физикальный осмотр, оценка жизненно важных показателей, ЭКГ, критериев включения/невключения; бралась кровь на общий, биохимический анализ, проводился общий анализ мочи и анализ мочи на определение беременности (для женщин с сохраненным репродуктивным потенциалом). Жизненно важные показатели (АД, ЧСС, ЧД) определялись в течение 1 минуты после 30-минутного отдыха в положении сидя.

Лабораторные исследования. На скрининговом визите, а также на Визите 2 и 3 проводились следующие анализы:

Общий анализ крови: определялись уровни гемоглобина, эритроцитов, гематокрита, лейкоцитов, лейкоцитарной формулы, тромбоцитов и скорость оседания эритроцитов (СОЭ).

Биохимический анализ сыворотки крови: измерялись показатели глюкозы, общего белка, общего билирубина, аспартатаминотрансферазы (АСТ), аланинаминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы, креатинина, натрия и калия.

Общий анализ мочи: оценивались цвет, прозрачность, относительная плотность, рН, наличие белка, глюкозы, а также проводился микроскопический анализ осадка мочи (эпителий, эритроциты, лейкоциты, цилиндры, бактерии, соли).

Анализ мочи на беременность: проводился для женщин с сохранённым репродуктивным потенциалом на скрининговом визите до процедуры рандомизации. Результат теста должен был быть отрицательным у всех женщин этой категории.

Электрокардиограмма. ЭКГ в 12-отведениях выполнялась на скрининговом визите, Визите 2 и 3. Копии ЭКГ прилагались к ИРК пациента. Измерялась частота сердечных сокращений и интервалы PR и QT, комплекс QRS.

Дуплексное сканирование магистральных артерий головы. Оценка степени атеросклеротического стеноза при ультразвуковом дуплексном сканировании основывалась на данных изображения атеросклеротической бляшки в В-режиме и/или режиме цветового доплеровского картирования по методу ECST [212]. При этом необходимо было, чтобы при ультразвуковом исследовании выявлялись атеросклеротические бляшки во внутренней сонной артерии и (или) позвоночной артерии с одной и (или) двух сторон. Копии заключения и репрезентативные снимки прилагались к ИРК пациента.

Магнитно-резонансная томография головного мозга. МРТ головного мозга проводилась на магнитно-резонансном томографе с величиной магнитной индукции не менее 1,0 Тл с использованием следующих режимов:

- Стандартные режимы T2-, T1-взвешенные изображения – для общей оценки состояния вещества головного мозга;

- T2-FLAIR (dark-fluid, d-f) и режим протонной плотности – для дифференцирования лакунарных инфарктов и расширенных периваскулярных пространств; с помощью режима FLAIR происходило подавление МР-сигнала от свободной (спинномозговой) жидкости, которая имела гипоинтенсивный сигнал, что улучшало визуализацию очага ишемии, а также очаговых изменений в белом веществе больших полушарий большого мозга, особенно расположенных перивентрикулярно и субкортикально; в режиме протонной плотности расширенные периваскулярные пространства изоинтенсивны ликвору;

- Диффузионно-взвешенные изображения – для исключения «острых» ишемических очаговых изменений вещества головного мозга;

- T2*-взвешенные изображения – получались с помощью импульсной последовательности градиентное эхо – это наиболее чувствительный к дезоксигемоглобину режим с сильно гипоинтенсивным МР-сигналом на изображениях; необходимость проведения подобного исследования заключалась в исключении мелких внутримозговых кровоизлияний и их последствий, особенно локализующиеся в глубоких отделах головного мозга.

Мониторинг жизненно важных показателей. В ходе визитов проводился стандартный мониторинг жизненно важных показателей: ЧСС, АД, ЧД, температура тела.

Оценка когнитивных функций. Оценка когнитивных функций проводилась по Монреальской шкале оценки когнитивных функций (MoCA).

Оценка общего состояния здоровья. Оценка общего состояния здоровья проводилась с помощью опросника SF-36V2. Этот инструмент предназначен для оценки качества жизни пациента и широко используется в исследованиях качества жизни в Европе и США.

Исследуемые параметры безопасности, схема исследования.

Для оценки безопасности использовались следующие параметры:

1. Оценка жизненно важных показателей путем измерения АД, ЧСС, ЧД и температуры тела на каждом визите. При наличии отклонений, они регистрировались как нежелательные явления;

2. Мониторинг состояния пациента после введения исследуемых препаратов осуществлялся измерением АД, ЧСС, ЧД и температуры тела, неврологический статус во всех контрольных точках;

3. Лабораторная оценка: результаты лабораторных показателей (клинического и биохимического анализов крови, анализа мочи) оценивались на визите скрининга и визите 2 и регистрировались как нежелательные явления, если возникал выход за границы нормальных значений;

4. Инструментальная оценка путем проведения ЭКГ в 12 отведениях (в динамике) на визитах скрининга и Визите 2 (неделя 5). При наличии отклонений, они регистрировались как нежелательные явления;

5. Клиническая оценка: на каждом визите и в контрольных точках фиксировались все НЯ и СНЯ, которые происходили с пациентом после приема исследуемого препарата и до окончания исследования.

Статистические исследования.

Для параметров безопасности представлены описательные статистики:

- количественные и порядковые данные: среднее арифметическое, стандартное отклонение, медиана, межквартильный размах, минимум, максимум;
- межквартильный размах, минимум, максимум;
- категориальные (качественные) данные: частота, доля (проценты).

Сравнительный анализ количественных параметров состоял из следующих этапов:

1. оценка соответствия данных нормальному закону распределения с использованием критерия согласия (например, с помощью критерия Шапиро-Уилка);
2. непосредственно статистическое сравнение данных с использованием соответствующих критериев.

Выбор статистического критерия определялся соответствием/несоответствием нормальному закону распределения и зависимостью/независимостью сравниваемых выборок:

- для данных, полученных в рамках одной группы, предполагается использование ANOVA для повторных измерений или ANOVA Фридмана согласно нормальности/ненормальности данных;
- для данных, полученных в разных группах лечения, использовался t-критерий Стьюдента или непараметрического U-критерия Манна-Уитни согласно нормальности/ненормальности данных;
- сравнение категориальных данных проводилось с помощью точного критерия Фишера или критерия χ^2 Пирсона.

Предполагалось, что, если условия применимости указанных методов статистического анализа не будут выполняться, методы анализа будут изменены с приведением соответствующего обоснования в итоговом отчете.

Сравнение групп по частоте достижения клинического эффекта терапии проводили с помощью критерия χ^2 или точного критерия Фишера. Был рассчитан двусторонний 95% доверительный интервал для разницы между группами (с использованием подхода Newcombe). Заключение о превосходстве могло быть сделано в том случае, если нижняя граница двустороннего 95% доверительного интервала для разности частот превышало 0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Доклинические исследования на лабораторных животных

3.1.1 Исследование специфической фармакологической активности

В рамках предыдущих исследований были проведены комплексные эксперименты на моделях патологических состояний, включая массивную кортикальную ишемию у крыс, посттравматическую интрацеребральную гематому, геморрагический инсульт, острое алкогольное отравление, а также модели депрессии. В результате впервые были выявлены нейропротективные и антидепрессивные свойства данного соединения, что представляет значительный вклад в понимание его потенциала в качестве терапевтического агента для различных неврологических расстройств [10,13,14,16,18,20,22,35,36,169].

3.1.1.1 Влияние гидроксиникотиноилглутамат кальция на обучение условному рефлексу активного избегания

Гидроксиникотиноилглутамат кальция (20 мг/кг, в/б) вводили ежедневно за 30 минут до обучения УРАИ в течение 6 последовательных дней. Показано, что гидроксиникотиноилглутамат кальция оптимизировал обучение крыс в условиях челночной камеры: под его влиянием время рефлекса на 5-й день обучения составило $37,0 \pm 6,1$, а в группе контрольных животных этот показатель был равен $47,0 \pm 5,2$ ($p \leq 0,05$). Пирацетам в этих условиях не оказывал влияния на обучение УРАИ ($44,5 \pm 7,4$).

3.1.1.2 Влияние гидроксиникотиноилглутамата кальция на обучение условному питьевому рефлексу в Т-образном лабиринте

В процессе обучения животных на фоне гидроксиникотиноилглутамата кальция установлено, что вещество практически не влияло на формирование памятного следа у животных в первую половину процесса обучения (с 1 по 3 сеанс). Однако, в дальнейшем с 10 по 20 сеанс крысы под влиянием ГНГК выполняли рефлекс значительно быстрее (в 1,5 раза) и различия с контролем были статистически достоверны (Таблица 2). Это свидетельствует о способности гидроксиникотиноилглутамата кальция оптимизировать процесс обучения животных условному лабиринтному рефлексу с положительным подкреплением преимущественно на заключительных этапах формирования памятного следа. Пирацетам, в дозе 400 мг/кг не оказывал существенного влияния на процесс обучения условному питьевому рефлексу в Т-образном лабиринте (Таблица 2).

Таким образом, ГНГК способствовал оптимизации обучения крыс условным рефлексам с положительным и отрицательным подкреплением.

Таблица 2 – Влияние гидроксиникотиноилглутамат кальция на обучение крыс условному питьевому рефлексу в Т – образном лабиринте

	Время рефлекса (с)				
	Контроль (физ. р-р.)	ГНГК 10 мг/кг,	ГНГК 20 мг/кг,	ГНГК 30 мг/кг,	Пирацетам 400 мг/кг,
1	54,6	52,7	48,6	50,2	53,8
2	79,2	56,8	53,7	63,4	67,6
3	53,4	62,3	71,2	68,2	63,5
4	74,0	67,1	65,0	69,3	71,9
5	59,4	64,3	74,5	64,6	64,9
6	79,7	72,3	62,6	66,6	68,7
7	68,0	53,1	49,0	55,2	51,9
8	77,7	58,2	54,3	65,3	61,5
9	52,7	68,3	70,3	58,4	64,3
10	62,9	70,4	66,4	60,5	48,8
11	76,9	48,0	34,0 *	54,2	51,1
12	49,1	28,2 *	24,0 *	23,1 *	38,7
13	37,4	32,3	24,5 *	22,3 *	34,6
14	39,4	21,1 *	18,4 *	17,6 *	28,9
15	40,0	27,6	25,8	21,6 *	27,8
16	31,1	25,5	23,8	26,7	13,9 *
17	28,5	22,9	19,9	16,3	19,9
18	37,3	25,2 *	22,2 *	20,2 *	25,0
19	36,0	23,9	20,9	17,3 *	16,9 *
20	40,2	14,7*	16,7 *	17,7 *	19,8 *
21	25,9	15,6	10,8*	7,7 *	11,9
22	28,6	13,4 *	10,4 *	6,4 *	9,5 *

*Примечание - * - достоверность различий между группами животных при $P < 0,05$ (U Критерий Манна Уитни)*

3.1.1.3 Антиамнестический эффект гидроксиникотиноилглутамата кальция на модели амнезии условной реакции пассивного избегания, вызванной скополамином

В группе контрольных животных, получавших физиологический раствор, латентное время воспроизведения УРПИ составляло $112,6 \pm 23,0$ с, доля не зашедших в темную камеру крыс - 90%. Скополамин вызывал амнезию навыка, что проявлялось уменьшением латентного периода рефлекса ($26,6 \pm 6,3$ с), а доля животных, не зашедших в темную камеру установки, - 10% (Таблица 3). Гидроксиникотиноилглутамат кальция в исследованных дозах обладал

выраженными антиамнестическими свойствами на данной модели и при воспроизведении рефлекса через сутки после обучения достоверно увеличивал латентное время и количество животных, не зашедших в темную камеру. Пирацетам, введенный в дозе 250 и 500 мг/кг, достоверно увеличивал латентное время, но оказывал меньший эффект чем ГНГК в дозе 50 мг/кг (Таблица 3).

Таблица 3 – Антиамнестическое действие веществ на модели амнезии УРПИ, вызванной скопололамином

Вещество	Доза мг/кг	Латентное время рефлекса, (с)	Время, проведенное на освещенной площадке, (с)	Количество животных, не зашедших в темную камеру, %
Контроль (физ.р-р)	—	112,6 ±23,0	112,6 ±23,0	90
Контроль + скополамин	2	26,6 ± 6,3 [#]	26,6 ± 6,3 [#]	10 ^{&}
ГНГК + скополамин	10	80 ±14,6*	95,4 ± 14,6*	60 ^{\$}
ГНГК + скополамин	20	114 ±20,9*	126 ±20,9*	80 ^{\$}
ГНГК + скополамин	50	120,4 ±12,7*	110,7 ±10,3*	83 ^{\$}
Пирацетам+ скополамин	250	75,3 ±12,6*	75,7 ± 12,7*	34
Пирацетам+ скополамин	500	82,6 ± 9,9*	83,5 ±12,3*	57 ^{\$}

[#] - достоверность отличий от контроля без скополамина при $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни), [&] - достоверность отличий от контроля без скополамина при $P < 0,05$ (точный критерий Фишера), * - достоверность отличий от контроля со скопололамином при $P < 0,05$ (U-критерий Манна-Уитни); ^{\$} - достоверность отличий от контроля со скопололамином при $P < 0,05$ (точный критерий Фишера).

Таким образом, гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах 10, 20, 50 мг/кг при в/б введении обладает мощным антиамнестическим эффектом, предупреждая амнезию УРПИ, вызванную МЭШ или скопололамином. Пирацетам в этих условиях проявляет значительно меньшее действие.

3.1.2 Исследование токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция

3.1.2.1 Исследование острой токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция

Исследование токсичности субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутрибрюшинном, внутримышечном и внутривентрикулярном введении мышам линии BALB/c и крысам Wistar.

Проведенные исследования показали, что однократное внутрибрюшинное, внутримышечное или внутрижелудочное введение субстанции изучаемого препарата в диапазоне испытанных доз (120-180 мг/кг) не вызывает признаков интоксикации и изменений в поведении животных. Дальнейшее увеличение доз препарата до 240-420 мг/кг при внутрибрюшинном и внутримышечном способах введения мышам, а при введении в желудок в дозах более 520 мг/кг сопровождалось снижением двигательной активности и вялостью животных. В последующие часы указанные явления, вызванные введением больших доз препарата, нарастали и наблюдалась гибель животных. Данные экспериментов по изучению токсичности субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутрибрюшинном внутримышечном и внутрижелудочном способах введения мышам линии BALB/c на 1 этапе с использованием метода Деймана и ЛеБланка при назначении препарата в повышающихся дозах (Таблица 4).

Таблица 4 - Показатели токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутрибрюшинном, внутримышечном и внутрижелудочном введении мышам линии BALB/c (1-й этап исследований)

Пол животных	Исследуемые дозы, мг/кг, при внутрибрюшинном введении										
	120	180	280	420	820	940	1300	1500	1750	2000	2500
Самцы	-	-	-	-	-	-	X	X			
Самки	-	-	-	-	-	-	X	X			
	Исследуемые дозы, мг/кг, при внутримышечном введении										
Самцы	-	-	-	-	-	-	-	X	X		
Самки	-	-	-	-	-	-	-	X	X		
	Исследуемые дозы, мг/кг, при внутрижелудочном введении										
Самцы	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X
Самки	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	X

Примечание - X - гибель животных; - - отсутствие гибели животных.

На основании полученных данных показатели ориентировочных ЛД₅₀ при внутрибрюшинном, внутримышечном и внутрижелудочном способах введения гидроксиникотиноилглутамат кальция для самцов и самок мышей линии BALB/C составили 1300, 1500 и 1750 мг/кг. При этом не выявлено существенных половых различий в чувствительности мышей данной линии к токсическому действию препарата. Симптомы проявления интоксикации мышей при различных способах введения гидроксиникотиноилглутамат кальция были сходными. При внутрибрюшинном введении препарата явления интоксикации развивались быстрее, чем при внутримышечном и, особенно, по сравнению с внутрижелудочным введением. На втором этапе изучения токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция в развернутых экспериментах на группах мышей с

использованием метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкинсону были испытаны дозы в диапазоне 800-2200 мг/кг [39].

При статической обработке результатов проведенных исследований по оценке токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутривнутрибрюшинном, внутримышечном и внутрижелудочном способах введения мышам линии BALB/c были получены следующие результаты (Таблица 5).

Таблица 5 - Показатели токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном введении мышам линии BALB/c (2-й этап исследований)

Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
	ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД _{50+m}	ЛД ₈₄
Внутрибрюшинно				
Самцы	960	1010	1240±111	1530
Самки	935	985	1210±92	1500
Внутримышечно				
Самцы	1305	1380	1670±66	2115
Самки	1272	1350	1635±92	2080
Внутрижелудочно				
Самцы	1442	1512	1760±137	2080
Самки	1390	1460	1700±124	2015

При изучении токсичности субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция в опытах на крысах Wistar было установлено, что картина интоксикации этого вида животных большими дозами препарата заметно не отличается от описанной выше картины отравления мышей линии BALB/c. Параметры токсикометрии субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном введении крысам Wistar представлены в (Таблица 6).

Таблица 6 - Показатели токсичности субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном введении крысам Wistar

Пол животных	Показатели токсичности, мг/кг			
	ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД _{50+m}	ЛД ₈₄
Внутрибрюшинно				
Самцы	1240	1290	1526±131	1810
Самки	1185	1235	1460±154	1740
Внутримышечно				
Самцы		1520	1755±118	2040
Самки	1395	1445	1670±124	1950
Внутрижелудочно				
Самцы	1685	1750	2050±134	2365
Самки	1580	1645	1940±115	2260

Представленные в таблицах 5 и 6 данные свидетельствуют о низкой токсичности субстанции ампасе при однократном введении мышам линии BALB/c и крысам Wistar и об

отсутствии существенных видовых и половых различий в чувствительности указанных видов животных к токсическому действию препарата [39].

3.1.2.2 Исследование переносимости субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутривенном введении кроликам

Проведённые исследования показали, что гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 13,4 мг/кг не оказывает влияния на общее состояние и поведение кроликов. В условиях эксперимента при внутривенном введении кроликам препарата в дозе 13,4 мг/кг, не наблюдалось изменений гематологических показателей (Таблица 7).

Таблица 7 - Гематологические показатели кроликов, получавших внутривенно гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг

Исследуемые показатели	Периоды наблюдения		
	До введения	Через 4 часа	Через 24 часа
Эритроциты, 10^{12} /л	6,45±0,27	6,57±0,31	6,63±0,29
Гемоглобин, г/л	126±8	124±7	131±6
Гематокрит, %	36,84±1,26	34,71±0,94	34,92±1,11
Объем эритроцитов, фл	56±2	57±1	58±2
Содержание гемоглобина в эритроците, Пг	19,5±0,5	19,7±0,6	19,7±1,4
Лейкоциты, 10^9 /л	11,73±0,59	11,56±0,63	11,42±0,74
Лимфоциты, 10^9 /л	6,23±0,42	6,39±0,51	6,53±0,37
Моноциты-эозинофилы, 10^9 /л	0,54±0,08	0,51±0,06	0,52±0,05
Гранулоциты, 10^9 /л	4,36±0,13	4,59±0,18	4,43±0,12
Лимфоциты, %	61,4±6,3	59,7±5,4	58,9±6,1
Соотношение моноциты/эозинофилы, %	5,3±0,3	5,5±0,4	5,1±0,6
Гранулоциты, %	35,4±3,7	38,8±4,1	36,9±3,5
Тромбоциты, 10^9 /л	471±29	496±32	483±26
Объем тромбоцитов, фл	6,1±0,3	6,2±0,3	6,3±0,2

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Для оценки влияния внутривенного введения субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция на основные виды обмена и функциональное состояние внутренних органов исследовали ряд биохимических показателей и активность некоторых ферментов сыворотки крови подопытных животных.

Анализ полученных данных не обнаружил достоверных различий в сыворотке крови уровней общего холестерина, билирубина, триглицеридов, креатинина и мочевины как в ближайшие 4 часа после внутривенного введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг, так и в последующий период наблюдения, соответствующий 24 часам после внутривенной инъекции препарата (в соответствии с Таблица 8).

Таблица 8 - Биохимические показатели сыворотки крови кроликов при внутривенном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг

Периоды наблюдения		
До введения	Через 4 часа	Через 24 часа
Общий холестерин ммоль/л		
1,36±0,10	1,21±0,23	1,36±0,13
Общий билирубин, мкмоль/л		
3,63±0,23	3,49±0,32	3,85±0,39
Триглицериды ммоль/л		
1,30±0,25	1,28±0,29	1,82±0,39
Мочевина ммоль/л		
5,59±0,35	5,42±0,37	5,92±0,40
Креатинин мкмоль/л		
91,8±4,34	90,8±2,91	88,5±4,37

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Достоверные различия не были обнаружены по уровню общего белка и глюкозы в сыворотке крови подопытных животных на протяжении всего эксперимента (Таблица 9).

Таблица 9 - Уровень общего белка и глюкозы в сыворотке крови кроликов при внутривенном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг

Периоды наблюдения		
До введения (фон)	Через 4 часа	Через 24 часа
Общий белок, г/л		
64,8±2,24	63,0±4,35	62,2±4,66
Глюкоза, ммоль/л		
8,25±0,46	8,43±0,55	8,22±0,48

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Показатели активности «печеночных» ферментов сыворотки крови животных, подвергавшихся воздействию гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 13,4 мг/кг, не выходили за пределы физиологической нормы и допустимых колебаний, характерных для данного вида животных (в соответствии с Таблица 10).

Таблица 10 - Показатели активности ферментов сыворотки крови кроликов при однократном внутривенном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг

Периоды наблюдения		
До введения (фон)	Через 4 часа	Через 24 часа
Щелочная фосфатаза, ЕД/л		
431,2±21,6	447,5±19,2	427,1±27,1
Аланинаминотрансфераза, ЕД/л		
70,5±5,20	72,8±6,41	73,3±4,26
Аспаратаминотрансфераза, ЕД/л		
40,8±5,62	43,5±5,32	36,4±6,03
Лактатдегидрогеназа, ЕД/л		
279,4±29,8	284,3±35,0	262,0±28,1

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Результаты проведенных исследований показали, что однократное внутривенное введение кроликам субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг, в 20 раз превышающей рекомендованную для применения в клинике высшую терапевтическую дозу, хорошо переносится животными, и не оказывает существенного влияния на гематологические и биохимические показатели, а также на функциональное состояние внутренних органов [39].

3.1.2.3 Изучение токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутрижелудочном введении в условиях трехмесячного хронического эксперимента на крысах

В результате проведенных исследований установлено, что в условиях хронического эксперимента внутрижелудочное введение субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанных дозах 6,7 и 13,4 мг/кг не влияет на общее состояние и поведение крыс. Животные имели гладкий шерстный покров, охотно поедали корм, сохраняли обычную двигательную активность.

Масса тела крыс в подопытных группах, получавших препарат, в течение всего хронического эксперимента, существенно не отличалась от показателей в контроле (Таблица 11).

Таблица 11 - Динамика массы тела у крыс (% к исходной) при 3-месячном внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция

Группы животных Дозы	Периоды наблюдения	
	1 месяц	3 месяца
Самцы		
Контроль	110,9±2,0	135,6±3,6
ГНГК 6,7 мг/кг	113,4±5,7	143,8±6,9
ГНГК 13,4мг/кг	111,2±5,4	145,9±6,8
Самки		
Контроль	110,0±2,7	130,1±3,4
ГНГК 6,7 мг/кг	111,7±4,9	139,8±5,5
ГНГК 13,4 мг/кг	112,6±4,1	140,3±3,9

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

На протяжении хронического эксперимента не установлено статистически значимых различий гематологических показателей у животных, получавших гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанных 10- и 20-кратных высших терапевтических дозах, по сравнению с контролем (Таблицы 12,13).

Таблица 12 - Гематологические показатели у крыс-самцов при внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в течение 3 месяцев

	Контроль	Гидроксиникот иноилглутамат кальция 6,7 мг/кг	Гидроксиникотино илглутамат кальция 13,4 мг/кг

До введения			
Эритроциты, 10^{12} /л	8,50±0,61	7,82±0,45	8,40±0,69
Гемоглобин, г/л	144±6	141±3	141±5
Гематокрит, %	36,66±0,55	36,70±0,71	35,94±0,64
Объем эритроцитов, фл	46±3	45±2	47±2
Содержание гемоглобина в эритроците, ПГ	18,0±0,4	19,2±0,8	18,5±0,7
Лейкоциты, 10^9 /л	10,33±1,01	11,42±1,00	10,91±0,98
Лимфоциты, 10^9 /л	7,63±0,67	8,12±0,84	8,06±0,91
Моноциты-эозинофилы, 10^9 /л	0,66±0,13	0,60±0,11	0,58±0,10
Гранулоциты, 10^9 /л	4,31±0,22	3,87±0,20	3,99±0,25
Лимфоциты, %	62,3±3,0	64,6±4,9	60,0±4,0
Соотношение моноциты/эозинофилы, %	4,7±0,5	5,0±0,6	5,2±0,6
Гранулоциты, %	30,0±3,1	29,8±2,7	27,9±3,0
Тромбоциты, %	699±36	722±35	687±33
Объем тромбоцитов, фл	6,3±0,3	6,5±0,2	6,2±0,4
1 месяц			
Эритроциты, 10^{12} /л	8,45±0,34	8,38±0,34	7,75±0,40
Гемоглобин, г/л	148±3	147±5	140±5
Гематокрит, %	35,94±1,13	37,15±0,93	35,44±1,26
Объем эритроцитов, фл	45±2	44±2	46±2
Содержание гемоглобина в эритроците, ПГ	17,7±0,5	17,5±0,6	18,1±0,5
Лейкоциты, 10^9 /л	8,58±0,92	9,98±0,82	10,55±1,10
Лимфоциты, 10^9 /л	5,25±0,58	6,40±0,70	5,95±0,98
Моноциты-эозинофилы, 10^9 /л	0,58±0,09	0,62±0,13	0,61±0,08
Гранулоциты, 10^9 /л	3,86±0,08	3,81±0,12	4,02±0,16
Лимфоциты, %	59,6±4,5	63,3±4,1	61,0±5,3
Соотношение моноциты/эозинофилы, %	6,1±0,3	6,0±0,7	5,2±0,6
Гранулоциты, %	31,5±3,3	30,5±3,1	32,3±2,6
Тромбоциты, %	724±30	691±29	704±33
Объем тромбоцитов, фл	6,1±0,2	6,0±0,2	5,9±0,2
3 месяца			
Эритроциты, 10^{12} /л	8,55±0,48	7,74±0,47	7,72±0,50
Гемоглобин, г/л	146±4	134±7	136±4
Гематокрит, %	40,52±1,14	37,80±2,10	38,07±2,00
Объем эритроцитов, фл	48±1	48±2	48±2
Содержание гемоглобина в эритроците, ПГ	16,8±0,8	17,6±0,8	17,6±0,6
Лейкоциты, 10^9 /л	11,04±0,88	12,15±1,06	12,26±1,07
Лимфоциты, 10^9 /л	7,02±0,80	8,25±0,92	7,48±0,97
Моноциты-эозинофилы, 10^9 /л	0,95±0,04	0,87±0,09	0,87±0,08
Гранулоциты, 10^9 /л	3,57±0,81	4,62±0,34	4,31±0,46
Лимфоциты, %	63,2±5,7	64,3±6,2	66,1±3,6

Соотношение моноциты/эозинофилы, %	6,2±0,4	6,8±0,6	5,9±0,5
Гранулоциты, %	30,1±2,5	31,2±3,2	28,6±4,5
Тромбоциты, %	761±35	709±37	775±33
Объем тромбоцитов, фл	6,7±0,1	6,5±0,2	6,4±0,3

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Таблица 13 - Гематологические показатели у крыс-самок при внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в течение 3 месяцев

	Контроль	Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг	Гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг
До введения			
Эритроциты, 10^{12} /л	7,91±0,60	7,44±0,57	7,98±0,49
Гемоглобин, г/л	143±3	145±4	146±6
Гематокрит, %	37,00±0,61	35,92±0,88	36,90±0,74
Объем эритроцитов, фл	47±1	46±2	47±2
Содержание гемоглобина в эритроците, ПГ	18,9±0,4	18,7±0,3	18,2±0,6
Лейкоциты, 10^9 /л	9,70±0,92	10,00±0,55	9,89±0,77
Лимфоциты, 10^9 /л	7,21±0,52	8,11±0,47	8,13±0,65
Моноциты-эозинофилы, 10^9 /л	0,93±0,11	0,90±0,07	0,78±0,13
Гранулоциты, 10^9 /л	4,44±0,33	3,68±0,40	4,21±0,38
Лимфоциты, %	65,0±4,0	66,2±5,4	60,1±5,1
Соотношение моноциты/эозинофилы, %	4,8±0,4	5,0±0,4	5,1±0,3
Гранулоциты, %	29,3±2,1	31,5±2,6	28,9±2,0
Тромбоциты, %	702±37	734±34	700±33
Объем тромбоцитов, фл	6,1±0,3	6,0±0,3	6,4±0,3
1 месяц			
Эритроциты, 10^{12} /л	8,12±0,67	8,00±0,50	7,90±0,22
Гемоглобин, г/л	142±4	141±4	144±5
Гематокрит, %	36,23±0,95	35,80±1,18	36,82±1,11
Объем эритроцитов, фл	46±2	49±2	46±1
Содержание гемоглобина в эритроците, ПГ	18,2±2,7	19,0±0,8	19,4±0,7
Лейкоциты, 10^9 /л	9,85±0,77	10,32±1,07	10,51±1,23
Лимфоциты, 10^9 /л	7,44±0,67	8,21±0,70	9,00±1,09
Моноциты-эозинофилы, 10^9 /л	0,50±0,10	0,49±0,06	0,59±0,10
Гранулоциты, 10^9 /л	3,65±0,18	3,36±0,17	3,97±0,28
Лимфоциты, %	68,8±5,8	71,0±4,3	70,9±5,1
Соотношение моноциты/эозинофилы, %	5,2±0,6	4,9±0,6	4,7±0,6
Гранулоциты, %	27,2±3,5	29,4±2,9	31,6±3,3
Тромбоциты, %	682±37	730±40	713±31
Объем тромбоцитов, фл	6,0±0,5	5,9±0,4	5,9±0,3

	3 месяца		
	7,21±0,45	7,00±0,29	6,90±0,44
Эритроциты, 10 ¹² /л	7,21±0,45	7,00±0,29	6,90±0,44
Гемоглобин, г/л	140±4	142±3	140±4
Гематокрит, %	36,11±1,06	37,06±1,00	36,77±1,01
Объем эритроцитов, фл	57,0±3,7	53,2±1,9	53,4±1,7
Содержание гемоглобина в эритроците, ПГ	18,0±0,6	18,3±0,7	19,0±0,8
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	10,02±0,66	10,00±1,00	9,78±0,98
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	8,91±0,45	8,06±0,77	8,94±0,60
Моноциты-эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,90±0,10	0,74±0,08	0,90±0,09
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	4,11±0,25	3,72±0,33	4,02±0,28
Лимфоциты, %	70,2±4,8	67,0±4,7	72,3±5,9
Соотношение моноциты/эозинофилы, %	4,3±0,3	5,0±0,7	4,7±0,6
Гранулоциты, %	29,5±3,3	30,1±2,8	31,2±3,7
Тромбоциты, %	729±38	800±41	774±36
Объем тромбоцитов, фл	6,5±0,4	6,3±0,5	6,3±0,4

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

В условиях хронического опыта на крысах при внутрижелудочном введении препарата в дозах 6,7 мг/кг и 13,4 мг/кг не выявлено существенных изменений уровня общего белка в сыворотке крови, что указывает на стабильность белковообразующей функции печени. Полученные данные свидетельствуют о том, что длительное назначение крысам ампасе не влияет на белковый обмен в организме (Таблица 14).

Таблица 14 - Показатели уровня общего белка в сыворотке крови крыс при 3-месячном внутрижелудочном введении ГНГК

Периоды наблюдения	Группы животных		
	Контроль	ГНГК 6,7 мг/кг	ГНГК 13,4 мг/кг
Общий белок, г/л			
Самцы			
До введения	70,2±2,93	74,2±3,03	73,9±4,71
1 месяц	73,2±3,93	70,6±1,98	72,0±2,52
3 месяца	71,5±1,43	72,9±1,35	73,6±1,74
Самки			
До введения	70,7±4,03	71,2±5,03	72,2±3,93
1 месяц	71,3±4,10	70,4±2,10	71,8±3,81
3 месяца	72,6±3,81	73,6±3,50	70,5±3,91

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Отсутствие повреждающего действия длительного внутрижелудочного введения крысам ГНГК в испытанных дозах 6,7 и 13,4 мг/кг подтверждается стабильной активностью “печеночных” ферментов - аспартат - и аланинаминотрансфераз, лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы на протяжении всего 3-месячного хронического эксперимента. При этом показатели

активности указанных ферментов в сыворотке крови контрольных крыс и крыс групп, получавших ГНГК в дозах 6,7 и 13,4 мг/кг, не отличались друг от друга (Таблицы 15,16).

Таблица 15 - Показатели активности ферментов сыворотки крови крыс при 3-месячном внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция (самцы)

Периоды Наблюдения	Исследуемые группы животных		
	Контроль	гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг	гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг
Щелочная фосфатаза, ед/л			
До введения	733,2±53,9	743,2±43,3	753,2±51,0
1месяц	722,9±46,9	767,0±46,6	772,2±41,1
3месяца	701,1±52,6	733,8±32,4	767,7±29,0
Аланинаминотрансфераза, ед/л			
До введения	83,2±3,93	85,2±5,03	87,2±4,13
1месяц	82,5±6,68	87,4±4,05	78,8±4,39
3месяца	81,4±6,22	81,7±5,62	77,6±4,76
Аспаратаминотрансфераза, ед/л			
До введения	103,2±4,99	103,2±5,93	108,2±7,03
1месяц	110,9±4,89	104,8±3,95	109,1±4,57
3месяца	105,9±5,52	106,7±6,30	106,0±3,95
Лактатдегидрогеназа, ед/л			
До введения	673,2±43,9	703,2±46,3	703,2±37,0
1месяц	623,2±59,6	641,5±76,5	697,5±45,5
3месяца	725,5±55,0	692,4±75,8	701,0±49,9

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Таблица 16 - Показатели активности ферментов сыворотки крови крыс при 3-месячном внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция (самки)

Периоды Наблюдения	Исследуемые группы животных		
	Контроль	гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг	гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг
Щелочная фосфатаза, ед/л			
До введения	712,9±56,0	723,9±36,7	699,7±41,9
1 месяц	732,7±43,5	726,4±37,9	735,6±46,3
3 месяца	722,9±40,7	738,9±52,8	732,9±49,0
Аланинаминотрансфераза, ед/л			
До введения	90,7±5,08	88,1±7,65	91,5±4,53
1 месяц	89,5±5,13	90,3±6,68	92,5±4,27
3 месяца	91,3±4,27	89,5±3,92	92,5±7,01
Аспаратаминотрансфераза, ед/л			
До введения	113,9±5,89	104,7±6,77	111,5±4,73
1 месяц	106,8±7,61	110,3±8,73	112,4±5,19
3 месяца	114,1±9,06	103,9±5,16	114,9±6,99

Лактатдегидрогеназа, ед/л			
До введения	693,2±49,6	703,2±31,5	723,2±69,7
1 месяц	713,2±46,3	731,2±38,6	713,2±59,6
3 месяца	683,2±51,4	711,2±35,8	717,2±61,1

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Под влиянием длительного назначения крысам гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах 6,7 и 13,4 мг/кг не изменялось содержание общего билирубина в сыворотке крови по сравнению с контрольными животными (Таблица 17).

Таблица 17 - Содержание общего билирубина в сыворотке крови крыс при 3-месячном внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция

Периоды Наблюдения	Исследуемые группы животных		
	Контроль	гидроксиникотиноилг лутамат кальция 6,7 мг/кг	гидроксиникотиноилглут амат кальция 13,4 мг/кг
Билирубин, мкмоль/л			
Самцы			
До введения	5,28±0,11	5,58±0,23	5,33±0,15
1 месяц	5,48±0,19	5,20±0,21	5,26±0,28
3 месяца	5,57±0,16	5,40±0,24	5,48±0,26
Самки			
До введения	5,38±0,09	5,21±0,11	5,18±0,20
1 месяц	5,58±0,08	5,31±0,12	5,40±0,20
3 месяца	5,58±0,18	5,37±0,17	5,46±0,26

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Длительное назначение гидроксиникотиноилглутамат кальция крысам (самцам и самкам) в дозах 6,7 и 13,4 мг/кг не оказывало влияния на уровень глюкозы в сыворотке крови по сравнению с контрольными животными, что свидетельствует об отсутствии нежелательного действия препарата на углеводный обмен в печени и функциональное состояние поджелудочной железы (Таблица 18) [39].

Таблица 18 - Содержание глюкозы в сыворотке крови крыс при 3-месячном внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция

Периоды наблюдения	Исследуемые группы животных		
	Контроль	гидроксиникотиноилг лутамат кальция 6,7 мг/кг	гидроксиникотиноил глутамат кальция 13,4 мг/кг
Глюкоза, ммоль/ л			
Самцы			
До введения	10,8±0,09	10,4±0,11	10,2±0,08
1 месяц	10,6±0,19	10,2±0,13	10,7±0,17
3 месяца	10,2±0,18	10,1±0,18	10,5±0,12
Самки			
До введения	10,1±0,21	10,9±0,14	10,6±0,09
1 месяц	10,5±0,11	10,8±0,07	10,4±0,13

3 месяца	10,3±0,10	10,7±0,15	10,5±0,12
----------	-----------	-----------	-----------

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

На протяжении хронического эксперимента не зарегистрировано изменений уровня холестерина и триглицеридов в сыворотке крови крыс, получавших гидроксиникотиноилглутамат кальция внутрижелудочно в дозах 6,7 и 13,4 мг/кг, что подтверждает отсутствие влияния препарата на липидный обмен (Таблица 19).

Таблица 19 - Содержание общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови крыс при 3-месячном внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция

Периоды наблюдения	Группы животных		
	Контроль	гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг	гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг
Самцы			
Общий холестерин, ммоль/л			
До введения	1,48±0,09	1,58±0,06	1,51±0,08
1 месяц	1,67±0,08	1,59±0,07	1,64±0,08
3 месяца	1,61±0,09	1,56±0,07	1,67±0,11
Триглицериды, ммоль/л			
До введения	0,59±0,04	0,63±0,07	0,61±0,05
1 месяц	0,68±0,08	0,70±0,09	0,69±0,07
3 месяца	0,71±0,06	0,67±0,06	0,65±0,08
Самки			
Общий холестерин, ммоль/л			
До введения	1,51±0,09	1,55±0,11	1,49±0,17
1 месяц	1,54±0,12	1,50±0,06	1,53±0,08
3 месяца	1,50±0,16	1,56±0,14	1,58±0,19
Триглицериды, ммоль/л			
До введения	0,68±0,08	0,58±0,07	0,61±0,09
1 месяц	0,65±0,06	0,63±0,05	0,66±0,07
3 месяца	0,69±0,07	0,68±0,06	0,67±0,09

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Уровень креатинина и мочевины в сыворотке крови крыс в подопытных группах, подвергавшихся воздействию гидроксиникотиноилглутамат кальция, не изменялся на протяжении всего эксперимента (Таблица 20)

Таблица 20 - Уровень мочевины и креатинина в сыворотке крови крыс при 3-месячном внутрижелудочном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция

Периоды наблюдения	Исследуемые группы животных		
	Контроль	гидроксиникотин оилглутамат кальция 6,7 мг/кг	гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг
Самцы			
Мочевина, ммоль/л			
До введения	8,48±0,19	8,51±0,35	8,61±0,22

1месяц	8,50±0,37	8,64±0,22	8,74±0,36
3месяца	8,47±0,39	8,36±0,37	8,60±0,25
Креатинин, мкмоль /л			
До введения	75,4±6,19	73,8±7,08	79,7±5,33
1месяц	74,7±5,11	73,8±4,27	80,6±4,59
3месяца	75,1±4,60	75,6±3,98	72,0±7,85
Самки			
Мочевина, ммоль/л			
До введения	8,35±0,39	8,28±0,24	8,11±0,22
1месяц	8,28±0,21	8,28±0,34	8,52±0,25
3месяца	8,47±0,24	8,37±0,30	8,34±0,29
Креатинин, мкмоль /л			
До введения	73,0±3,99	75,1±4,11	76,4±4,21
1месяц	75,8±4,19	77,1±3,22	75,4±4,59
3месяца	75,3±3,11	74,0±3,19	73,8±3,87

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

Таким образом, проведенные исследования показали, что ежедневное внутрижелудочное введение гидроксиникотиноилглутамат кальция крысам Wistar в течение 3 месяцев в дозах 6,7 мг/кг и 13,4 мг/кг (10- и 20-кратные высшие терапевтические дозы, рекомендованные для человека) не влияет на общее состояние и поведение крыс, а также на гематологические и биохимические показатели животных [39].

В ходе патоморфологического исследования были сформированы следующие группы: макроскопического и микроскопического исследования. I группа – контроль (эту группу составили здоровые животные), самцы и самки; II группа – животным вводили гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг (самцы и самки). III группа – животным вводили гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг (самцы и самки). Результаты представлены в Приложении Б.

3.1.2.4 Исследование токсичности готовой лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутримышечном введении кроликам в условиях 1-месячного хронического эксперимента

В результате проведенных исследований установлено, что в условиях хронического эксперимента на кроликах при ежедневном внутримышечном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в готовой лекарственной форме в испытанной дозе 6,7 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза для человека) не оказывает существенного влияния на общее состояние и поведение животных. На протяжении хронического эксперимента не выявлено достоверных изменений массы тела и ректальной температуры у подопытных животных по сравнению с контролем (Таблица 21) [17].

Таблица 21 - Динамика массы тела и ректальной температуры у кроликов при 4-х недельном внутримышечном введении готовой лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг

Периоды наблюдения	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
<i>Масса тела, % к исходной</i>		
4 недели	106,8±4,0	108,1±4,3
<i>Ректальная температура, °С</i>		
До введения (фон)	38,6±0,3	38,5±0,4
4 недели	38,4±0,5	38,8±0,5

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

На протяжении хронического эксперимента не установлено статистически значимых различий в морфологическом составе периферической крови кроликов по сравнению с данными контрольных животных. Гематологические показатели подопытных кроликов, подвергавшихся воздействию гидроксиникотиноилглутамат кальция в готовой лекарственной форме в испытанной дозе 6,7 мг/кг, не выходили за пределы допустимых физиологических колебаний, характерных для данного вида животных (Таблица 22) [17].

Таблица 22 - Гематологические показатели у кроликов при внутримышечном в течение 4-х недель введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в готовой лекарственной форме

Исследуемые показатели	Периоды наблюдения	
	До введения	Через 4 недели
КОНТРОЛЬ		
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,06±0,31	6,10±0,21
Гемоглобин, г/л	129±4	131±3
Гематокрит, %	36,82±1,90	36,67±1,12
Объем эритроцитов, фл	57±2	61±2
Содержание гемоглобина в эритроците, пг	19,9±1,2	20,3±0,7
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	11,41±0,69	11,73±0,36
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	6,12±0,60	6,22±0,64
Моноциты/эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,37±0,04	0,46±0,06
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	4,00±0,36	3,70±0,35

Лимфоциты, %	67,2±5,5	72,8±7,0
Моноциты/ эозинофилы, %	4,2±0,4	4,8±0,4
Гранулоциты, %	36,5±4,0	34,2±3,9
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	506±31	487±33
Объем тромбоцитов, фл	6,5±0,4	6,4±0,4
Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг		
Эритроциты, 10 ¹² /л	5,96±0,32	5,92±0,26
Гемоглобин, г/л	128±6	131±5
Гематокрит, %	37,78±1,10	37,10±0,84
Объем эритроцитов, фл	58±3	63±2
Содержание гемоглобина в эритроците, пг	19,7±1,8	22,7±1,3
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	12,60±0,69	11,15±0,77
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	5,29±0,34	5,73±0,42
Моноциты/эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,40±0,09	0,49±0,11
Гранулоциты, 10 ⁹ /л	2,90±0,27	2,67±0,29
Лимфоциты, %	65,3±6,1	67,4±5,8
Моноциты/ эозинофилы, %	4,9±0,4	5,2±0,6
Гранулоциты, %	35,0±3,7	31,2±4,0
Тромбоциты, 10 ⁹ /л	510±36	471±34
Объем тромбоцитов, фл	6,6±0,5	6,7±0,3

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

При внутримышечном введении кроликам на протяжении 4-х недель хронического эксперимента готовая лекарственная форма гидроксиникотиноилглутамат кальция не влияла на уровень содержания общего белка сыворотки крови подопытных животных, что свидетельствует о стабильности белковообразующей функции печени и об отсутствии повреждающего действия препарата на данную функцию печени (Таблица 23) [17].

Таблица 23 - Содержание общего белка (г/л) в сыворотке крови кроликов при 4-х недельном внутримышечном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг

Периоды наблюдения	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7мг/кг
До назначения (фон)	67,0±5,26	69,3±3,86

4 недели	66,1±7,98	69,3±3,57
----------	-----------	-----------

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

Для выявления возможного повреждающего действия гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутримышечном введении животным в условиях хронического эксперимента на функциональное состояние печени исследовали активность щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аланин - и аспартатаминотрансфераз, а также уровень общего билирубина сыворотки крови кроликов.

Как показали проведенные исследования, в результате 4-х недельного хронического эксперимента не выявлено существенных изменений уровня общего билирубина и активности указанных ферментов сыворотки крови кроликов (Таблица 24) [17].

Таблица 24 - Показатели активности ферментов и содержания билирубина в сыворотке крови кроликов, получавших внутримышечно гидроксиникотиноилглутамат кальция в течение 4-х недель

Периоды Наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Общий билирубин, мкмоль/л		
Фон	2,35±0,45	3,25±0,49
4 недели	2,58±0,74	3,35±0,25
Щелочная фосфатаза, ед/л		
Фон	212,2±10,9	231,2±11,6
4 недели	218,7±4,28	217,4±11,5
Лактатдегидрогеназа, ед/л		
Фон	119,2±10,2	109,4±9,80
4 недели	112,8±8,83	100,8±14,8
Аспартатаминотрансфераза, ед/л		
Фон	18,6±4,20	24,4±6,03
4 недели	18,3±5,71	22,9±3,99
Аланинаминотрансфераза, ед/л		
Фон	67,2±13,2	71,4±15,2
4 недели	60,9±19,5	72,2±19,3

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

На протяжении 4-х недельного хронического эксперимента уровни мочевины и креатинина в сыворотке крови кроликов, подвергавшихся воздействию

гидроксинокотиноилглутамат кальция в лекарственной форме, соответствовали средним величинам, характерным для данного вида животных, и существенно не отличались от исходных показателей в начале эксперимента и от контроля. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии повреждающего действия изучаемого препарата на функцию почек (Таблица 25) [17].

Таблица 25 - Содержание мочевины и креатинина в сыворотке крови кроликов при 4-х недельном внутримышечном назначении гидроксинокотиноилглутамат кальция в лекарственной форме

Периоды наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксинокотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Мочевина, ммоль/л		
Фон	6,30±0,35	6,18±0,66
4 недели	6,31±0,20	6,68±0,39
Креатинин, мкмоль/л		
Фон	86,8±6,38	89,9±9,34
4 недели	84,2±7,70	87,5±4,13

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Для оценки влияния гидроксинокотиноилглутамат кальция на углеводный обмен у кроликов в условиях хронического эксперимента определяли содержание глюкозы в сыворотке крови подопытных животных. В результате проведенных исследований не было отмечено существенных изменений уровня глюкозы у кроликов, получавших в течение 4-х недель препарат, по сравнению с контрольными животными и с исходными параметрами до начала введения готовой лекарственной формы гидроксинокотиноилглутамат кальция (Таблица 26).

Таблица 26 - Уровень глюкозы (ммоль/л) в сыворотке крови кроликов при внутримышечном назначении готовой лекарственной формы гидроксинокотиноилглутамат кальция в течение 4-х недель

Периоды Наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксинокотиноилглутамат кальция 6,7мг/кг
Фон	8,20±0,65	8,15±0,36
4 недели	8,52±0,23	8,85±0,20

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Для изучения влияния гидроксинокотиноилглутамат кальция в лекарственной форме на липидный обмен у кроликов при 4-х недельном внутримышечном введении в дозе 6,7 мг/кг,

измеряли содержание общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови подопытных животных. Анализ полученных данных не выявил изменений уровня общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови кроликов, подвергавшихся воздействию изучаемого препарата, по сравнению с исходными показателями и данными контрольных животных (Таблица 27).

Таблица 27 - Показатели липидного обмена у кроликов при 4-х недельном внутримышечном введении кальция в лекарственной форме

Периоды наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Общий холестерин, ммоль/л		
Фон	1,02±0,09	1,07±0,22
4 недели	1,04±0,18	0,95±0,12
Триглицериды, ммоль/л		
Фон	0,95±0,09	1,09±0,08
4 недели	1,22±0,07	1,21±0,10

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что внутримышечное введение гидроксиникотиноилглутамат кальция кроликам в течение 4-х недель в дозе 6,7 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза для человека) не влияет на общее состояние и поведение животных. Гидроксиникотиноилглутамат кальция не изменяет гематологические показатели и, по данным использованных биохимических тестов, не влияет на функциональное состояние важнейших органов и систем организма подопытных животных.

Проведенное гистологическое исследование в сопоставлении группы контроля и группы, которой в течение 4-х недель производилось внутримышечное введение в дозе 6,7 мг/кг свидетельствует об отсутствии токсического повреждения внутренних органов животных и местнораздражающего действия под влиянием лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутримышечном введении кроликам в течение 4 недель в испытанной дозе 6,7 мг/кг. Таким образом, токсического действия лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг при 4-х недельном внутримышечном введении на внутренние органы животных не установлено [17].

3.1.2.5 Изучение токсичности готовой лекарственной формы препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутривенном введении кроликам в условиях 2-недельного субхронического эксперимента

В результате проведенных исследований установлено, что гидроксиникотиноилглутамат кальция в лекарственной форме в условиях субхронического эксперимента при ежедневном внутривенном введении в течение 2 недель кроликам в испытанной дозе 6,7 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза для человека) не оказывает существенного влияния на общее состояние и поведение животных. На протяжении субхронического эксперимента не выявлено достоверных изменений массы тела и ректальной температуры у подопытных животных по сравнению с контролем (Таблица 28).

Таблица 28 - Динамика массы тела и ректальной температуры у кроликов при 2-х недельном внутривенном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг

Периоды наблюдения	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
<i>Масса тела, % к исходной</i>		
2 недели	102,7±3,6	103,8±4,1
<i>Ректальная температура, °С</i>		
До введения (фон)	38,4±0,4	38,3±0,3
2 недели	38,5±0,4	38,7±0,4

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

При исследовании морфологического состава периферической крови кроликов, получавших гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг не отмечено изменений под влиянием препарата по сравнению с контролем (Таблица 29).

Таблица 29 - Гематологические показатели у кроликов при внутривенном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в течение 2-х недель

Исследуемые показатели	Периоды наблюдения	
	Контроль	Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
До введения		
Эритроциты, 10 ¹² /л	6,73±0,32	6,50±0,30
Гемоглобин, г/л	130±6	129±5
Гематокрит, %	36,18±2,53	36,09±2,74
Объем эритроцитов, фл	57±3	56±2
Содержание гемоглобина в эритроците, пг	19,8±1,4	19,9±1,1
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	10,32±0,36	10,20±0,90
Лимфоциты, 10 ⁹ /л	6,49±0,81	6,60±0,70
Моноциты/эозинофилы, 10 ⁹ /л	0,29±0,05	0,27±0,04

Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	$3,15 \pm 0,18$	$3,02 \pm 0,16$
Лимфоциты, %	$63,5 \pm 4,8$	$60,0 \pm 5,6$
Моноциты/ эозинофилы, %	$1,8 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,2$
Гранулоциты, %	$35,8 \pm 4,7$	$37,5 \pm 4,3$
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	507 ± 31	517 ± 34
Объем тромбоцитов, фл	$6,5 \pm 0,5$	$6,6 \pm 0,6$
2 недели		
Эритроциты, $10^{12}/\text{л}$	$6,46 \pm 0,37$	$6,60 \pm 0,50$
Гемоглобин, г/л	131 ± 6	129 ± 7
Гематокрит, %	$37,18 \pm 1,49$	$38,58 \pm 1,27$
Объем эритроцитов, фл	58 ± 3	59 ± 3
Содержание гемоглобина в эритроците, пг	$19,6 \pm 0,7$	$19,4 \pm 0,8$
Лейкоциты, $10^9/\text{л}$	$10,53 \pm 1,16$	$10,47 \pm 1,20$
Лимфоциты, $10^9/\text{л}$	$6,73 \pm 0,81$	$7,13 \pm 0,70$
Моноциты/эозинофилы, $10^9/\text{л}$	$0,30 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,03$
Гранулоциты, $10^9/\text{л}$	$3,17 \pm 0,19$	$3,08 \pm 0,10$
Лимфоциты, %	$67,5 \pm 5,8$	$69,3 \pm 5,7$
Моноциты/эозинофилы, %	$4,9 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,3$
Гранулоциты, %	$35,1 \pm 5,2$	$33,5 \pm 3,0$
Тромбоциты, $10^9/\text{л}$	495 ± 35	486 ± 31
Объем тромбоцитов, фл	$6,5 \pm 0,4$	$6,5 \pm 0,3$

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

При в/в введении кроликам на протяжении 2-х недель субхронического эксперимента гидроксиникотиноилглутамат кальция не влиял на уровень содержания общего белка сыворотки крови подопытных животных, что свидетельствует о стабильности белковообразующей функции печени и об отсутствии повреждающего действия препарата на данную функцию печени (Таблица 30).

Таблица 30 - Содержание общего белка (г/л) в сыворотке крови кроликов при 2-х недельном внутривенном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг

Периоды наблюдения	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
До назначения (фон)	$70,0 \pm 4,26$	$72,2 \pm 4,66$

2 недели	72,4±4,86	72,2±3,78
----------	-----------	-----------

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

Для выявления возможного повреждающего действия гидроксиникотиноилглутамат кальция при в/в введении животным в условиях субхронического эксперимента на функциональное состояние печени исследовали активность щелочной фосфатазы, лактатдегидрогеназы, аланин - и аспартатаминотрансфераз, а также уровень общего билирубина сыворотки крови кроликов.

Как показали проведенные исследования, в результате 2-х недельного субхронического эксперимента не выявлено существенных изменений уровня общего билирубина и активности указанных ферментов сыворотки крови кроликов (Таблица 31) [17].

Таблица 31 - Показатели активности ферментов и содержания билирубина в сыворотке крови кроликов, получавших внутривенно гидроксиникотиноилглутамат кальция в течение 2-х недель

Периоды Наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Общий билирубин, мкмоль/л		
Фон	3,35±0,65	3,85±0,69
2 недели	3,45±0,39	3,69±0,24
Щелочная фосфатаза, ед/л		
Фон	412,2±20,9	431,2±21,6
2 недели	428,8±26,6	425,6±26,6
Лактатдегидрогеназа, ед/л		
Фон	419,2±40,8	449,4±49,8
2 недели	433,4±43,3	487,4±41,6
Аспартатаминотрансфераза, ед/л		
Фон	28,6±4,00	26,4±3,03
2 недели	25,4±2,06	30,2±5,88
Аланинаминотрансфераза, ед/л		
Фон	77,2±4,20	70,5±5,20
2 недели	76,1±5,88	81,9±9,16

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

На протяжении 2-х недельного субхронического эксперимента уровни мочевины и креатинина в сыворотке крови кроликов, подвергавшихся воздействию

гидроксиникотиноилглутамат кальция, соответствовали средним величинам, характерным для данного вида животных, и существенно не отличались от исходных показателей в начале эксперимента и от контроля. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии повреждающего действия изучаемого препарата на функцию почек (Таблица 32).

Таблица 32 - Содержание мочевины и креатинина в сыворотке крови кроликов при 2-х недельном назначении гидроксиникотиноилглутамат кальция

Периоды наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Мочевина, ммоль/л		
Фон	4,30±0,35	4,68±0,45
2 недели	4,48±0,48	4,62±0,41
Креатинин, мкмоль/л		
Фон	89,8±3,38	91,8±4,34
2 недели	90,5±3,75	93,1±2,50

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

Для оценки влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на углеводный обмен у кроликов в условиях субхронического эксперимента определяли содержание глюкозы в сыворотке крови подопытных животных. В результате проведенных исследований не было отмечено существенных изменений уровня глюкозы у кроликов, получавших в течение 2-х недель препарат, по сравнению с контрольными животными и с исходными параметрами до начала введения готовой лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамат кальция (Таблица 33).

Таблица 33 - Уровень глюкозы (ммоль/л) в сыворотке крови кроликов при назначении готовой лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамат кальция в течение 2-х недель

Периоды Наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Фон	8,40±0,45	8,45±0,46
2 недели	8,07±0,47	8,26±0,30

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

Для изучения влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на липидный обмен у кроликов при 2-х недельном назначении в дозе 6,7 мг/кг, измеряли содержание общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови подопытных животных. Анализ полученных

данных не выявил изменений уровня общего холестерина и триглицеридов в сыворотке крови кроликов, подвергавшихся воздействию изучаемого препарата, по сравнению с исходными показателями и данными контрольных животных (Таблица 34).

Таблица 34 - Показатели липидного обмена у кроликов при 2-х недельном внутривенном назначении готовой лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамат кальция

Периоды наблюдения	Группы животных	
	1. Контроль	2. Гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Общий холестерин, ммоль/л		
Фон	1,22±0,12	1,17±0,22
2 недели	1,23±0,15	1,13±0,21
Триглицериды, ммоль/л		
Фон	0,75±0,07	0,80±0,06
2 недели	0,88±0,08	0,90±0,09

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что в/в введение гидроксиникотиноилглутамат кальция кроликам в течение 2-х недель в дозе 6,7 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза для человека) не влияет на общее состояние и поведение животных. Гидроксиникотиноилглутамат кальция не изменяет гематологические показатели и по данным биохимических тестов не влияет на функциональное состояние важнейших органов и систем организма подопытных животных [17].

По данным макроскопического исследования токсического и местнораздражающего действия гидроксиникотиноилглутамат кальция в готовой лекарственной форме при внутривенном введении в течение 2-х недель в дозе 6,7 мг/кг у данной группы животных не выявлено. Проведенное патоморфологическое исследование внутренних органов кроликов после двухнедельного внутривенного введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в готовой лекарственной форме в дозе 6,7 мг/кг не выявило токсического действия препарата. При гистологическом исследовании краевых вен уха кролика – мест введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 6,7 мг/кг не установлено местнораздражающего действия препарата. Данные гистологических исследований свидетельствуют об отсутствии токсического действия гидроксиникотиноилглутамат кальция на организм кроликов при его внутривенном введении в течение 2-х недель в испытанной дозе 6,7 мг/кг.

3.1.2.6 Исследование мутагенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция

Изучение мутагенных свойств позволяет оценить способность веществ вызывать разные типы мутаций в зародышевых и соматических клетках. Некоторые лекарственные препараты могут обладать мутагенными свойствами, что делает их потенциально опасными. Такие препараты могут быть частью необходимого лечения и иметь значительные преимущества, но также могут вызывать долгосрочные негативные последствия. Изучение мутагенных свойств разрабатываемых лекарственных препаратов является необходимой задачей. Одним из основных факторов являются химические соединения, которые могут увеличивать частоту спонтанных мутаций. Мутагены могут воздействовать на разные участки генома, что подчеркивает необходимость комплексного тестирования. Невозможность однозначно определить источник мутации создает проблемы для фармакологов. Для изучения мутагенных свойств использовались следующие методы:

1. Учет генных мутаций на микроорганизмах в тесте Эймса;
2. Учет доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей;
3. Учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих;

Мутации могут быть спонтанными и вызванными внешними факторами. Следует проводить изучение мутагенов с использованием нескольких различных тест-систем. Это позволяет оценивать уровень мутагенности препаратов. Исследования с использованием теста Эймса и учета хромосомных aberrаций, подтверждают необходимость применения нескольких методов для выявления мутаций и их типов. Ограничиваясь лишь одним методом, ученые могут упустить важные результаты, которые способны влиять на окончательные выводы.

Существует влияние метаболической активации на мутагенную активность веществ. Ткани и организмы обладают различными уровнями репарации и способности к восстановлению ДНК. Химические соединения могут изменять свои свойства в зависимости от условий внутри организма. Комплексный подход при тестировании мутагенности лекарственных препаратов позволяет обеспечить более точные и достоверные результаты, что в конечном счете гарантирует безопасность для пациентов.

Изучение мутагенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция на микроорганизмах в тесте Эймса.

Бактериальные штаммы увеличивали число ревертантов под действием вещества, взятого в качестве положительного контроля. В то же время исследуемый препарат не вызывал достоверного увеличения числа ревертантов (Таблицы 35-37).

Таблица 35 - Действие гидроксиникотиноилглутамат кальция на индикаторный штамм бактерий ТА 98 в тесте Эймса

Исследуемое вещество	Доза мкг на чашку	Штамм ТА 98	
		-S9	+S9

		Mi			M	M ₀ /M _k	MA	Mi			M	M ₀ /M _k	MA
Контроль H ₂ O	100	22	20	22	21,3		-	26	30	24	26,6		-
2AA	20							990	1188	1089	1086	40,9	+
4NQO	0,5	724	760	792	758	35,6	+						
Гидрокси никотиноил- глутамат кальция	0,14	22	20	17	19,6	0,92	-	32	25	38	31,2	1,17	-
	1,4	21	20	13	17,6	0,83	-	22	22	38	26,4	0,99	-
	14,0	22	22	19	20,9	0,98	-	25	30	21	25,1	0,94	-
	140,0	26	26	30	27,3	1,28	-	19	30	18	21,7	0,82	-
	1400,0	29	31	36	31,9	1,49	-	19	17	17	17,6	0,66	-

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Таблица 36 - Действие гидроксиникотиноилглутамат кальция на индикаторный штамм бактерий TA 100 в тесте Эймса

Исследуемое вещество	Доза мкг на чашку	Штамм TA 100											
		-S9						+S9					
		Mi			M	M ₀ /M _k	MA	Mi			M	M ₀ /M _k	MA
Контроль H ₂ O	100	74	71	69	71,3		-	75	100	90	87,7		-
2AA	20							237 6	258 4	271 5	255 4	29,1	+
Азид Na	2,0	105 6	158 4	99 0	118 3	16,6	+						
Гидрокси никотиноил- глутамат кальция	0,14	67	64	70	67,0	0,94	-	72	75	75	74,0	0,84	-
	1,4	63	68	66	65,6	0,92	-	74	76	66	71,9	0,82	-
	14,0	64	53	56	57,5	0,81	-	61	75	67	67,4	0,77	-
	140,0	70	61	57	62,4	0,87	-	75	82	82	79,6	0,91	-
	1400,0	75	60	59	64,3	0,90	-	62	63	74	66,1	0,75	-

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Таблица 37 - Действие гидроксиникотиноилглутамат кальция на индикаторный штамм бактерий TA 1537 в тесте Эймса

Исследуемое вещество	Доза мкг на чашку	Штамм TA 1537											
		-S9						+S9					
		Mi			M	M ₀ /M _k	MA	Mi			M	M ₀ /M _k	MA
Контроль H ₂ O	100	5	5	8	5,85		-	10	11	9	9,97		-
2AA	20							14 4	14 8	151	148	14,8	+
9AA	100	>1000 0	>100 00	>100 00	>1000 0	>171 0	+						
ГНГК	0,14	5	6	4	4,93	0,84	-	6	9	6	6,87	0,69	-
	1,4	6	4	8	5,77	0,99	-	9	9	6	7,86	0,79	-
	14,0	5	5	5	5,00	0,85	-	4	5	8	5,43	0,54	-
	140,0	5	9	9	7,40	1,26	-	13	7	8	9,00	0,90	-
	1400,0	8	10	5	7,37	1,26	-	17	15	6	11,5	1,16	-

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Примечание - M_i – число ревертантов на чашку, M – среднее геометрическое, M_0/M_k – отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле, МА – мутагенная активность: «+» - наличие активности, «-» - отсутствие активности.

Из представленных выше данных можно сделать вывод о том, что гидроксиникотиноилглутамат кальция в концентрациях 0,14-1400 мкг/чашку не вызывает увеличения количества ревертантов у штаммов *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1537, т.е. не обладает мутагенным действием в тесте Эймса.

Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на индукцию доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей

В рамках настоящего исследования был проведён анализ мутагенных свойств кальция гидроксиникотиноилглутамата на гибридных мышах первого поколения (F1) с генотипом (СВА х С57В16). Основная цель исследования заключалась в определении способности данного препарата индуцировать увеличение числа летальных мутаций в половых клетках самцов на различных стадиях сперматогенеза.

Метод доминантных летальных мутаций, разработанный на основе наблюдений за генетическими изменениями в половых клетках, подверженных воздействию мутагенов, является одним из наиболее информативных подходов для оценки мутагенного потенциала химических соединений и лекарственных препаратов. Впервые данный метод был применён для изучения мутагенеза у млекопитающих в 1937 году Brenneke. Впоследствии Kaplan и Lyon (1953), и Russel et al. (1954) усовершенствовали методику, предложив использовать её для скрининга мутагенов. В 1966 году Bateman предложил адаптировать тест для оценки мутагенности химических веществ. С тех пор данный метод стал неотъемлемой частью генетических исследований, включая оценку мутагенности новых фармакологических препаратов, в том числе в России.

В рамках эксперимента самцы подвергались воздействию испытуемого вещества, что приводило к возникновению доминантных летальных мутаций в их сперматозоидах. Затем обработанных самцов скрещивали с интактными самками. На определённых этапах беременности самок подвергали эвтаназии, а зародыши извлекали для последующего анализа. Для оценки мутагенного эффекта на различных стадиях сперматогенеза самок периодически заменяли.

Однако следует отметить, что данный метод имеет определённые ограничения. Результаты оценки гибели сравнивали с контрольными данными, полученными в аналогичных условиях. При обработке результатов необходимо учитывать активность систем репарации ДНК, которые могут снижать мутагенные эффекты как в сперматозоидах, так и в ооцитах. Метод

проводили на гибридах F1, полученных от специально отобранных линий мышей, что позволило минимизировать генетические вариации, влияющие на результаты.

Для обеспечения достоверности полученных данных, исследования проводились на большом количестве животных. Результаты анализировались с использованием статистических методов, что позволило повысить надёжность выводов.

Доминантные летальные мутации представляют собой генетические изменения в половых клетках родителей. Эти мутации приводят к гибели первого поколения потомков на ранних стадиях эмбрионального развития. Эти мутации чаще всего связаны с хромосомными aberrациями и генными мутациями. Мутагенный эффект проявляется в виде повышенной смертности эмбрионов. Если яйцеклетка была оплодотворена сперматозоидом, несущим доминантную летальную мутацию, гибель эмбриона может наступить до или после имплантации. При оценке мутагенности ампасе учитывали постимплантационную смертность (Таблица 38).

Таблица 38 - Результаты изучения способности гидросиникотиноилглутамат кальция индуцировать доминантные летальные мутации в зародышевых клетках мышей

Стадия сперматогенеза	Доза мкг/кг	Всего самок	Число беременных самок	% беременных самок	Постимплантационные потери	χ^2
Зрелые спермии	0	45	31	69	0,047	-
	гидросиникотиноилглутамат кальция 33,5 мг/кг	45	31	69	0,024	
Поздние сперматиды	0	45	36	80	0,085	-
	гидросиникотиноилглутамат кальция 33,5 мг/кг	45	30	67	0,026	
Ранние сперматиды	0	45	32	71	0,058	-
	гидросиникотиноилглутамат кальция 33,5 мг/кг	45	32	71	0,039	

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Как видно из таблицы 38, на разных стадиях сперматогенеза уровень постимплантационных потерь у животных, подвергавшихся воздействию гидросиникотиноилглутамат кальция, однократно, внутрибрюшинно, в дозе 33,5 мг/кг, равной 50-кратной высшей терапевтической для человека (0,67 мг/кг), ни в одном случае статистически достоверно не превышает показателей у контрольных животных, χ^2 в связи с этим не определяли.

Исследование цитогенетической активности гидросиникотиноилглутамат кальция методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей.

Цитогенетические исследования играют важную роль в оценке генотоксичности химических веществ и лекарственных препаратов. Одним из методов, используемых для оценки цитогенетической активности, является анализ хромосомных aberrаций. В данном исследовании был проведен анализ хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей под действием определенного гидроксиникотиноилглутамат кальция. Представлены данные по действию гидроксиникотиноилглутамат кальция на хромосомы костного мозга мышей линии F₁(СВА х С₅₇В1₆) (Таблица 39).

Таблица 39 - Учет структурных нарушений хромосом в клетках костного мозга мышей при действии гидроксиникотиноилглутамат кальция

Вариант опыта	№	Количество клеток		Аберрации					Доля клеток с аберрациями
		Исследовано	С аберрациями	Фрагменты		Обмены	Множест	Пробелы	
				Одиноч.	Парные				
ГНГК 33,5 мг/кг, Однократно Экспозиция 24 часа	1	100	0	0	0	0	0	0	0
	2	100	1	1	0	0	0	0	1,0
	3	100	1	0	0	0	0	1	1,0
	4	100	0	0	0	0	0	0	0
	5	100	0	0	0	0	0	0	0
Итого		500	2	1	0	0	0	1	0,4±0,2
ГНГК 6,7 мг/кг, 5-тикратно Экспозиция 6 часов	1	100	1	1	0	0	0	0	1,0
	2	100	0	0	0	0	0	0	0
	3	100	1	1	0	0	0	0	1,0
	4	100	1	1	0	0	0	0	1,0
	5	100	0	0	0	0	0	0	0
Итого		500	3	3	0	0	0	0	0,6±0,5
Контроль, Физиологический р-р	1	100	0	0	0	0	0	0	0
	2	100	1	0	0	0	0	1	1,0
	3	100	1	1	0	0	0	0	1,0
	4	100	1	1	0	0	0	0	1,0
	5	100	0	0	0	0	0	0	0
Итого		500	3	2	0	0	0	1	0,6±0,5

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

Как видно из приведенных экспериментальных данных, статистически достоверных различий в уровне хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей, подвергавшихся воздействию изучаемого препарата в испытанных дозах по сравнению с контролем, не установлено.

Следовательно, по примененному тесту учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих гидроксиникотиноилглутамат кальция не обладает мутагенной активностью.

Исследования мутагенности гидроксиникотиноилглутамат кальция показали, что:

- гидроксиникотиноилглутамат кальция в концентрациях 0,14 - 1400 мкг/чашку не обладает мутагенным действием в тесте Эймса;
- гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутрибрюшинном введении в дозе 33,5 мг/кг, равной 50-кратной высшей терапевтической дозе для человека, не вызывает индукцию доминантных леталей у мышей-гибридов первого поколения F1(CBA x C57Bl6);
- гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутрибрюшинном введении в испытанных дозах 33,5 и 6,7 мг/кг не увеличивает уровень хромосомных aberrаций в костном мозге у мышей-гибридов первого поколения F1(CBA x C57Bl6).

Таким образом, на основании проведенных исследований можно сделать вывод, что гидроксиникотиноилглутамат кальция не обладает мутагенным действием.

3.1.2.7 Исследование эмбриотоксических и тератогенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция

Эмбриотоксичность и тератогенность препаратов могут существенно влиять на развитие плода, что в свою очередь может вызвать серьезные патологии и пороки развития. Эмбриотоксичность определяется как способность химического вещества или препарата оказывать отрицательное воздействие на развивающийся эмбрион и зародыш. Это может выражаться в нарушении нормального процесса его развития, что иногда приводит к гибели эмбриона или рождению плодов с различными аномалиями. Эмбриотоксичные препараты могут нарушать деление и дифференциацию клеток, негативно влияя на формирование основных органов и систем. Тератогенность, в свою очередь, предполагает наличие у препарата способности вызывать различные пороки развития, или тератогенные эффекты, у плода. Пороки могут быть как врождёнными аномалиями, так и функциональными расстройствами, связанными с неправильным формированием органовых систем в результате воздействия тератогенных факторов на определенных этапах пренатального развития. Это особенно опасно в первые 8-12 недель беременности, когда происходит самый активный процесс органогенеза. В условиях растущей популярности фармакотерапии среди беременных женщин, задача безопасного применения лекарственных средств становится особенно актуальной, поскольку не всегда возможно предсказать, как тот или иной препарат повлияет на развивающийся организм. Данное исследование нацелено на уменьшение рисков, связанных с использованием гидроксиникотиноилглутамат кальция у беременных женщин и на обеспечение их здоровья и здоровья будущих детей.

Исследования показали, что прибавка массы тела беременных крыс подопытной группы не отличалась от показателей контрольной группы (Таблица 40).

Таблица 40 - Динамика массы тела беременных крыс (% от исходной)

Группы животных	1 неделя	2 неделя	3 неделя
Контроль	109,5±0,8	116,7±1,5	129,4±2,5
Гидроксинокотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг	111,3±1,2	118,3±1,6	131,7±3,5

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Такие критерии оценки эмбриотоксичности, как продолжительность беременности, количество живых плодов, мест имплантации и желтых тел, массы тела эмбрионов и их кранио-каудальный размер у беременных крыс, получавших препарат в исследуемой дозе 6,7 мг/кг, статистически достоверно не отличались от соответствующих показателей у животных контрольной группы. Показатели пред- и постимплантационной гибели в опытной группе также не превышали показателей в контроле (Таблица 41) [17].

Таблица 41 - Показатели эмбриотоксического действия гидроксинокотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг при внутримышечном введении крысам с 1 по 19 сутки беременности

Исследуемые показатели	1. Контроль	2. Гидроксинокотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг
Продолжительность беременности. (сутки)	23,0±0,4	23,1±0,2
Количество желтых тел на 1 крысу	9,8±0,6	10,2±1,2
Количество мест имплантации на 1 крысу	8,6±0,8	9,3±1,0
Количество эмбрионов на 1 крысу	7,9±1,0	8,5±1,5
Количество резорбций на 1 крысу	1,0±0,3	0,6±0,3
Предимплантационная гибель, %	12,2	8,8
Постимплантационная гибель, %	8,1	8,6
Кранио-каудальный размер плода, см	3,3±0,2	3,3±0,1
Масса плода, г	3,2±0,1	3,0±0,2

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

При макроскопическом осмотре и микроанатомическом исследовании (стандартные разрезы по Вильсону-Дыбану) плодов, подвергавшихся в пренатальном периоде воздействию гидроксинокотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 6,7 мг/кг, не выявлено каких-либо уродств или пороков развития внутренних органов. Частота такой патологии, как внешние гематомы, гематомы в ткани тела, гидронефроз, кровоизлияния в брюшную полость и перикард в группе крыс, получавших во время беременности препарат, достоверно не отличались от показателей контрольных животных (Таблица 42) [17].

Таблица 42 - Аномалии развития и кровоизлияния у плодов на 20 сутки пренатального периода

Исследуемые показатели	Группы животных	
	1.Контроль	2.Гидроксиникотиноил-глутамат кальция, 6,7 мг/кг.
Внешние гематомы, абс.	0	1
Кровоизлияние в брюшную полость, абс.	0	0
Общий отек эмбриона, абс.	0	0
Гематома в ткани тела, абс.	0	0
Гидронефроз, абс.	0	0
Кровоизлияние в перикард, абс.	1	1

Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$

При анализе тотальных препаратов, окрашенных ализарином, для изучения развития костной системы у крысиных плодов, подвергавшихся в пренатальном периоде воздействию гидроксиникотиноилглутамат кальция, не выявлено пороков развития скелета. Задержка оссификации не определилась ни по одной из исследуемых точек (Таблица 43) [17].

Таблица 43 - Показатели развития костного скелета плодов на 20-е сутки пренатального развития

Отсутствие центров оссификации в скелетах плодов	Группы животных	
	1.Контроль	2.Гидроксиникотиноил-глутамат кальция 6,7 мг/кг
Грудина, абсолютное количество на помет	1	0
Подъязычная кость, %	0	0
Передняя конечность, %		
2-я пястная кость	0	0
3-я пястная кость	1(0,9)	0
4-я пястная кость	3(2,7)	2(4,1)
Задняя конечность, %		
2-я плюсневая кость	0	0
3-я плюсневая кость	0	0
4-я плюсневая кость	4(3,6)	3(6,2)
Кости туловища, %		
седалищная	0	0

Подвздошная	1(0,9)	0
Лонная	2(1,8)	0

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

При внутримышечном введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг с 1 по 19 день беременности крысам не установлено влияния препарата на количество родившихся крысят. Динамика массы тела крысят на протяжении первого месяца жизни не отличалась от соответствующих показателей в контроле. Показатели смертности крысят, подвергавшихся в пренатальном периоде развития воздействию исследуемого препарата в изучаемой дозе, так же не отличались от контрольных (в соответствии с Таблица 50). Развитие потомства в течение всего периода наблюдения по другим принятым параметрам (покрытие шерстью, появление резцов, открытие глаз, отлипание ушных раковин, открытие вагины, опускание яичек, время созревания рефлексов и др.) происходило без отклонения от сроков, характерных для нормального физиологического развития животных этого вида (Таблица 44) [17].

Таблица 44 - Показатели постнатального развития крысят, подвергавшихся в пренатальном периоде (1-19 сутки беременности) воздействию гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг

Исследуемые показатели	Группы животных	
	1.Контроль	2.Гидроксиникотиноил-глутамат кальция, 6,7 мг/кг
Количество родившихся крысят на 1 крысу	7,6±1,5	8,6±1,5
Постнатальная смертность, %	2,9	2,8
Масса тела крысят, г		
при рождении	5,1±0,3	5,7±0,4
7 сутки жизни	15,7±0,8	14,1±0,8
14 сутки жизни	22,3±2,2	24,8±1,0
21 сутки жизни	35,9±1,4	37,2±1,9
28 сутки жизни	48,3±2,9	49,7±3,2

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

В заключение следует отметить, что гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 6,7 мг/кг (10-кратная максимальная терапевтическая доза для человека) при внутримышечном введении беременным крысам с 1 по 19 день гестации не влияет на динамику массы тела беременных крыс и продолжительность беременности. Не установлено влияния препарата на показатели эмбриотоксичности препарата (количество живых плодов, показатели

пред- и постимплантационной гибели, масса тела эмбрионов, их кранио-каудальный размер и др.) и постнатальное развитие крысят. Гидроксиникотиноилглутамат кальция в высоких дозах не обладает выраженными эмбриотоксическими и тератогенными свойствами, особенно в ключевые моменты пренатального развития [17].

3.1.2.8 Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на репродуктивную функцию крыс

В последние десятилетия частота нарушений репродуктивной функции у млекопитающих, включая человека, выросла. Внешние факторы, включая химические вещества и фармакологические препараты, могут негативно влиять на репродуктивную систему. Крысы представляют собой удобную модель для таких исследований. Они схожи физиологически с человеком и высоко чувствительны к различным веществам.

При исследовании показателей плодовитости крыс не выявлено различий в обеих опытных группах по сравнению с контрольной группой (Таблица 45).

Таблица 45 - Показатели плодовитости животных, получавших гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг

Исследуемые показатели	Группы животных		
	1.Контроль	2.Гидроксиникотин оилглутамат кальция (вводили самкам)	3.Гидроксиникотиноил-глутамат кальция (вводили самцам)
1. Количество ссаженных самок, абс.	20	20	20
2. Количество оплодотворенных самок, абс.	15	16	15
3. Количество беременных самок, абс.	12	12	13
4. Индекс плодовитости, %.	75	80	75
5. Индекс беременности, %.	80	75	86

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Внутримышечное введение гидроксиникотиноилглутамат кальция самцам и самкам в 10-ти кратной высшей терапевтической дозе не вызывало изменений таких показателей репродуктивной функции крыс, как количество желтых тел, мест имплантации, живых плодов, количество резорбций. Величины пред- и постимплантационной гибели в обеих опытных группах не превышали показателей контрольной группы. Масса тела эмбрионов и кранио-каудальный размер не отличались во всех трех группах (Таблица 46) [17].

Таблица 46 - Влияние гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг на репродуктивную функцию крыс

Исследуемые показатели	Группы животных
------------------------	-----------------

	1.Контроль	2.Гидроксиникотин оил-глутамат кальция (вводили самкам)	3.Гидроксиникотиноил- глутамат кальция (вводили самцам)
Количество беременных самок, абс.	12	12	13
Количество желтых тел	10,0±0,5	10,5±1,5	10,6±1,2
Количество мест имплантации	8,8±0,6	9,4±1,6	9,4±0,9
Количество живых плодов	8,0±0,9	8,4±2,2	8,6±1,2
Количество мертвых плодов	0,6	0	0
Количество резорбций	0,6±0,3	0,5±0,2	0,6±0,2
Предимплантационная гибель, %	12,0	10,5	11,3
Постимплантационная гибель, %	9,1	10,6	8,5
Масса плода, г.	3,5±0,2	3,2±0,2	3,3±0,2
Кранио-каудальный размер плода, см.	3,2±0,2	3,4±0,2	3,3±0,1

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Прибавка массы тела беременных крыс опытных групп не отличалась от показателей контрольной группы. Продолжительность беременности и инстинкт материнства у подопытных животных, получавших гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг, не отличались от аналогичных показателей у контрольных животных.

Количество крысят на 1 крысу, как в группе самок, получавших гидроксиникотиноилглутамат кальция, так и в группе самок, беременных от самцов, получавших препарат, а также масса плодов при рождении и дальнейшая прибавка массы тела новорожденных крысят в первый месяц неонатального развития достоверно не отличались от контроля (Таблица 47) [17].

Таблица 47 - Показатели постнатального развития крысят при изучении влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на репродуктивную функцию крыс

Исследуемые показатели	Группы животных		
	1.Контроль	2.Гидроксиникотин оил-глутамат кальция (вводили самкам)	3.Гидроксиникотиноил- глутамат кальция (вводили самцам)
Количество родившихся крысят на 1 самку, абс.	7,8±1,5	7,8±0,9	8,6±1,0
Постнатальная смертность крысят через 3 недели, %	2,6	2,5	2,1
Масса тела новорожденных крысят, г	5,4±0,5	5,6±0,5	6,1±0,7
Динамика массы тела крысят, г			

1-я неделя	15,9±0,6	15,8±0,9	15,3±0,9
2-я неделя	23,1±2,2	23,0±0,7	24,2±1,2
3-я неделя	39,6±2,5	42,5±2,5	43,5±2,5
4-я неделя	51,3±3,4	53,7±3,9	54,1±3,7

*Примечание - * - достоверность различий между группами при $P < 0,05$*

Физическое развитие крысят в течение 1-го месяца постнатального развития (покрытие шерстью, появление резцов, открытие глаз, отлипание ушных раковин, открытие вагины, опускание яичек и т.д.) не отличалось от сроков, характерных для нормального физиологического развития животных этого вида [17].

В заключение следует отметить, что в результате проведенных исследований установлено, что внутримышечное введение гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг, что составляет 10-ти кратную максимальную терапевтическую дозу, рекомендованную для человека, не оказывает существенного влияния на половую активность животных. Репродуктивные показатели (количество живых плодов, масса тела эмбрионов, их кранио-каудальный размер, количество желтых тел, мест имплантации, резорбций, пред- и постимплантационная гибель) в опытных группах практически не отличались от показателей контрольной группы. Гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 6,7 мг/кг не влиял на показатели постнатального развития (количество родившихся крысят на одну самку, масса тела новорожденных крысят, постнатальная смертность крысят, динамика массы тела крысят в течение 4-х недель постнатального развития). Следовательно, гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 6,7 мг/кг, составляющей 10-кратную высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для человека, не влияет на репродуктивную функцию подопытных животных [17].

3.1.2.9 Исследование алергизирующих свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция.

Известно, что алергизирующие свойства лекарственных средств могут быть вызваны различными механизмами. Один из них — это формирование комплексов антиген-антитело, который инициирует иммунный ответ. Некоторые препараты, могут взаимодействовать с белками организма, образуя новые структурные единицы, которые воспринимаются иммунной системой как чуждые.

Исследование анафилактической активности гидроксиникотиноилглутамат кальция.

Гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг (10 -кратная высшая терапевтическая доза для человека) при внутрибрюшинном введении как на 14, так и на 21 день сенсibilизации не вызывает проявления анафилактического шока.

Реакция гиперчувствительности III типа на морских свинках.

Гиперчувствительность III типа представляет собой важный аспект иммунологии. Он заключается в формировании и проявлении иммунных комплексов в ответ на повторные контакты с антигенами. Данные комплексы могут образовываться при повторных контактах с антигенами и откладываться в тканях и органах, вызывая патогенные воспалительные реакции. Иммунные комплексы играют главную роль в патогенезе гиперчувствительности III типа. Их образование и отложение в тканях приводят к активации иммунных клеток, таких как макрофаги, нейтрофилы и лимфоциты, а также к активации факторов воспаления. Это приводит к локализованному воспалению и повреждению тканей. Эта реакция может проявляться как васкулит, системная красная волчанка (СКВ), ревматоидный артрит и другие заболевания. В таких заболеваниях происходит повреждение тканей из-за депонирования иммунных комплексов, что имеет большое клиническое значение. Морские свинки часто используются, поскольку их иммунная система схожа с человеческой. Результаты проведенных исследований показали, что ни в одном случае не было обнаружено гиперемии, признаков отека или воспаления.

Исследование влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на клеточность подколенного лимфоузла у мышей.

Подколенные лимфоузлы действуют как фильтры для патогенных микроорганизмов и антигенов. Изменения в клеточности лимфоузлов могут свидетельствовать о состоянии иммунного ответа, а также о различных патологиях, включая опухолевые процессы и инфекции (Таблица 48).

Таблица 48 - Влияние гидроксиникотиноилглутамат кальция на клеточность подколенных лимфоузлов у мышей-гибридов F₁(СВАхС₅₇Вl₆)

Группы животных	Клеточность подколенных лимфоузлов (млн/мл)
1. Контроль	0,35±0,03
2. Гидроксиникотиноил-глутамат кальция (6,7 мг/кг) 50 мкл/мышь	0,39±0,04

*Примечание - * - достоверность различий между группами при P<0,05*

Проведенные исследования показали, что субплантарное введение гидроксиникотиноилглутамат кальция не вызывает увеличения клеточности подколенного лимфоузла у мышей, что свидетельствует об отсутствии аллергенного потенциала у данного препарата.

При этом относительный индекс клеточности подколенных лимфоузлов опытных и контрольных лап составил 1.11

Таким образом, исследование аллергизирующего действия гидроксиникотиноилглутамат кальция показало, что препарат не обладает аллергизирующими свойствами при оценке влияния препарата на клеточность подколенных лимфоузлов у мышей.

3.1.3 Исследование фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция

По результатам предварительных фармакологических и токсикологических исследований гидроксиникотиноилглутамат кальция, предполагаемая суточная доза препарата для человека равна 50 мг. В пересчете на единицу поверхности тела эта доза эквивалентна дозе 1 мг на крысу массой 200 г (5 мг/кг) [271]. При фармакологическом исследовании гидроксиникотиноилглутамата кальция на крысах было обнаружено, что его антигипоксическое и противоишемическое воздействие проявлялось при более высоких дозах, варьировавшихся от 20 до 40-50 мг/кг. В связи с этим минимальная доза препарата, использованная в фармакокинетическом исследовании, составила 20 мг/кг. Кроме того, гидроксиникотиноилглутамат кальция вводился крысам в дозах 100 и 500 мг/кг, где первая доза соответствовала минимальной, применявшейся в токсикологических исследованиях, а вторая доза вызывала статистически значимое снижение двигательной активности животных. Для фармакокинетического изучения гидроксиникотиноилглутамат кальция у кроликов была выбрана доза, равная 50 мг/кг, которая в пересчете на единицу поверхности тела эквивалентна дозе, равной 100 мг/кг, для крысы, т.е. средней дозы препарата, использованной в опытах на крысах.

Было изучено влияние на разделение пиков состава органической части фазы (метилового спирта, ацетонитрила или их смеси), рН буфера и его ионной силы. Установлено, что значительное влияние на время выхода пика гидроксиникотиноилглутамат кальция и его отделение от пиков, имеющих близкие времена удерживания, оказывает ионная сила буфера подвижной фазы. На рис. ПА-4 и ПА-6 представлены хроматограммы образцов сыворотки крови, не содержащей гидроксиникотиноилглутамат кальция. Буфер в подвижной фазе – 10 мМ K_2HPO_4 и 17 мМ K_2HPO_4 , соответственно, рН каждого буфера - 7,0 (рН-метр Mettler Toledo SevenEasy, Mettler Toledo, США). На рис. ПА-5 и ПА-7 приведены хроматограммы тех же проб, но с добавлением гидроксиникотиноилглутамат кальция.

Как видно на рис. ПА-4 и ПА-5, посторонний пик сыворотки крови имеет одинаковое время выхода с пиком гидроксиникотиноилглутамат кальция и мешает его определению (10 мМ буфер). При использовании 17 мМ буфера определению гидроксиникотиноилглутамат кальция в образце сыворотки крови ничего не мешает - пики разошлись (в соответствии рисунками ПА-6 и ПА-7).

При определении содержания гидроксиникотиноилглутамат кальция в биологических пробах животных были получены Хроматограммы биологических проб, содержащих и не содержащих гидроксиникотиноилглутамат кальция, при выбранных условиях хроматографирования, приведены на рис. ПА-5 - ПА-7 (образцы сыворотки крови крыс), рис. ПА-8 и рис. ПА-9 (образцы сыворотки крови кроликов), рис. ПА-10 и ПА-11 (образцы тканей головного мозга крыс), рис. ПА-12 и ПА-13 (образцы тканей почек крыс), рис. ПА-14 и ПА-15 (образцы тканей печени крыс), рис. ПА-16, ПА-17 и ПА-18 (образцы мочи крыс).

Для анализа сыворотки крови животных объем пробы составлял 10 мкл. Предел обнаружения гидроксиникотиноилглутамата кальция достигал 100 нг/мл, а предел количественного определения — 300 нг/мл. Относительная ошибка при концентрациях от 300 до 1000 нг/мл составляла 14,0%, а при концентрациях от 1 до 20 мкг/мл — 3,4%. Калибровка была линейной в диапазоне от 1 до 20 мкг/мл. В условиях пробоподготовки гидроксиникотиноилглутамат кальция сохранял стабильность в течение 4 часов. Для образцов головного мозга, печени и почек объем наносимой пробы экстрактов головного мозга, печени и почек составлял 10 мкл. Чувствительность обнаружения гидроксиникотиноилглутамата кальция достигала 0,15 мкг/г, а количественное определение возможно при концентрации от 0,5 мкг/г. Относительная погрешность при анализе концентраций от 0,5 до 3,0 мкг/г составляла 10,7%, а в диапазоне от 3 до 3000 мкг/г — 3,1%. Калибровочная кривая оставалась линейной в пределах от 3 до 3000 мкг/г. Устойчивость гидроксиникотиноилглутамат кальция в экстрактах органов проверяли на модельных смесях при хранении при комнатной температуре и в морозильнике при -18 оС в течение суток. Установлено, что за это время количественное содержание гидроксиникотиноилглутамат кальция в пробах не уменьшалось.

Для образцов мочи объем наносимой пробы супернатанта составлял 3 мкл. Предел чувствительности методики составлял 2 мкг/мл. Предел количественного определения – 10 мкг/мл. Относительная ошибка определения составляла 2,3%. Калибровка линейна в диапазоне от 100 до 6000 мкг/мл. Устойчивость гидроксиникотиноилглутамат кальция в условиях пробоподготовки проверяли на модельных смесях. Препарат оказался устойчив при инкубировании его в моче в течение суток при 37°С в присутствии буфера или в присутствии буфера и фермента, а также при инкубировании его непосредственно в моче без добавления буфера. При упаривании в вакууме при 90°С в течение 4 час гидроксиникотиноилглутамат кальция также оказался устойчив. Пробы, подготовленные для хроматографического анализа (спиртовые экстракты), анализировали в течение 2 ч после приготовления. Устойчивость гидроксиникотиноилглутамат кальция в спиртовых экстрактах проверяли на модельных смесях при хранении при комнатной температуре и в морозильнике при -18°С в течение суток. Было

установлено, что за это время количественное содержание гидроксиникотиноилглутамат кальция в пробах не уменьшается.

Исследование фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция предполагало оценку его концентрации в крови, периферических тканях и моче при различных дозах препарата, а также проверку линейности фармакокинетических процессов.

Результаты анализа уровней гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс, которым вводили препарат внутривенно в дозах 20, 100 и 500 мг/кг, представлены в таблицах ПБ-1, ПБ-2 и ПБ-3 соответственно (Приложение Б). Представлены значения площади под кривой "концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция - время" в пределах от нуля до 2 ч ($AUC_{2ч}$), т.е. в пределах минимальной длительности наблюдения за концентрацией гидроксиникотиноилглутамат кальция (опыты с введением препарата в дозе 20 мг/кг) (Таблица 49).

Таблица 49 - Значения площади под фармакокинетическими кривыми гидроксиникотиноилглутамат кальция после в/в введения крысам

Доза препарата (мг/кг)	$AUC_{2ч}$, мкг×ч/мл
20	12
100	78
500	930

Как следует из Таблицы 49, по мере повышения дозы гидроксиникотиноилглутамат кальция величина $AUC_{2ч}$ систематически возрастает, почти пропорционально в диапазоне от 20 до 100 мг/кг (6,5-кратное возрастание $AUC_{2ч}$ при 5-кратном повышении дозы) и гораздо резче (в 12 раз) при повышении дозы от 100 до 500 мг/кг. Это отчетливо проявляется на графике зависимости $AUC_{2ч}$ от дозы гидроксиникотиноилглутамат кальция, однако фрагмент этой зависимости для доз от 0 до 100 мг/кг удовлетворительно описывается уравнением прямой, проходящей через начало координат. Таким образом, в диапазоне, ограниченном 100 мг/кг, фармакокинетику гидроксиникотиноилглутамат кальция можно считать линейной. Вместе с тем, ее линейный характер искажается при введении препарата в дозах, превышающих 100 мг/кг (Рисунок 9) [39].

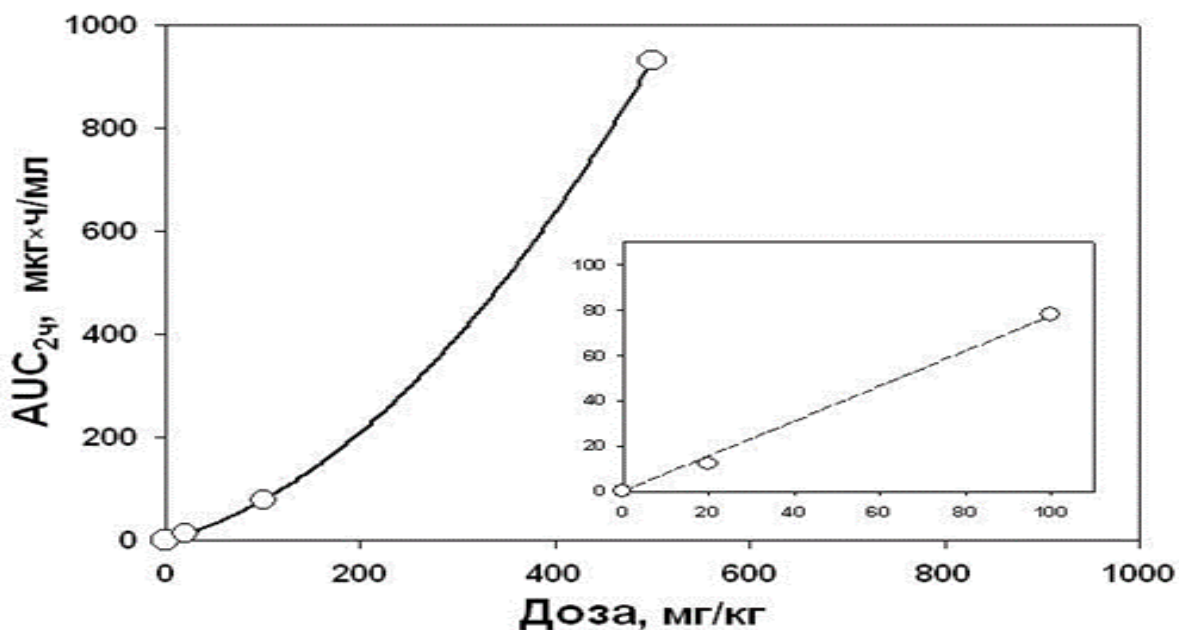


Рисунок 9 - Проверка гипотезы линейности фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция после его в/в крысам

Представлены среднегеометрические значения концентраций гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс после в/в введения препарата, их интервальные оценки и соответствующие фармакокинетические профили, построенные по этим значениям (Рисунок 10). Вне зависимости от дозы снижение концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови носило двухфазный характер: в начальной фазе (смешанная фаза распределения и элиминации) концентрация препарата снижалась быстрее, чем в конечной (фаза элиминации) [308].

Попытка аппроксимации всех трех фармакокинетических профилей одним и тем же уравнением двучастовой модели оказалась безуспешной. Как видно, удовлетворительно описывались лишь профили, полученные при введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах 20 и 100 мг/кг, но не в дозе 500 мг/кг (Рисунок 10). В последнем случае расчетные значения концентрации препарата оказались значительно ниже фактических, что обусловлено описанным выше искажением линейности фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция (см. предыдущий раздел). Повышение дозы гидроксиникотиноилглутамат кальция до 500 мг/кг сопровождается почти двукратным снижением общего клиренса и среднего времени удержания препарата на фоне заметного ускорения транспортных процессов (повышенные значения констант k_{12} и k_{21}) (Таблица 50). При этом ни стационарный объем распределения, ни период полувыведения не изменяются (Рисунок 11). Независимое описание данных, полученных при введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах 20-100 мг/кг и 500 мг/кг, уравнением 1 можно считать удовлетворительным (Рисунок 12) [39].

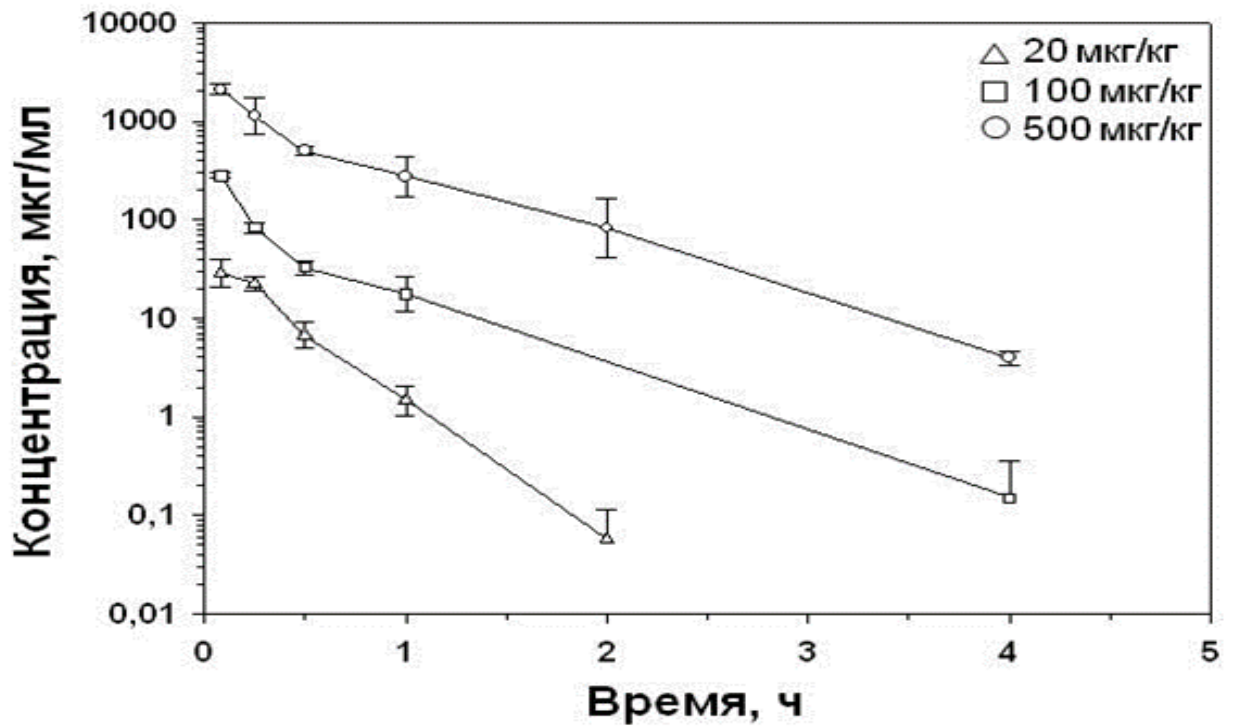


Рисунок 10 - Фармакокинетические профили гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс после в/в введения, построенные по средним значениям концентраций

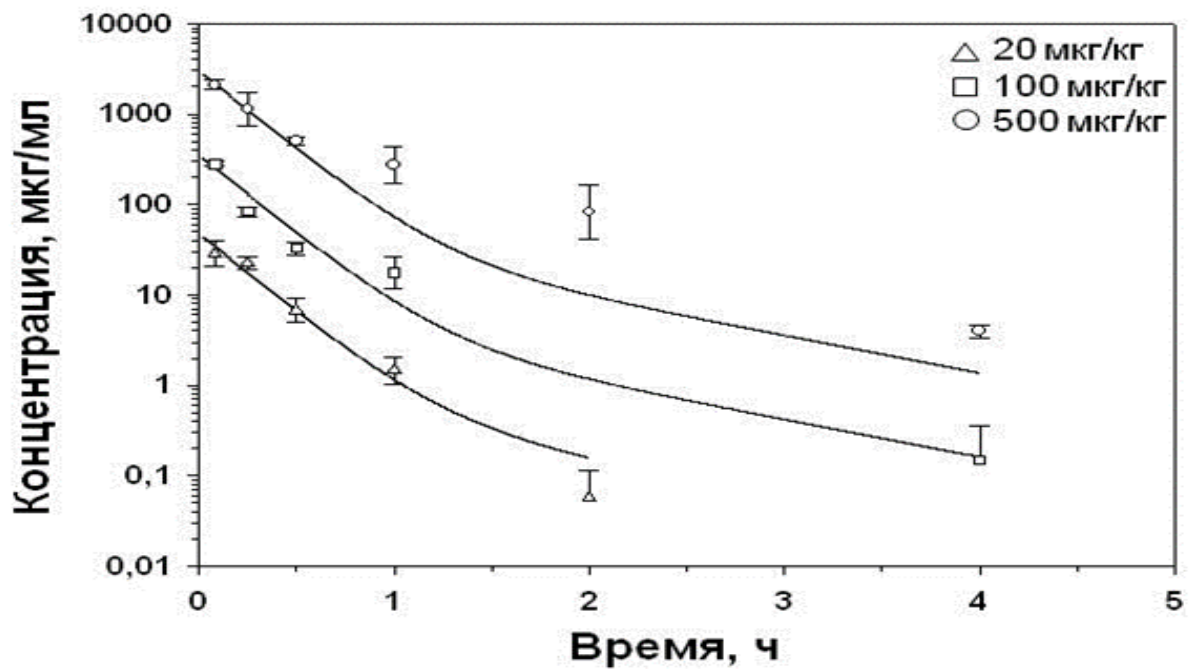


Рисунок 11 - Фармакокинетические профили гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс после в/в введения, рассчитанные одновременно для трех доз препарата

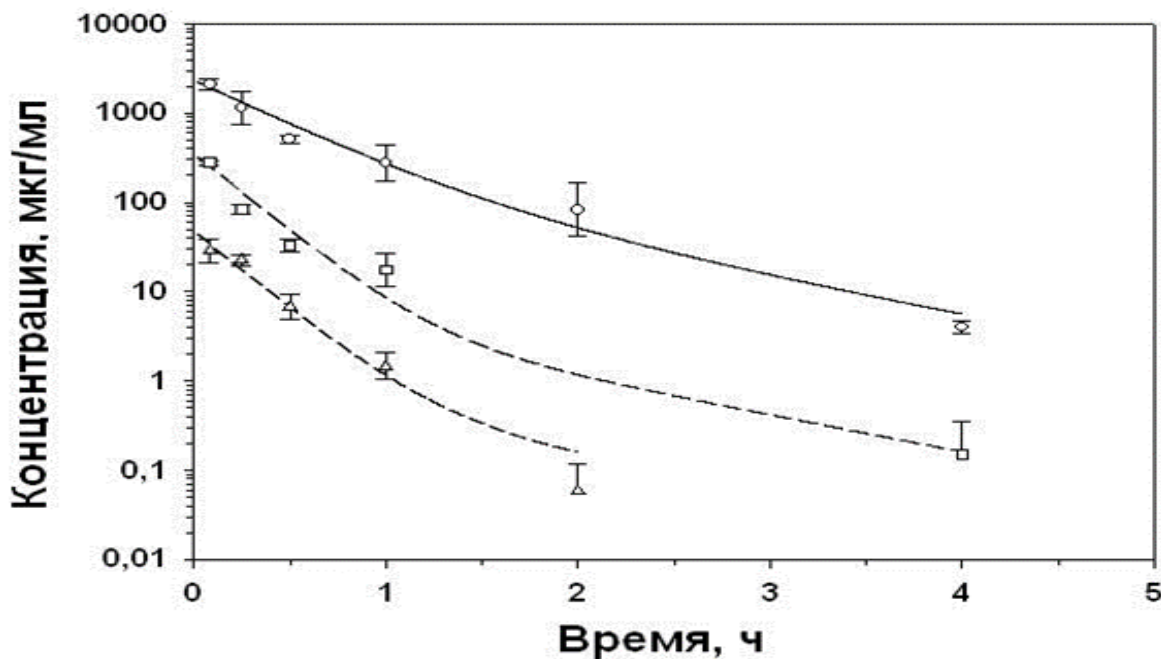


Рисунок 12 - Фармакокинетический профиль гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс после в/в введения препарата в дозе 500 мг/кг, рассчитанный отдельно от остальных данных

Таблица 50 - Фармакокинетические параметры гидроксиникотиноилглутамат кальция у крыс после в/в введения

Доза препарата (мг/кг)	α ч ⁻¹	β ч ⁻¹	k_{21} ч ⁻¹	k_{e1} ч ⁻¹	k_{12} ч ⁻¹	Cl мл/мин	V_{ss} л	MRT ч	$T_{1/2}$ ч
20-100	4,04	0,952	1,00	3,83	0,158	3,7	0,067	0,32	0,73
500	2,46		2,65	2,97	1,67	1,6	0,053	0,58	

Значения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в тканях головного мозга, печени и почек крыс приведены в таблицах ПБ-4, ПБ-5 и ПБ-6 соответственно (Приложение Б), а среднегеометрические значения концентраций с интервальными оценками и соответствующие фармакокинетические профили, построенные по этим значениям ниже (Рисунок 13). Как видно на рисунке, препарат быстро проникает в периферические ткани животных: максимальные уровни гидроксиникотиноилглутамат кальция зарегистрированы уже через 15 мин после инъекции. Эти уровни в тканях головного мозга и печени ниже, а в тканях почек – выше, чем в сыворотке крови. Последующее снижение концентрации препарата в тканях происходит медленнее, чем в сыворотке крови, так что уже через 4 ч его уровни в тканях головного мозга и печени не отличаются от таковых в крови. Уровни гидроксиникотиноилглутамат кальция в тканях почек превышают его уровни в сыворотке крови на всем протяжении периода наблюдения.

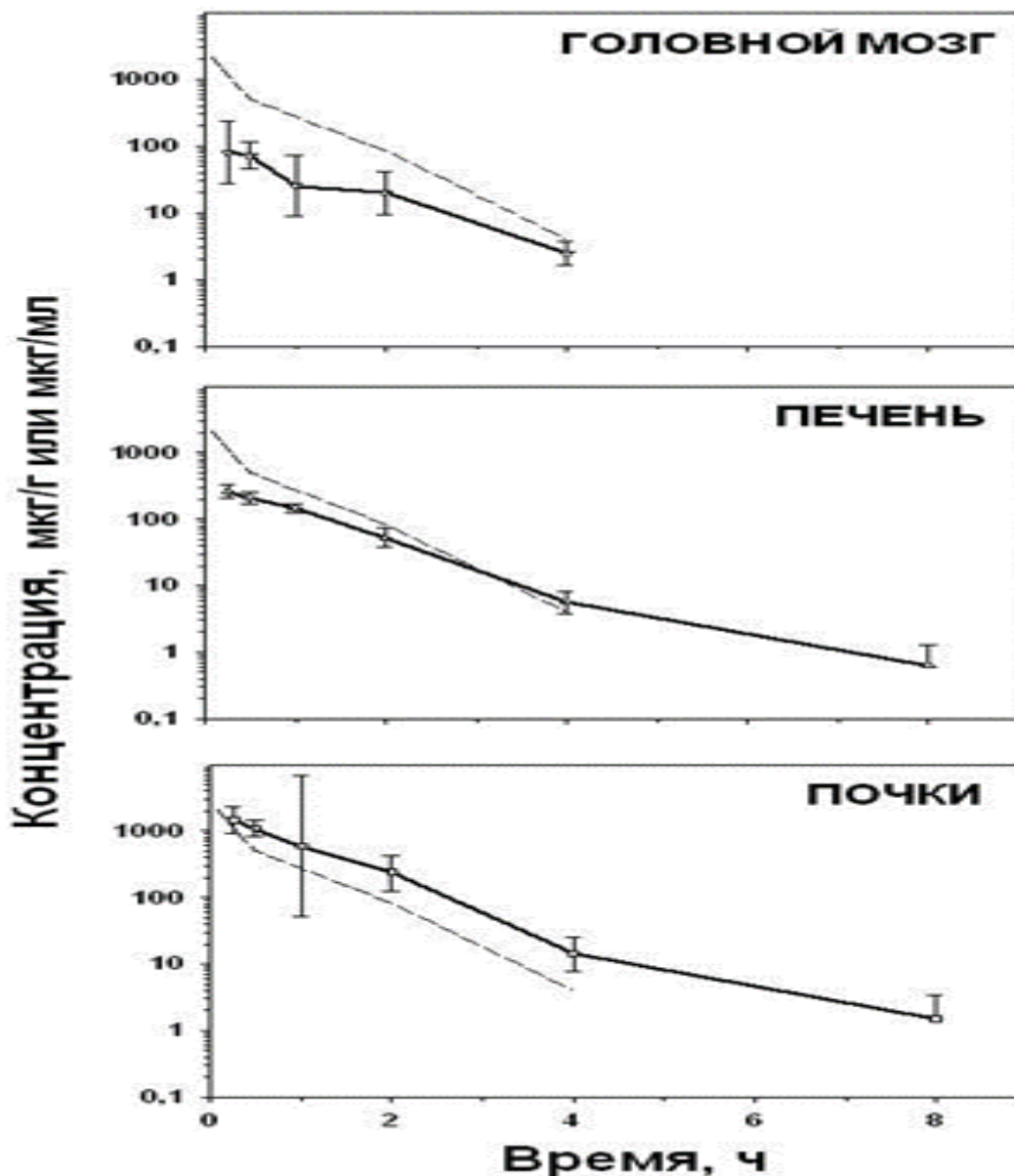


Рисунок 13 - Фармакокинетические профили гидросиникотиноилглутамат кальция в тканях крыс после в/в введения препарата в дозе 500 мг/кг. Пунктир – профиль гидросиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови

Значения для головного мозга, печени и почек, а также значения тканевой доступности гидросиникотиноилглутамат кальция (применительно к тканям головного мозга – терапевтической доступности) после его в/в введения крысам в дозе 500 мг/кг (Таблица 51).

Таблица 51 - Тканевая доступность гидросиникотиноилглутамат кальция у крыс

Ткань	$AUC_{4ч}^T$, мкг×ч/г	$AUC_{4ч}$, мкг×ч/мл	f_t , %
Головной мозг	98	1110	9
Печень	340		31

Почки	1560		140
-------	------	--	-----

Как следует из таблицы, степень проникновения гидроксиникотиноилглутамат кальция в ткани головного мозга и печени значительно ниже, чем в ткани почек.

С целью оценки влияния дозы на проникновение гидроксиникотиноилглутамат кальция в периферические ткани были сопоставлены его уровни, отмеченные через 1 ч после в/в введения препарата в дозах 500 и 100 мг/кг (Таблица ПБ-7) соответственно (Приложение Б). Как видно, нелинейность фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция проявляется в непропорциональном повышении концентрации препарата в крови и почках (в меньшей степени – в печени) при увеличении дозы препарата от 100 мг/кг до 500 мг/кг (Рисунок 14). Так, при 5-кратном увеличении дозы значения его концентрации в печени увеличивается в 8 раз, а в почках в 11 раз. В то же время, изменения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в тканях головного мозга пропорциональны дозе (отношения концентрации к дозе при введении препарата в дозах 100 и 500 мг/кг близки), что свидетельствует о надежной прогнозируемости его эффектов [39].

Результаты определения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в суточной моче крыс после введения им препарата в/в в дозах 5, 20 и 100 мг/кг приведены в Таблице ПБ-8 соответственно (Приложение Б). Как следует из представленных данных, во всех случаях значения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция до и после обработки проб β -глюкуронидазой практически одинаковы, что указывает на несущественный вклад процессов конъюгации в элиминацию препарата. Более того, после введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах 5 и 20 мг/кг суммарное количество неизмененного препарата, выведенного с мочой (соответственно 1,1 и 4,8 мг), оказалось сопоставимым с введенным (соответственно 1 и 4 мг на крысу) (Таблица 52). Относительно меньшее количество гидроксиникотиноилглутамат кальция в суточной моче (в среднем 11 мг против 20 мг введенного) после введения препарата в дозе 100 мг/кг не следует рассматривать как признак снижения роли почек в его элиминации – в этом случае экскреция могла быть более продолжительной, но не менее полной [39].

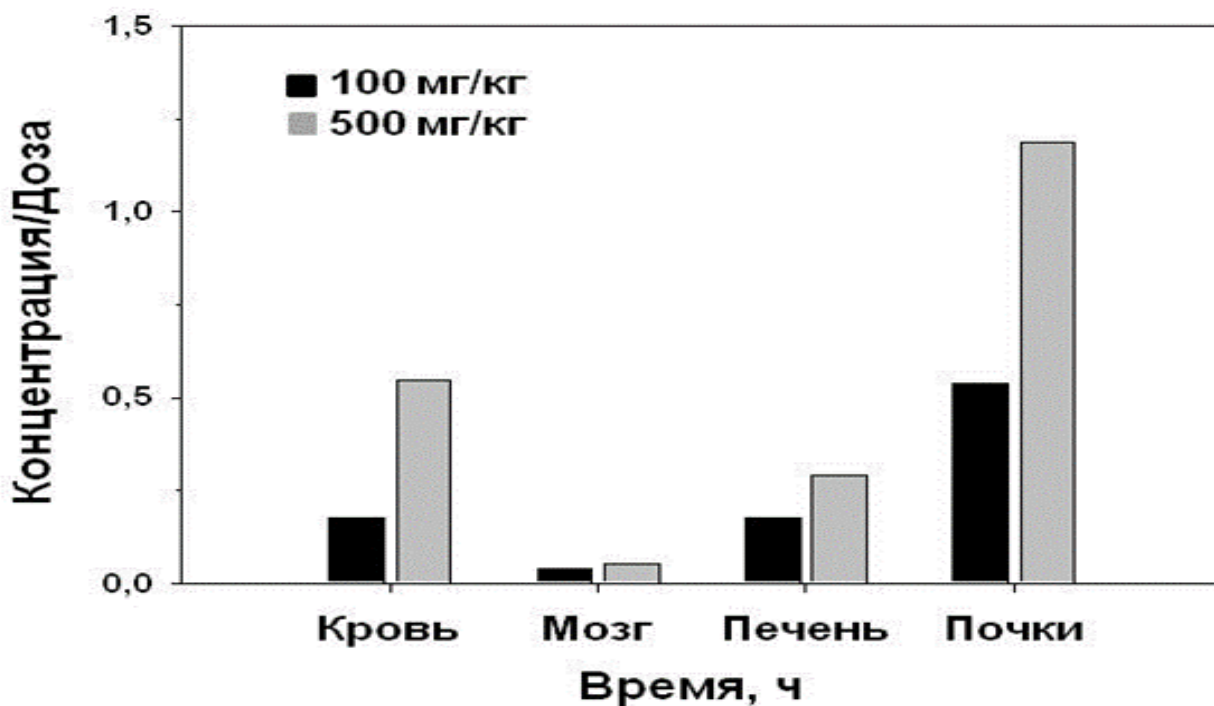


Рисунок 14 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови и тканях крыс через 1 час после в/в введения препарата, отнесенная к дозе препарата

Таблица 52 - Экскреция гидроксиникотиноилглутамат кальция с мочой после в/в введения препарата крысам (мг)

№№ крыс п/п	Доза в мг/ в (мг/кг)		
	1/5	4/20	20/100
1	0,84	3,4	13
2	1,4	6,1	19
3	0,98	5	5,9
4			19
5			12
M_A	1,1	4,8	13,78
SD	0,3	1,4	5,5

Значения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс, которым вводили препарат в/м в дозе 100 мг/кг, приведены в Таблице ПБ-9 соответственно (Приложение Б), а среднегеометрические значения концентраций, их интервальная оценка и соответствующий фармакокинетический профиль, построенный по этим значениям (Рисунок 15). Как видно на рисунке, гидроксиникотиноилглутамат кальция быстро поступает из места введения в системный кровоток: высокие уровни препарата достигаются уже через 5 мин после

инъекции, хотя в течение последующих 30 мин его концентрация практически не меняется. Последующее снижение уровней гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови происходит так же быстро, как и после в/в введения, однако уже через 4 ч они оказываются ниже порога чувствительности аналитического метода. Столь необычный профиль изменения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция при введении в/м обусловлен двухстадийным процессом всасывания препарата у крыс. Как видно, периоду моноэкспоненциального снижения относительной доли невсосавшегося препарата предшествует период, в пределах которого эта доля почти не меняется, что свидетельствует о насыщаемом процессе всасывания (Рисунок 16). С формальной точки зрения, его можно рассматривать как результат сложения двух процессов, один из которых описывается кинетическим уравнением 0-го порядка, а второй – уравнением 1-го порядка. В связи с этим оценка абсолютной биодоступности гидроксиникотиноилглутамат кальция при в/м введении крысам по отношению соответствующих площадей была бы некорректной [39].

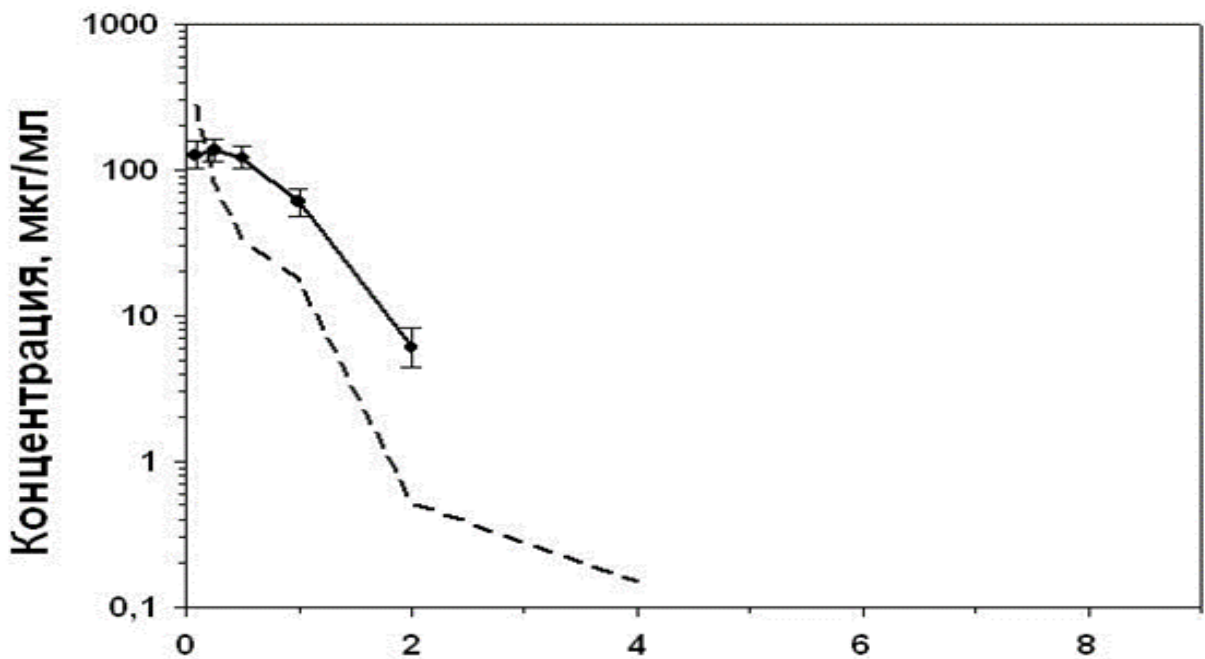


Рисунок 15 - Фармакокинетический профиль гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс после его в/м введения. Пунктир – профиль гидроксиникотиноилглутамат кальция после в/в введения

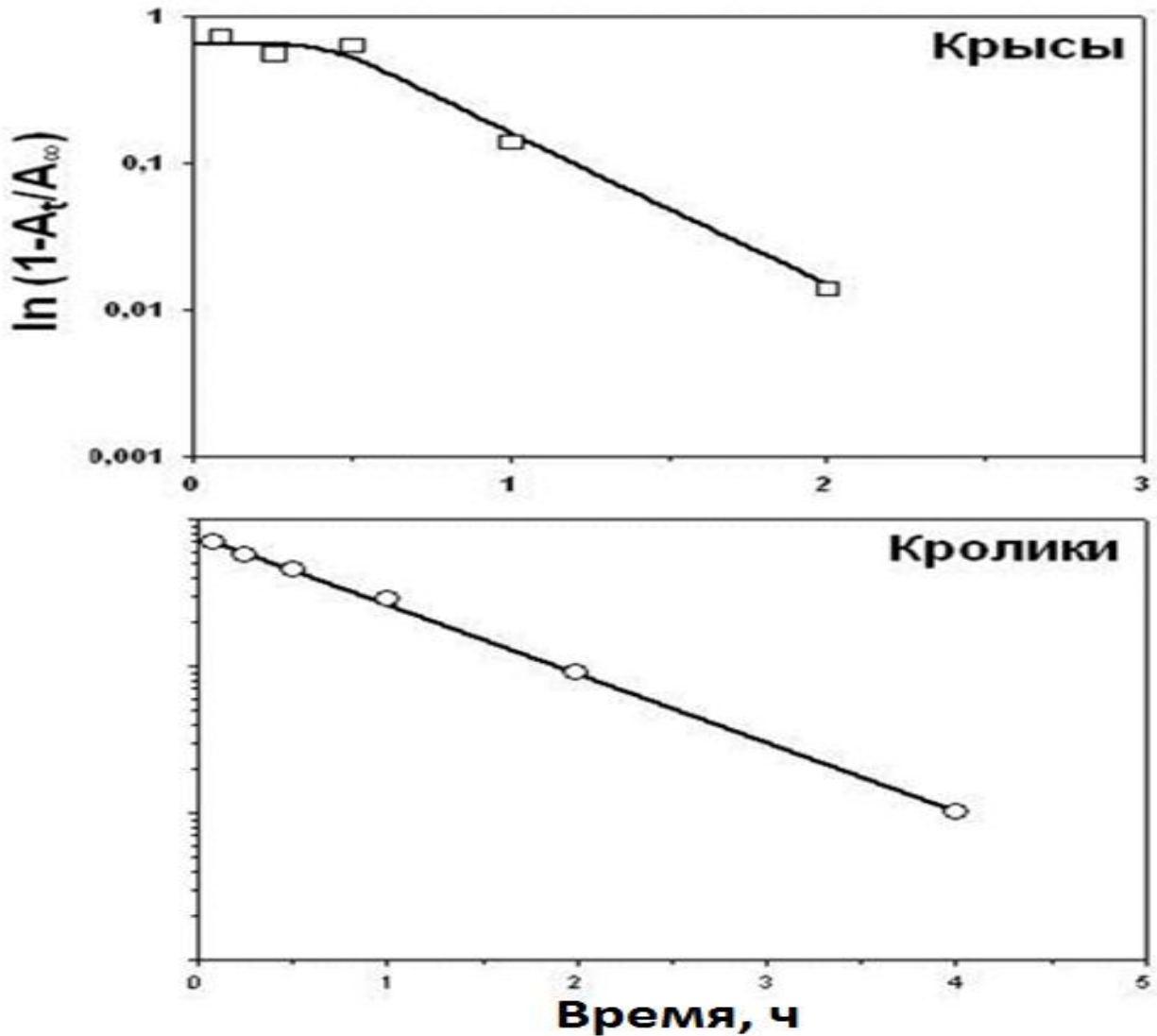


Рисунок 16 - Реконструирование кинетических кривых всасывания гидросиникотиноилглутамат кальция после в/м введения по методу Loo-Riegelman

Прогнозирование уровней гидросиникотиноилглутамат кальция при ежедневном в/в введении раз в сутки в течение 5 дней осуществляли с помощью параметров фармакокинетики, установленных после однократного введения препарата в дозах 20-100 мг/кг, в диапазоне доз, обеспечивающем условия линейности. Представлены результаты прогнозирования уровней гидросиникотиноилглутамат кальция при многократном введении в дозе 5 мг/кг, эквивалентной суточной дозе гидросиникотиноилглутамат кальция для человека и дозе 20 мг/кг (минимальная эффективная доза у крыс) (Рисунок 17). В соответствии с прогнозом ежедневное введение гидросиникотиноилглутамат кальция в указанных дозах не должно приводить к накоплению препарата в крови.

Значения концентрации гидросиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови кроликов, которым вводили препарат в/в в дозе 50 мг/кг, приведены в Таблице ПБ-10 соответственно (Приложение Б) и (Рисунок 18). На том же рисунке показаны индивидуальные

фармакокинетические профили, рассчитанные по параметрам уравнения 1. Как видно на рисунке, во всех случаях изменения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция во времени удовлетворительно описывались уравнением двучастевой модели. Как следует из представленных данных, фармакокинетика гидроксиникотиноилглутамат кальция характеризуется выраженной индивидуальной вариабельностью (Таблица 53). Так, значения периода полувыведения варьировали от 0,7 до 6,4 ч (9-кратные различия), среднего времени удержания – от 0,6 до 3,1 ч (5-кратные различия), а стационарного объема распределения – от 1,4 до 9,5 л (7-кратные различия). Существенно меньшая вариабельность отмечена для площади под кривой «концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция – время» - от 49 до 108 мкг×ч/мл – и общего клиренса – от 23 до 51 мл/мин (2-кратные различия в обоих случаях) [39].

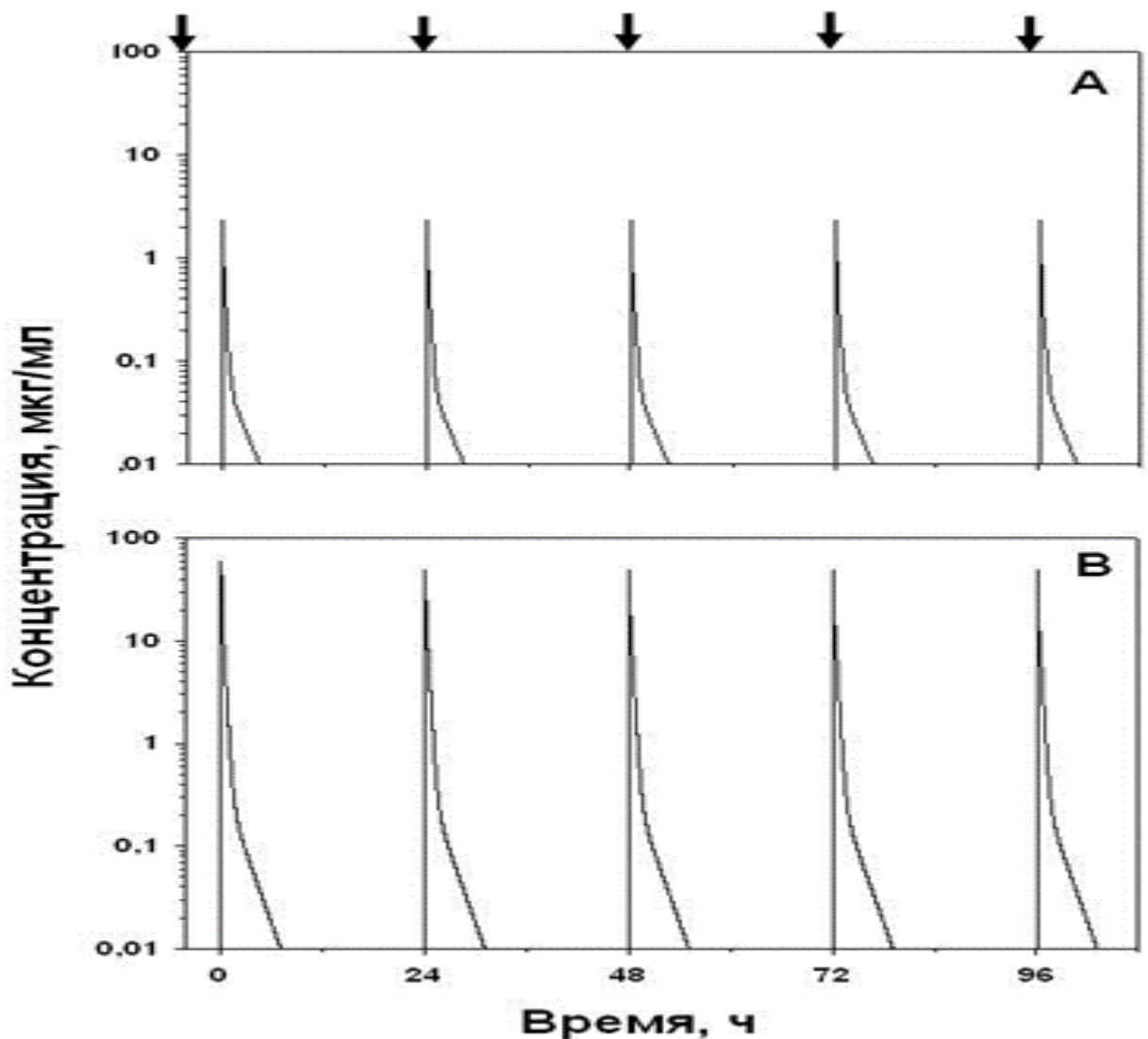


Рисунок 17 - Прогнозирование уровней гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови крыс после его ежедневного в/в введения в дозе: А.- 5 мг/кг, В. – 20 мг/кг в течение 5 суток. Стрелками показаны моменты введения препарата

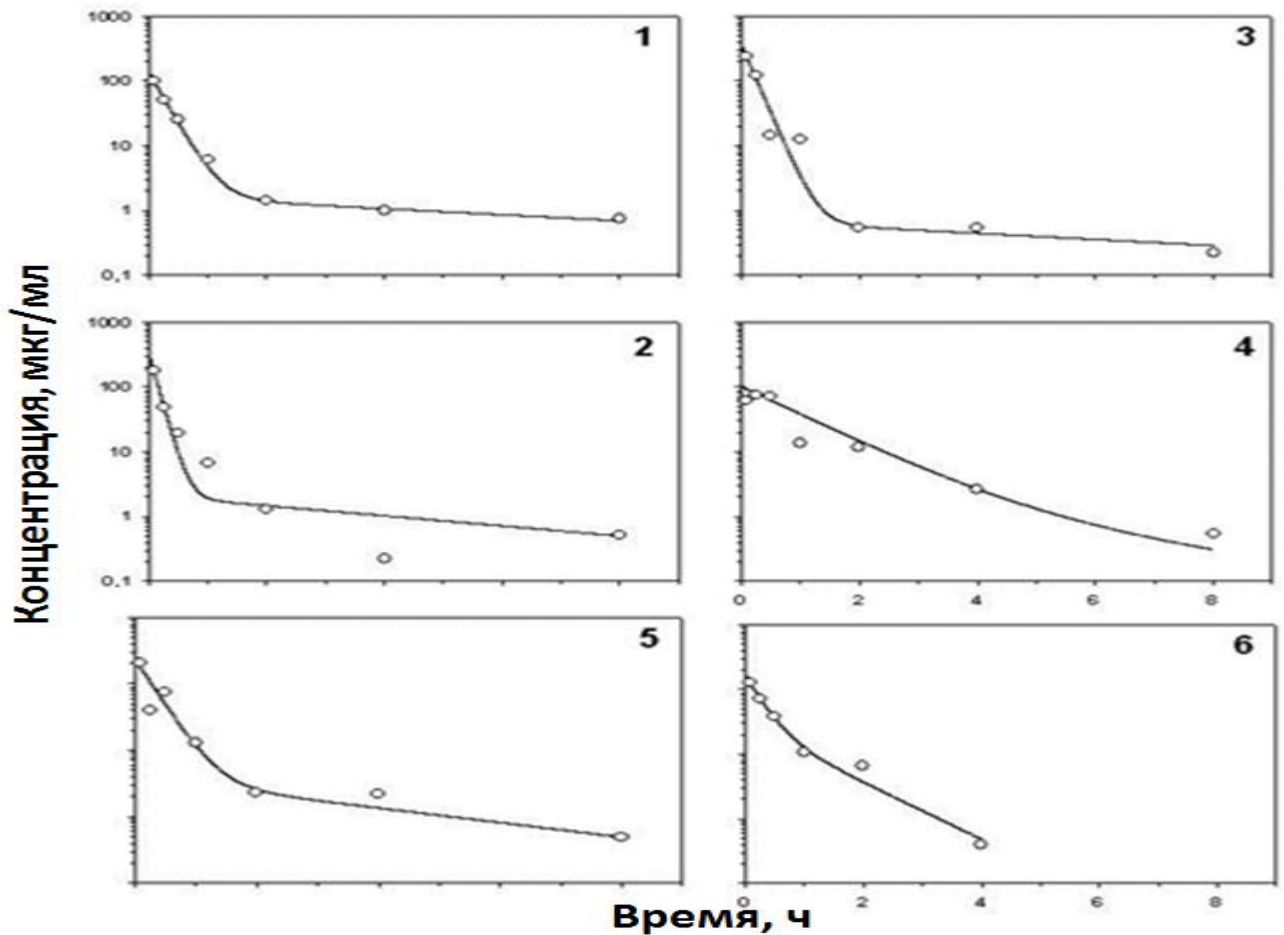


Рисунок 18 - Рассчитанные фармакокинетические профили гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови после в/в введения 6 испытуемым животным препарата

Таблица 53 - Фармакокинетические параметры гидроксиникотиноилглутамат кальция у кроликов после в/в введения

№№ п/п	α ч ⁻¹	β ч ⁻¹	k_{21} ч ⁻¹	k_{el} ч ⁻¹	k_{12} ч ⁻¹	AUC мкг×ч/мл	Cl мл/мин	V_{ss} л	MRT ч	$T_{1/2}$ ч	
1	3,72	0,108	0,155	2,60	1,08	48,7	51,3	9,48	3,1	6,43	
2	7,52	0,179	0,226	5,96	1,51	55,4	45,1	3,48	1,28	3,86	
3	4,87	0,11	0,118	4,50	0,363	80,6	31,0	1,68	0,91	6,35	
4	1,00	0,307	0,330	0,94	0,046	108	23,1	1,67	1,21	2,26	
5	3,26	0,253	0,303	2,72	0,490	81,3	30,7	1,78	0,99	2,74	
6	3,94	1,01	1,50	2,67	0,79	62,0	40,0	1,37	0,57	0,685	
SD	M_A	4,05	0,328	0,44	3,23	0,71	72,7	36,9	3,24	1,34	3,72
		2,13	0,343	0,53	1,75	0,53	21,8	10,5	3,15	0,90	2,31
	M_G	3,47	0,23	0,29	2,79	0,47	70,1	35,6	2,47	1,16	2,96

Интер-вальная	1,77÷	0,10÷	0,12÷	1,49÷	0,13÷	52,2÷	26,5÷	1,19÷	0,66÷	1,28÷
оценка	6,83	0,54	0,71	5,26	1,63	94,0	47,7	5,13	2,03	6,81

Среднегеометрические значения концентрации гидроксиникотиноилглутамата кальция у кроликов, их интервальные оценки и соответствующий фармакокинетический профиль, рассчитанный по параметрам уравнения 1 (Рисунок 19). Как видно на рисунке, экспериментальные данные удовлетворительно описываются двучастевой моделью (Таблица 54).

Таблица 54 - Фармакокинетические параметры гидроксиникотиноилглутамат кальция у кроликов после в/в введения, рассчитанные по средним значениям данных

α ч ⁻¹	β ч ⁻¹	k_{21} ч ⁻¹	k_{el} ч ⁻¹	k_{12} ч ⁻¹	AUC мкг×ч/мл	Cl мл/мин	V_{ss} л	MRT ч	$T_{1/2}$ ч
4,14	0,302	0,389	3,21	0,837	56,0	44,7	2,63	1,00	2,29

Сопоставление значений фармакокинетических параметров гидроксиникотиноилглутамат кальция, свидетельствует о том, что его элиминация у кроликов происходит гораздо медленнее, чем у крыс. Так, в первом случае продолжительность периода полувыведения и среднее время удержания оказались в 3 раза выше, чем во втором. Эти различия обусловлены более высоким общим клиренсом и меньшим стационарным объемом распределения гидроксиникотиноилглутамат кальция у крыс, чем кроликов (18 мл ×мин/кг против 13 мл×мин/кг и 335 против 790 мл/кг, соответственно).

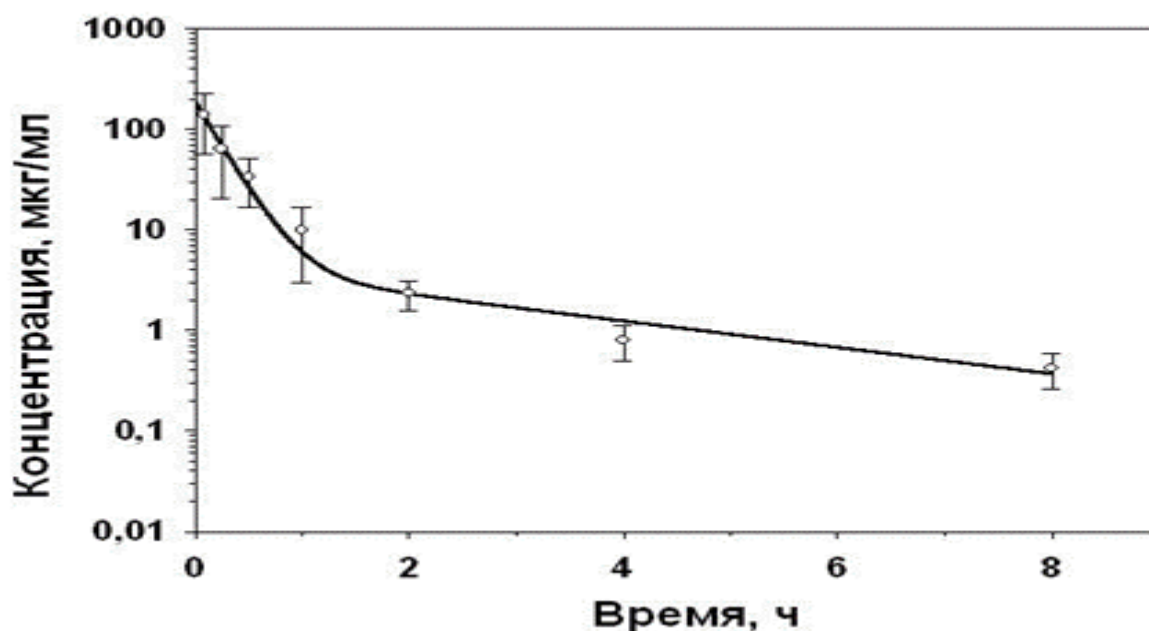


Рисунок 19 - Фармакокинетические профили гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови кроликов после в/в введения препарата, рассчитанные по средним значениям данных

Значения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови кроликов, которым вводили препарат в/м в дозе 50 мг/кг, приведены в Таблице ПБ-11 соответственно (Приложение Б). На том же рисунке для каждого животного изображены соответствующие фармакокинетические профили, рассчитанные по параметрам уравнения 2.

Гидроксиникотиноилглутамат кальция быстро всасывается после в/м введения: в большинстве случаев максимальная концентрация препарата в крови достигалась уже через 5 мин после инъекции (Рисунок 20). Последующее снижение уровней гидроксиникотиноилглутамат кальция носило монотонный характер. Процесс поступления гидроксиникотиноилглутамат кальция из места введения в системный кровоток может быть аппроксимирован кинетическим уравнением 1-го порядка. В связи с этим индивидуальные профили изменения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция во времени были описаны трехэкспоненциальным уравнением двухчастевой модели, предполагающей моноэкспоненциальное всасывание препарата. Фармакокинетические параметры гидроксиникотиноилглутамат кальция, рассчитанные внемодельным способом (C_{max} , AUC_t и C_{max}/AUC_t) и путем аппроксимации кинетических данных уравнением 2 (AUC , MRT и $T_{1/2}$), (Таблица 55). Как следует из представленных данных, значения фармакокинетических параметров гидроксиникотиноилглутамат кальция, введенного в/м, характеризуются умеренной индивидуальной вариабельностью, которая выражена слабее, чем при введении препарата в/в. В частности, это относится и к периоду полувыведения и среднему времени удержания, которые после в/м введения гидроксиникотиноилглутамат кальция варьировали в 1,5-1,7-кратном диапазоне, а при в/в введении – соответственно в 9- и 5-кратном (см. выше). Вместе с тем, значения обоих параметров, установленные при в/м введении гидроксиникотиноилглутамат кальция, следует рассматривать лишь как кажущиеся, поскольку они существенно ниже установленных при в/в введении препарата (Таблица 56). По-видимому, это обусловлено тем, что снижение концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция, наблюдаемое после в/м введения, происходит на фоне незавершенного процесса распределения препарата между кровью и периферическими тканями. Иными словами, конечная фаза фармакокинетической кривой в этом случае отражает не только элиминацию препарата, но и его перенос из системного кровотока на периферию [39].

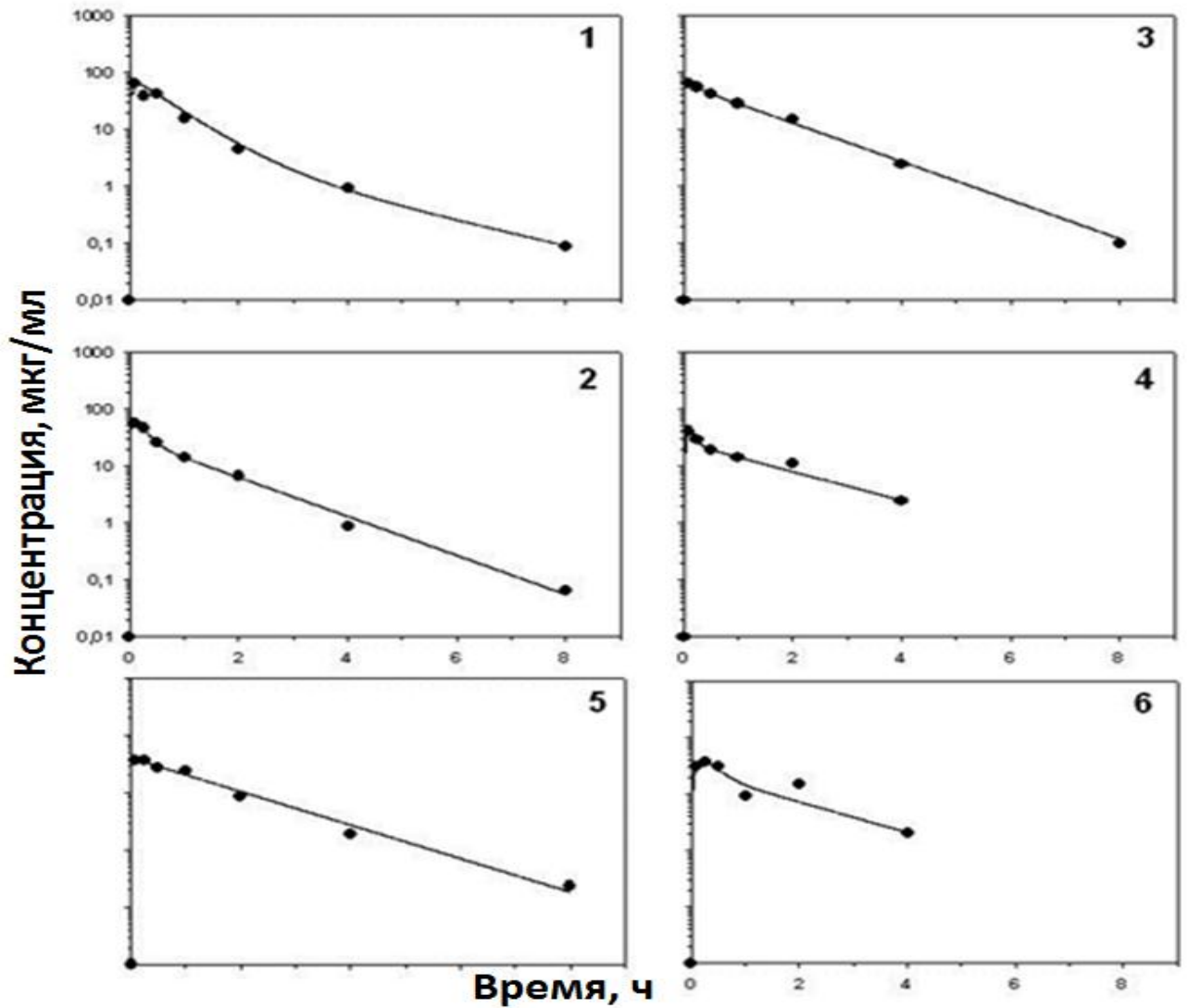


Рисунок 20 - Фармакокинетические профили гидросиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови кроликов после в/м введения препарата (цифрами указаны номера животных)

Таблица 55 - Фармакокинетические параметры гидросиникотиноилглутамат кальция у кроликов после в/м введения

№№ п/п	C_{\max} мкг/мл	AUC_t мкг×ч/мл	C_{\max}/AUC_t ч ⁻¹	AUC мкг×ч/мл	MRT ч	$T_{1/2}$ ч
1	63,0	52,3	1,20	57,0	0,94	1,36
2	55,4	49,0	1,13	47,3	1,08	0,88
3	63,0	85,4	0,74	78,9	1,28	0,89
4	40,6	47,3	0,86	46,4	1,62	1,18
5	37,0	58,8	0,63	58,7	1,44	1,03
6	36,1	53,8	0,67	47,2	1,43	1,11

M_A	49,2	57,8	0,87	55,9	1,30	1,08
SD	12,8	14,1	0,24	12,5	0,25	0,18
M_G	47,8	56,6	0,85	54,9	1,28	1,06
Интервальная Оценка	36,8÷62,2	45,6÷70,2	0,64÷1,11	44,7÷67,4	1,04÷1,56	0,90÷1,26

Среднегеометрические значения концентраций гидроксиникотиноилглутамат кальция, их интервальные оценки и соответствующий фармакокинетический профиль, рассчитанный по параметрам уравнения 2, в сравнении с аналогичным профилем, полученным после в/в введения препарата (Рисунок 21). Как видно на рисунке, уровни гидроксиникотиноилглутамат кальция после его в/м введения лишь в первые полчаса ниже, чем после в/в введения. Уже через 1 ч они выше, чем после в/в введения, хотя к концу периода наблюдения (через 8 ч), концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция после в/м введения ниже, чем после в/в введения.

В дальнейшем исследовали биодоступность гидроксиникотиноилглутамат кальция после в/м введения. Значения площадей под фармакокинетическими кривыми, рассчитанные по усредненным значениям концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция после его в/в и в/м введения, соответствующее значение степени всасывания, максимальная концентрация и отношение ее к площади под кривые при в/м введении препарата (Таблица 56).

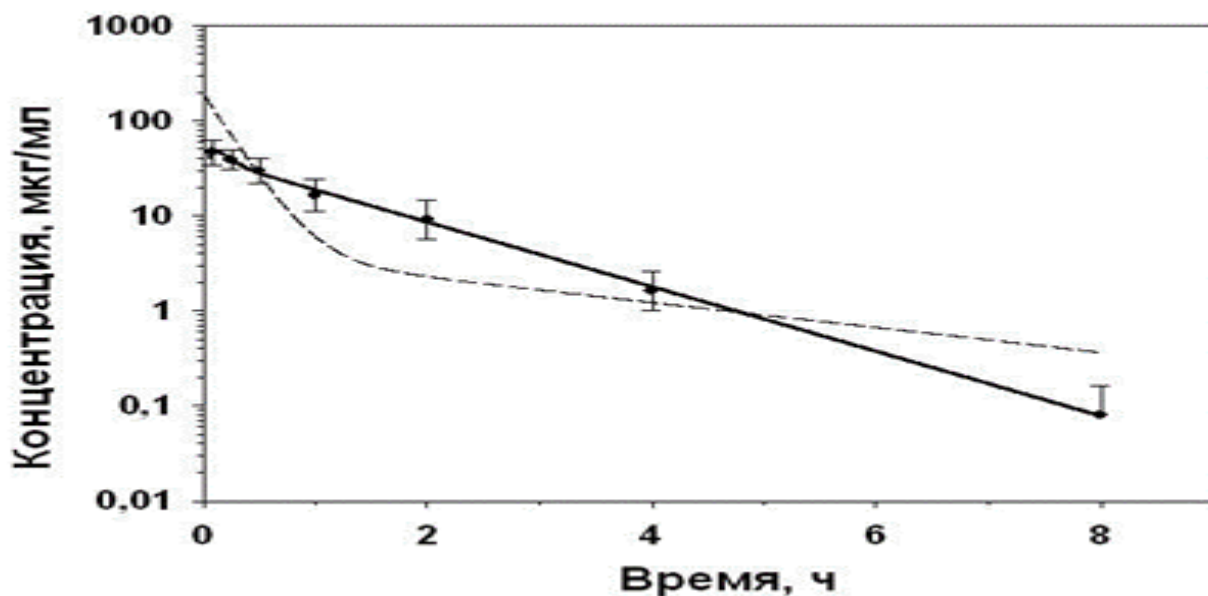


Рисунок 21 - Фармакокинетический профиль гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови кроликов после в/м введения препарата

Как следует из Таблицы, абсолютная биодоступность препарата при его в/м введении кроликам близка к 100%, а скорость всасывания характеризуется высоким значением C_{max} / $AUC_{8ч}^{в/м}$. Таким образом, с фармакокинетической точки зрения оба пути введения препарата могут быть терапевтически эквивалентными.

Таблица 56 - Биодоступность гидроксиникотиноилглутамат кальция при в/м введении кроликам

Путь введения	C_{\max} , мкг/мл	$AUC_{8ч}$ ($AUC_{8ч}^{B/M}$), мкг×ч/мл	f , %	$C_{\max}/AUC_{8ч}^{B/M}$, ч ⁻¹
В/в	-	57,4	-	-
В/м	46,4	55,9	97	0,83

На основе полученных данных было проведено прогнозирование фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция у человека по результатам ее изучения на животных. Фармакокинетика гидроксиникотиноилглутамат кальция характеризуется выраженными видовыми различиями: общий клиренс и стационарный объем распределения препарата, отнесенные к массе тела, у крыс и кроликов различаются в 1,5-2 раза. Этим объясняется несовпадение фармакокинетических профилей гидроксиникотиноилглутамат кальция в крови крыс и кроликов, получавших его в эквивалентных дозах (100 и 50 мг/кг, соответственно), как в начальной фазе (более высокие уровни препарата у крыс, обусловленные меньшим объемом распределения), так и в конечной фазе (более высокие уровни у кроликов, обусловленные меньшим клиренсом).

С целью оценки возможности межвидовой экстраполяции фармакокинетических данных усредненные значения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция у крыс и кроликов, полученные после в/в введения препарата в эквивалентных дозах, были представлены в координатах Дедрика. Для этого хронологические значения времени отбора проб крови были пересчитаны в значения «фармакокинетического времени» по уравнению. Как видно, использование фармакокинетического времени позволяет добиться сближения значений концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция, отмеченных у крыс и кроликов при одном и том же значении $t \times m^{-0,25}$, и описать данные одним набором параметров уравнения (Рисунок 22). При этом расчетное значение $T_{1/2,PK}$ составило $1,35 \text{ ч} \times \text{кг}^{-0,25}$, а прогнозируемое значение периода полувыведения гидроксиникотиноилглутамат кальция у человека, вычисленное по уравнению 13,

$$T_{1/2, \text{человек}} = 1,35 \times (70)^{0,25} = 4 \text{ (ч)},$$

где 70 – масса тела человека в кг. Результаты этого прогноза могут быть использованы для рационального планирования регламента отбора проб при последующем фармакокинетическом изучении гидроксиникотиноилглутамат кальция в фазе I его клинических испытаний.

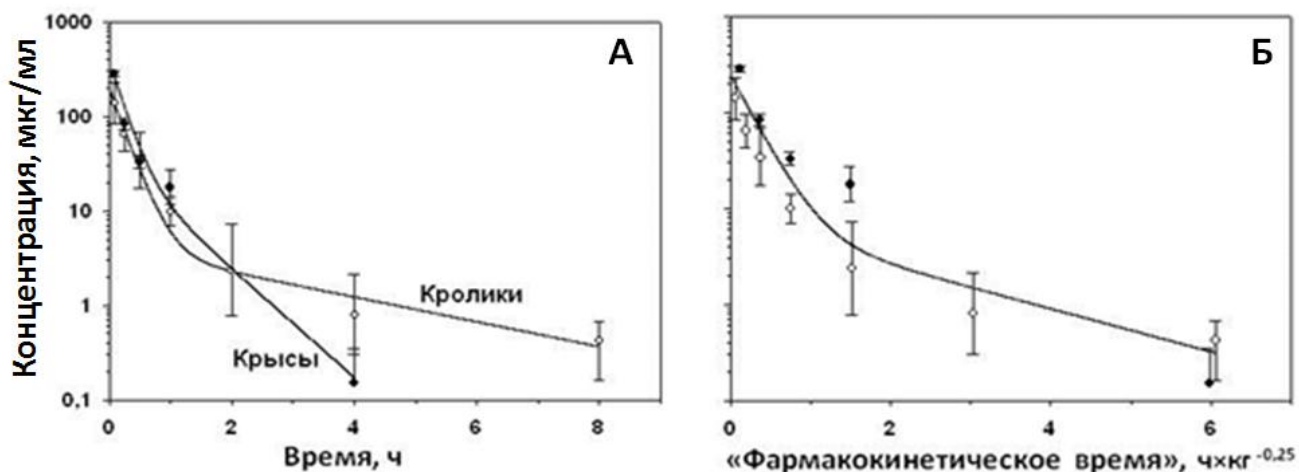


Рисунок 22 - Средние значения концентрации гидросиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови животных после в/в введения препарата в дозе 100 мг/кг (крысы) и 50 мг/кг (кролики) и соответствующие фармакокинетические профили в А. - обычных координатах; Б. – в координатах Дедрика

3.1.4 Изучение фармакодинамики гидросиникотиноилглутамата кальция

3.1.4.1 Исследования влияния гидросиникотиноилглутамат кальция на нейродегенеративные изменения в коре больших полушарий головного мозга при остром локальном геморрагическом инсульте

Во время проведения эксперимента осуществляли мониторинг общего состояния животных, их выживание в течение всего эксперимента и влияние фармакологического средства на исследуемые показатели. Во всех экспериментальных животных отмечалось существенное снижение двигательной активности (развитие парезов), потребности в воде и приеме пищи. Летального исхода моделирования инсульта не отмечено.

При исследовании фронтальной коры больших полушарий мозга белых крыс в условиях моделирования острого аутогеморрагического инсульта было установлено неравномерное кровенаполнение сосудов и наличие отека ткани. Вокруг участка интрацеребральной гематомы регистрируется картина сопутствующего глиоза.

На 14 сутки после инсульта в ипсилатеральной коре мозга отмечено развитие отека ткани, а к 28 суткам его характер можно охарактеризовать как острый кортикальный. Пирамидные нейроны III-V слоев коры гипохромные, что является проявлением резкого дисметаболического расстройства, а дендриты и аксоны прослеживаются в поверхностный слой коры, что вызвано их отеком. Вокруг кортикальных сосудов наблюдается резко выраженный периваскулярный отек. В пирамидных нейронах отмечено резкое гидропическое набухание перикарионов, что также отмечено морфометрически (Рисунки 23-29) [25,211].

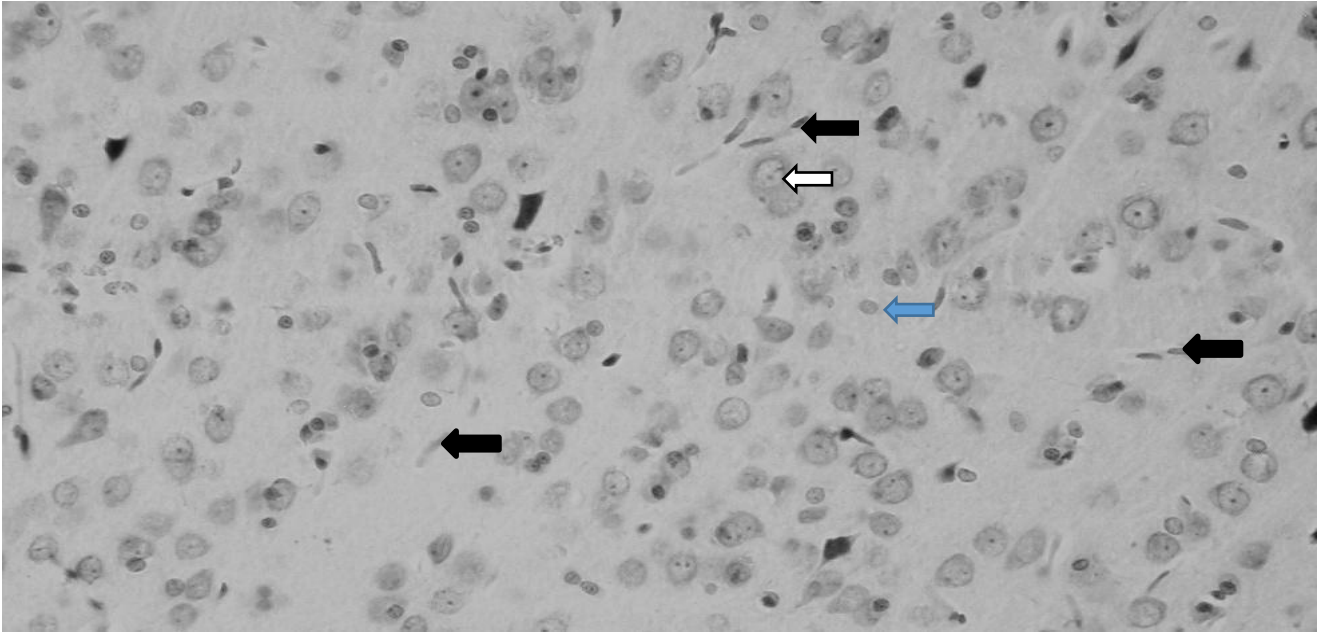


Рисунок 23 - Кора головного мозга интактных животных. Условные обозначения:
 ↖ нейрон; ↗ глиоцит; ↘ гемокapилляр. Метиленовый синий. Об. 20, ок. 10.

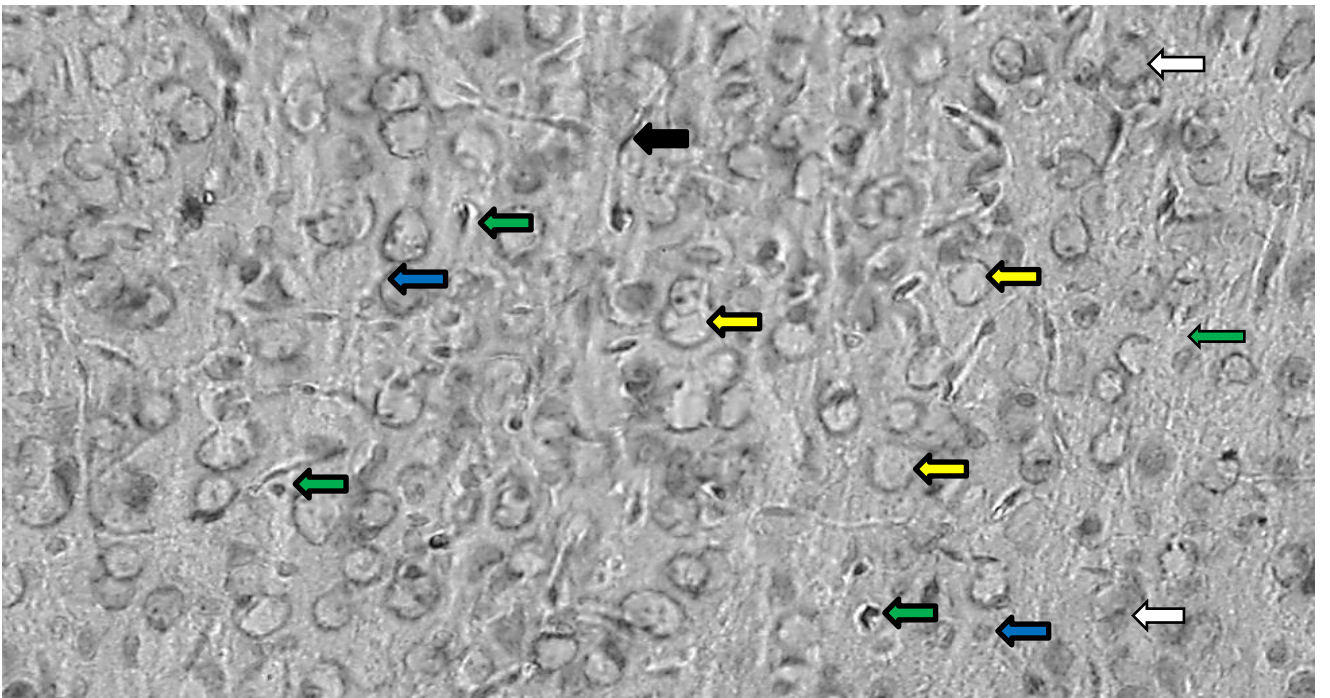


Рисунок 24 - Кора головного мозга после инсульта (28 сутки). Острый отек ткани мозга, гидропическая дистрофия нейронов, пикноз глиальных клеток, периваскулярный и перичелюлярный отек. Условные обозначения: ↖ нейрон; ↗ гидропическая дистрофия нейрона; ↘ глиоцит; ↙ апоптоз глиоцита; ↚ гемокapилляр. Метиленовый синий. Об. 20, ок. 10.

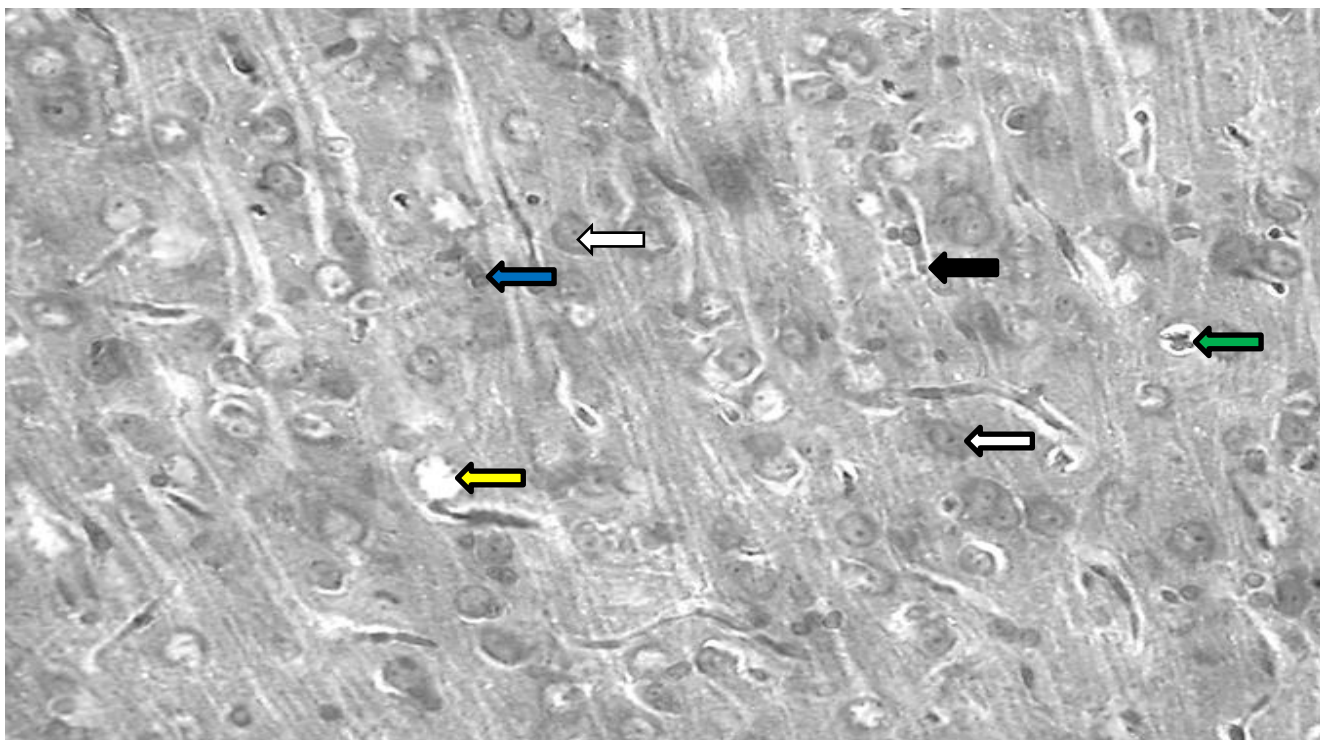







Рисунок 25 - Кора головного мозга при инсульте и введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 0,1 мг/кг (14 сутки). Отек ткани мозга, гидропическая дистрофия нейронов, пикноз глиальных клеток, периваскулярный и перичеселюлярный отек. Условные обозначения:  нейрон;  гидропическая дистрофия нейрона;  глиоцит;  апоптоз глиоцита;  гемокapилляр. Метиленовый синий. Об. 20, ок. 10.

В контралатеральном полушарии в группе опытных животных, получавших гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 30,0 мг/кг через 28 суток после инсульта, установлено достоверное увеличение нейроглиального индекса в сравнении с ипсилатеральной корой этой же группы (Таблица 57).

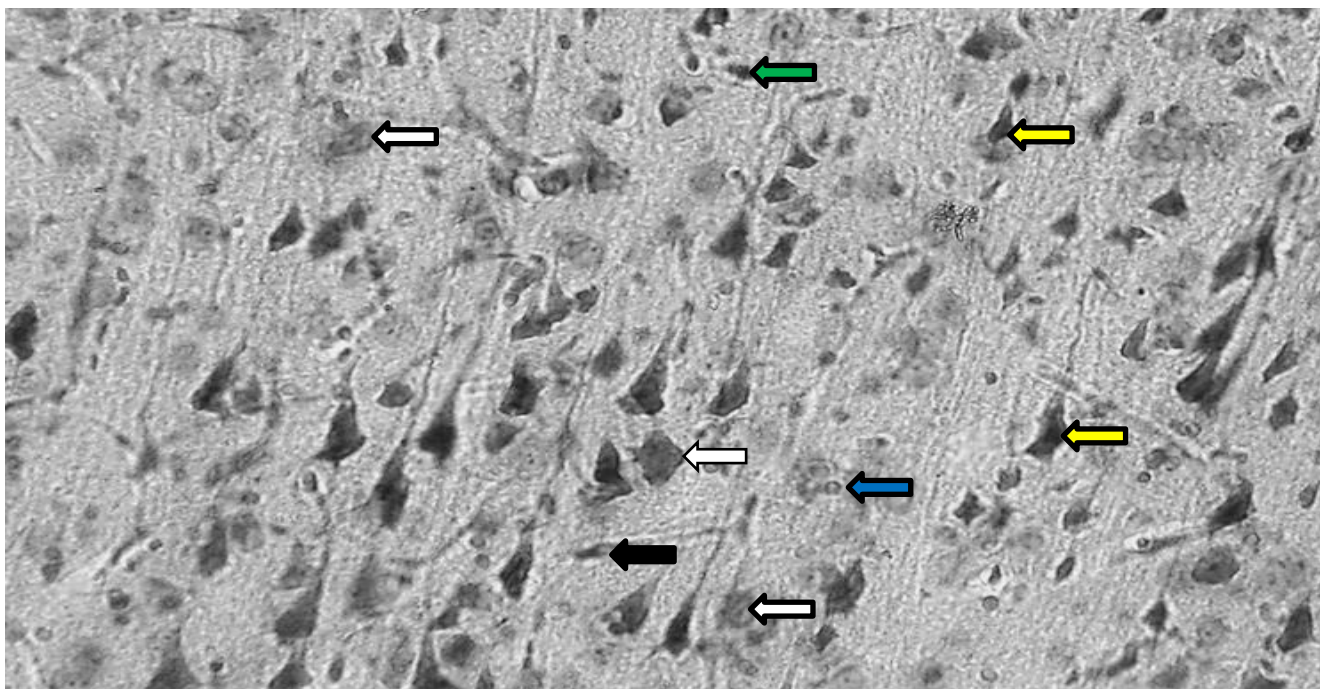







Рисунок 26 - Кора головного мозга при инсульте и введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 0,1 мг/кг (28 сутки). Некроз нейронов по ишемическому типу. Условные обозначения:  нейрон;  некроз нейрона;  глиоцит;  апоптоз глиоцита;  гемокапилляр. Метиленовый синий. Об. 20, ок. 10.

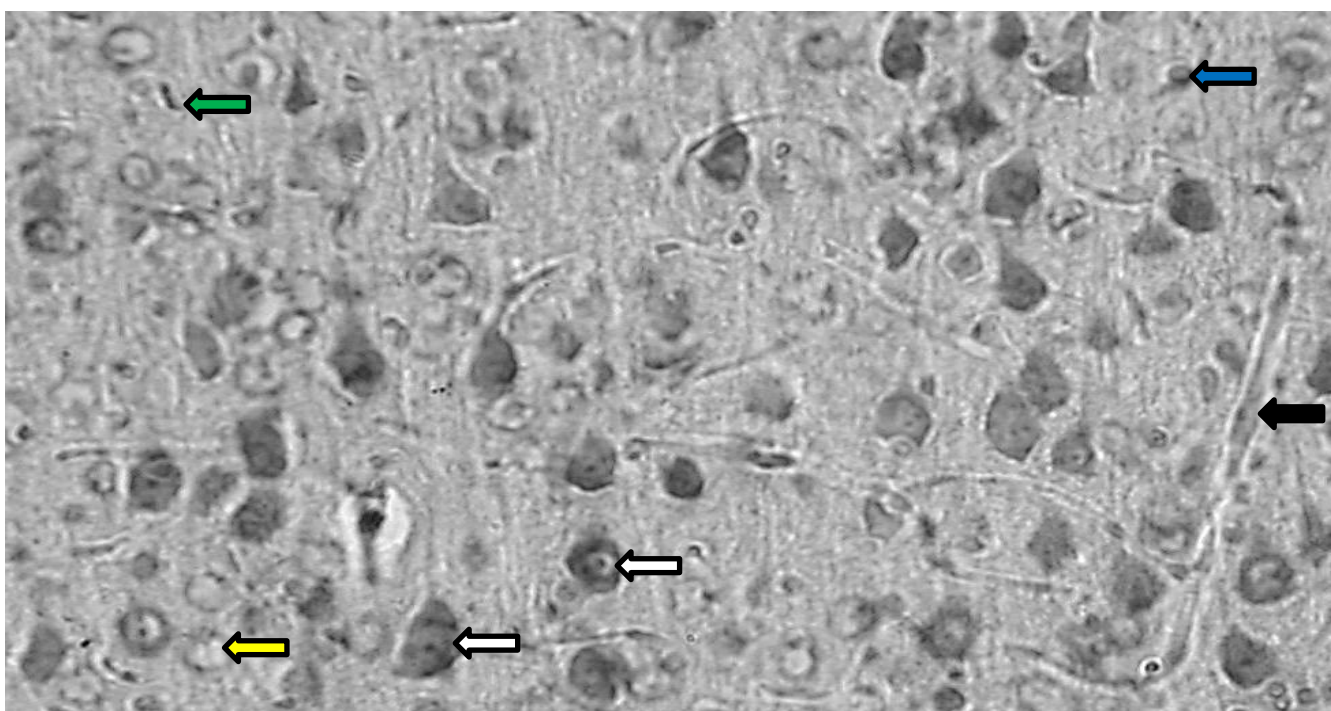







Рисунок 27 - Кора головного мозга при инсульте и введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 3,0 мг/кг (28 сутки). Менее выражен перичеселлярный отек и отек тел нейронов. Условные обозначения:  нейрон;  гидропическая дистрофия нейрона;  глиоцит;  апоптоз глиоцита;  гемокапилляр. Метиленовый синий. Об. 20, ок. 10.

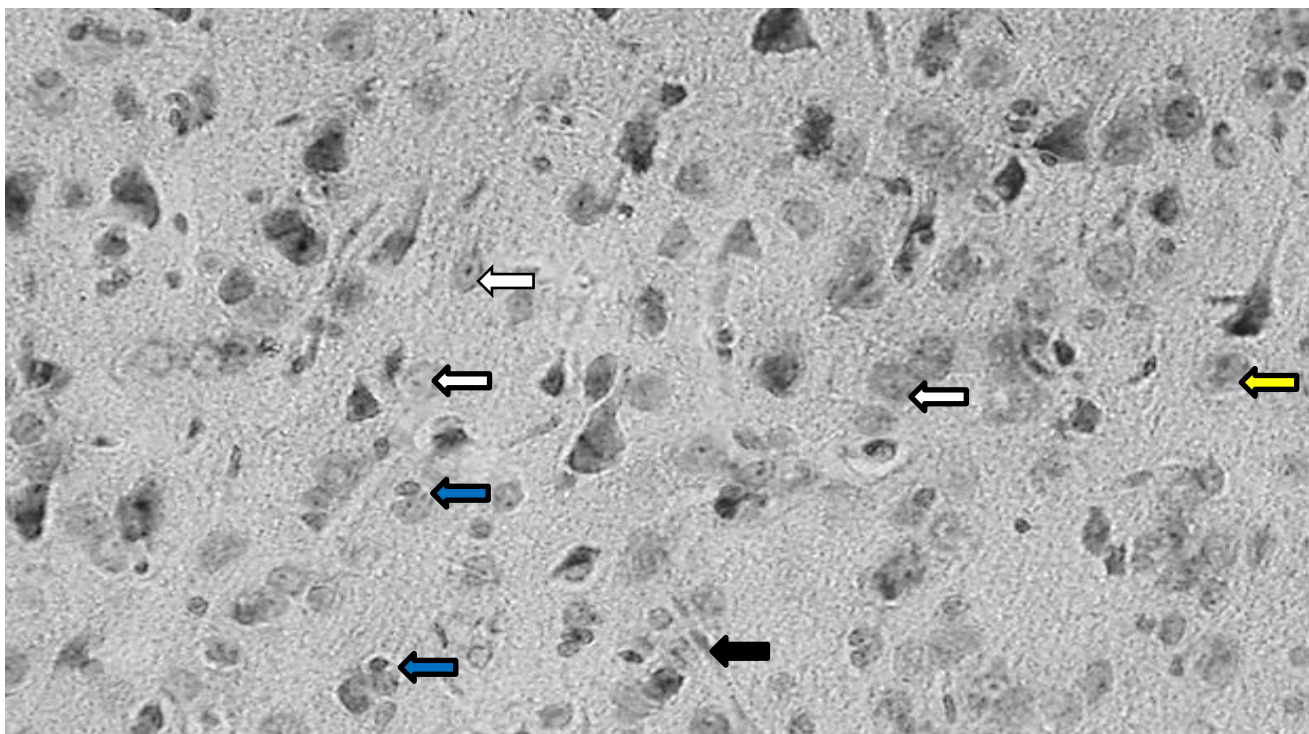







Рисунок 28 - Кора головного мозга при инсульте и введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 30,0 мг/кг (14 сутки). Менее выражена гидропическая дистрофия нейронов. Условные обозначения:  нейрон;  некроз нейрона;  глиоцит;  апоптоз глиоцита;  гемокapилляр. Метиленовый синий. Об. 20, ок. 10.

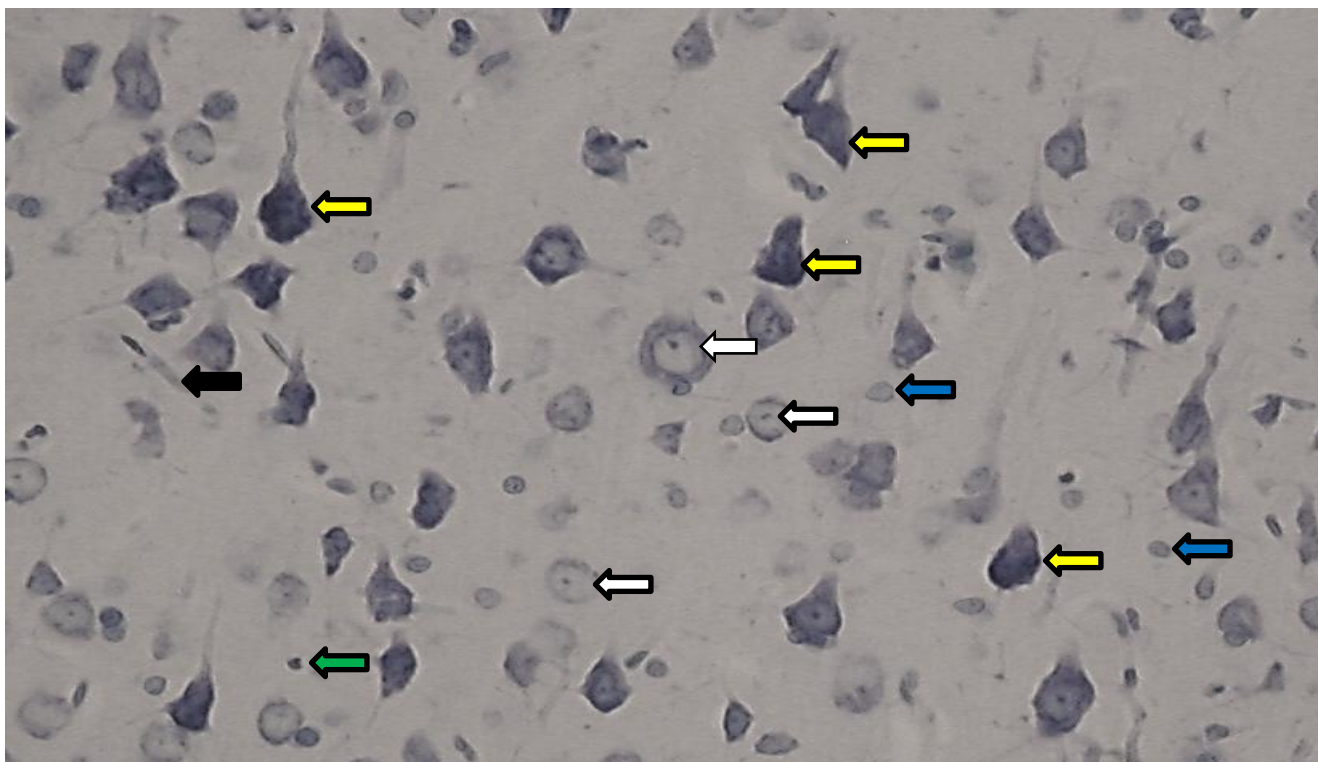







Рисунок 29 - Кора головного мозга при инсульте и введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 30,0 мг/кг (28 сутки). Менее выражен отек нервной ткани и дистрофия нейронов, повышается выживаемость глиальных клеток. Условные обозначения:  нейрон;  некроз

нейрона;  глиоцит;  апоптоз глиоцита;  гемеокапилляр. Метиленовый синий. Об. 20, ок. 10.

Так, у контрольных животных на 14 и 28 сутки площадь перикариона пирамидных нейронов III-V слоев ипсилатерального полушария составляли соответственно $580,5 \pm 48,7$ мкм² ($p < 0,05$) и $509,9 \pm 46,3$ мкм² ($p < 0,05$) (достоверные отличия от показателей интактных животных в пределах 50-60%, $p < 0,05$), а в контралатеральные полушария указанные показатели пирамидных нейронов на 28 сутки наоборот возросли, что ассоциировано с функциональной активацией в отдаленный период, а не отеком нейронов.

При использовании гидроксиникотиноилглутамат кальция морфометрические изменения кортикальных нейронов достоверно изменились лишь в некоторых опытных группах. Снижение отека нейронов установлено на 14 сутки при введении гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 0,1 и 30,0 в ипси- и контралатеральном полушарии. В контралатеральном полушарии при дозе препарата 3,0 и 30,0 отмечено функциональную активацию нейронов, что морфологически проявлялось в виде повышения хромофилии цитоплазмы клеток и увеличения площади перикарионов (Таблица 57) [25,211].

Таблица 57 - Площадь нейронов

№	Группа/доза (мг/кг)	Период наблюдения			
		14 сутки		28 сутки	
		Ипси-латеральное полушарие	Контра-латеральное полушарие	Ипси-латеральное полушарие	Контра-латеральное полушарие
1	Интактные	$351,4 \pm 13,4$			
2	Псевдо-оперированные	-	-	$378,7 \pm 12,4$	$364,0 \pm 17,1$
3	Контроль	$580,5 \pm 48,7$	$513,2 \pm 38,6$	$509,9 \pm 46,3$	$597,0 \pm 38,9$
4	0,1	$484,2 \pm 37,8a$	$400,1 \pm 26,1a,b$	$561,1 \pm 48,1$	$584,3 \pm 48,1$
5	3,0	$574,7 \pm 39,3$	$629,0 \pm 48,2a$	$568,7 \pm 39,2$	$576,8 \pm 46,3$
6	30,0	$431,0 \pm 29,7a$	$675,7 \pm 44,0a,b$	$482,2 \pm 37,5$	$504,9 \pm 43,1a$

Примечание - a - достоверно в сравнении с контролем ($p < 0,05$)

b - достоверно в сравнении с ипсилатеральным полушарием ($p < 0,05$)

Анализ нейродегенеративных процессов показал позитивное влияние препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция на восстановительные процессы. Через 14 суток после инсульта в контрольной группе животных количество нейронов (в поле зрения, $\times 20$) не превышало 40% в ипсилатеральном полушарии ($249,3 \pm 12,2$ нейронов/тест-зоны), а в контралатеральном - 50% ($334,3 \pm 17,0$ нейронов/тест зоны, $p < 0,05$). На 28 сутки плотность нейронов составила соответственно 30% и 50% (Таблица 58) [25,211].

Таблица 58 - Плотность нейронов

№	Группа/доза (мг/кг)	Период наблюдения	
		14 сутки	28 сутки

		Ипси-латеральное полушарие	Контра-латеральное полушарие	Ипси-латеральное полушарие	Контра-латеральное полушарие
1	Интактные	653,6±25,2			
2	Псевдо-оперированные	-	-	635,2±10,3	665,6±18,9
3	Контроль	249,3±12,2	334,3±17,0b	194,0±20,3	322,7±17,2b
4	0,1	254,8±19,3	325,2±10,5b	183,0±9,0	338,5±19,2b
5	3,0	280,0±9,3a	443,6±14,6a,b	273,2±12,0a	458,8±7,3a,b
6	30,0	269,1±6,7a	435,3±14,4a,b	290,0±9,3a	472,1±8,5a,b

Примечание - а - достоверно в сравнении с контролем (p<0,05)

б - достоверно в сравнении с ипсилатеральным полушарием (p<0,05)

Таблица 59 - Нейроглиальный индекс (количество глиоцитов контактирующих с

нейроном)

№	Группа/доза (мг/кг)	Период наблюдения			
		14 сутки		28 сутки	
		Ипси-латеральное полушарие	Контра-латеральное полушарие	Ипси-латеральное полушарие	Контра-латеральное полушарие
1	Интактные	2,1±0,2			
2	Псевдо-оперированные	-	-	1,8±0,2	2,0±0,2
3	Контроль	1,7±0,1	1,8±0,2	1,4±0,1	1,9±0,2
4	0,1	1,4±0,2a	1,5±0,1a	1,5±0,1	2,3±0,2
5	3,0	1,5±0,2	2,2±0,2	1,7±0,2	2,6±0,3
6	30,0	1,6±0,1	2,4±0,2	1,6±0,2	2,4±0,3b

Примечание - а - достоверно в сравнении с контролем (p<0,05)

б - достоверно в сравнении с ипсилатеральным полушарием (p<0,05)

При введении гидроксиникотиноилглутамат кальция достоверный эффект на выживаемость кортикальных нейронов при введении препарата в дозе 3,0 и 30,0 мг/кг. На 14 сутки плотность выживших нейронов достоверно была выше в сравнении с контролем на 8-10% в ипсилатеральном полушарии и на 30% в контралатеральном. На 28 сутки эти значения возросли к 35-45% и 40-45% соответственно. Достоверного отличия в действии препарата между дозой 3,0 мг/кг и 30,0 мг/кг не отмечено.

Анализ нейроглиальных взаимодействий показал значительное снижение плотности глиоцитов контактирующих с нейроном. Глиальный индекс снизился на 25-30% в сравнении с показателем интактных животных, что главным образом вызвано гибелью самих глиоцитов (Таблица 59). Введение гидроксиникотиноилглутамат кальция не оказало достоверного влияния на эти изменения, отмечено тенденцию в нормализации нейроглиальных взаимодействий [25,211].

3.1.4.2 Исследование вытеснения гидроксиникотиноил глутаматом кальция высокоаффинных лигандов из активных центров нейрорецепторов in vitro

Данное исследование включает оценку того, способно ли соединение конкурировать с другими молекулами, которые обычно связываются с этими местами, потенциально влияя на функцию целевых рецепторов или ферментов. Такие исследования имеют решающее значение для понимания потенциальных фармакологических или токсикологических эффектов гидроксиникотиноилглутамат кальция. В данных исследованиях используются радиоактивные лиганды для маркировки участков связывания. Добавляя гидроксиникотиноилглутамат кальция, можно измерить, сколько радиоактивного лиганда вытеснено, что указывает на способность соединения конкурировать за участок связывания. Понимание свойств замещения гидроксиникотиноилглутамат кальция важно для определения его потенциальных фармакологических эффектов. Например, если он способен замещать рецептор нейротрансмиттера, он может действовать как агонист или антагонист, модулируя эффекты нейротрансмиттера. Такие исследования имеют решающее значение для разработки лекарств и понимания потенциальных токсикологических эффектов соединений. При анализе связывания, проводимом в базовых условиях, установлено ингибирование (или стимуляцию) между 30,1% и 52,1% для следующих рецепторов / транспортеров: AMPA (агонист радиолиганда) 43,6%; NMDA (антагонист радиолиганда) 44,9%; каинит (агонист радиолиганда) 30,9%; PCP (антагонист радиолиганда) 49,8%; сигма (неселективный) (h) (агонист радиолиганда) 44,5%; Ca²⁺ канал (L, сайт верапамила) (фенилалкиламин) (антагонист радиолиганда) 30,1%; переносчик норэпинефрина (h) (антагонист радиолиганда) 52,1%. IC₅₀ для всех вышеупомянутых случаев > 1,0E-03 М (Таблица 60).

Таблица 60 - Результаты по эталонным соединениям

Идентификатор соединения	IC ₅₀ (M)	K _i (M)	nH
α1 (неселективный) (антагонист радиолиганда)			
празозин	2.3E-10 M	6.0E-11 M	1.0
β2 (h) (антагонист радиолиганда)			
ICI 118551	5.8E-10 M	1.9E-10 M	0.8
BZD (центральный) (агонист радиолиганда)			
диазепам	9.3E-09 M	7.8E-09 M	0.9
BZD (периферический) (антагонист радиолиганда)			
PK 11195	1.3E-09 M	1.2E-09 M	1.0
CB1 (h) (агонист радиолиганд)			
CP 55940	1.4E-09 M	1.2E-09 M	0.9
CB2 (h) (агонист радиолиганд)			
WIN 55212-2	1.4E-09 M	9.4E-10 M	0.6

ГАМК (неселективный) (агонист радиолиганд)			
ГАМК	3.9E-08 M	2.3E-08 M	0.8
АМРА (агонист радиолиганда)			
L-глутамат	3.9E-07 M	3.5E-07 M	0.9
каинат (агонист радиолиганда)			
каиновая кислота	2.5E-08 M	2.0E-08 M	0.7
глицин (антагонист радиолиганда)			
стрихнин	2.4E-08 M	2.2E-08 M	1.1
H1 (h) (антагонист радиолиганд)			
пириламин	2.9E-09 M	1.9E-09 M	1.4
H3 (h) (антагонист радиолиганд)			
(R) α -Me-гистамин	1.4E-09 M	3.4E-10 M	1.0
MT1 (ML1A) (h) (агонист радиолиганд)			
мелатонин	1.9E-10 M	1.5E-10 M	0.8
Y1 (h) (агонист радиолиганд)			
NPY	1.4E-10 M	9.8E-11 M	1.4
N нейрональный $\alpha 4\beta 2$ (h) (агонист радиолиганд)			
никотин	5.1E-09 M	1.7E-09 M	0.9
PCP (антагонист радиолиганда)			
МК 801	9.8E-09 M	5.6E-09 M	1.1
5-HT1A (h) (агонист радиолиганд)			
8-OH-DPAT	9.0E-10 M	4.5E-10 M	0.9
сигма (неселективный) (h) (агонист радиолиганд)			
галоперидол	1.9E-07 M	1.5E-07 M	1.2
sst (неселективный) (агонист радиолиганд)			
Соматостатин-14	1.8E-10 M	1.1E-10 M	0.9
Ca ²⁺ канал (L, сайт верапамила) (фенилалкиламин) (антагонист радиолиганд)			
D 600	5.2E-08 M	2.6E-08 M	0.6
Канал K _{ATФ} (антагонист радиолиганда)			
глибенкламид	2.1E-10 M	6.9E-11 M	1.1
Cl ⁻ канал (ГАМК-управляемый) (антагонист радиолиганд)			
пикротоксинин	1.1E-07 M	9.1E-08 M	0.8

Транспортер аденозина (антагонист радиолиганда)			
NBTI	2.1E-10	7.4E-11 М	0.9
переносчик норадреналина (h) (антагонист радиолиганд)			
протриптилин	6.2E-09 М	4.6E-09 М	1.7
транспортер дофамина (h) (антагонист радиолиганд)			
ВТСР	9.5E-09 М	5.0E-09 М	1.1
Транспортер 5-НТ (h) (антагонист радиолиганда)			
имипрамин	3.1E-09 М	1.4E-09 М	1.0

Примечание - IC50 – концентрация тестируемого соединения, которая вызывает 50% ингибирование контрольного ответа; Ki – константа ингибирования (выраженная в молях) для тестируемого соединения, которая обозначает сродство лиганда к рецептору. Концентрация конкурирующего тестируемого соединения, которое занимало бы 50% рецепторов, если бы не было радиолиганда. Он рассчитывается по значению IC50 с использованием уравнения Ченга-Пруссоффа; nH – коэффициент Хилла - наклон линейной части кривой концентрация-отклик, определенный нелинейным регрессионным анализом с использованием подгонки кривой уравнения Хилла.

Полученные результаты позволяют предположить, что основной нейрохимической мишенью препарата гидросиникотиноилглутамат кальция является глутаматная система, преимущественно AMPA-рецепторы.

3.1.4.3 Изучение влияния субстанции гидросиникотиноилглутамат кальция на синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера – пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа на переживающих срезах гиппокампа крыс *in vitro*

В ходе I серии экспериментов было выявлено, что перфузия переживающих срезов раствором, содержащим гидросиникотиноилглутамат кальция в концентрации 500 мкМ (n=5) увеличивал амплитуду (ПС) (1-й стимул – на $3,46 \pm 1\%$, $p < 0,05$ 30-й стимул – достоверно не изменял), а латентный период (ПС) уменьшал (1-й стимул – на $1,1 \pm 0,1$ мсек, 30-й стимул – на $1 \pm 0,1\%$; $p < 0,05$). (Рисунок 30) В концентрации 1мМ (n= 5) увеличивал амплитуду (ПС) (1-й стимул – на $27,8 \pm 2,6\%$, 30-й стимул – на $9,46 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$), а латентный период (ПС) уменьшал (1-й стимул – на $2,96 \pm 0,85$ мсек, 30-й стимул – на $1,96 \pm 0,52$ мсек; $p < 0,05$).

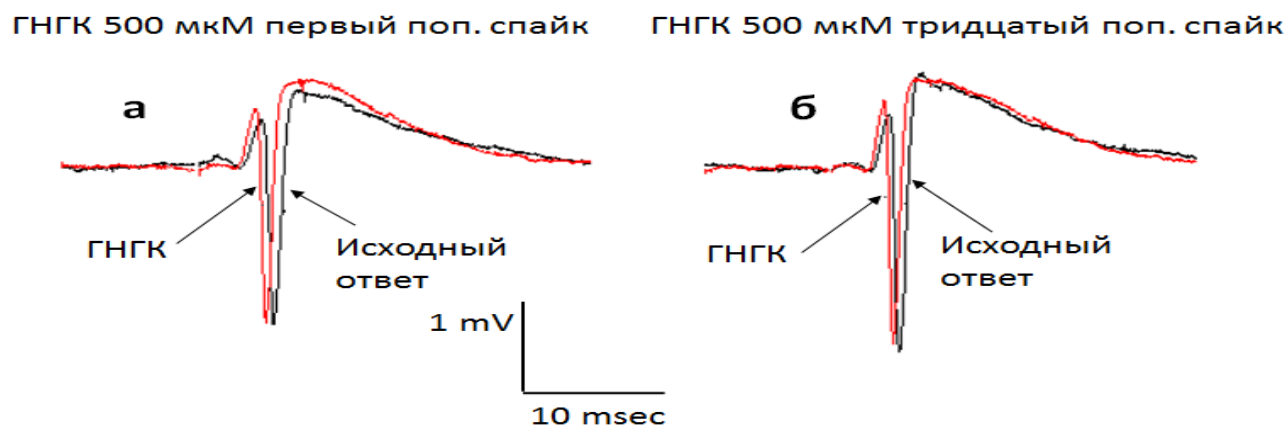


Рисунок 30 - Влияние добавления в перфузионную среду гидросиникотиноилглутамат кальция (ГНГК) в концентрации 500 мкМ на ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс. Калибровка по оси абсцисс – время, 10 мс; по оси ординат – амплитуда, 1 мВ.

В концентрации 2мМ (n= 5) увеличивал амплитуду (ПС) (1-й стимул – на $28.9 \pm 2.6\%$, 30-й стимул – на $15.6 \pm 9.6\%$; $p < 0,05$), а латентный период (ПС) уменьшал (1-й стимул – на 1.9 ± 0.3 мсек, 30-й стимул – на 1.56 ± 0.15 мсек; $p < 0,05$) (Рисунок 31).

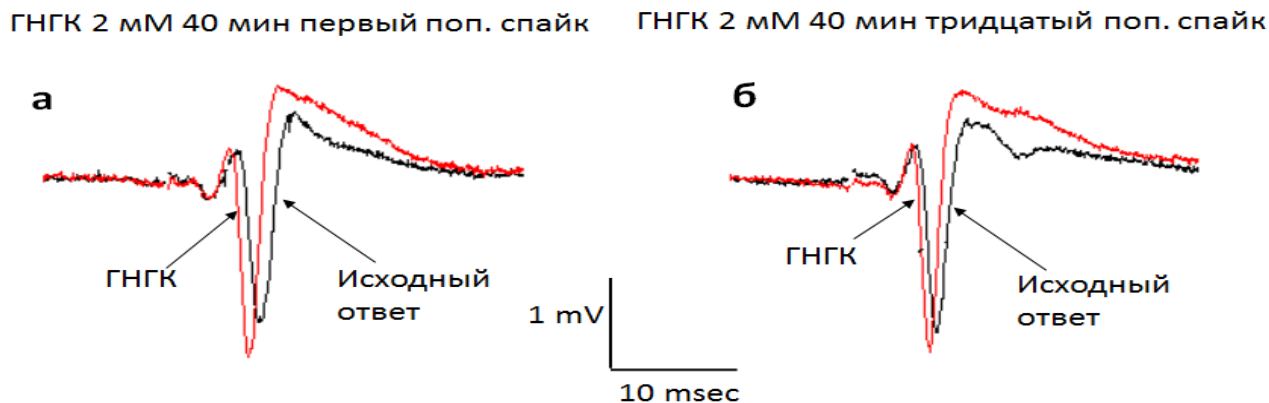


Рисунок 31 - Влияние добавления в перфузионную среду гидросиникотиноилглутамат кальция (ГНГК) в концентрации 2 мМ на ортодромные популяционные ответы в поле СА1 гиппокампа крыс. Калибровка по оси абсцисс – время, 10 мс; по оси ординат – амплитуда, 1 мВ.

Необходимо отметить, что гидросиникотиноилглутамат кальция в исследованном диапазоне концентраций (500мкМ-2мМ) не вызывал возникновения эпилептиформной активности. Следовательно, гидросиникотиноилглутамат кальция в зависимости от концентрации способен облегчать синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера – пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа крыс, не вызывая эпилептиформной активности.

3.1.4.4 Исследование механизма действия гидросиникотиноилглутамата кальция: роль глутаматергической системы в антиамнестическом эффекте

Эксперименты показали, что введение МК-801 (селективный блокатор NMDA рецептора) в дозе 0,1 мг/кг до обучения условно-рефлекторной реакции избегания (УРПИ) вызывало амнезию у животных. Это проявлялось в значительном сокращении латентного времени рефлекса при его воспроизведении через 24 часа после обучения (Таблица 61). При увеличении дозы до 0,25 мг/кг амнезия становилась более выраженной, и большинство крыс, получавших эту дозу, забывали навык, заходя в темную камеру. Количество обучившихся животных в этой группе составляло лишь 20% (Таблица 61).

Исследование влияния гидросиникотиноилглутамат кальция в дозах 40 и 80 мг/кг на МК-801-индуцированную амнезию УРПИ не выявило защитного эффекта препарата. При воспроизведении УРПИ через 24 часа после введения МК-801 в дозе 0,25 мг/кг у крыс, предварительно получавших гидросиникотиноилглутамат кальция в дозах 40 и 80 мг/кг, не

наблюдалось изменения латентного времени рефлекса и числа обучившихся животных (Таблицей 61). Это, по-видимому, связано с тем, что гидроксиникотиноилглутамат кальция в используемых дозах практически не взаимодействует с NMDA рецепторами.

Исследование действия антагониста AMPA-рецепторов глутаматергической системы DNQX на антиамнестические свойства гидроксиникотиноилглутамат кальция в модели амнезии УРПИ, вызванной МЭШ, показало следующее. В контрольных группах крыс после МЭШ только 25–27,3 % животных помнили об ударе током и избегали темного отсека камеры при воспроизведении рефлекса через 24 часа. В контрольных группах без МЭШ этот показатель составлял от 100 до 72,8 %. DNQX не вызывал дефицита обучения и воспроизведения памятного следа, а также не влиял на амнезию УРПИ, вызванную МЭШ (Таблица 62). Гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 40 мг/кг, введенный за 30 минут до обучения, устранял амнезию МЭШ, статистически достоверно увеличивая процент обучавшихся животных до 63,6 %. В группе крыс, получивших гидроксиникотиноилглутамат кальция и DNQX, антиамнестический эффект гидроксиникотиноилглутамат кальция был полностью устранен DNQX, и количество обучавшихся животных составило всего 18,2 % (Таблица 62). Эти результаты свидетельствуют об участии AMPA подтипа глутаматных рецепторов в реализации антиамнестических свойств препаратов.

Таким образом, можно предположить, что антиамнестическое действие гидроксиникотиноилглутамат кальция определяется в значительной степени его взаимодействием с AMPA подтипом глутаматных рецепторов.

Таблица 61 - Влияние гидроксиникотиноилглутамат кальция на воспроизведении на модели амнезии УРПИ, вызванной МК-801

Группа животных	Доза, мг/кг	Воспроизведение через 24 часа	
		Латентное время рефлекса	Доля животных, не зашедших в темную камеру, %
Контроль	-	180	100
МК-801	0,25	52,53 ± 21,81 [#]	20 ^{\$}
ГНГК + МК801	40+0,25	62,25 ± 22,45	24
	80+0,25	64,16 ± 30,04	28

Примечание - # - достоверность значений относительно группы контроля, при $P \leq 0,05$ (критерий Стьюдента); \$ - при $P \leq 0,05$ (точный критерий Фишера).

Таблица 62 - Влияние антагониста AMPA рецепторов глутаматергической системы DNQX на антиамнестический эффект гидросиникотиноилглутамат кальция на модели амнезии УРПИ, вызванной МЭШ

Группа животных	Доза, мг/кг	Воспроизведение через 24 часа	
		Латентное время рефлекса, с	Доля животных, не зашедших в темную камеру, %
Контроль	-	143,36 ± 19,06	72,7
МЭШ	-	75,64 ± 21,18	27,3 [#]
ГНГК + МЭШ	40	151,64 ± 15,72*	63,6 ^{\$}
DNQX	10	161,25 ± 17,54	87,5
DNQX+МЭШ	10	77,00 ± 26,82	20
ГНГК + DNQX	40+10	147,83 ± 30,24	66,7
ГНГК + DNQX + МЭШ	40+10	49,00 ± 18,95**	18,2 ^{&}

Примечание - # - достоверность отличий от интактных крыс (контроля), при $P \leq 0,05$ (χ^2). * - достоверность отличий от группы крыс с МЭШ, при $P \leq 0,05$ (t-критерий Стьюдента); \$ - при $P \leq 0,05$ (χ^2). ** - достоверность отличий от группы крыс ГНГК + МЭШ, при $P \leq 0,05$ (t-критерий Стьюдента); & - при $P \leq 0,05$ (χ^2).

Таким образом фармакодинамика гидросиникотиноилглутамат кальция была изучена: на уровне взаимодействий с основными нейрорецепторами, которые могут влиять на процессы клеточной гибели (молекулярный уровень), а также на уровне нейро-глиального ансамбля в условиях моделирования геморрагического инсульта (тканевой уровень), на срезах гиппокампа (на уровне структуры ЦНС) и в условиях *in vivo* на уровне целостного организма с использованием специфических фармакологических анализаторов. Полученные результаты позволяют предположить, что основной нейрохимической мишенью гидросиникотиноилглутамат кальция является глутаматная система, преимущественно AMPA-рецепторы. Принимая во внимание способность гидросиникотиноилглутамат кальция корректировать глиальный состав и нейро-глиальное соотношение в условиях внутримозговой сосудистой катастрофы и значимость глутамата в процессах нейро- и глиопротекции, не следует исключать того, что мишенью препарата могут являться глутаматные рецепторы глиоцитов. Данные о способности гидросиникотиноилглутамат кальция облегчать спайковую активность пирамидных нейронов поля CA1 гиппокампа при стимуляции коллатералей Шаффера и

зависимости антиамнестического эффекта препарата от активности AMPA-рецепторов согласуются с результатами экспериментов *in vitro* [211].

Резюме. Фармакокинетика гидроксиникотиноилглутамат кальция зависит от дозы: до 100 мг/кг действует линейно, выше — нелинейно. Доклинические исследования показали отсутствие мутагенности, аллергенности, иммунотоксичности и других негативных эффектов. ГНГК связывается с AMPA и NMDA рецепторами, обладает нейропротективными свойствами, улучшая нейроархитектонику после геморрагического инсульта и облегчая нейротрансмиттерную передачу в системе Шаффера.

3.2 Клинические исследования на здоровых добровольцах и пациентах

3.2.1 Изучение фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамат кальция на здоровых добровольцах.

Целью данного исследования являлось изучение фармакокинетики соединения в виде раствора для внутривенного введения 5 мг/мл 5мл у здоровых добровольцев. По результатам скрининга в исследование было включено 20 здоровых мужчин. Средний возраст рандомизированных добровольцев, которым был введен препарат исследования составил $30,10 \pm 8,12$ лет, рост $1,81 \pm 0,08$ м, масса тела $80,94 \pm 12,46$ кг, средний ИМТ $24,69 \pm 3,56$ кг/м².

В качестве добровольцев в исследование включались лица, добровольно изъявившие желание участвовать в исследовании, прошедшие физикальное и лабораторно-инструментальное обследование и соответствующие следующим критериям:

1. пол: мужчины;
2. возраст 18 – 45 лет;
3. верифицированный диагноз «здоров»: отсутствие патологии со стороны желудочно-кишечного тракта, печени, почек, сердечно-сосудистой системы, ЦНС (предварительно проведенные стандартные клинико-лабораторные и инструментальные исследования не выявили клинически значимых отклонений от нормы);
4. отрицательные результаты анализов крови на ВИЧ (форма 50), сифилис (RW), гепатит В (HBs-Ag) и гепатит С (HCV РНК);
5. индекс массы тела (ИМТ) составляет $18 \leq \text{ИМТ} \leq 32$ кг/м²;
6. наличие письменного согласия добровольца на включение в исследование;
7. некурящие добровольцы или бывшие курильщики (определяются как полностью бросившие курить не менее 3 месяцев до включения в исследование).

Критерии невключения.

Лица, имеющие хотя бы один из перечисленных ниже признаков, не были включены в исследование:

1. Отягощенный аллергологический анамнез;
2. повышенная чувствительность к гидроксиникотиноилглутамату или вспомогательным веществам, входящим в состав препарата исследования;
3. хронические заболевания сердечно-сосудистой, бронхолегочной, нейроэндокринной системы, а также заболевания желудочно-кишечного тракта, печени, почек, крови;
4. исходный уровень АД: $90/60 < АД < 140/90$ мм рт. ст.;
5. исходный уровень ЧСС: $55 < ЧСС < 90$ уд. В мин.;
6. исходный уровень ЧДД: $16 < ЧДД < 20$ в мин.;
7. температура тела: $36,5 < t^{\circ} < 37,0$ °С;
8. хирургические вмешательства на желудочно-кишечном тракте (за исключением аппендэктомии);
9. острые инфекционные заболевания менее чем за 4 недели до скрининга;
10. регулярный прием лекарственных препаратов менее чем за 2 недели до начала исследования;
11. прием лекарственных препаратов, оказывающих выраженное влияние на гемодинамику, функцию печени и др. (барбитураты, омепразол, циметидин и т.д.), менее чем за 2 месяца до начала исследования;
12. донорская сдача крови (450 мл крови или плазмы и более) менее чем за 2 месяца до начала исследования;
13. участие любом КИ препаратов менее чем за 3 месяца до начала скрининга;
14. прием более чем 10 ед. алкоголя в неделю (1 ед. алкоголя эквивалентна ½ л пива, 200 мл вина или 50 мл спирта) или анамнестические сведения об алкоголизме, наркомании, злоупотреблении лекарственными препаратами;
15. курение сигарет или эквивалентного количества никотин-содержащих продуктов (в том числе, но, не ограничиваясь: табачные стики для систем нагревания табака, жидкость и/или картриджи для электронных сигарет) (положительный тест на котинин);
16. положительный анализ мочи на следы наркотиков и психотропных веществ (опиаты (морфин), барбитураты, каннабиноид/марихуана, бензодиазепин, метадон, фенциклидин);
17. положительный тест на содержание алкоголя в выдыхаемом воздухе;
18. невозможность понимать или следовать инструкциям протокола.

Добровольцы были проинформированы о том, что во время всего исследования они должны соблюдать стандартный режим: не подвергаться физической и психической нагрузке, не употреблять спиртные напитки, кофе, чай, колу, какао и цитрусовые соки, а также не принимать никакие другие лекарственные препараты. В обязанности добровольцев также входило информирование врача-исследователя о любых изменениях режима и самочувствия во время и после проведения фармакокинетического исследования [3,10,16,19,20,22,33,35,173].

В проведенном исследовании оценены следующие параметры фармакокинетики:

- C_{\max} – величина максимальной концентрации;
- T_{\max} – время достижения максимальной концентрации;
- AUC_{0-t} – площадь под кривой «концентрация в сыворотке-время» с момента введения лекарственного препарата до последней определяемой концентрации во временной точке t ;
- $AUC_{0-\infty}$ – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» (от нуля до бесконечности);
- k_{el} – константа элиминации;
- V_d – объем распределения;
- $T_{1/2}$ – период полувыведения;
- C_{\max}/AUC – относительная скорость всасывания.

Были получены следующие результаты оценки фармакокинетики.

Среднее значение AUC_{0-t} для исследуемого препарата при внутривенном введении как ($M \pm SD$) составило $934,0 \pm 211,1$ нг·ч/мл (диапазон от 484,0 до 1340,2 нг·ч/мл), среднее значение $AUC_{0-\infty}$ ($M \pm SD$) составило $946,4 \pm 212,7$ нг·ч/мл (диапазон от 492,7 до 1356,1 нг·ч/мл), среднее значение C_{\max} составило $1875,0 \pm 306,3$ нг/мл (диапазон от 1470,0 до 2570,0 нг/мл), медиана T_{\max} составила 0,50 ч (диапазон 0,50 – 1,00 ч), среднее значение k_{el} составило $0,63375 \pm 0,13655$, среднее значение V_d составило $44,84 \pm 10,63$ л, среднее значения $T_{1/2}$ составило $1,13 \pm 0,20$ ч, среднее значение C_{\max}/AUC_{0-t} составило $2,0670 \pm 0,3765$ ч⁻¹. Индивидуальные значения фармакокинетических параметров представлены ниже (Таблица 63).

Таблица 63. Фармакокинетические параметры гидроксиникотиноила глутамата в сыворотке крови добровольцев после однократного введения исследуемого препарата внутривенно

№ д-ца	C_{\max} , нг/мл	T_{\max} , ч	AUC_{0-t} , нг·ч/мл	$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	k_{el} , ч ⁻¹	V_d , л	$T_{1/2}$, ч	C_{\max}/AUC , ч ⁻¹
01	1750,0	0,08	738,3	747,9	0,56380	59,29	1,23	2,3702
02	2350,0	0,08	1207,7	1222,2	0,61599	33,21	1,13	1,9458
03	1830,0	0,08	811,8	822,6	0,52989	57,35	1,31	2,2542

№ д-ца	C_{\max} , нг/мл	T_{\max} , ч	AUC_{0-t} , нг·ч/мл	$AUC_{0-\infty}$, нг·ч/мл	k_{el} , ч ⁻¹	V_d , л	$T_{1/2}$, ч	C_{\max}/AUC , ч ⁻¹
04	2130,0	1,00	1340,2	1356,1	0,60632	30,41	1,14	1,5893
05	2340,0	0,50	922,0	936,0	0,53123	50,28	1,30	2,5379
06	1990,0	0,50	1108,8	1131,5	0,49436	44,69	1,40	1,7947
07	1470,0	0,50	484,0	492,7	0,75130	67,54	0,92	3,0374
08	1960,0	0,50	830,0	848,4	0,66352	44,41	1,04	2,3614
09	1510,0	0,50	825,4	838,6	0,54066	55,14	1,28	1,8293
10	1600,0	1,00	742,6	752,0	1,01688	32,69	0,68	2,1546
11	1550,0	0,50	599,1	609,9	0,76837	53,34	0,90	2,5873
12	1730,0	0,50	944,7	950,7	0,77261	34,04	0,90	1,8314
13	1780,0	0,50	945,1	958,5	0,52200	49,97	1,33	1,8834
14	1970,0	1,00	1240,9	1249,3	0,69805	28,67	0,99	1,5876
15	1550,0	1,00	886,5	891,2	0,84465	33,21	0,82	1,7485
16	2000,0	1,00	1018,7	1031,5	0,54178	44,73	1,28	1,9633
17	1830,0	1,00	1003,1	1015,9	0,60026	41,00	1,15	1,8244
18	2570,0	0,65	1106,8	1119,4	0,51160	43,65	1,35	2,3220
19	2020,0	0,62	1028,5	1045,4	0,53223	44,93	1,30	1,9640
20	1570,0	0,50	895,3	909,0	0,56945	48,29	1,22	1,7536
Mean	1875,0	0,50	934,0	946,4	0,63375	44,84	1,13	2,0670
Geom	1852,2	1,00	909,4	921,8	0,62153	43,63	1,12	2,0368
Median	1830,0	0,24	933,3	943,3	0,58486	44,71	1,19	1,9545
Min	1470,0	36,17	484,0	492,7	0,49436	28,67	0,68	1,5876
Max	2570,0	1,00	1340,2	1356,1	1,01688	67,54	1,40	3,0374
SD	306,3	0,50	211,1	212,7	0,13655	10,63	0,20	0,3765
CV	16,34	0,50	22,60	22,47	21,55	23,71	17,98	18,21

Ниже представлен усредненный фармакокинетический профиль концентрации гидроксиникотиноила глутамата в сыворотке крови добровольцев после однократного введения исследуемого препарата внутривенно в линейных координатах (Рисунок 32).

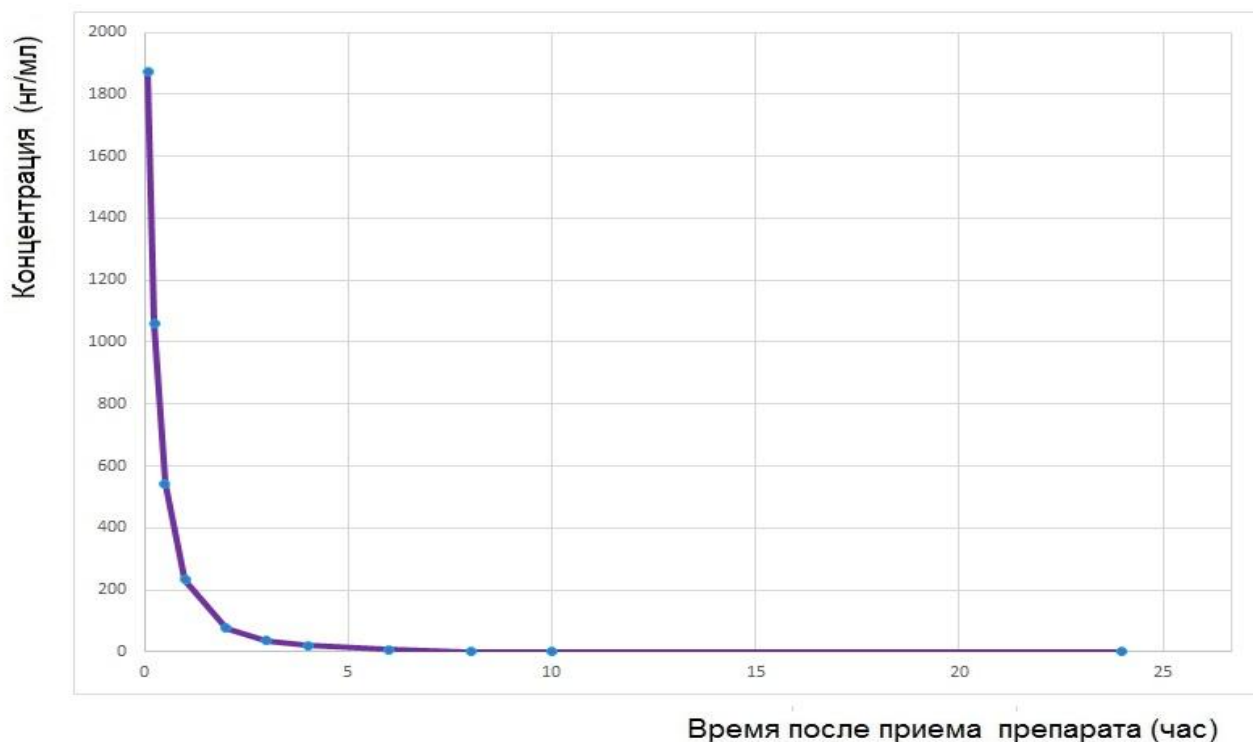


Рисунок 32 – Усреднённый фармакокинетический профиль концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови добровольцев после однократного введения внутривенно в дозе 25мг в линейных координатах.

Полученные результаты свидетельствуют о линейности фармакокинетических параметров и позволяют прогнозировать курсы и длительность применения у пациентов. Определена двухкратная межиндивидуальная вариабельность ряда фармакокинетических параметров гидроксиникотиноилглутамата кальция при внутривенном введении. Значения оценки средних фармакокинетических параметров для внутривенного введения составили: $T_{1/2}$ период полувыведения – 1,13 часа, V_d объем распределения (параметр, отражающий кажущийся объем жидкости, необходимый для равномерного распределения введенной дозы препарата в концентрации, соответствующей его уровню в плазме крови) - 44,84 литра, константа элиминации k_{el} (показывает, какая часть ЛС элиминируется из организма в единицу времени) - $0,63375 \text{ ч}^{-1}$. Высокий V_d показывает, что лекарство активно распределяется в тканях и проникает через гистогематические барьеры. Полученные данные позволили разработать дозовый режим: 25 мг внутривенно струйно медленно один раз в сутки[3,10,16,19,20,22,33,35,173].

3.2.2 Изучение безопасности применения гидроксиникотиноилглутамат кальция на здоровых добровольцах и пациентах

Проведена комплексная оценка безопасности применения гидроксиникотиноилглутамат кальция. В оценке безопасности участвовало 20 добровольцев и 124 пациента с хроническим

нарушением мозгового кровообращения. Безопасность и переносимость препарата оценивали на протяжении всего исследования на основании динамического клинического наблюдения за субъективными и объективными данными состояния добровольцев (жалобы, осмотр, АД, ЧСС, температура тела и т. п.).

Мониторинг нежелательных явлений (НЯ) осуществлялся в ходе всего исследования, с момента подписания информированного согласия.

На фоне однократного введения гидроксиникотиноилглутамат кальция клинически значимых изменений в общем анализе мочи ни у одного добровольца на протяжении всего исследования не наблюдалось; у добровольцев отмечались клинически незначимые изменения некоторых биохимических и гематологических показателей. Изменения были незначительными, в границах нормальных значений. Динамика средних значений лабораторных показателей представлена (Таблицы 64 – 65) [3,10,16,19,20,22,33,35,173].

Таблица 64 - Динамика гематологических показателей у здоровых добровольцев после однократного внутривенного введения препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция

Показатель	Скрининг		Через 24 час		6 день		28 день	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
гемоглобин	147,5	8,9	148,0	15,8	146,0	8,6	149,6	8,5
эритроциты	4,8	0,3	4,8	0,5	4,7	0,3	4,7	0,4
MCV	90,5	4,1	90,2	3,9	86,6	16,7	89,9	4,5
MCH	30,8	1,5	30,8	1,6	30,9	1,5	31,1	1,7
MCHC	345,2	6,0	375,9	8,8	344,5	6,8	345,5	7,6
гематокрит	43,4	2,3	44,2	6,9	41,4	6,4	42,3	2,1
цв.показатель	0,9	0,0	0,9	0,0	0,9	0,0	1,0	0,2
тромбоциты	251,8	51,8	237,7	68,1	259,4	66,7	253,6	65,3
лейкоциты	5,9	1,4	5,9	1,6	6,2	1,7	5,7	1,3
н.палочкоядерные	2,1	1,0	2,2	1,5	1,8	1,1	2,3	1,3
н.сегментоядерные	57,6	7,8	60,8	7,0	59,2	7,6	57,6	7,7
эозинофилы	3,0	1,9	2,5	2,0	2,8	2,0	2,7	1,7
лимфоциты	28,8	6,8	27,4	6,7	29,5	7,6	41,8	7,2
моноциты	8,4	3,3	7,0	3,2	6,7	2,7	8,9	3,0

СОЭ	3,6	0,9	3,5	1,7	3,8	3,4	3,3	2,4
-----	------------	-----	------------	-----	------------	-----	------------	-----

Примечание - * - $p < 0.05$; – в сравнении с исходным значением на Скрининге

Таблица 65 - Динамика биохимических показателей у здоровых добровольцев после однократного внутривенного введения препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция

Показатель	Скрининг		Через 24 час		6 день		28 день	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
глюкоза	4,94	0,50	4,74	0,44	4,96	0,44	5,01	0,51
билирубин	13,47	5,55	14,27	5,28	11,93	4,29	11,80	5,15
общ.белок	74,10	3,78	71,37	3,60	73,68	3,29	73,57	3,68
креатинин	88,80	12,30	88,67	12,05	122,55	168,78	90,70	12,53
ЩФ	184,47	45,99	188,30	56,46	194,70	46,90	191,93	54,23
АСТ	23,37	8,41	21,97	10,46	24,47	12,06	23,03	7,01
АЛТ	25,80	13,54	28,07	25,00	27,37	14,36	26,40	12,66

Примечание - * - $p < 0.05$; – в сравнении с исходным значением на Скрининге

Статистически значимых достоверных отклонений лабораторных показателей на протяжении всего исследования не наблюдалось.

Уровни жизненных показателей колебались в границах нормальных значений, дополнительных обследований или специальных назначений в связи с изменениями жизненных показателей никому из добровольцев не потребовалось [3,10,16,19,20,22,33,35,173].

Серьезных нежелательных реакций у добровольцев при введении гидроксиникотиноилглутамат кальция не наблюдалось. Описание всех наблюдавшихся нежелательных явлений представлено (Таблица 66).

Таблица 66 - Нежелательные явления (НЯ), наблюдавшиеся при однократном внутривенном введении препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция добровольцам

Доброволец		Описание НЯ	Продолжительность	Исход, принятые меры	Комментарии
№	Код				
03	ШАС	Легкое головокружение	10-15 сек от начала введения; длилось 3-4 сек	Прошло самостоятельно	
		Ощущение жара в лице	4,5 мин от начала введения; длилось 3 мин.	Прошло самостоятельно	

05	ПНН	Легкое головокружение	15,5 мин от начала введения; длилось 2-3 мин	Прошло самостоятельно	
07	АВА	Ощущение тепла на лице	20 сек от начала введения; длилось 5 сек	Прошло самостоятельно	
11	ЛСА	Ощущения тепла в руке в месте введения препарата	70 сек от начала введения; длилось ~10 сек	Прошло самостоятельно	
12	ФОА	Умеренно выраженная гиперемия лица	2 мин от начала введения; длилось 25 мин	Прошло самостоятельно	
4	ГИВ	Слабо выраженная гиперемия лица	5 мин от начала введения; длилось 7 мин	Прошло самостоятельно	
		Клинически значимые изменения в <u>биохимическом анализе крови</u> : АЛТ – 129 Е/л (Норма: 0-40 Е/л), АСТ – 52 Е/л (Норма: 0-37 Е/л)	Через сутки после введения. На визите V ₂ биохимические показатели вернулись к нормальным значениям.	Прошло самостоятельно	
		Явления ОРЗ (насморк, кашель, подъем температуры тела до 38,2°C).	Через 6 дней после введения препарата, полностью завершилось	Прошло самостоятельно	
		Клинически значимые изменения в <u>общем анализе крови</u> : СОЭ – 20 мм/ч (Норма: 2-10 мм/ч).	Через 13 дней после введения. На визите V ₃ гематологические показатели вернулись к нормальным значениям.	Прошло самостоятельно	Отклонение, вероятно, связано с перенесенным заболеванием
15	БМВ	Клинически значимые изменения в <u>биохимическом анализе крови</u> : ЩФ – 343	Через сутки после введения. На визите V ₂ биохимические показатели	Прошло самостоятельно	

		Е/л (Норма: 98-279 Е/л),	вернулись к нормальным значениям.		
17	СМС	Слабо выраженная гиперемия лица	1 мин от начала введения; длилось 5 мин	Прошло самостоятельно	
18	МСА	Чувство тяжести в катетеризированной руке	в процессе введения; длилось 3 мин	Прошло самостоятельно	
19	ПДА	Клинически значимые изменения в <u>общем анализе крови</u> : тромбоциты – $135 \cdot 10^9$ кл/л (Норма: $180-320 \cdot 10^9$ кл/л).	Через сутки после введения. На визите V ₂ биохимические показатели вернулись к нормальным значениям.	Прошло самостоятельно	
23	ГАА	Ощущения легкого онемения в руке в месте установки катетера	1 мин от начала введения; длилось 3 мин	Прошло самостоятельно	
		Легкая гиперемия лица	33 мин от начала введения; длилось 21 мин	Прошло самостоятельно	
24	ГВП	Ощущение “прохождения препарата по сосудам”	во время введения препарата	Прошло самостоятельно	
		Ощущение дискомфорта в поясничной области справа	57 мин от начала введения; длилось 1 мин	Прошло самостоятельно	
25	ЕИЕ	Чувство жара	57 мин от начала введения; длилось 1 мин	Прошло самостоятельно	
		Гиперемия лица	57 мин от начала введения; длилось 1 мин	Прошло самостоятельно	
		Клинически значимое <u>изменение на ЭКГ</u> : АВ-блокада Мобитца II степени, не сопровождающаяся клинической симптоматикой	Через сутки после введения	Вызван на незапланированный визит через 4 дня после введения препарата: зарегистрир	Преходящая АВ-блокада Мобитца наблюдается у добровольца с 15 лет. При включении в

				ована AV-блокада Мобитца I степени.	исследование добровольца (врач по образованию) считал эту информацию несущественной для исследования, в связи с чем не сообщил ее врачу-исследователю.
31	ГАН	Легкое пощипывание в месте инъекции	3 мин после окончания введения; длилось 15 мин	Прошло самостоятельно	
32	ГАН	Умеренно выраженная болезненность в месте инъекции давящего характера	от начала введения; длилось 1 час 10 мин	Прошло самостоятельно	
36	КАВ	Чувство "распирания" в месте инъекции	после введения первой половины дозы препарата; длилось 1 час 10 мин	Прошло самостоятельно	
37	КАВ	Чувство легкого ушиба в месте инъекции	при введении препарата; длилось 50 мин	Прошло самостоятельно	
38	ГСИ	Чувство "распирания" в месте инъекции	на фоне введения препарата после введения 1 мл (10 сек)	Прошло самостоятельно	
39	КПА	Чувство "распирания" в месте инъекции	при введении препарата; длилось 16 мин	Прошло самостоятельно	
		Чувство легкого ушиба в месте инъекции	16 мин от начала введения; длилось 24 мин	Прошло самостоятельно	
40	ШСС	Легкое пощипывание в месте инъекции	На фоне введения препарата; длилось 37 мин	Прошло самостоятельно	

	Чувство легкого ушиба в месте инъекции	37 мин от начала введения; длилось 2 часа	Прошло самостоятельно	
--	--	---	-----------------------	--

Дополнительных лабораторных и инструментальных обследований, кроме указанных в Таблице 66, не потребовалось. Госпитализация сверх предусмотренной Протоколом исследования не продлевалась. Клинически значимых отклонений на протяжении всего исследования ни у одного добровольца не наблюдалось. Различия по сравнению с исходным значением параметров перед введением препарата в некоторых временных точках, можно объяснить ранним подъемом перед исследованием и волнением в связи с установкой катетера и введением неизвестного препарата.

В клиническом исследовании у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения была проведена оценка безопасности применения по сравнению с группой плацебо. Клинически значимых отклонений от нормы результатов общего анализа крови, результатов биохимического анализа крови и результатов общего анализа мочи не зарегистрировали ни у одного пациента из группы исследуемого препарата или из группы плацебо.

В соответствии с результатами статистического анализа, статистически значимых изменений показателей в динамике наблюдения жизненно важных показателей, данных объективных исследований и других наблюдениях, затрагивающих безопасность или статистически значимых межгрупповых различий, не отметили.

Сопутствующие заболевания сердечно-сосудистой системы были диагностированы у всех пациентов из обеих групп; сопутствующие неврологические заболевания – у 50 (80,65%) и 49 (79,03%) пациентов из основной и контрольной групп соответственно; сопутствующие заболевания желудочно-кишечного тракта – у 24 (38,71%) и 21 (33,87%) пациентов из основной и контрольной групп соответственно; сопутствующие заболевания мочеполовой системы – у 13 (20,97%) и 13 (20,97%) пациентов из основной и контрольной групп соответственно; сопутствующие заболевания органов дыхания – у 8 (12,90%) и 5 (8,06%) пациентов из основной и контрольной групп соответственно; сопутствующие гинекологические заболевания – у 6 (12,24%) и 4 (8,00%) пациентов из основной и контрольной групп соответственно; сопутствующие заболевания эндокринной системы – у 4 (6,45%) и 2 (3,23%) пациентов из основной и контрольной групп соответственно; сопутствующие психические, инфекционные и дерматологические заболевания отсутствовали.

Наиболее распространенными сопутствующими заболеваниями у пациентов из основной группы были гипертензия (71,0%), церебральная ишемия (38,7%), гипертоническая болезнь

сердца (29,0%), нарушение мозгового кровообращения (27,4%), хронический гастрит (22,6%), патология спины (21,0%), ишемия миокарда (14,5%), хронический пиелонефрит (14,5%), сосудистая энцефалопатия (12,9%) и хронический бронхит (11,3%). У пациентов из контрольной группы наиболее распространенными сопутствующими заболеваниями были гипертензия (66,1%), церебральная ишемия (40,3%), гипертоническая болезнь сердца (33,9%), нарушение мозгового кровообращения (25,8%), хронический гастрит (22,6%), патология спины (16,1%), ишемия миокарда (14,5%), хронический пиелонефрит (12,9%), сосудистая энцефалопатия (12,9%) и хронический холецистит (11,3%) (Таблица 67).

В качестве сопутствующей терапии наиболее распространенными препаратами у пациентов из основной группы были ингибиторы агрегации тромбоцитов в комбинации (45,2%), эналаприл (30,6%), аторвастатин (27,4%), амлодипин (24,2%), лозартан (21,0%), розувастатин (17,7%), бисопролол (17,7%), индапамид (11,3%), периндоприл (11,3%) и эналаприл в комбинации с диуретиками (11,3%). У пациентов из контрольной группы наиболее распространенными средствами сопутствующей терапии были эналаприл (50,0%), ингибиторы агрегации тромбоцитов в комбинации (37,1%), бисопролол (33,9%), аторвастатин (32,3%), индапамид (29,0%), лозартан в комбинации с диуретиками (29,0%), лозартан (19,4%) и розувастатин (17,7%) (Таблица 68).

Таблица 67 - Сопутствующие заболевания по категориям

MedDRA SOC	MedDRA PT	Основная группа (N = 62)	Контрольная группа (N = 62)
10007541 Нарушения со стороны сердца	10020823 Гипертоническая болезнь сердца	18 (29,0%)	21 (33,9%)
	10028600 Ишемия миокарда	9 (14,5%)	9 (14,5%)
10014698 Эндокринные нарушения	10018498 Зоб	1 (1,6%)	2 (3,2%)
	10049046 Аутоиммунный тиреоидит	1 (1,6%)	0 (0,0%)
10015919 Нарушения со стороны органа зрения	10007739 Катаракта	1 (1,6%)	0 (0,0%)
10017947 Желудочно-кишечные нарушения	10008882 Хронический гастрит	14 (22,6%)	14 (22,6%)
	10013836 Дуоденальная язва	1 (1,6%)	0 (0,0%)
	10017822 Язва желудка	2 (3,2%)	1 (1,6%)
	10033649 Панкреатит хронический	3 (4,8%)	0 (0,0%)
10019805 Нарушения со стороны печени и желчевыводящих путей	10008617 Хронический холецистит	3 (4,8%)	7 (11,3%)
	10008629 Холелитиаз	2 (3,2%)	2 (3,2%)
10021881 Инфекции и инвазии	10009137 Хронический синусит	1 (1,6%)	1 (1,6%)
	10009152 Хронический тонзиллит	0 (0,0%)	1 (1,6%)
	10011781 Цистит	2 (3,2%)	1 (1,6%)
	10037601 Хронический пиелонефрит	9 (14,5%)	8 (12,9%)
10027433 Нарушения метаболизма и питания	10020603 Гиперхолестеринемия	1 (1,6%)	4 (6,5%)
	10029883 Ожирение	1 (1,6%)	0 (0,0%)
	10058108 Дислипидемия	1 (1,6%)	1 (1,6%)

MedDRA SOC	MedDRA PT	Основная группа (N = 62)	Контрольная группа (N = 62)
10028395 Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани	10003983 Патология спины	13 (21,0%)	10 (16,1%)
	10031161 Остеартрит	1 (1,6%)	3 (4,8%)
10029104 Доброкачественные, злокачественные и неуточненные новообразования (вкл. кисты и полипы)	10036940 Аденома предстательной железы	0 (0,0%)	1 (1,6%)
	10046798 Лейомиома матки	5 (8,1%)	5 (8,1%)
10029205 Нарушения со стороны нервной системы	10008120 Церебральная ишемия	24 (38,7%)	25 (40,3%)
	10008196 Нарушение мозгового кровообращения	17 (27,4%)	16 (25,8%)
	10063661 Сосудистая энцефалопатия	8 (12,9%)	8 (12,9%)
10037175 Психические расстройства	10022437 Бессонница	0 (0,0%)	1 (1,6%)
10038359 Нарушения со стороны почек и мочевыводящих путей	10055171 Гипертензивная нефропатия	0 (0,0%)	1 (1,6%)
10038604 Нарушения со стороны репродуктивной системы и молочных желез	10004446 Доброкачественная гиперплазия предстательной железы	1 (1,6%)	1 (1,6%)
	10036978 Простатит	1 (1,6%)	1 (1,6%)
10038738 Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения	10006458 Бронхит, хронический	7 (11,3%)	4 (6,5%)
10042613 Процедуры оперативного и консервативного лечения	10003010 Аппендэктомия	1 (1,6%)	0 (0,0%)
	10008611 Холецистэктомия	1 (1,6%)	0 (0,0%)
	10021151 Гистерэктомия	1 (1,6%)	0 (0,0%)
10047065 Нарушения со стороны сосудов	10020772 Гипертензия	44 (71,0%)	41 (66,1%)

Таблица 68 - Сопутствующая терапия

АТС 03	АТС 05	Основная группа (N = 62)	Контрольная группа (N = 62)
A02B Препараты для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки и ГЭРБ	A02BC01 Омепразол	1 (1,6%)	0 (0,0%)
A11G Аскорбиновая кислота (витамин С), включая комбинации с другими средствами	A11GA01 Аскорбиновая кислота (витамин С)	1 (1,6%)	1 (1,6%)
B01A Анти тромботические средства	B01AC30 Ингибиторы агрегации тромбоцитов в комбинации	28 (45,2%)	23 (37,1%)
C01E Другие препараты для лечения заболеваний сердца	C01EB15 Триметазидин	0 (0,0%)	1 (1,6%)
C02A Антиадренергические средства центрального действия	C02AC05 Моксонидин	4 (6,5%)	0 (0,0%)
C03B Тиазидоподобные диуретики	C03BA11 Индапамид	7 (11,3%)	18 (29,0%)
C07A Бета-адреноблокаторы	C07AB02 Метопролол	6 (9,7%)	4 (6,5%)
	C07AB07 Бисопролол	11 (17,7%)	21 (33,9%)
	C07AB12 Небиволол	1 (1,6%)	0 (0,0%)
C08C Селективные блокаторы кальциевых каналов с	C08CA01 Амлодипин	15 (24,2%)	0 (0,0%)

АТС 03	АТС 05	Основная группа (N = 62)	Контрольная группа (N = 62)
преимущественным действием на сосуды			
C08D Селективные блокаторы кальциевых каналов с прямым действием на сердце	C08DA01 Верапамил	1 (1,6%)	0 (0,0%)
C09A Ингибиторы АПФ	C09AA01 Каптоприл	1 (1,6%)	0 (0,0%)
	C09AA02 Эналаприл	19 (30,6%)	31 (50,0%)
	C09AA03 Лизиноприл	6 (9,7%)	0 (0,0%)
	C09AA04 Периндоприл	7 (11,3%)	5 (8,1%)
C09B Ингибиторы АПФ в комбинации с другими препаратами	C09BA02 Эналаприл в комбинации с диуретиками	7 (11,3%)	6 (9,7%)
	C09BA04 Периндоприл в комбинации с диуретиками	4 (6,5%)	1 (1,6%)
	C09BB04 Амлодипин + Периндоприл	3 (4,8%)	4 (6,5%)
C09C Антагонисты ангиотензина II	C09CA01 Лозартан	13 (21,0%)	12 (19,4%)
	C09CA03 Валсартан	0 (0,0%)	2 (3,2%)
C09D Антагонисты ангиотензина II в комбинации с другими препаратами	C09DA01 Лозартан в комбинации с диуретиками	6 (9,7%)	18 (29,0%)
	C09DA09 Азилсартана медоксомил в комбинации с диуретиками	0 (0,0%)	1 (1,6%)
C10A Гиполипидемические средства	C10AA01 Симвастатин	1 (1,6%)	1 (1,6%)
	C10AA05 Аторвастатин	17 (27,4%)	20 (32,3%)
	C10AA07 Розувастатин	11 (17,7%)	11 (17,7%)
	C10AX06 Омега-3 триглицериды, включая другие эфиры и кислоты	0 (0,0%)	1 (1,6%)
J01F Макролиды, линкозамиды и стрептограминны	J01FA10 Азитромицин	1 (1,6%)	0 (0,0%)
J05A Противовирусные препараты прямого действия	J05AX13 Умифеновир	1 (1,6%)	0 (0,0%)
M01A Нестероидные противовоспалительные и противоревматические препараты	M01AC06 Мелоксикам	1 (1,6%)	0 (0,0%)
M09A Другие препараты для лечения заболеваний костно-мышечной системы	M09AX Прочие препараты для лечения заболеваний костно-мышечной системы	0 (0,0%)	4 (6,5%)
N02B Другие анальгетики и антипиретики	N02BE01 Парацетамол	0 (0,0%)	1 (1,6%)
	N02BE71 Парацетамол в комбинации с психолептиками	1 (1,6%)	0 (0,0%)
R01A Деконгестанты и другие препараты для местного применения	R01AA07 Ксилометазолин	1 (1,6%)	0 (0,0%)
R05C Отхаркивающие препараты, кроме комбинаций с противокашлевыми средствами	R05CB01 Ацетилцистеин	1 (1,6%)	0 (0,0%)
S01X Препараты для лечения заболеваний глаз другие	S01XA Препараты для лечения заболеваний глаз другие	1 (1,6%)	0 (0,0%)

В популяцию безопасности вошло 124 пациента. За весь период наблюдения в основной группе было зарегистрировано 9 НЯ (у 9 пациентов [14,52%, 95% ДИ: 6,86–25,78%]), в контрольной группе – 5 НЯ (у 5 пациентов [8,06%, 95% ДИ: 2,67–17,83%]). У пациентов из основной группы регистрировали следующие НЯ: инфекция верхних дыхательных путей (3 случая, 4,8% пациентов), хронический бронхит (2 случая, 3,2% пациентов), а также по 1 случаю (у 1,6% пациентов) возникновения пирексии, головокружения во время процедуры, патологии спины и состояния сонливости. У пациентов из контрольной группы регистрировали 4 случая (6,5% пациентов) инфекции верхних дыхательных путей и 1 случай (1,6% пациентов) возникновения состояния сонливости. Частота возникновения НЯ у пациентов из основной и контрольной групп не различалась. Все НЯ были легкой степени тяжести и не требовали отмены или изменения параметров терапии, случаев возникновения СНЯ не регистрировали. Связь НЯ с исследуемым препаратом оценили как возможную в 2 случаях (головокружение во время процедуры и состояние сонливости). Связь НЯ с исследуемым препаратом оценили как группу сомнительную – в 8 случаях, как условную – в 1 случае. Связь НЯ с плацебо оценили как сомнительную – в 5 случаях (Таблицы 69 -71).

Таблица 69 – Количество пациентов с зарегистрированными нежелательными явлениями

Группа	Результат	Количество пациентов с НЯ
Основная группа (N =62)	Есть НЯ	9 (14,52%), 95% ДИ: 6,86% - 25,78%
	Нет НЯ	53 (85,48%), 95% ДИ: 74,22% - 93,14%
Контрольная группа (N =62)	Есть НЯ	5 (8,06%), 95% ДИ: 2,67% - 17,83%
	Нет НЯ	57 (91,94%), 95% ДИ: 82,17% - 97,33%
p (между группами)		0,395

Таблица 70 – Нежелательные явления по нозологиям

Система органов	Нежелательная реакция	Основная группа (N = 62)	Контрольная группа (N = 62)
Общие нарушения и реакции в месте введения	Пирексия	1 (1,6%)	0 (0,0%)
Инфекции и инвазии	Инфекция верхних дыхательных путей	3 (4,8%)	4 (6,5%)
Травмы, интоксикации и осложнения процедур	Головокружение во время процедуры	1 (1,6%)	0 (0,0%)
Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани	Патология спины	1 (1,6%)	0 (0,0%)
Нарушения со стороны нервной системы	Состояние сонливости	1 (1,6%)	1 (1,6%)

Система органов	Нежелательная реакция	Основная группа (N = 62)	Контрольная группа (N = 62)
Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения	Бронхит, хронический	2 (3,2%)	0 (0,0%)

Таблица 71 - Количество НЯ, потребовавших отмены или изменения параметров терапии

Группа	Количество НЯ, потребовавших отмены или изменения параметров терапии
Основная группа (N =9)	0 (0,00%), 95% ДИ: 0,00% - 33,63%
Контрольная группа (N =5)	0 (0,00%), 95% ДИ: 0,00% - 52,18%
p (между группами)	НП

У пациентов из основной группы зарегистрировали следующие НЯ: инфекция верхних дыхательных путей (3 случая, 4,8% пациентов), хронический бронхит (2 случая, 3,2% пациентов), а также по 1 случаю (у 1,6% пациентов) возникновения пирексии, головокружения во время процедуры, патологии спины и состояния сонливости (Таблица 72). Все НЯ были легкой степени тяжести.

Таблица 72 - Нежелательные явления, развившиеся у пациентов основной группы

N = 62 Система органов / Явление	Лёгкие НЯ		Средние НЯ		Тяжелые НЯ		Итого		Всего С + НС
	С	НС	С	НС	С	НС	С	НС	
10018065 Общие нарушения и реакции в месте введения	0 (0,0%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)
10037660 Пирексия		3031							
10021881 Инфекции и инвазии	0 (0,0%)	3 (4,8%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	3 (4,8%)	3 (4,8%)
10046306 Инфекция верхних дыхательных путей		3043 3045 7017							
10022117 Травмы, интоксикации и осложнения процедур	1 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)
10066964 Головокружение во время процедуры	4033								
10028395 Нарушения со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани	0 (0,0%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)	1 (1,6%)
10003983 Патология спины		3009							
10029205 Нарушения со стороны нервной системы	1 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)

N = 62 Система органов / Явление	Лёгкие НЯ		Средние НЯ		Тяжелые НЯ		Итого		Всего С + НС
	С	НС	С	НС	С	НС	С	НС	
10041349 Состояние сонливости	3029								
10038738 Нарушения со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостения	0 (0,0%)	2 (3,2%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	2 (3,2%)	2 (3,2%)
10006458 Бронхит, хронический		4009 4025							

Примечание - в таблице представлены все НЯ, которые хронологически произошли в данной группе после применения хотя бы одной дозы данного препарата; С – связанные с исследуемым препаратом; НС – не связанные с исследуемым препаратом

У пациентов из контрольной группы зарегистрировали 4 случая (6,5% пациентов) инфекции верхних дыхательных путей и 1 случай (1,6% пациентов) возникновения состояния сонливости (Таблица 73). Все НЯ были легкой степени тяжести.

Таблица 73 - Нежелательные явления, развившиеся у пациентов контрольной группы

N = 62 Система органов / Явление	Лёгкие НЯ		Средние НЯ		Тяжелые НЯ		Итого		Всего С + НС
	С	НС	С	НС	С	НС	С	НС	
10021881 Инфекции и инвазии	0 (0,0%)	4 (6,5%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	4 (6,5%)	4 (6,5%)
10046306 Инфекция верхних дыхательных путей		4004 4046 4048 7024							
10029205 Нарушения со стороны нервной системы	1 (1,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)	0 (0,0%)	1 (1,6%)
10041349 Состояние сонливости	3032								

Примечание - в таблице представлены все НЯ, которые хронологически произошли в данной группе после применения хотя бы одной дозы данного препарата; С – связанные с исследуемым препаратом; НС – не связанные с исследуемым препаратом

Внутривенное введение гидроксиникотиноилглутамата кальция обладает хорошей безопасностью и переносимостью. По частоте встречаемости нежелательных явлений, а также отклонений от норм лабораторных показателей достоверно не отличается от группы плацебо.

3.2.3 Оценка эффективности применения гидроксиникотиноилглутамата кальция

Изучение эффективности оригинального препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция, раствора для внутривенного введения, проведено в рамках рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования, у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения вследствие артериальной гипертензии и (или) атеросклероза магистральных артерий головы. Хроническое нарушение мозгового кровообращения - органическое поражение головного мозга вследствие медленно прогрессирующего нарушения церебрального кровообращения, которое сопряжено с развитием диффузных мелкоочаговых изменений мозговой ткани, обуславливающих нарастающее нарушение функций головного мозга.

В рамках исследования была реализована система маркировки препаратов, направленная на обеспечение защиты участников, возможность отслеживания и идентификации лекарственного средства и самого исследования. В общей сложности 124 пациента, удовлетворяющих установленным критериям включения/невключения, были случайным образом распределены по 2 группам исследования. Каждому участнику присваивался уникальный трехзначный идентификационный номер, служивший рандомизационным кодом.

Перед началом исследования была разработана схема рандомизации с использованием метода случайных чисел. Данная схема была доступна исключительно Спонсору и не предоставлялась исследователям, что исключало возможность предвзятого выбора группы для конкретного пациента.

Процедура рандомизации осуществлялась методом запечатанных конвертов. При включении пациента в исследование врач-исследователь вскрывал один из конвертов, на внешней стороне которого был указан идентификационный номер пациента, а внутри содержалась информация о группе терапии, к которой был отнесен данный участник. Вскрытый конверт сохранялся вместе с первичной медицинской документацией пациента.

Набор пациентов продолжался до достижения целевого количества рандомизированных участников. По достижении запланированного числа рандомизаций исследователи были незамедлительно уведомлены о необходимости прекращения процесса набора пациентов. Неиспользованные конверты были изъяты из клинического центра, что обеспечило целостность и надежность данных исследования.

В клинической картине доминируют субъективные расстройства в виде головных болей и ощущения тяжести в голове, шума в ушах, общей слабости, повышенной утомляемости, эмоциональной лабильности, снижения памяти и внимания, головокружения чаще несистемного характера, депрессии, неустойчивости при ходьбе, нарушения сна [3,10,16,19,20,22,33,35,173].

Критерии включения в исследование:

1. Наличие письменного Информированного согласия на участие в исследовании от

пациента.

2. Пациенты обоего пола в возрасте от 50 до 75 лет.
3. Отрицательный результат анализа мочи на беременность у женщин репродуктивного возраста.
4. Артериальная гипертензия (с градацией на степени) и (или) атеросклероз магистральных артерий головы:
 - диагноз АГ соответствует общепринятым критериям и градациям на степени;
 - подтверждение атеросклероза магистральных артерий головы результатами дуплексного сканирования магистральных артерий головы (сонные артерии, позвоночные артерии) с выявлением атеросклеротических бляшек во внутренних сонных артериях и определением степени стеноза по методу ECST.
5. Наличие признаков поражения вещества головного по данным нейровизуализации (МРТ головного мозга): «немые» лакунарные инфаркты без указания на острое развитие какой-либо очаговой неврологической симптоматики в анамнезе, лейкоареоз.

Критерии невключения в исследование:

1. Инсульт, транзиторная ишемическая атака, преходящая слепота на один глаз в анамнезе;
2. Инфаркт миокарда в анамнезе;
3. Лейкоареоз и (или) «немые» лакунарные инфаркты при отсутствии артериальной гипертензии и (или) атеросклероза;
4. Амилоидная ангиопатия сосудов головного мозга;
5. Алкоголизм;
6. Фибрилляция предсердий;
7. Сахарный диабет;
8. Воспалительные и аутоиммунные заболевания с поражением сосудов головного мозга;
9. Нейродегенеративные заболевания с нарушением когнитивных функций (болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция, болезнь диффузных телец Леви, деменция при болезни Паркинсона, болезнь Гентингтона, наследственные болезни накопления и пр.);
10. Наследственные или генетические заболевания с поражением сосудов малого калибра, например, CADASIL, CARASIL, MELAS, болезнь Фабри и пр.;
11. Применение пациентами ингибиторов холинэстеразы, производных амантадина, мемантина, а также иных лекарственных препаратов, действие которых заявлялось как метаболическое, нейропротективное, ноотропное и пр., а также нейролептиков, барбитуратов, транквилизаторов, психостимуляторов;

12. Заболевания печени и (или) почек, прочие заболевания, которые, по мнению исследователя, могли исказить результаты исследования;

13. Одновременное участие пациента в другом клиническом исследовании.

С целью оценки эффективности применения ампакинов у данной категории пациентов были использованы следующие шкалы и методы:

- оценки когнитивных функций по Монреальской шкале (MoCA),
- счета по опроснику здоровья SF-36V2,
- счета по оценочной шкале Монтгомери-Асберга для депрессий (MADRS),
- оценки качества сна по Питтсбургскому индексу качества сна,
- измерение концентрации серотонина в крови в течении суток.

3.2.3.1 Оценка влияния на симптомы депрессии

Оценка симптомов депрессии проводилась по оценочной шкале Монтгомери-Асберга для депрессий, предложенной в 1979 г. (Montgomery-Asberg Depression Rating Scale, MADRS).

MADRS учитывает все основные симптомы депрессии, хотя некоторые характерные симптомы не включены в шкалу. MADRS, по-видимому, более точно регистрирует динамику состояния, чем HDRS. Следовательно, значимые различия между методами терапии могут быть зафиксированы на выборке меньшего объема, что с этической точки зрения является большим преимуществом при проведении клинических исследований.

Время, необходимое для заполнения бланка шкалы, варьирует от 20 минут до 1 часа в зависимости от состояния пациента и опыта оценивающего. Балл рассчитывается следующим образом: каждый пункт шкалы оценивается от 0 до 6, в соответствии с нарастанием тяжести симптома. При альтернативной оценке учитывается определение тяжести. Суммарный балл составляет от 0 до 60 и снижается, в соответствии с улучшением состояния. Результаты исследования представлены (Таблица 74).

Таблица 74 – Абсолютные показатели счета по шкале Монтгомери-Асберга для депрессий (MADRS)

Доза, мг	Скрининг	2 Визит	3 Визит	4 Визит	5 Визит
Плацебо	12 5÷19 n=20	9 6÷18 n=20	10 5÷17 n=20	11 6÷12 n=20	11 7÷14 n=20
25	10 5÷17 n=20	9 6÷18 n=16	8 5÷12 n=20	7 4÷13 n=20	6 3÷13 n=20 p1=0,0006
Нк-в	1,1228 p=0,7730	1,4826 p=0,6874	0,4099 p=0,9386	12,2372 p=0,0069	9,3444 p=0,0258

Примечание - данные представлены в виде медианы (нижний ÷ верхний квартили). Нк-в - показатель критерия Крускала-Уоллиса; n – число пациентов в группе (объем выборки).p –

уровень значимости при множественном сравнении независимых выборок, $p1$ – уровень значимости при сравнении двух независимых выборок (отличие от группы плацебо (1)).

Множественное сравнение независимых выборок выявило статистически значимые различия на визите 5 ($HK-W=9,344$; $p= 0,0258$). Как показало сравнение двух независимых выборок, эти различия были обусловлены снижением параметра в группе с препаратом по сравнению с группой 1 (плацебо) (Таблица 75).

Полученные результаты позволяют утверждать, что препарат гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 25 мг на 40% снижает проявление симптомов депрессии по сравнению с плацебо по шкале MADRS, что указывает на терапевтический эффект препарата.

3.2.3.2 Оценка влияния на психическое здоровье по шкале SF-36

Шкала позволяет оценить наличие/отсутствие депрессии, тревоги, эмоциональное благополучие пациента. Показатели каждой шкалы варьируют между 0 и 100, где 100 представляет полное здоровье. Установлена тенденция к увеличению параметра при приеме препарата в дозе 25 мг по характеристике «психическое здоровье» на визите 5 (на 11% по сравнению с плацебо), что так же свидетельствует о возможности препарата снижать проявления депрессии (Таблица 75).

Таблица 75 – оценка психического здоровья по шкале SF-36

Психическое здоровье					
Плацебо	64 58÷69 n=20	63 52÷73 n=20	65 56÷69 n=20	64 60÷72 n=20	65 60÷70 n=20
25	65 50÷80 n=20	66 58÷77 n=20	68 55÷76 n=20	68 59÷76 n=20	72 62÷80 n=20
H_{K-w}	2,0485 p=0,5624	0,8205 p=0,8445	1,300 p=0,7291	6,3765 p=0,0947	11,2020 p=0,0707

Примечание - данные представлены в виде медианы (нижний ÷ верхний квартили). H_{K-w} - показатель критерия Крускала-Уоллиса; n – число пациентов в группе (объем выборки); p – уровень значимости при множественном сравнении независимых выборок, $p1$ – уровень значимости при сравнении двух независимых выборок (отличие от группы плацебо (1)).

3.2.3.3 Оценка влияния на концентрацию серотонина в крови добровольцев

Анализ уровня серотонина в крови на группе из 20 добровольцев с подтвержденным отсутствием карциномы показал, что до введения только 85% испытуемых имели нормальные показатели (70–170 нг/мл). Наблюдалась явная положительная динамика: уровень серотонина повысился с исходного среднего значения 125,31 нг/мл, через 1 час после внутривенного введения уровень серотонина вырос до 135,21 нг/мл и достиг максимума 138,88 нг/мл к 24 часам,

достоверное увеличение составило +10,8%, нормализовав значения у 15% участников с исходно низким уровнем. Статистический анализ подтвердил статистическую значимость изменений уровня серотонина во времени ($p = 0,038$), что указывает на системный, а не случайный характер наблюдаемых изменений (Таблицы 76-78).

Таблица 76 - Результаты статистического анализа отклонений показателей серотонина

Категория уровня серотонина		До введения	Через 30 мин	Через 1 час	Через 2 часа	Через 3 часа	Через 4 часа	Через 8 часов	Через 24 часа
Норма	Абс.	17	18	20	19	19	18	19	20
	%	85	90	100	95	95	90	95	100
Отклонение – ниже нормы	Абс.	3	2	0	1	1	2	1	0
	%	15	10	0	5	5	10	5	0
Отклонение – выше нормы	Абс.	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 77 - Результаты статистического анализа клинической значимости отклонений показателя серотонина

Категория уровня серотонина		До введения	Через 30 мин	Через 1 час	Через 2 часа	Через 3 часа	Через 4 часа	Через 8 часов	Через 24 часа
Норма	Абс.	17	18	20	19	19	18	19	20
	%	85	90	100	95	95	90	95	100
Отклонение клинически незначимо	Абс.	3	2	0	1	1	2	1	0
	%	15	10	0	5	5	10	5	0
Отклонение клинически значимо	Абс.	0	0	0	0	0	0	0	0
	%	0	0	0	0	0	0	0	0

Таблица 78 – Динамика концентрации серотонина нг/мл после внутривенного введения препарата гидроксиникотиноилглутамат кальция

№	До	Через 30 мин	Через 1 ч	Через 2 ч	Через 3 ч	Через 4 ч	Через 8 ч	Через 24 ч	Динамика	
									Абс.	%
01	96,2	104,0	104,8	107,2	100,5	105,4	105,4	102,1	5,9	6,1
02	123,3	126,3	150,2	149,8	146,0	144,1	152,2	158,7	35,4	28,7
03	133,8	135,5	139,3	139,6	132,6	138,2	137,9	137,9	4,1	3,1
05	108,1	105,6	110,7	96,9	112,4	96,5	106,6	119,0	10,9	10,1
04	53,1*	61,4*	73,3	80,7	78,3	66,2*	68,5*	71,6	18,5	34,8
06	136,6	127,8	124,3	127,9	137,5	131,9	146,8	134,9	-1,7	-1,2
07	97,9	90,0	108,9	116,5	115,3	101,0	106,7	104,6	6,7	6,8
08	157,1	163,0	163,8	144,7	154,2	177,4	183,7	169,5	12,4	7,9
09	198,2	206,9	234,0	205,3	232,6	201,9	215,1	226,2	28,0	14,1
10	32,1*	95,1	101,0	100,0	111,8	88,6	115,0	77,6	45,5	141,7
11	159,9	177,9	166,6	130,8	137,2	142,8	163,0	149,1	-10,8	-6,8
12	119,0	125,3	142,2	138,6	130,6	148,7	142,2	132,6	13,6	11,4

13	172,4	118,7	155,0	166,0	151,0	157,1	162,0	166,6	-5,8	-3,4
14	71,0	72,1	99,0	91,6	75,3	94,7	74,3	88,2	17,2	24,2
15	96,3	135,0	129,9	120,8	105,6	128,9	107,7	118,5	22,2	23,1
16	169,1	156,8	159,9	141,9	157,5	156,2	134,7	170,6	1,5	0,9
17	130,5	88,0	102,2	87,4	100,1	101,3	86,1	125,9	-4,6	-3,5
18	65,0*	72,1	74,7	67,0*	67,0*	59,8*	79,0	71,7	6,7	10,3
19	246,1	265,6	233,5	249,1	221,7	258,7	237,4	263,5	17,4	7,1
20	140,5	52,4*	130,9	152,9	158,7	158,2	165,6	188,7	48,2	34,3
N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Mean	125,31	123,98	135,21	130,74	131,30	132,88	134,50	138,88	13,57	17,49
Median	126,90	122,00	130,40	129,35	131,60	135,05	136,30	133,75	11,65	8,99
Min	32,10	52,40	73,30	67,00	67,00	59,80	68,50	71,60	-10,80	-6,75
Max	246,10	265,60	234,00	249,10	232,60	258,70	237,40	263,50	48,20	141,74
Q1	96,25	89,00	103,50	98,45	103,05	98,75	106,00	103,35	2,80	1,98
Q3	158,50	146,15	157,45	147,25	152,60	156,65	162,50	168,05	20,35	23,64
SD	51,28	51,90	43,51	42,95	42,75	47,11	45,58	50,14	16,16	31,72

Примечание - * Отклонение ниже нормы

Статистический анализ подтвердил статистическую значимость изменений уровня серотонина во времени ($p = 0,038$), что указывает на системный, а не случайный характер наблюдаемых изменений. Препарат продемонстрировал нормализующий эффект: у 15% участников с изначально пониженным уровнем серотонина его показатели достигли нормы через 24 часа после инфузии. К концу периода наблюдения (24 часа) у всех испытуемых уровень серотонина находился в диапазоне физиологической нормы (70-170 нг/мл), что свидетельствует о стабилизирующем эффекте препарата.

Введение гидроксиникотиноилглутамат кальция внутривенно показало благоприятное влияние на серотонинергическую систему, что может иметь практическое значение при лечении состояний, связанных с нарушением обмена серотонина.

3.2.3.4 Оценка влияния на сон

Данный опросник оценивает качество сна за последний месяц. Он состоит из 19 вопросов, сгруппированных в 7 разделов. Целый ряд исследований показал валидность и достоверность получаемых при его использовании результатов. Итоговая оценка 5 и менее свидетельствует о хорошем качестве сна; более 5 - о плохом. С учетом указанной градации баллов шкалы, результаты распределились следующим образом (Таблица 79).

Таблица 79 – Результаты оценки абсолютных показателей Питтсбургскому индексу качества сна

Группа Доза, мг	Скрининг	2 Визит	3 Визит	4 Визит	5 Визит
Группа 1 Плацебо	8 5÷8,5 n=20	7,5 5÷8,25 n=20	7,5 5,75÷10 n=20	7 5÷9 n=20	7,5 5,75÷9,25 n=20
Группа 4	8	7,5	5,5	5	4

25мг	5÷12 n=20	5÷11 n=20	4÷8,25 n=20	4÷9 n=20	2,75÷5,00 n=20 p1= 0,006
Нк-w	0,756 p=0,86	2,955 p=0,402	7,285 p=0,063	4,862 p=0,188	16,5068 p=0,001

Примечание - данные представлены в виде медианы (нижний ÷ верхний квартили). Нк-w - показатель критерия Крускала-Уоллиса; n – число пациентов в группе (объем выборки); p – уровень значимости при множественном сравнении независимых выборок, p1 – уровень значимости при сравнении двух независимых выборок (отличие от группы плацебо (1)).

Множественное сравнение независимых выборок выявило статистически значимые различия между группами на визите 5 (НК-W=16,5068; p=0,001). Как показал статистический анализ при сравнении двух независимых выборок, эти различия были обусловлены уменьшением индекса качества сна в группе с препаратом (доза 25 мг, p= 0,006) по сравнению с группой 1 (плацебо). Разница показателей Питтсбургского индекса качества сна в группе плацебо и группе пациентов с назначением препарата в дозе 25 мг составила 47%. Согласно полученным результатам, препарат гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 25 мг уменьшает проявления нарушений качества сна у пациентов.

3.2.3.5 Оценка влияния на когнитивные функции

Монреальская Шкала оценки когнитивных функций (MoCA) была разработана как средство быстрой оценки при умеренной когнитивной дисфункции. Она оценивает различные когнитивные сферы: внимание и концентрацию, исполнительные функции, память, язык, зрительно-конструктивные навыки, абстрактное мышление, счет и ориентацию. Время для проведения MoCA составляет примерно 10 минут. Максимально возможное количество баллов - 30; 26 баллов и более считается нормальным. Были получены следующие результаты оценки состояния пациентов по шкале MoCA (Таблица 80).

Таблица 80 - Результаты оценки состояния пациентов по шкале MoCA

Визит	Группа	Параметр	Счет по шкале MoCA
Визит скрининга	Основная группа	n	62
		M	20,71
		CO	1,12
		95% ДИ	20,42-20,99
		мин.	19,00
		макс.	23,00
		Me	20,00
		МКД	20,00-21,00
	Контрольная группа	n	62
		M	20,87
		CO	1,29
		95% ДИ	20,54-21,20
		мин.	19,00

Визит	Группа	Параметр	Счет по шкале MoCA
		макс.	23,00
		Me	21,00
		МКД	20,00-22,00
		р (между группами)	0,474 (w)
День 8/Визит 2	Основная группа	n	62
		M	21,74
		CO	1,27
		95% ДИ	21,42-22,06
		мин.	18,00
		макс.	25,00
		Me	22,00
		МКД	21,00-23,00
		р (с начальным уровнем)	< 0,001 (w) *
	Контрольная группа	n	62
		M	21,42
		CO	1,37
		95% ДИ	21,07-21,77
		мин.	18,00
		макс.	25,00
		Me	21,00
		МКД	20,25-22,00
		р (с начальным уровнем)	< 0,001 (w) *
р (между группами)		0,090 (w)	
День 16/Визит 3	Основная группа	n	62
		M	22,77
		CO	1,32
		95% ДИ	22,44-23,11
		мин.	20,00
		макс.	25,00
		Me	23,00
		МКД	22,00-24,00
		р (с начальным уровнем)	< 0,001 (w) *
	Контрольная группа	n	62
		M	21,87
		CO	1,52
		95% ДИ	21,48-22,26
		мин.	19,00
		макс.	26,00
		Me	22,00
		МКД	21,00-23,00
		р (с начальным уровнем)	< 0,001 (w) *
р (между группами)		< 0,001 (w) *	
День 31/Визит 4	Основная группа	n	62

Визит	Группа	Параметр	Счет по шкале MoCA
		М	23,37
		СО	1,45
		95% ДИ	23,00-23,74
		мин.	20,00
		макс.	26,00
		Ме	24,00
		МКД	22,25-24,00
		р (с начальным уровнем)	< 0,001 (w) *
	Контрольная группа	п	62
		М	22,02
		СО	1,60
		95% ДИ	21,61-22,42
		мин.	18,00
		макс.	27,00
		Ме	22,00
МКД		21,00-23,00	
р (с начальным уровнем)	< 0,001 (w) *		
р (между группами)			< 0,001 (w) *
День 106/Визит 5	Основная группа	п	62
		М	22,06
		СО	1,38
		95% ДИ	21,71-22,41
		мин.	19,00
		макс.	25,00
		Ме	22,00
		МКД	21,00-23,00
	р (с начальным уровнем)	< 0,001 (w) *	
	Контрольная группа	п	62
		М	20,98
		СО	1,35
		95% ДИ	20,64-21,33
		мин.	18,00
		макс.	24,00
Ме		21,00	
МКД		20,00-22,00	
р (с начальным уровнем)	0,113 (w)		
р (между группами)			< 0,001 (w) *

Межгрупповой сравнительный анализ несвязанных выборок не выявил различий на этапе скрининга ($p \geq 0,05$), что указывает на однородность популяции пациентов, распределенных между группой плацебо и группой, получавшими препарата исследования. Исходный счет по

шкале MoCA у пациентов из основной или контрольной группы составил $20,71 \pm 1,12$ и $20,87 \pm 1,29$, через 7 дней (Визит 2) данный показатель повысился до $21,74 \pm 1,27$ и $21,42 \pm 1,37$ соответственно, через 15 дней (Визит 3) – до $22,77 \pm 1,32$ и $21,87 \pm 1,52$ соответственно, через 30 дней (Визит 4) – до $23,37 \pm 1,45$ и $22,02 \pm 1,60$ соответственно, через 106 дней (Визит 5) – до $22,06 \pm 1,38$ и $20,98 \pm 1,35$ (Рисунок 33).

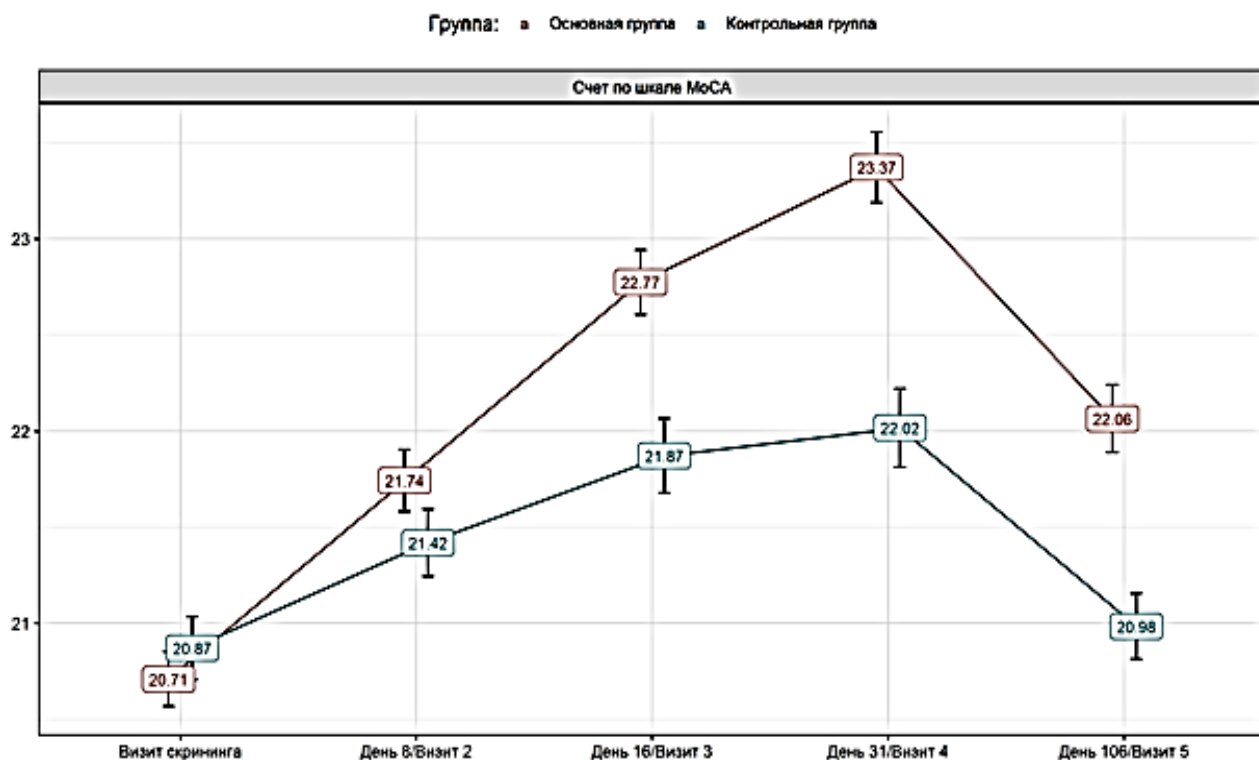


Рисунок 33 – Динамика счета по шкале MoCA

На 30 день после начала терапии изменение счета по шкале MoCA у пациентов из основной группы составило $2,66 \pm 0,99$, а у пациентов из контрольной группы – $1,15 \pm 1,05$ ($p < 0,001$ при межгрупповом сравнении (Таблица 81)).

Таблица 81 – Изменение счета по шкале MoCA на 30 день после начала терапии

Группа	Параметр	Изменение MoCA
Основная группа	n	62
	M	2,66
	CO	0,99
	95% ДИ	2,41-2,91
	мин.	1,00
	макс.	5,00
	Me	3,00
Контрольная группа	MКД	2,00-3,00
	n	62
	M	1,15
	CO	1,05

Группа	Параметр	Изменение MoCA
	95% ДИ	0,88-1,41
	мин.	-1,00
	макс.	4,00
	Me	1,00
	МКД	1,00-1,00
p (между группами)		< 0,001 (w) *

Основной переменной эффективности является «доля пациентов, для которых лечение признано эффективным по шкале MoCA через 4 недели после начала терапии». Успех терапии определялся как изменения счета по шкале MoCA по сравнению с исходными значениями (до начала терапии) на 2 балла на день оценки эффективности.

Доля пациентов, для которых лечение было признано успешным по шкале MoCA (повышение счета на 2 балла и более), на 30 день после начала терапии в основной или контрольной группе составила 83,87% (95% ДИ: 72,33–91,98%) и 22,58% (95% ДИ: 12,93–34,97%) соответственно ($p < 0,001$ при межгрупповом сравнении). Таким образом, эффективность терапии в основной группе (при сравнении с контрольной) была выше на 61,29% (95% ДИ: 45,087–72,478%) (Таблица 82).

Таблица 82 - Изменение счета по шкале MoCA по сравнению с исходными значениями (до начала терапии) на 2 балла на день оценки эффективности

Группа	Изменение	Количество пациентов (доля, %)
Основная группа (N =62)	Достигнуто	52 (83,87%), 95% ДИ: 72,33% - 91,98%
	Не достигнуто	10 (16,13%), 95% ДИ: 8,02% - 27,67%
Контрольная группа (N =62)	Достигнуто	14 (22,58%), 95% ДИ: 12,93% - 34,97%
	Не достигнуто	48 (77,42%), 95% ДИ: 65,03% - 87,07%
p (между группами)		< 0,001 (chisq) *
Оценка		61,290
95% ДИ (для разницы)		45,087 - 72,478

Представленные данные свидетельствуют, что гидроксиникотиноилглутамат кальция достоверно улучшил когнитивные функции у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения.

3.3 Концепция применения модуляторов AMPA-рецепторов для терапии когнитивных нарушений

Полученные в работе данные свидетельствуют о быстром проникновении ампакина ГНГК в головной мозг через гематоэнцефалический барьер. Установленное в работе средство с AMPA-рецептором, свидетельствует о преимущественном взаимодействии ГНГК с данным подтипом глутаматных рецепторов.

Известно, что действие глутамата реализуется через активацию специфических рецепторов. Основные это AMPA-рецептор и NMDA-рецептор, которые контролируют ионный канал, избирательно пропускающий положительно заряженные ионы, основную часть ионного тока составляют ионы натрия – их ионные каналы пропускают внутрь клетки, и ионы калия – из клетки. NMDA-рецептор может так же пропускать ионы кальция внутрь клетки. Ионы магния и цинка, находясь вне клетки, выступают в качестве блокаторов NMDA канала. В дальнейших исследованиях были обнаружены каинатные и метаботропные рецепторы глутамата [76,258,276].

AMPA-рецептор и NMDA-рецептор являются важными звеньями в формировании долговременной потенциации (LTP). Это выражается в увеличении возбуждающего постсинаптического потенциала в ответ на повторяющиеся стимулы. В соответствии с существующей теорией, LTP в первую очередь связывают с увеличением плотности AMPA-рецепторов на мембране постсинаптического нейрона. Предполагается, что глутамат возбуждает AMPA-рецепторы на постсинаптической мембране, и в клетку проникают ионы натрия, что вызывает деполяризацию, в это время канал, контролируемый NMDA-рецептором, остаётся закрытым ионом магния. Деполяризация мембраны выталкивает магний из ионного канала в NMDA-рецепторе, открывая его для кальция. Кальций, входя в клетку, запускает каскад реакций, ведущий к увеличению числа AMPA-рецепторов на мембране, и запускает работу Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II, которая путём фосфорилирования регуляторных участков существующих AMPA-рецепторов увеличивает их проводимость [94,206,207,250].

Данные, полученные в исследовании, свидетельствуют об увеличении скорости передачи нервных импульсов в гиппокампе под воздействием ГНГК, что подтверждает этот механизм.

Хроническое нарушение мозгового кровообращения приводит к снижению синаптической пластичности в коре головного мозга и появлению когнитивных нарушений, вследствие физиологических и патологических нарушений функционирования нейронов и глиальных клеток.

Проведенная в рамках данного исследования оценка когнитивных способностей по шкале MoCA у пациентов с ХНМК продемонстрировала положительное влияние ампакина, достоверно отличающееся от плацебо.

Существует взаимосвязь между глутаматными и серотонинергическими рецепторами, где серотонин выступает модулятором, а глутамат отвечает за возбуждающую передачу. Они

совместно регулируют память, внимание и настроение, а дисбаланс лежит в основе депрессии, нарушений сна и других нарушений. Глутамат активирует NMDA-рецепторы на телах нейронов ядер шва, что стимулирует синтез и высвобождение серотонина в различных отделах мозга [84, 237,255].

Данные, полученные в исследовании, продемонстрировали что ампакин ГНГК увеличивает концентрацию серотонина в крови, что как вторичный мессенджер может служить маркером положительного влияния на лимбическую систему. Результаты, полученные в рамках проведенного исследования, свидетельствуют о снижении симптомов проявления депрессии и снижении нарушений сна у пациентов по оценочным шкалам MADRS и PSQI, что говорит о комплексном положительном влиянии ампакина на серотонинергические нейроны лимбической системы посредством взаимодействия с AMPA-рецепторами.

Полученный комплекс данных позволяет сделать заключение, что новый представитель класса ампакинов – гидроксиникотиноилглутамат кальция обладает хорошим профилем безопасности и комплексным воздействием на лимбическую систему.

Подтверждение клинической эффективности применения ампакина в коррекции когнитивных нарушений позволяет предположить возможную эффективность в терапии ряда неврологических нарушений в основе патогенеза которых лежит механизм эксайтотоксичности.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках сравнительного анализа антиамнестической и ноотропной активности ампакина гидроксиникотиноилглутамата кальция и препарата сравнения пирацетам было установлено, что гидроксиникотиноилглутамат кальция оптимизировал обучение крыс в условиях челночной камеры в модели условного рефлекса активного избегания, снизив на 5-й день обучения, необходимое время на 21,3%. Пирацетам в этих условиях не оказывал влияния на обучение УРАИ.

Данные результаты согласуются с исследованиями других ампакинов. Так, Hampson с соавторами продемонстрировали, что ампакин CX717 успешно корректирует когнитивные нарушения у приматов, действуя через глутаматергические механизмы, но в существенно более высоких дозах (0,3-1,5 мг/кг), чем гидроксиникотиноилглутамат кальция [133].

С целью изучения влияния гидроксиникотиноилглутамата кальция на обучение условному рефлексу с положительным подкреплением использовался Т-образный лабиринт с питьевым вознаграждением. Крысы под влиянием ГНГК выполняли рефлекс в 1,5 раза быстрее. Это свидетельствует о способности ГНГК оптимизировать процесс обучения животных условному лабиринтному рефлексу с положительным подкреплением преимущественно на заключительных этапах формирования памятного следа. Пирацетам, в дозе 400 мг/кг оказывал влияние на процесс обучения условному питьевому рефлексу в Т-образном лабиринте но в меньшей степени.

В отличие от этого, Simmons с коллегами показали, что ампакин CX929 эффективен в моделях болезни Хантингтона, но требует более высоких доз для проявления терапевтической активности, чем исследуемый гидроксиникотиноилглутамат кальция [255].

Было проведено исследование антиамнестического потенциала гидроксиникотиноилглутамата на модели условного рефлекса пассивного избегания с амнезией вызванной скополамином. Гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 10 и особенно 50 мг/кг обладал выраженными антиамнестическими свойствами на данной модели и при воспроизведении рефлекса через сутки после обучения. Пирацетам, введенный в дозе 250 и 500 мг/кг, достоверно увеличивал только процент животных, не зашедших в темную камеру при воспроизведении УРПИ.

Это открытие представляет собой важный вклад в понимание потенциала гидроксиникотиноилглутамата кальция в терапии когнитивных нарушений.

В рамках изучения фармакокинетических характеристик гидроксиникотиноилглутамата кальция были проведены комплексные исследования на лабораторных животных — белых крысах-самцах линии Вистар ($n = 100$), с массой тела около 200 г. Препарат вводился внутривенно (в/в) в дозах 20, 100 и 500 мг/кг или внутримышечно (в/м) в дозе 100 мг/кг. Введение

осуществлялось натощак, после 8-часового периода голодания. Растворы препарата готовились *ex tempore*, на основе изотонического раствора натрия хлорида, с индивидуальным расчетом объема, исходя из массы тела каждого животного. Результаты исследования демонстрируют линейную фармакокинетику гидроксиникотиноилглутамата кальция в диапазоне дозировок до 100 мг/кг, что согласуется с данными, полученными для других ампакинов, таких как CX-516 [2]. Для последнего также характерна линейная кинетика в низком и среднем диапазоне доз. При увеличении дозы до 100-500 мг/кг наблюдается переход к нелинейной фармакокинетике, аналогичной результатам, полученным для соединения CX-717, которое демонстрирует нелинейность при дозах выше 200 мг/кг [24].

Одной из ключевых особенностей гидроксиникотиноилглутамата кальция является его высокая способность к проникновению через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и в периферические ткани. Это преимущество отличает исследуемый препарат от некоторых других ампакинов, таких как IDRA-21, для которого характерно более медленное проникновение в ткани мозга [23]. В то же время, подобно ампакину LY451646, концентрация гидроксиникотиноилглутамата кальция в целевых участках мозга пропорциональна введенной дозе [9].

Отсутствие кумулятивного эффекта при многократном введении является важным фармакокинетическим параметром, который сближает гидроксиникотиноилглутамат кальция с ампакином S18986. Оба препарата не проявляют тенденции к накоплению в организме. Расчетный период полувыведения у человека, полученный методом межвидовой экстраполяции, составляет около 1 часа. Этот показатель ниже, чем данные для некоторых ранних ампакинов, таких как PERA, у которого период полувыведения составляет 2,5-3 часа и CX-614, у которого этот показатель составляет 5-6 часов [26,31]. Гидроксиникотиноилглутамат кальция является перспективным кандидатом для клинических испытаний и использования в лечении когнитивных нарушений.

Проведено комплексное токсикологическое изучение гидроксиникотиноилглутамата кальция на различных видах животных. Полученные результаты позволяют классифицировать данное соединение как малотоксичное, что свидетельствует о его высоком потенциале по сравнению с другими представителями класса ампакинов.

Среднесмертельные дозы (LD_{50}) при различных путях введения варьируются в диапазоне 1210 до 2050 мг/кг. Это значительно превышает показатели токсичности для ампакина CX-546 (LD_{50} при пероральном введении 600–800 мг/кг) [4]. Гидроксиникотиноилглутамат кальция демонстрирует более благоприятный профиль безопасности по сравнению с соединением IDRA-21, для которого характерны конвульсивные проявления при дозах выше 500 мг/кг [304].

Препарат продемонстрировал отсутствие существенных видовых и половых отличий в чувствительности к токсическому действию. Данные результаты согласуются с данными о фармакодинамике большинства ампакинов бензамидного ряда, включая CX-614 и CX-717 [49,51]. Эта особенность значительно упрощает экстраполяцию результатов доклинических исследований для дальнейших клинических испытаний.

При хроническом внутрижелудочном введении крысам (3 месяца), внутримышечном введении кроликам (4 недели) и внутривенном введении кроликам (2 недели) в дозах 6, 7 и 13,4 мг/кг, гидроксиникотиноилглутамат кальция проявил высокую переносимость. Так же препарат не вызывает токсических повреждений внутренних органов и местнораздражающего действия. Это подтверждается результатами патоморфологических исследований. В отличие от LY451395, для которого описаны гепатотоксические эффекты при длительном применении [155].

Исследование острой внутривенной токсичности гидроксиникотиноилглутамата кальция продемонстрировало его благоприятный профиль безопасности. При однократном внутривенном введении кроликам в дозе 13,4 мг/кг, что в 20 раз превышает высшую терапевтическую дозу для человека, препарат хорошо переносился животными и не вызывал токсических повреждений и нарушений функционального состояния внутренних органов.

Полученные данные существенно контрастируют с результатами аналогичных исследований ампакина CX-516, при внутривенном введении которого наблюдались побочные эффекты (тремор, возбуждение) уже при дозах 3-5 мг/кг, что составляет лишь 3-5-кратное превышение терапевтической дозы [132]. Более того, для ампакина LY451646 при внутривенном введении в дозе 10 мг/кг (10-кратная терапевтическая доза) были зарегистрированы выраженные нейротоксические эффекты, включая судороги и нарушения координации движений [262].

Важно отметить, что ампакин CX-717, рассматриваемый как один из наиболее перспективных представителей данного класса соединений, при внутривенном введении в дозе 15 мг/кг (приблизительно 15-кратная терапевтическая доза) вызывал преходящие электрокардиографические изменения и умеренные нарушения функции печени [70]. Подобные эффекты отсутствовали при применении гидроксиникотиноилглутамата кальция даже в более высоких относительных дозах.

Ампакин Org 26576 при внутривенном введении приматам в дозе 8 мг/кг (10-кратная терапевтическая доза) демонстрировал кардиотоксические эффекты, включая тахикардию и изменения артериального давления [160], что также не наблюдалось в случае гидроксиникотиноилглутамата кальция.

Наиболее близкие к гидроксиникотиноилглутамату кальция показатели безопасности при внутривенном введении были зарегистрированы для ампакина S 18986, который в дозе 12 мг/кг (15-кратная терапевтическая доза) не вызывал значимых токсических эффектов у крыс [183].

Однако следует отметить, что исследования S 18986 проводились на грызунах, а не на кроликах, что затрудняет прямое сравнение результатов. При комплексном исследовании безопасности готовой лекарственной формы ампакина гидроксиникотиноилглутамата кальция (стерильный раствор в ампулах 5 мг/мл по 5 мл) было проведено изучение хронической токсичности на кроликах при различных путях парентерального введения. Препарат вводился ежедневно внутримышечно в течение 4 недель и внутривенно на протяжении 2 недель в дозе 6,7 мг/кг, что в 10 раз превышает высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для человека.

Результаты показали, что лекарственная форма гидроксиникотиноилглутамата кальция хорошо переносится животными при обоих способах введения. Биохимические тесты не выявили негативного влияния на функциональное состояние внутренних органов кроликов, а гематологические показатели оставались в пределах нормы.

Данные результаты выгодно отличаются от показателей хронической токсичности других ампакинов. Так, при изучении ампакина СХ-516 в 4-недельном эксперименте на крысах при ежедневном внутривенном введении в дозе, превышающей терапевтическую в 5 раз (2,5 мг/кг), наблюдались изменения в биохимических показателях крови, свидетельствующие о нагрузке на печень, включая повышение уровней АЛТ и АСТ на 15-20% [132]. В отличие от этого, гидроксиникотиноилглутамат кальция не вызывал подобных изменений даже при 10-кратном превышении терапевтической дозы.

Ампакин LY451395 в хроническом 2-недельном эксперименте на собаках при ежедневном внутримышечном введении в дозе 4 мг/кг (8-кратная терапевтическая доза) вызывал повышение активности щелочной фосфатазы и креатинфосфокиназы, что указывало на развитие умеренного воспалительного процесса в месте инъекции [277]. При использовании гидроксиникотиноилглутамата кальция подобных местных реакций не наблюдалось.

Особого внимания заслуживает сравнение с ампакином СХ-717, который при 3-недельном внутривенном введении обезьянам в дозе 3 мг/кг (6-кратная терапевтическая доза) вызывал транзиторные изменения в гематологических показателях, включая умеренное снижение количества лейкоцитов и тромбоцитов [131]. Гидроксиникотиноилглутамат кальция не оказывал подобного влияния на гематологические параметры даже при более высокой относительной дозе и длительном введении.

При изучении хронической токсичности ампакина Org 26576 в 4-недельном эксперименте на кроликах при внутримышечном введении в дозе 5 мг/кг (7-кратная терапевтическая доза) были выявлены изменения электрокардиографических показателей, включая увеличение интервала QT [217]. В исследованиях гидроксиникотиноилглутамата кальция подобных кардиотоксических эффектов не наблюдалось.

Наиболее близкие к гидроксиникотиноилглутамату кальция результаты были получены при изучении ампакина S 47445, который в 4-недельном эксперименте на крысах при ежедневном внутривенном введении в дозе 6 мг/кг (примерно 10-кратная терапевтическая доза) также не вызывал значимых токсических эффектов [72]. Однако следует отметить, что исследование S 47445 проводилось на грызунах, а не на кроликах, что затрудняет прямое сравнение результатов. Комплексные патоморфологические исследования, проведенные по завершении экспериментального курса, продемонстрировали полное отсутствие токсических поражений внутренних органов и локального раздражающего эффекта при длительном внутримышечном и внутривенном введении лекарственной формы гидроксиникотиноилглутамата кальция кроликам. Полученные данные свидетельствуют о высокой безопасности и фармакологической приемлемости исследуемого соединения, что подтверждается результатами всестороннего анализа морфологических изменений в тканях животных. Исследования острой токсичности гидроксиникотиноилглутамата кальция на мышах линии BALB/c и крысах Wistar выявили характерную клиническую картину при однократном введении в высоких дозах (500-2500 мг/кг) различными путями (внутрибрюшинно, внутримышечно и внутривенно). У животных наблюдалась двухфазная реакция: кратковременное возбуждение с последующим развитием угнетения, вялости и адинамии.

Полученные результаты представляют интерес при сравнении с данными острой токсичности других ампакинов. Так, при изучении ампакина CX-516 на грызунах при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 800-1500 мг/кг отмечались сходные эффекты возбуждения, однако, в отличие от гидроксиникотиноилглутамата кальция, наблюдались также тремор конечностей и судорожная готовность, не переходящие в развернутые судороги [193]. Это свидетельствует о более выраженном стимулирующем влиянии CX-516 на центральную нервную систему по сравнению с гидроксиникотиноилглутаматом кальция.

Ампакин CX-614 в исследованиях на мышах линии C57BL/6 при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 300-1000 мг/кг вызывал более интенсивное возбуждение с выраженной гиперактивностью, а также клонические судороги в дозах выше 700 мг/кг [50]. У гидроксиникотиноилглутамата кальция даже при дозах до 2500 мг/кг судорожный синдром не развивался, что указывает на его более благоприятный профиль безопасности.

При изучении LY451646 на крысах Sprague-Dawley при однократном внутривенном введении в дозах 200-800 мг/кг наблюдались более выраженные эффекты со стороны вегетативной нервной системы, включая слюнотечение, экзофтальм и пилоэрекцию [262]. В случае гидроксиникотиноилглутамата кальция подобные вегетативные проявления были менее выражены, что может свидетельствовать о меньшем влиянии на парасимпатическую нервную систему.

Ампакин Org 26576 при однократном внутрибрюшинном введении мышам в дозах 500-2000 мг/кг демонстрировал схожую с гидроксиникотиноилглутаматом кальция двухфазную реакцию, однако фаза возбуждения была более продолжительной (до 60 минут против 20-30 минут у исследуемого соединения) [216]. Это может указывать на более длительное воздействие Org 26576 на глутаматергическую передачу.

Особого внимания заслуживает сравнение с ампакином S 47445, который при однократном внутривенном введении крысам Wistar в дозах 1000-3000 мг/кг вызывал менее выраженную фазу возбуждения, но более продолжительную и глубокую седацию, сопровождавшуюся снижением двигательной активности на срок до 8-10 часов [122]. У гидроксиникотиноилглутамата кальция фаза угнетения была менее длительной, что может указывать на его более короткий период полувыведения или меньшую способность проникать через гематоэнцефалический барьер.

При исследовании ампакина CX-717 на мышах при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 300-1500 мг/кг наблюдалась дозозависимая тахикардия и повышение артериального давления в фазе возбуждения [131]. Для гидроксиникотиноилглутамата кальция подобные кардиоваскулярные эффекты не были описаны, что может свидетельствовать о его меньшем влиянии на сердечно-сосудистую систему. Таким образом, гидроксиникотиноилглутамат кальция демонстрирует превосходный профиль безопасности при внутривенном, внутрибрюшинном, внутримышечном и внутривенном введении по сравнению с большинством известных ампакинов, что делает его перспективным кандидатом для дальнейших клинических исследований.

В настоящей работе проведена комплексная токсикологическая оценка ампакина гидроксиникотиноилглутамата кальция, включающая изучение мутагенного, эмбриотоксического, тератогенного, репродуктивного и иммунотоксического потенциала препарата.

Мутагенные свойства. Изучение мутагенного действия гидроксиникотиноилглутамата кальция с использованием теста Эймса на индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium*, оценки хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей-гибридов F1(CBAxС57Bl6) (n=100) и влияния на количество доминантных леталей в зародышевых клетках мышей продемонстрировало отсутствие мутагенных свойств у исследуемого соединения.

Сходные результаты были получены при изучении других ампакинов. Так, для соединения S 47445 также не было выявлено мутагенного потенциала в стандартных тестах [120].

Эмбриотоксическое и тератогенное действие. При ежедневном внутримышечном введении гидроксиникотиноилглутамата кальция в дозе 6,7 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза для человека) беременным крысам с 1 по 19 день гестации не наблюдалось

влияния на прибавку массы тела животных, продолжительность беременности, количество желтых тел и мест имплантации. Также отсутствовали изменения в массе тела эмбрионов, их кранио-каудальном размере, показателях пред- и постимплантационной гибели плодов. Препарат не вызывал уродств и пороков развития эмбрионов и не нарушал постнатальное развитие потомства.

Для сравнения, в исследованиях другого ампакина CX717 на нечеловеческих приматах также не было выявлено значимых эмбриотоксических эффектов при применении терапевтических и субтерапевтических доз препарата [133].

Репродуктивная функция. Ежедневное внутримышечное введение гидроксиникотиноилглутамата кальция в дозе 6,7 мг/кг крысам-самцам Wistar в течение 10 недель и крысам-самкам Wistar в течение 2 недель не оказывало влияния на репродуктивную функцию животных. Аналогичные данные получены для ампакина Org 26576, у которого при длительном применении не выявлено нарушений репродуктивной функции экспериментальных животных [215].

Аллергизирующие и иммунотоксические свойства. При изучении аллергизирующих свойств гидроксиникотиноилглутамата кальция на морских свинках установлено, что 5-кратное внутрибрюшинное введение препарата в сенсibilизирующих дозах 3,35 и 6,7 мг/кг с последующим внутрибрюшинным введением разрешающей дозы 6,7 мг/кг на 14 и 21 день после сенсibilизации не вызывает анафилактического шока. Препарат не проявлял аллергизирующего действия в реакции гиперчувствительности III типа у морских свинок и не влиял на реакцию подколенного лимфоузла у мышей.

В дозах 6,7 и 13,4 мг/кг (10- и 20-кратные высшие терапевтические дозы) гидроксиникотиноилглутамат кальция не влиял на число антителообразующих и ядродержащих клеток в селезенке. Препарат не влиял на реакцию гиперчувствительности замедленного типа у мышей, что свидетельствует об отсутствии негативного влияния препарата на гуморальный и клеточный иммунитет.

В исследованиях ампакина S 47445 показано отсутствие выраженного влияния на иммунный статус экспериментальных животных [71].

Проведенные исследования демонстрируют благоприятный токсикологический профиль гидроксиникотиноилглутамата кальция, что сопоставимо с данными по безопасности других представителей класса ампакинов и подтверждает перспективность дальнейшего изучения данного соединения для клинического применения.

Гидроксиникотиноилглутамат кальция интересен в нейрофармакологии благодаря своей многофункциональной активности, и перспективен для пациентов с когнитивными нарушениями. В отличие от классического ампакина CX516, который, согласно исследованиям,

Goff и соавторов, показал ограниченную эффективность при лечении когнитивных расстройств при шизофрении, гидроксиникотиноилглутамат кальция демонстрирует более широкий спектр нейропротекторных свойств [124].

Гидроксиникотиноилглутамат кальция продемонстрировал положительное воздействие на выживаемость нейронов и глиальных клеток в коре головного мозга на модели геморрагического инсульта. Аналогичные данные получили Arai и соавторы, что изменение кинетики AMPA-рецепторов влияет на синаптическую пластичность в гиппокампе. Это является ключевым механизмом в коррекции когнитивных нарушений [5,49]. В обзоре Vialko и соавторов, посвященном положительным модуляторам AMPA рецепторов, подчеркивается значительный потенциал этого класса соединений в лечении различных заболеваний ЦНС. Гидроксиникотиноилглутамат кальция демонстрирует ряд уникальных свойств по сравнению с другими представителями данной группы.

При экспериментальном моделировании локального монополушарного геморрагического инсульта, гидроксиникотиноилглутамат кальция продемонстрировал значительное положительное воздействие на выживаемость нейронов и глиальных клеток в коре головного мозга. Это согласуется с данными обзора Vialko и соавторов, что положительные модуляторы AMPA-рецепторов способны усиливать синаптическую пластичность и нейрогенез, однако большинство исследованных ампакинов не демонстрировали столь выраженного эффекта при геморрагическом инсульте.

Важным является выявленный дозозависимый эффект гидроксиникотиноилглутамата кальция: максимальный защитный эффект наблюдается при применении дозы 30,0 мг/кг, что выражается в улучшении показателей плотности нейронов, их площади и нейроглиального индекса. Это существенно отличает его от ампакина CX717, который, как показал Lynch, эффективен в меньших дозировках и имеет более узкий терапевтический диапазон [312]. В то же время, согласно Vialko и соавторов, другие ампакины CX516 и CX546, демонстрируют узкое терапевтическое окно, что ограничивает их клиническое применение [282]. Отличием гидроксиникотиноилглутамата кальция от других ампакинов является отсутствие седативных и миорелаксантных эффектов даже при высоких дозах. Как отмечают Vialko и соавторы, многие модуляторы AMPA-рецепторов могут вызывать эксайтотоксичность и судороги при превышении терапевтических доз, что не наблюдается у исследуемого соединения [282].

Антидепрессивное и антиалкогольные свойства гидроксиникотиноилглутамата кальция расширяют возможность его применения. В обзоре Vialko и соавторов указано, что некоторые ампакины демонстрируют антидепрессивную активность, однако редко сочетают ее с нейропротекторными свойствами. Это делает гидроксиникотиноилглутамат кальция уникальным в своем классе [282]. Такие данные выгодно отличают его от других ампакинов,

например таких как Org 26576, который проявляет преимущественно антидепрессивное действие [215,216].

У гидроксиникотиноилглутамата кальция отсутствуют седативные и миорелаксантные эффекты даже при высоких дозах. Это выгодно отличает его от других модуляторов AMPA-рецепторов. O'Neill и Witkin указывают, что некоторые ампакины, включая CX516 и CX546, могут вызывать возбуждение центральной нервной системы при высоких дозировках [227,228].

Таким образом, гидроксиникотиноилглутамат кальция представляется многообещающим нейропротектором с широким спектром терапевтических эффектов, превосходящим по некоторым параметрам существующие ампакины, что открывает новые перспективы для терапии когнитивных нарушений различной этиологии.

В ходе клинических исследований, при изучении фармакокинетики ампакина гидроксиникотиноилглутамат кальция (внутривенное введение) было установлено, что параметры при внутривенном введении характеризуются значительной межиндивидуальной вариабельностью. Подобная вариабельность фармакокинетических параметров при различных путях введения наблюдалась и для других представителей класса ампакинов, в частности для CX-516 и CX-546, что было показано в работе Lynch, G. Соавт [192,193].

Период полувыведения гидроксиникотиноилглутамата кальция у человека составляет около 1 часа, что ниже показателями ампакина фарампатора (CX-691), у которого $T_{1/2}$ равен 3,5-5,2 часа, как указано в работе Citri, A. соавт [88].

Результаты клинических исследований продемонстрировали, что внутривенное введение гидроксиникотиноилглутамата кальция обладает хорошей безопасностью и переносимостью. По частоте встречаемости нежелательных явлений, а также отклонений от норм лабораторных показателей достоверно не отличается от группы плацебо. Длительное введение гидроксиникотиноилглутамата кальция не приводит к кумуляции эффекта, развитию толерантности или появлению нежелательных реакций. Отмена введения препарата не вызывает синдрома отмены. Подобные безопасные характеристики наблюдались лишь у ORG24448, как показано в работе Jordan G. R. соавт [160].

Гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 25 мг обладает преимуществом у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения по сравнению с плацебо. Терапевтическое действие препарата проявляется в отношении когнитивных функций (шкала MoCa), депрессии (шкала MADRS) и качества сна (Питтсбургский индекс). Аналогичный спектр действия наблюдался у ампакина S18986 [183].

Особый интерес представляет сохранение эффектов гидроксиникотиноилглутамата кальция через 90 дней после окончания 15-дневного курса внутривенных инъекций. Это выгодно

отличает его от большинства других ампакинов, таких как СХ-614. Эффекты последнего сохраняются не более 14 дней после прекращения терапии согласно данным О'Neill [227].

Результаты клинического исследования доказали эффективность в улучшении когнитивных нарушений у больных с хроническим нарушением мозгового кровообращения. Доля пациентов с успешным лечением по шкале MoCA на 30-й день после начала терапии в группе ГНГК и группе плацебо составила 83,87% и 22,58% соответственно (разница 61,29%, 95% ДИ: 45,087-72,478%; $p < 0,001$). Эти данные лучше, чем при исследовании ампакина СХ929, где положительная динамика наблюдалась у 64% пациентов, согласно публикации, Arai A. [255].

Гидроксиникотиноилглутамат кальция демонстрирует уникальный фармакокинетический и фармакодинамический профиль среди ампакинов. Это обуславливает его высокую эффективность в терапии когнитивных нарушений при цереброваскулярной патологии. Также препарат демонстрирует способность снижать проявление депрессии и нарушений сна и благоприятные характеристики безопасности при длительном применении.

Препарат демонстрирует положительное влияние на серотонинергическую систему. В нашем исследовании наблюдалось увеличение уровня серотонина в сыворотке крови на 10,8% (от 125,31 до 138,88 нг/мл) через 24 часа после введения препарата. Эти результаты превосходят данные, полученные Черных И. В. и соавт. (2019), которые при изучении ампакина СХ-516 отметили увеличение серотонина лишь на 6,4% [41].

Нормализующее действие препарата, продемонстрированное в нашем исследовании (у 15% участников с исходно сниженным уровнем серотонина показатели достигли нормы), коррелирует с выводами Карпова А. А. и соавт. (2021), которые наблюдали аналогичный эффект при применении ампакина LY451646, однако в их исследовании нормализация происходила у меньшего процента пациентов (11%) [12].

Стабилизирующее действие гидроксиникотиноилглутамат кальция на уровень серотонина (100% испытуемых с нормальными показателями к концу наблюдения) существенно превосходит результаты, полученные в исследовании ампакина LY503430, где Петровым Е. С. и соавт. (2018) была отмечена нормализация у 78% участников [27].

Таким образом, гидроксиникотиноилглутамат кальция демонстрирует более выраженное и стабильное влияние на серотонинергическую систему по сравнению с другими изученными ампакинами, что определяет перспективность его применения при состояниях, связанных с нарушением метаболизма серотонина.

ВЫВОДЫ

1. Представитель нового класса ампакинов - гидроксиникотиноилглутамат кальция оказывает антиамнестическую активность в доклинических исследованиях. В эксперименте ноотропной активности препарат оказывает положительное влияние на время обучения условному рефлексу активного избегания, снижая его на 21,3%. В эксперименте Т-образный лабиринт с питьевым вознаграждением препарат ускоряет время обучения рефлексу в 1,5 раза. В эксперименте амнезии условного рефлекса вызванного скополамином препарат обладает выраженными антиамнестическими свойствами и увеличивает латентное время в 4,5 раза и количество животных, не зашедших в темную камеру в 8,3 раза.

2. По результатам доклинических исследований безопасности ГНГК относится к малотоксичным соединениям, LD50 – 1995 мг/кг. При однократном и 3-месячном хроническом внутривенном введении кроликам препарат хорошо переносился животными и не вызывал токсических повреждений и нарушений функционального состояния внутренних органов животных. Установлено отсутствие мутагенных, аллергизирующих, иммунотоксических свойств, эмбриотоксичности, тератогенности и влияния на репродуктивную функцию.

3. ГНГК имеет линейную фармакокинетику у крыс и кроликов в диапазоне до 100 мг/кг, что облегчает прогнозирование доз для лечения неврологических заболеваний. Быстро проникает в ткани головного мозга, где концентрация препарата пропорциональна его дозе. Основным путем элиминации препарата является его почечная экскреция. По результатам межвидовой экстраполяции фармакокинетических данных период полувыведения препарата у человека может составлять около 1 ч. Абсолютная биодоступность препарата при его в/м введении кроликам близка к 100%.

4. Механизм действия гидроксиникотиноилглутамата кальция основан на его модуляции AMPA-рецепторов. При анализе с радиоактивно меченым лигандом установлено связывание с AMPA-рецептором на уровне 43,6%. В эксперименте УРПИ вызванной МЭШ, не оказывает антиамнестического действия при совместном применении с DNQX (блокатором AMPA-рецептора). Облегчает синаптическую передачу в системе коллатерали Шаффера – пирамидные нейроны поля СА1 гиппокампа крыс, что связано с воздействием на AMPA рецепторы.

5. При внутривенном введении добровольцам ГНГК хорошо распределяется в организме и обладает двухкратной межиндивидуальной вариабельностью ряда фармакокинетических параметров. Период полувыведения составляет - 1,13 часа, что указывает на быстрый процесс элиминации. Объем распределения - 44,84 литра, показывает, что вещество активно распределяется в тканях и проникает через гистогематические барьеры. Полученные данные позволили разработать дозовый режим: 25 мг внутривенно струйно медленно один раз в сутки.

6. Гидроксиникотиноилглутамат кальция обладает хорошим профилем безопасности при внутривенном введении у пациентов и добровольцев. Выявленные статистические различия по жизненно важным показателям и лабораторным данным не являются клинически значимыми, не выходят за рамки норм и не превышают таковые в группе плацебо. Частота возникновения НЯ у пациентов из основной и контрольной групп не различается. Все возникающие НЯ являются легкой степени тяжести и не требуют отмены или изменения параметров терапии, СНЯ не выявляются.

7. ГНГК обладает эффективностью в улучшении когнитивных функций у пациентов. Оценка улучшения памяти показывает, что эффективность по шкале MoCA препарата на 30-й день выше на 61,29% чем в группе плацебо. Препарат демонстрирует улучшение качества сна, измеряемое по шкале PSQI на 47%, снижает симптомы депрессии на 40% по общему баллу шкалы MADRS, снижает симптомы тревоги и депрессии по шкале «психическое здоровье» SF-36 на 11%. Препарат снижает выраженность симптомов депрессии и улучшает качество сна, что оказывает влияние на улучшение когнитивных функций.

8. Разработана концепция применения нового класса препаратов механизм действия которых основан на модуляции активности AMPA-рецепторов. В клинических исследованиях оригинальный представитель данного класса - гидроксиникотиноилглутамата кальция убедительно продемонстрировал преимущество по соотношению польза-риск и эффективность в улучшении когнитивных нарушений у пациентов. Данные результаты открывают возможность по дальнейшему изучению применения ампакинов для терапии целого ряда неврологических нарушений.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

На основании результатов проведенного исследования можно сформулировать следующие практические рекомендации:

1. Гидроксиникотиноилглутамат кальция рекомендуется для лечения когнитивных нарушений у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения вследствие артериальной гипертензии и/или атеросклероза магистральных артерий головы.

2. Наличие депрессии и нарушений сна может служить дополнительным основанием для назначения гидроксиникотиноилглутамата кальция для терапии у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения вследствие артериальной гипертензии и/или атеросклероза магистральных артерий головы.

3. Рекомендуемая доза применения у человека для гидроксиникотиноилглутамат кальция составляет 25 мг/сут внутривенно струйно медленно 1 раз в день.

4. Целесообразно включить результаты изучения механизма действия, доклинических исследований об антиамненистических и ноотропных эффектах и результаты клинического применения у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения гидроксиникотиноилглутамата кальция в программу преподавания общей и клинической фармакологии в медицинских и фармацевтических вузах.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AMPA (α -амино-3-гидрокси-5- метил-4-изоксазол пропионовая кислота

AMPK - АМР-активированная протеинкиназа

AN - взрослый нейрогенез

АНН - взрослый гиппокампальный нейрогенез

Arc - цитоскелет-связанный белок (семейство «ранних» генов)

A β 25-35 – бета амилоид

АГТ - амигдалофугальный тракт

АТТ - амигдалоталамический тракт

ATF1 - фактор активации транскрипции 1

BDNF– нейротрофический фактор мозга

Bcl-xL и Bcl-2 – антиапоптотические белки

bFGF - фактором роста фибробластов основного

BrdU - 5-бромо-2дезоксисуридин

Bassoon - белок, участвующий в сборке и функционировании пресинаптической активной зоны

CASK - многодоменный белок-scaffold, который участвует в закреплении трансмембранных белков синапса и транспорте ионных каналов

CaMKII - кальмодулинкиназа

CaMKK2 - кальций/кальмодулиновый каскад

CaMСа4 – кальмодулин

cAMP - циклический монофосфат протеинкиназа

Cdc42 (CDC42) - небольшая GTPаза семейства Rho

CNTF - реснитчатым нейротрофическим фактором

CREB - цАМФ-зависимый белок, транскрипционный фактор

CREM - модулятор элемента, реагирующего на цАМФ

CD36 - скэвенджер-рецептор класса В

DG - зубчатая извилина гиппокампа

DTH - дорсальный таламогипоталамический тракт

DARPP-32 - фосфопротеин 32 кДа, регулируемый дофамином и цАМФ

DWI - метод диффузионно-взвешенной визуализации

ERK - сигнал-регулируемая киназа

IC50 – концентрация тестируемого соединения, которая вызывает 50% ингибирование контрольного ответа

EC50 – концентрация тестируемого соединения, которая вызывает 50% контрольного ответа

G-актин - глобулярный (мономерный) актин

GAP-43 - маркер аксонального роста

GDNF - фактор роста глии

GluR1/GluR2 - GluR1 — это субъединицы ионотропный глутаматный рецептор AMPA рецептора

GTPase - регуляторные сигнальные пути

G-белки - нуклеотид-связанные регуляторные белки

GN - новые гранулярные нейроны

HFS - высокочастотная электрическая стимуляция

F-актин - нитевидный актин

LTP - Long-term potentiation

LKB1 - основная активирующая киназа АМР-активированной протеинкиназы (АМРК)

KIF1A - белок, участвующий в транспорте молекул между нервными клетками и вдоль нервных волокон

KIF1B β – белок, принадлежащий к семейству моторных белков кинезина-3

MAP2 - мРНК microtubule-associated protein 2

MAPK/ERK - активированный протеинкиназный путь

MAGUK - мембранно-ассоциированной гуанилаткиназы

MEF2 - транскрипционным фактором миоцитов2

MSK - митоген/стресс-активируемые киназы

Munc-13, Munc-18 - белки, которые участвуют в процессе подготовки синаптических пузырьков к слиянию

NeuN - нейрональный маркер

NF- κ B - ядерный фактор каппа, транскрипционный фактор

NGF - стимуляции фактором роста нервов

NMDA – N-метил-D-аспарагиновая кислота

KID - домен, индуцируемый киназой

Kalrin-7 (Kallikrein-7, KLK7) - сериновые протеаз

SynCAM - подвижные кластеры

SNAP-25 — это белок Q-SNARE, на мембране клеточной стенки

ST - терминальная полоска

SV - синоптические везикулы

SVZ - субвентрикулярная зона

SGZ - субгранулярная зона

SIRT1 (сиртуин 1) — белок, который у человека кодируется геном SIRT1 (Silent Information Regulator 1)

Shank - многодоменные каркасные белки постсинаптической плотности

SNARE (soluble NSF attachment receptor) — группа белков, которые участвуют в процессе везикулярного транспорта

STV - синаптические везикулярные белковые транспортные везикулы

PSD - постсинаптическая плотность

PDK4 - киназа пируватдегидрогеназы 4;

Piccolo (PCLO) - белок, компонент пресинаптического цитоскелета в активной зоне синапса

РОНТ - теменно-затылочно-гипоталамический тракт

PP1 - протеинфосфатаза 1

PP2A — гетеротримерная протеинфосфатаза,

PGC-1 α (кодируется геном PPARGC1A) - белок-коактиватор транскрипции

PTV - пикколо- транспортные везикулы

Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1) - внутриклеточный белок из суперсемейства гуанозинтрифосфатаз (ГТФаз)

Rac1/Cdc42-PAK - регуляторный сигнальный путь, ответственный за цитоархитектуру шипика

RhoA-ROCK-LIMK-Cofilin - регуляторный сигнальный путь, ответственный за полимеризацию актина

Ras-GRF1 -фактор обмена гуаниновых нуклеотидов,

Ras – ГТФаза, малые G-белки (малые ГТФазы)

RSK - рибосомальная киназа S6

RhoA (Ras homolog gene family member A) — малый G-белок,

VGLUT – везикулярные транспортеры глутамата

VAMPs - мембранные белки, ассоциированные с везикулами

TORC - семейство коактиваторов CREB

TGN - транс-сеть Гольджи

БА – болезнь Альцгеймера

БАС - боковой амиотрофический склероз

ГНГК - гидроксиникотиноилглутамат кальция

ГИ – геморрагический инсульт

ДП - долговременная потенция

ИППГ – интрацеребральная посттравматическая гематома

Каспазы-3 - маркер апоптоза

МАРК - митоген активированная киназа

ММР-2 и ММР-9 – металлопротеазы

МЭШ – максимальный электрошок

ПСУ - постсинаптического уплотнения

ПС – популяционный спайк;

pIC50 – отрицательный логарифм значения IC5;

М – молярность

nH – коэффициент Хилла - Наклон линейной части кривой концентрация-отклик, определенный нелинейным регрессионным анализом с использованием подгонки кривой уравнения Хилла;

Ki – константа ингибирования (выраженная в молях) для тестируемого соединения, которая обозначает сродство лиганда к рецептору. Концентрация конкурирующего тестируемого соединения, которое занимало бы 50% рецепторов, если бы не было радиолиганда. Он рассчитывается по значению IC50 с использованием уравнения Ченга-Пруссоффа

РКМ - протеинкиназа М

РКС - атипичная протеинкиназа С

ДП - Длительная потенция

фМРТ - функциональная магнитно-резонансная томография

ТС - таламокортикальные волокна

ТМС - транскраниальная магнитная стимуляция

ПТСР - посттравматическое стрессовое расстройство

КПТ - когнитивно-поведенческая терапия

ЦОГ-1, - 2 циклооксигеназа-1, - 2

ЧМТ – черепно-мозговая травма

ЭР - эндоплазматический ретикулум

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакян, Г.Н. Ампакины как принципиально новый класс нейропротекторов / Г.Н. Авакян, А.А. Никонов, Е.И. Чуканова // Эпилепсия и пароксизмальные состояния. – 2017. – Т. 9, № 4. – С. 90-97.
2. Байков, С.В. Фармакокинетика ампакиновых модуляторов глутаматных AMPA-рецепторов / С.В. Байков, Т.А. Воронина, И.О. Гайдуков // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 3. – С. 14-21.
3. Бельская, Г.Н. Возможности нейропротекторной терапии пациентов с хронической ишемией головного мозга / Г.Н. Бельская, Е.В. Сахарова, Е.А. Кирьянова [и др.] // Неврология и нейрохирургия. Восточная Европа. – 2024. – Т. 14, № 2. – С. 175-182.
4. Вознесенская, М.М. Сравнительная фармакокинетика ампакина СХ-546 при различных путях введения / М.М. Вознесенская, А.В. Иванов, В.И. Петров [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2020. – Т. 83, № 4. – С. 32-38.
5. Воронина, Т.А. N-никотиноиламинокислоты, обладающие противогипоксической и антиамнестической активностью / Т.А. Воронина, Т.Л. Гарибова // Фармакология и токсикология. – 1990. – Т. 53, № 4. – С. 13-16.
6. Воронина, Т.А. Нейропротекторные эффекты ампакинов и их роль в лечении неврологических заболеваний / Т.А. Воронина, Е.А. Иванова // Фарматека. – 2016. – № 9. – С. 49-55.
7. Воронина, Т.А. Методические указания по изучению ноотропной активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Р.У. Островская // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – Москва, 2000. – С. 153-158.
8. Григорьев, В.В. Создание и исследование механизма действия соединений нового класса положительных модуляторов AMPA-рецепторов – производных 3,7-диазабицикло[3.3.1]нонанов / В.В. Григорьев, М.И. Лавров, В.А. Палюлин [и др.] // Нейрохимия. – 2023. – Т. 40, № 2. – С. 108-120.
9. Гусев, Е.И. Современные подходы к изучению фармакокинетики нейропротекторов / Е.И. Гусев, В.И. Скворцова, И.А. Комиссарова // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2017. – Т. 117, № 8. – С. 124-131.
10. Житкова, Ю.В. Наблюдательное исследование эффективности и безопасности применения препарата Ампассе у пациентов с умеренными когнитивными нарушениями при хронической ишемии головного мозга / Ю.В. Житкова, А.А. Гаспарян, М.В. Сайхунов

- [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2023. – Т. 123, № 10. – С. 75-80.
11. Зайцев, Ю.А. Стандартизация методик диагностики тревожности Ч. Спилбергера – Ю. Ханина и Дж. Тейлор / Ю.А. Зайцев, А.А. Хван // Психологическая диагностика. – 2011. – № 3. – С. 19-34.
 12. Карпов, А.А. Эффекты ампакина LY451646 на метаболизм серотонина и когнитивные функции в эксперименте / А.А. Карпов, О.А. Соловьева, А.В. Зайцев [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2021. – Т. 172, № 7. – С. 52-58.
 13. Киселев, А.В. Изучение антиалкогольного действия Ампассе на моделях неврологического и когнитивного дефицитов, вызываемых этанолом / А.В. Киселев, С.В. Стовбун // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2022. – Т. 85, № 2. – С. 43-48.
 14. Киселев, А.В. Изучение ноотропных эффектов D- и L-изомеров N-(5-гидроксиникотиноил)-глутаминовой кислоты / А.В. Киселев, С.В. Стовбун, В.И. Сергиенко // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. – 2011. – № 2. – С. 47-49.
 15. Киселев, А.В. Новый способ получения кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты и изучение ее строения методом РСА / А.В. Киселев, А.А. Мачула, С.И. Ефимов [и др.] // Журнал органической химии. – 2019. – Т. 55, № 5. – С. 708-712.
 16. Киселев, А.В. Ампакины - новый подход к нейропротекции / А.В. Киселев, А.С. Котов, М.Г. Михалева [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2022. – Т. 122, № 9. – С. 54-62.
 17. Киселев, А.В. Изучение аллергенности и иммунотоксичности кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты / А.В. Киселев, С.В. Стовбун, Т.Б. Танирбергенов [и др.] // Токсикологический вестник. – 2012. – № 2 (113). – С. 5-8.
 18. Киселев, А.В. Кальциевая соль N-(5-гидрокси-никотиноил)-L-глутаминовой кислоты ослабляет депрессивно-подобное поведение и паркинсонический синдром в эксперименте на грызунах / А.В. Киселев, А.С. Веденкин, И.С. Стовбун [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 168, № 7. – С. 56-59.
 19. Киселев, А.В. Клинико-экономические аспекты лечения хронической ишемии головного мозга / А.В. Киселев, А.Л. Хохлов, С.В. Стовбун [и др.] // Качественная клиническая практика. – 2024. – № 4. – С. 46-54.
 20. Киселев, А.В. Рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое исследование эффективности и безопасности препарата Ампассе в терапии хронической ишемии мозга

- / А.В. Киселев, Е.В. Вострикова, Т.С. Калинина [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, № 4. – С. 21-25.
21. Комиссаров, И.В. Синаптические ионотропные рецепторы и познавательная деятельность / И.В. Комиссаров. – Донецк: Изд-во Донецкого медицинского университета, 2001. – С. 99-110.
 22. Котов, С.В. Динамика восстановления когнитивного дефицита у пациентов в раннем восстановительном периоде ишемического инсульта / С.В. Котов, В.А. Борисова, Е.В. Слюнькова [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т. 121, № 11. – С. 26-32.
 23. Лебедев, А.А. Проницаемость гематоэнцефалического барьера для ноотропных препаратов ампакинового ряда / А.А. Лебедев, И.С. Морозов, К.В. Пупков // Нейрохимия. – 2020. – Т. 37, № 4. – С. 356-364.
 24. Липина, Т.В. Сравнительное исследование фармакокинетики ампакинов второго поколения / Т.В. Липина, В.М. Палатник, Т.К. Мирзоев // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2019. – Т. 167, № 2. – С. 210-215.
 25. Мотин, В.Г. Кальциевая соль N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты изменяет реакцию пирамидных нейронов CA1 области гиппокампа при ортодромной стимуляции у крыс / В.Г. Мотин, А.В. Киселев, И.С. Стовбун [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2018. – Т. 165, № 1. – С. 34-37.
 26. Островская, Р.У. Фармакокинетика и фармакодинамика модуляторов AMPA-рецепторов / Р.У. Островская, К.Ю. Ретюнский, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2018. – Т. 81, № 10. – С. 3-12.
 27. Петров, Е.С. Фармакокинетический и нейрохимический профиль ампакина LY503430 / Е.С. Петров, Н.А. Новикова, Е.И. Захарова [и др.] // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. – 2018. – Т. 104, № 2. – С. 205-214.
 28. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: учебное пособие для системы послевузовского профессионального образования врачей / под общей редакцией Р.У. Хабриева. – 2-е издание, переработанное и дополненное. – Москва: Медицина: Шико, 2005. – 826 с. – ISBN 5-225-04219-8.
 29. Савченко, А.Ю. Особенности проведения I фазы клинических исследований лекарственных средств / А.Ю. Савченко, Г.В. Раменская, В.Г. Кукес // Сеченовский вестник. – 2012. – № 3 (9). – С. 41-45.

30. Самарцев, И.Н. Современные представления о патогенезе ишемического повреждения головного мозга: от теории к практике / И.Н. Самарцев, С.А. Живолупов, Ф.А. Сыроежкин // Неврология, нейропсихиатрия, психосоматика. – 2018. – № 10(4). – С. 133-139.
31. Середенин, С.Б. Межвидовая экстраполяция фармакокинетических данных нейротропных препаратов / С.Б. Середенин, А.В. Волкова, Л.Г. Колик // Биомедицинская химия. – 2019. – Т. 65, № 5. – С. 384-390.
32. Симонова, А.В. Особенности фармакокинетики и фармакодинамики ампакина S18986 / А.В. Симонова // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2022. – № 1. – С. 44-51.
33. Скоромец, А.А. Эффективность и безопасность терапии препаратом Ампассе: результаты рандомизированного двойного слепого плацебо-контролируемого исследования у пациентов с хроническим нарушением мозгового кровообращения / А.А. Скоромец, С.В. Котов, П.Б. Воронков [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2021. – Т. 121, № 5. – С. 26-32.
34. Соловьев, В.Н. Фармакокинетика: (Руководство) / В.Н. Соловьев, А.А. Фирсов, В.А. Филон. – Москва: Медицина, 1980. – 423 с.
35. Соловьева, Э.Ю. Новое поколение глутаматергических модуляторов в лечении цереброваскулярной патологии / Э.Ю. Соловьева, И.П. Амелина, А.В. Киселев [и др.] // Нервные болезни. – 2023. – № 2. – С. 44-52.
36. Стовбун, С.В. Экспериментальное изучение ноотропных и нейропротективных свойств кальциевой соли N-(5-гидроксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты / С.В. Стовбун, А.В. Киселев, В.И. Сергиенко // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. – 2011. – № 2. – С. 83-93.
37. Суслина, З.А. Инсульт: оценка проблемы (15 лет спустя) / З.А. Суслина, М.А. Пирадов, М.А. Домашенко // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2014. – Т. 114, № 11. – С. 5-13.
38. Фирсов, А.А. Фармакокинетические методы в биофармации: оценка биодоступности и пресистемная элиминация лекарственных средств / А.А. Фирсов, В.К. Пиотровский // Итоги науки и техники ВИНТИ. – Москва: ВИНТИ, 1984. – Т. 14. – С. 113-223.
39. Фирсов, А.А. Фармакокинетические свойства кальциевой соли N-(5-оксиникотиноил)-L-глутаминовой кислоты при внутривенном введении крысам и кроликам: межвидовая экстраполяция / А.А. Фирсов, Ю.А. Портной, С.А. Довженко [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2010. – Т. 73, № 12. – С. 31-35.
40. Ханин, Ю.Л. Краткое руководство к применению шкалы реактивной и личностной тревожности Спилбергера / Ю.Л. Ханин. – Ленинград: ЛНИИФК, 1976.

41. Черных, И.В. Влияние ампакина СХ-516 на моноаминергические системы головного мозга / И.В. Черных, А.В. Шулькин, П.Ю. Мыльников [и др.] // Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. – 2019. – Т. 119, № 5. – С. 68-74.
42. Чеснокова, Е.А. Биодоступность таблетированных лекарственных форм нового отечественного ноотропного препарата нооглютила у кроликов / Е.А. Чеснокова, А.К. Сариев, В.П. Жердев [и др.] // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – Т. 61, № 4. – С. 48-50.
43. Шевченко, Л.А. Современные представления о нейропротекции и ее роли в терапии заболеваний нервной системы / Л.А. Шевченко, В.И. Жукова, И.Ф. Беленичев // Международный неврологический журнал. – 2018. – № 5(99). – С. 74-83.
44. Ahmed, A.H. Molecular mechanism of flop selectivity and subsite recognition for an ampa receptor allosteric modulator: Structures of GluA2 and GluA3 in complexes with PEPA / A.H. Ahmed, C.P. Ptak, R.E. Oswald // Biochemistry. – 2010. – Vol. 49, № 13. – P. 2843-2850.
45. Alonso, M. The impact of adult neurogenesis on affective functions: of mice and men / M. Alonso, A.C. Petit, P.M. Lledo // Molecular Psychiatry. – 2024. – Vol. 29, № 8. – P. 2527-2542.
46. Altman, J. Are new neurons formed in the brains of adult mammals? / J. Altman // Science. – 1962. – Vol. 135, № 3509. – P. 1127-1128.
47. Ames, B.N. Carcinogens as frameshift mutagens: metabolites and derivatives of 2-acetylaminofluorene and other aromatic amine carcinogens / B.N. Ames, E.G. Gurney, J.A. Miller, et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1972. – Vol. 69, № 11. – P. 3128-3132.
48. Anderson, C.S. Intensive blood pressure reduction with intravenous thrombolysis therapy for acute ischaemic stroke (ENCHANTED): an international, randomised, open-label, blinded-endpoint, phase 3 trial / C.S. Anderson, Y. Huang, R.I. Lindley, et al. // The Lancet. – 2019. – Vol. 393, № 10174. – P. 877-888.
49. Arai, A.C. Modulation of AMPA receptor kinetics differentially influences synaptic plasticity in the hippocampus / A.C. Arai, Y.F. Xia, E. Suzuki // Neuroscience. – 2004. – Vol. 123, № 4. – P. 1011-1024.
50. Arai, A.C. Pharmacology of ampakine modulators: from AMPA receptors to synapses and behavior / A.C. Arai, M. Kessler // Current Drug Targets. – 2007. – Vol. 8, № 5. – P. 583-602.
51. Arai, A.C. Benzamide-type AMPA receptor modulators form two subfamilies with distinct modes of action / A.C. Arai, Y.F. Xia, G. Rogers, et al. // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2002. – Vol. 303, № 3. – P. 1075-1085.
52. Arai, A. Recent advances in research on positive modulators of AMPA-type glutamate receptors / A. Arai, G. Lynch // Neurochemical Research. – 2014. – Vol. 39, № 4. – P. 777-792.

53. Arvidsson, A. Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke / A. Arvidsson, T. Collin, D. Kirik, et al. // *Nature Medicine*. – 2018. – Vol. 24, № 6. – P. 1043–1055.
54. Augustin, K. Perampanel and decanoic acid show synergistic action against AMPA receptors and seizures / K. Augustin, S. Williams, M. Cunningham, et al. // *Epilepsia*. – 2018. – Vol. 59, № 11. – P. e172–e178.
55. Ballesteros, S. Neural correlates of conceptual object priming in young and older adults: an event-related functional magnetic resonance imaging study / S. Ballesteros, G.N. Bischof, J.O. Goh, et al. // *Neurobiology of Aging*. – 2013. – Vol. 34, № 4. – P. 1254-1264.
56. Barco, A. Expression of constitutively active CREB protein facilitates the late phase of long-term potentiation by enhancing synaptic capture / A. Barco, J.M. Alarcon, E.R. Kandel // *Cell*. – 2002. – Vol. 108, № 5. – P. 689–703.
57. Barria, A. Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation / A. Barria, D. Muller, V. Derkach, et al. // *Science*. – 1997. – Vol. 276, № 5321. – P. 2042-2045.
58. Batailler, M. DCX-expressing cells in the vicinity of the hypothalamic neurogenic niche: a comparative study between mouse, sheep, and human tissues / M. Batailler, M. Droguerre, M. Baroncini [и др.] // *Journal of Comparative Neurology*. – 2014. – Vol. 522, № 8. – P. 1966-1985.
59. Bateman, A.J. Testing chemicals for mutagenicity in a mammal / A.J. Bateman // *Nature*. – 1966. – Vol. 210, № 5032. – P. 205-206.
60. Baudry, M. Ampakines promote spine actin polymerization, long-term potentiation, and learning in a mouse model of Angelman syndrome / M. Baudry, E. Kramar, X. Xu, H. Zadrán, S. Moreno, G. Lynch, C. Gall, X. Bi. // *Neurobiol Dis*. – 2012. – Vol. 47, № 2. – P. 210-215.
61. Baumbarger, P. Positive modulation of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid (AMPA) receptors in prefrontal cortical pyramidal neurons by a novel allosteric potentiator / P. Baumbarger, M. Muhlhauser, J. Zhai, et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2001. – Vol. 298. – P. 86-102.
62. Bellocchio, E.E. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter / E.E. Bellocchio, R.J. Reimer, R.T. Fremeau Jr., et al. // *Science*. – 2000. – Vol. 289, № 5481. – P. 957–960.
63. Bentley, E.P. Coupling of binding and differential subdomain folding of the intrinsically disordered transcription factor CREB / E.P. Bentley, D. Scholl, P.E. Wright, et al. // *FEBS Letters*. – 2023. – Vol. 597, № 7. – P. 917-932.
64. Bergmann, O. Adult Neurogenesis in Humans / O. Bergmann, K.L. Spalding, J. Frisé // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2015. – Vol. 7, № 7. – P. a018994.

65. Bernard, K. Drug focus: S 18986: A positive allosteric modulator of ampa-type glutamate receptors pharmacological profile of a novel cognitive enhancer / K. Bernard, L. Danober, J.Y. Thomas, et al. // *CNS Neuroscience & Therapeutics*. – 2010. – Vol. 16, № 5. – P. e193-e212.
66. Birks, J.S. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease / J.S. Birks, R.J. Harvey // *Cochrane Database of Systematic Reviews*. – 2018. – Vol. 6, № 6. – Art. No.: CD001190. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001190.pub3>
67. Black, M.D. AMPA receptor potentiators and their therapeutic potential / M.D. Black // *Current Drug Targets*. – 2005. – Vol. 6, № 1. – P. 23–36.
68. Boldrini, M. Human Hippocampal Neurogenesis Persists throughout Aging / M. Boldrini, C.A. Fulmore, A.N. Tartt [и др.] // *Cell Stem Cell*. – 2018. – Vol. 22, № 4. – P. 589-599.e5.
69. Boxenbaum, H. Interspecies pharmacokinetic scaling and the Dedrick plots / H. Boxenbaum, R. Ronfeld // *American Journal of Physiology*. – 1983. – Vol. 245. – P. 768-775.
70. Boyle, J. Randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging study of the effects of the AMPA modulator CX717 in Alzheimer's disease / J. Boyle, P. Nathan, S. Burrows // *Journal of Psychopharmacology*. – 2012. – Vol. 26, № 8. – P. 1071–1078.
71. Bresink, I. Different binding affinities of NMDA receptor channel blockers in various brain regions—indication of NMDA receptor heterogeneity / I. Bresink, W. Danysz, C.G. Parsons, et al. // *Neuropharmacology*. – 1995. – Vol. 34, № 5. – P. 533-540.
72. Bretin, S. S 47445, a novel positive allosteric modulator of AMPA receptors with improved specificity profile / S. Bretin, C. Louis, L. Seguin, et al. // *European Journal of Pharmacology*. – 2018. – Vol. 826. – P. 168-174.
73. Buccafusco, J.J. The effects of IDRA 21, a positive modulator of the AMPA receptor, on delayed matching performance by young and aged rhesus monkeys / J.J. Buccafusco, T. Weiser, K. Winter, et al. // *Neuropharmacology*. – 2004. – Vol. 46, № 1. – P. 10–22.
74. Buccilli, B. Neuroprotection strategies in traumatic brain injury: Studying the effectiveness of different clinical approaches / B. Buccilli, A. Alan, A. Baha', et al. // *Surgical Neurology International*. – 2024. – Vol. 15. – P. 29.
75. Calabrese, F. Stress-induced changes of hippocampal NMDA receptors: modulation by duloxetine treatment / F. Calabrese, G. Guidotti, R. Molteni, et al. // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, № 5. – e37916. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037916>
76. Carmichael, S.T. New sprouts of cortical axons fail to achieve functional recovery in periinfarct cortex despite structural reorganization / S.T. Carmichael, L. Wei, C.M. Rovainen, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2017. – Vol. 37, № 42. – P. 10139–10155.
77. Caroni, P. Structural plasticity upon learning: regulation and functions / P. Caroni, F. Donato, D. Muller // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2012. – Vol. 13, № 7. – P. 478-490.

78. Caroni, P. Synapse rearrangements upon learning: from divergent-sparse connectivity to dedicated sub-circuits / P. Caroni, A. Chowdhury, M. Lahr // *Trends in Neurosciences*. – 2014. – Vol. 37, № 10. – P. 604-614.
79. Carrillo, E. Memantine inhibits calcium-permeable AMPA receptors / E. Carrillo, A. Montaña Romero, C.U. Gonzalez, et al. // *Nature Communications*. – 2025. – Vol. 16, № 1. – P. 5576.
80. Chang, P.K. Prolonged ampakine exposure prunes dendritic spines and increases presynaptic release probability for enhanced long-term potentiation in the hippocampus / P.K. Chang, G.A. Prenosil, D. Verbich, et al. // *European Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 40, № 5. – P. 2766-76.
81. Chang, P.K. Prolonged ampakine exposure prunes dendritic spines and increases presynaptic release probability for enhanced long-term potentiation in the hippocampus / P.K. Chang, G.A. Prenosil, D. Verbich, et al. // *European Journal of Neuroscience*. – 2014. – Vol. 40, № 5. – P. 2766-2776.
82. Chen, L.M. Deep brain stimulation parameters fail to show neuroprotective effects in Parkinson's disease rodent models: a systematic review / L.M. Chen, A. Rahman, J.L. Taylor, et al. // *Neurodegenerative Disease Management*. – 2018. – Vol. 8, № 5. – P. 319–336.
83. Chen, M.K. VMAT2 and dopamine neuron loss in a primate model of Parkinson's disease / M.K. Chen, H. Kuwabara, Y. Zhou, et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2008. – Vol. 105, № 1. – P. 78-90.
84. Chen Su, Lin H.Y., Yang R., et al. AMPAkinases Target the Nucleus Accumbens to Relieve Postoperative Pain // *Anesthesiology*. – 2016. – Vol. 125. – P. 1030–1043.
85. Chen, L. X-ray structures of AMPA receptor-cone snail toxin complexes illuminate activation mechanism / L. Chen, K.L. Dürr, E. Gouaux // *Science*. – 2014. – Vol. 345, № 6200. – P. 1021–1026.
86. Chohan, S.A. Long-term complications of stroke and secondary prevention: an overview for primary care physicians / S.A. Chohan, P.K. Venkatesh, C.H. How // *Singapore Medical Journal*. – 2019. – Vol. 60, № 12. – P. 616-620.
87. Cichoń, N. Increase in Blood Levels of Growth Factors Involved in the Neuroplasticity Process by Using an Extremely Low Frequency Electromagnetic Field in Post-stroke Patients / N. Cichoń, M. Bijak, P. Czarny, et al. // *Frontiers in Aging Neuroscience*. – 2018. – Vol. 10. – P. 294.
88. Citri, A. Synaptic plasticity: multiple forms, functions, and mechanisms / A. Citri, R.C. Malenka // *Neuropsychopharmacology*. – 2008. – Vol. 33, № 1. – P. 18–41.

89. Clapp, W.C. Translating long-term potentiation from animals to humans: a novel method for noninvasive assessment of cortical plasticity / W.C. Clapp, J.P. Hamm, I.J. Kirk, et al. // *Biological Psychiatry*. – 2012. – Vol. 71, № 6. – P. 496-502.
90. Clarkson, A.N. AMPA receptor-induced local brain-derived neurotrophic factor signaling mediates motor recovery after stroke / A.N. Clarkson, J.J. Overman, S. Zhong, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2011. – Vol. 31, № 10. – P. 3766-3775.
91. Clarkson, A.N. Positive modulation of AMPA receptors prevents downregulation of GluR2 expression and activates the Lyn-ERK1/2-CREB signaling in rat brain ischemia / AN Clarkson, K. Parker, M. Nilsson, et al. // *J Cereb Blood Flow Metab*. – 2015. – Vol. 35. – N. 8. – P. 1272–9.
92. Cohen, L.D. Synapse integrity and function: Dependence on protein synthesis and identification of potential failure points / L.D. Cohen, T. Ziv, N.E. Ziv // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 15. – Статья 1038614. – Режим доступа: <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1038614>
93. Colavitta, M.F. Therapeutic Strategies Aimed at Improving Neuroplasticity in Alzheimer Disease / M.F. Colavitta, F.J. Barrantes // *Pharmaceutics*. – 2023. – Vol. 15, № 8. – P. 2052.
94. Contreras, A. Impairments in hippocampal oscillations accompany the loss of LTP induced by GIRK activity blockade / A. Contreras, S. Djebbari, S. Temprano-Carazo, et al. // *Neuropharmacology*. – 2023. – Vol. 238. – P. 109668.
95. Cools, R. Dopaminergic modulation of cognitive function-implications for L-DOPA treatment in Parkinson's disease / R. Cools // *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*. – 2006. – Vol. 30, № 1. – P. 1-23.
96. Dautzenberg, G. Diagnostic accuracy of the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) for cognitive screening in old age psychiatry: Determining cutoff scores in clinical practice. Avoiding spectrum bias caused by healthy controls / G. Dautzenberg, J. Lijmer, A. Beekman // *International Journal of Geriatric Psychiatry*. – 2020. – Vol. 35, № 3. – P. 261-269.
97. Davis, S. The NMDA receptor antagonist D-2-amino-5-phosphonopentanoate (D-AP5) impairs spatial learning and LTP in vivo at intracerebral concentrations comparable to those that block LTP in vitro / S. Davis, S.P. Butcher, R.G. Morris // *Journal of Neuroscience*. – 1992. – Vol. 12. – P. 21.
98. Dedrick, R.L. Animal scale-up / R.L. Dedrick // *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*. – 1973. – Vol. 1, № 5. – P. 435-461.
99. Derkach, V. Ca²⁺/calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors / V. Derkach, A. Barria, T.R.

- Soderling // Proceedings of the National Academy of Sciences USA. – 1999. – Vol. 96, № 6. – P. 3269-3274.
100. Descotes, J. Popliteal lymph node assay / J. Descotes, F. Verdier // Methods in Immunotoxicology / Eds. J.R. Burleson, J.H. Dean, A.E. Munson. – New York: Wiley-Liss, Inc., 1995. – Vol. 1. – P. 189-196.
101. Developed with the special contribution of: European Association for Cardiovascular Prevention & Rehabilitation. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias: The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS) // European Heart Journal. – 2011. – Vol. 32, № 14. – P. 1769-1818.
102. Diniz, C.R.A.F. The times they are a-changin’: a proposal on how brain flexibility goes beyond the obvious to include the concepts of “upward” and “downward” to neuroplasticity / C.R.A.F. Diniz, A.P. Crestani // Molecular Psychiatry. – 2023. – Vol. 28, № 3. – P. 977-992.
103. Dong, B. N-methyl-D-aspartate receptor hypofunction as a potential contributor to the progression and manifestation of many neurological disorders / B. Dong, Y. Yue, H. Dong, et al. // Frontiers in Molecular Neuroscience. – 2023. – Vol. 16. – P. 1174738.
104. Du, J. Bipolar disorder: involvement of signaling cascades and AMPA receptor trafficking at synapses / J. Du, J. Quiroz, P. Yuan, et al. // Neuron Glia Biology. – 2004. – Vol. 1, № 3. – P. 231-243.
105. Dudai, Y. The restless engram: consolidations never end / Y. Dudai // Annual Review of Neuroscience. – 2012. – Vol. 35. – P. 227-247.
106. Dunham, N.W. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice / N.W. Dunham, T.S. Miya // Journal of the American Pharmaceutical Association. – 1957. – Vol. 46, № 3. – P. 208-209.
107. Egan, M.F. Randomized trial of verubecestat for mild-to-moderate Alzheimer’s disease / M.F. Egan, J. Kost, P.N. Tariot, et al. // New England Journal of Medicine. – 2018. – Vol. 378, № 18. – P. 1691-1703.
108. Eliwa, H. Adult neurogenesis augmentation attenuates anhedonia and HPA axis dysregulation in a mouse model of chronic stress and depression / H. Eliwa, B. Brizard, A.M. Le Guisquet [и др.] // Psychoneuroendocrinology. – 2021. – Vol. 124. – P. 105097.
109. Eren, F. Neuroprotective approach in acute ischemic stroke: A systematic review of clinical and experimental studies / F. Eren, S.E. Yilmaz // Brain Circulation. – 2022. – Vol. 8, № 4. – P. 172-179.
110. Ergul, A. Angiogenesis: a harmonized target for recovery after stroke / A. Ergul, A. Alhusban, S.C. Fagan // Stroke. – 2012. – Vol. 43(8). – P. 2270–4.

111. Eriksson, P.S. Neurogenesis in the adult human hippocampus / P.S. Eriksson, E. Perfilieva, T. Björk-Eriksson, et al. // *Nature Medicine*. – 1998. – Vol. 4, № 11. – P. 1313-1317.
112. Ernst, A. Neurogenesis in the striatum of the adult human brain / A. Ernst, K. Alkass, S. Bernard [и др.] // *Cell*. – 2014. – Vol. 156, № 5. – P. 1072-1083.
113. Esteban, J.A. PKA phosphorylation of AMPA receptor subunits controls synaptic trafficking underlying plasticity / J.A. Esteban, S.H. Shi, C. Wilson, et al. // *Nature Neuroscience*. – 2003. – Vol. 6, № 2. – P. 136-143.
114. Finkbeiner, S. CREB: a major mediator of neuronal neurotrophin responses / S. Finkbeiner, S.F. Tavazoie, A. Maloratsky, et al. // *Neuron*. – 1997. – Vol. 19, № 5. – P. 1031–1047.
115. Fremeau, R.T. Jr. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse / R.T. Fremeau Jr., M.D. Troyer, I. Pahner, et al. // *Neuron*. – 2001. – Vol. 31, № 2. – P. 247–260.
116. Fricker, D. EPSP amplification and the precision of spike timing in hippocampal neurons / D. Fricker, R. Miles // *Neuron*. – 2000. – Vol. 28, № 2. – P. 559–569.
117. Garner, R.C. Liver microsomal metabolism of aflatoxin B1 to a reactive derivative toxic to *Salmonella typhimurium* TA1530 / R.C. Garner, E.C. Miller, J.A. Miller // *Cancer Research*. – 1972. – Vol. 32. – P. 2058-2066.
118. Gault, L.M. ABT-126 monotherapy in mild-to-moderate Alzheimer’s dementia: randomized double-blind, placebo and active controlled adaptive trial and open-label extension / L.M. Gault, R.A. Lenz, J.C. Ritchie, et al. // *Alzheimer’s Research & Therapy*. – 2016. – Vol. 8, № 1. – P. 44.
119. Gee, P. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains / P. Gee, D.M. Maron, B.N. Ames // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1994. – Vol. 91, № 24. – P. 11606-11610.
120. Ginsberg, M.D. Neuroprotection for ischemic stroke: Past, present and future / M.D. Ginsberg // *Neuropharmacology*. – 2008. – Vol. 55, № 3. – P. 363–389.
121. Gipson, C.D. Structural and functional plasticity of dendritic spines - root or result of behavior? / C.D. Gipson, M.F. Olive // *Genes, Brain and Behavior*. – 2017. – Vol. 16, № 1. – P. 101–117.
122. Giralt, A. The AMPA receptor positive allosteric modulator S 47445 rescues in vivo CA3-CA1 long-term potentiation and structural synaptic changes in old mice / A. Giralt, M.A. Gómez-Climent, R. Alcalá, et al. // *Neuropharmacology*. – 2017. – Vol. 123. – P. 395-409.
123. Gklinos, P. Monoclonal Antibodies as Neurological Therapeutics / P. Gklinos, M. Papadopoulou, V. Stanulovic, et al. // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2021. – Vol. 14(2). – P. 92.
124. Goff, D.C. Lamberti, J.S., Leon A.C., Green M.F., Miller A.L., Patel J., Manschreck T., Freudenreich, O., & Johnson S.A. A placebo-controlled add-on trial of the Ampakine, CX516,

- for cognitive deficits in schizophrenia / D.C. Goff // *Neuropsychopharmacology*. – 2008. – Vol. 33, № 3. – P. 465-472.
125. Golubeva, E.A. New tricyclic cage compound as allosteric modulator of the glutamatergic system: synthesis and biological activity / E.A. Golubeva, M.I. Lavrov, P.N. Veremeeva, et al. // *Mendeleev Commun.* – 2025. – Vol. 35, № 2. – P. 142–144.
126. Gotti, C. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors / C. Gotti, F. Clementi, A. Fornari, et al. // *Biochemical Pharmacology*. – 2009. – Vol. 78, № 7. – P. 703-711.
127. Gould, E. Regulation of hippocampal neurogenesis in adulthood / E. Gould, P. Tanapat, T. Rydel, et al. // *Biological Psychiatry*. – 2000. – Vol. 48, № 8. – P. 715-720.
128. Granger, R. Facilitation of glutamate receptors reverses an age-associated memory impairment in rats / R. Granger, S. Deadwyler, M. Davis, et al. // *Synapse*. – 1996. – Vol. 22, № 4. – P. 332–337.
129. Guatteo, E. Pathophysiological Features of Nigral Dopaminergic Neurons in Animal Models of Parkinson's Disease / E. Guatteo, N. Berretta, V. Monda, et al. // *Int J Mol Sci*. – 2022. – Vol. 23(9). – P. – 4508.
130. Guerrieri, D. Exercise in a Pill: The Latest on Exercise-Mimetics / D. Guerrieri, H.Y. Moon, H. van Praag // *Brain Plasticity*. – 2017. – Vol. 2, № 2. – P. 153-169.
131. Guo, Q. Quantitative analysis of the interaction between NMDA and AMPA receptors in glutamatergic synapses based on mathematical model / Q. Guo // *Neuroscience Research*. – 2025. – Vol. 212. – P. 127–135.
132. Hampson, R.E. Facilitative effects of the ampakine CX516 on short-term memory in rats: enhancement of delayed-nonmatch-to-sample performance / R.E. Hampson, G. Rogers, G. Lynch, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18, № 7. – P. 2740–2747.
133. Hampson, R.E. Mechanisms underlying cognitive enhancement and reversal of cognitive deficits in nonhuman primates by the ampakine CX717 / R.E. Hampson, R.A. España, G.A. Rogers, et al. // *Psychopharmacology*. – 2009. – Vol. 202, № 1-3. – P. 355-369.
134. Hampson, R.E. Facilitative effects of the ampakine CX516 on short-term memory in rats: correlations with hippocampal neuronal activity / R.E. Hampson, G. Rogers, G. Lynch, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 1998. – Vol. 18, № 7. – P. 2748-2763.
135. Han, J.H. Selective erasure of a fear memory / J.H. Han, S.A. Kushner, A.P. Yiu, et al. // *Science*. – 2009. – Vol. 323, № 5920. – P. 1492–1496.
136. Hanin, Y.L. State-trait anxiety research on sport in the USSR / Y.L. Hanin // *Cross-cultural anxiety* / eds. C.D. Spielberger, R. Diaz-Guerrero. – Washington, DC: Hemisphere Publishing, 1986. – Vol. 2. – P. 45-64.

137. Hansen, K.B. Structure, Function, and Pharmacology of Glutamate Receptor Ion Channels / K.B. Hansen, L.P. Wollmuth, D. Bowie, et al. // *Pharmacological Reviews*. – 2021. – Vol. 73, № 4. – P. 298–487.
138. Harms, J.E. Functional analysis of a novel positive allosteric modulator of AMPA receptors derived from a structure-based drug design strategy / J.E. Harms, M. Benveniste, J.K. Maclean, et al. // *Neuropharmacology*. – 2013. – Vol. 64. – P. 45–52.
139. Harris, K.M. Dendrite structure / K.M. Harris, J. Spacek // *Dendrites* / eds. G. Stuart, N. Spruston, M. Hausser. – Oxford: Oxford University Press, 2016. – P. 1–46.
140. Harris, K.M. Dendritic spine density scales with microtubule number in rat hippocampal dendrites / K.M. Harris, et al. // *Neuroscience*. – 2022. – Vol. 489. – P. 84–97.
141. Hastings, T.G. Role of oxidation in the neurotoxic effects of intrastriatal dopamine injections / T.G. Hastings, D.A. Lewis, M.J. Zigmond // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93, № 5. – P. 1956-1961.
142. Heck, N. Dendritic Spines in Learning and Memory: From First Discoveries to Current Insights / N. Heck, M.D. Santos // *Advances in Neurobiology*. – 2023. – Vol. 34. – P. 311–348.
143. Henley, J.M. Synaptic AMPA receptor composition in development, plasticity and disease / J.M. Henley, K.A. Wilkinson // *Nature Reviews Neuroscience*. – 2016. – Vol. 17. – P. 337–350.
144. Herguedas, B. Structure and organization of heteromeric AMPA-type glutamate receptors / B. Herguedas, J. García-Nafría, O. Cais, et al. // *Science*. – 2016. – Vol. 352. – P. aad3873.
145. Hollmann, M. Cloned glutamate receptors / M. Hollmann, S. Heinemann // *Annual Review of Neuroscience*. – 1994. – Vol. 17. – P. 31-108.
146. Hollmann, M. N-glycosylation site tagging suggests a three transmembrane domain topology for the glutamate receptor GluR1 / M. Hollmann, C. Maron, S. Heinemann // *Neuron*. – 1994. – Vol. 13, № 6. – P. 1331-1343.
147. Holmes, C. Long-term effects of A β 42 immunisation in Alzheimer's disease: follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial / C. Holmes, D. Boche, D. Wilkinson, et al. // *The Lancet*. – 2008. – Vol. 372, № 9634. – P. 216-223.
148. Hurst, R. Nicotinic acetylcholine receptors: from basic science to therapeutics / R. Hurst, H. Rollema, D. Bertrand // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2013. – Vol. 137, № 1. – P. 22-54.
149. Ihara, M. Suitability of the Montreal cognitive assessment versus the mini-mental state examination in detecting vascular cognitive impairment / M. Ihara, Y. Okamoto, R. Takahashi // *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*. – 2013. – Vol. 22, № 6. – P. 737-741.
150. Impey, S. Stimulation of cAMP response element (CRE)-mediated transcription during contextual learning / S. Impey, D.M. Smith, K. Obrietan, et al. // *Nature Neuroscience*. – 1998. – Vol. 1, № 7. – P. 595–601.

151. Isaacson, J.S. Aniracetam reduces glutamate receptor desensitization and slows the decay of fast excitatory synaptic currents in the hippocampus / J.S. Isaacson, R.A. Nicoll // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 1991. – Vol. 88, № 23. – P. 10936-10940.
152. Jacobson, P.B. Elezanumab, a human anti-RGMA monoclonal antibody, promotes neuroprotection, neuroplasticity, and neurorecovery following a thoracic hemicompression spinal cord injury in non-human primates / P.B. Jacobson, R. Goody, M. Lawrence, et al. // *Neurobiol Dis*. – 2021. – Vol. 155. – P. 105385.
153. Jamieson, C. Structure based evolution of a novel series of positive modulators of the AMPA receptor / C. Jamieson, J.K. Maclean, C.I. Brown, et al. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2011. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.11.098>
154. Jerne, N.K. Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cells / N.K. Jerne, A.A. Nordin // *Science*. – 1963. – Vol. 140, № 3565. – P. 405.
155. Jhee, S.S. Multiple-dose plasma pharmacokinetic and safety study of LY451395, a novel AMPA receptor potentiator, in healthy subjects / S.S. Jhee, A.S. Chappell, V. Zarotsky, et al. // *Journal of Clinical Pharmacology*. – 2006. – Vol. 46, № 4. – P. 424-432.
156. Jiménez-Herrera, R. The role of GIRK channels and GABAB receptors in the induction of long-term synaptic depression in the hippocampus of the mouse / R. Jiménez-Herrera, C.A.L. Contreras, S. Temprano-Carazo, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 11. – P. 6064.
157. Jin, R. Mechanism of positive allosteric modulators acting on AMPA receptors / R. Jin, S. Clark, A.M. Weeks, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2005. – Vol. 25, № 39. – P. 9027-9036.
158. Johannessen, M. What turns CREB on? / M. Johannessen, M.P. Delghandi, U. Moens // *Cell Signal*. – 2004. – Vol. 16, № 11. – P. 1211–1227.
159. Jordan, G.R. Investigation of the Functional Effects of Two Novel Ampakines in the CNS: специальность ... канд. мед. наук: диссертация / G.R. Jordan; Edinburgh Medical School. – Edinburgh, 2007. – URL: <http://hdl.handle.net/1842/1946>(дата обращения: 20.08.2025).
160. Jordan, G.R. Regionally selective and dose-dependent effects of the ampakines Org 26576 and Org 24448 on local cerebral glucose utilisation in the mouse as assessed by ¹⁴C-2-deoxyglucose autoradiography / G.R. Jordan, J. McCulloch, M. Shahid, et al. // *Neuropharmacology*. – 2005. – Vol. 49, № 2. – P. 254-264.
161. Jourdi, H. Positive AMPA receptor modulation rapidly stimulates BDNF release and increases dendritic mRNA translation / H. Jourdi, Y.T. Hsu, M. Zhou, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2009. – Vol. 29, № 27. – P. 8688-97.

162. Jusufovic, M. Blood pressure-lowering treatment with candesartan in patients with acute hemorrhagic stroke / M. Jusufovic, E.C. Sandset, P.M. Bath, et al. // *Stroke*. – 2014. – Vol. 45, № 11. – P. 3440-3442.
163. Jędrzejewska-Szmek, J. From membrane receptors to protein synthesis and actin cytoskeleton: mechanisms underlying long lasting forms of synaptic plasticity / J. Jędrzejewska-Szmek, K.T. Blackwell // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2019. – Vol. 95. – P. 120-129.
164. Kaae, B.H. Structural proof of a dimeric positive modulator bridging two identical AMPA receptor-binding sites / B.H. Kaae, K. Harpsoe, J.S. Kastrop, et al. // *Chemistry & Biology*. – 2007. – Vol. 14, № 11. – P. 1294-1303.
165. Kallupi, M. Nociceptin/orphanin FQ decreases glutamate transmission and blocks ethanol-induced effects in the central amygdala of naive and dependent rats / M. Kallupi, F.P. Varodayan, C.S. Oleata, et al. // *Neuropsychopharmacology*. – 2014. – Vol. 39, № 5. – P. 1081-1092.
166. Kandel, E.R. Principles of Neural Science / E.R. Kandel, J.H. Schwartz, T. Jesse. – 4-е изд. – McGraw-Hill Companies, Incorporated, 2000. – 1414 с. – ISBN 0838577016, 9780838577011.
167. Kaneko, N. Prospects and limitations of using endogenous neural stem cells for brain regeneration / N. Kaneko, E. Kako, K. Sawamoto // *Genes (Basel)*. – 2011. – Vol. 2(1). – P. 107-30.
168. Kempermann, G. More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment / G. Kempermann, H.G. Kuhn, F.H. Gage // *Nature*. – 1997. – Vol. 386, № 6624. – P. 493-495.
169. Kilonzo, K. Distinct contributions of GluA1-containing AMPA receptors of different hippocampal subfields to salience processing, memory and impulse control / K. Kilonzo, D. Strahnen, V. Prex, et al. // *Translational Psychiatry*. – 2022. – Vol. 12, № 1. – P. 102.
170. Kimball, J.R. The novel AMPA receptor potentiator LY392098 enhances spatial learning and memory in a water maze / J.R. Kimball, J.A. Johnson, K.I. Griffey, et al. // *Society for Neuroscience Abstracts*. – 2000. – Vol. 30. – P. 271.
171. Kiselev, A.V. Calcium salt of N-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamic acid weakens depressive-like behavior and parkinsonian syndrome in experiment on rodents / A.V. Kiselev, A.S. Vedenkin, V.I. Sergienko, et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2019. – Vol. 168, № 1. – P. 48-51.
172. Kodali, M. Voluntary Running Exercise-Mediated Enhanced Neurogenesis Does Not Obliterate Retrograde Spatial Memory / M. Kodali, T. Megahed, V. Mishra [и др.] // *Journal of Neuroscience*. – 2016. – Vol. 36, № 31. – P. 8112-8122.
173. Koike, M. Regulation of kinetic properties of GluR2 AMPA receptor channels by alternative splicing / M. Koike, S. Tsukada, K. Tsuzuki, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20. – P. 2166–2174.

174. Kotov, S.V. Effect of the Start Time of Cognitive Rehabilitation After Ischemic Stroke on the Level of Recovery / S.V. Kotov, A.V. Kiselev, E.V. Isakova, et al. // *Neuroscience and Behavioral Physiology*. – 2024. – Vol. 54, № 1. – P. 46-51.
175. Kourosh-Arami, M. Heterosynaptic plasticity-induced modulation of synapses / M. Kourosh-Arami, A. Komaki, M. Gholami, et al. // *Journal of Physiological Sciences*. – 2023. – Vol. 73, № 1. – P. 33.
176. Krintel, C. Structural analysis of the positive AMPA receptor modulators CX516 and Me-CX516 in complex with the GluA2 ligand-binding domain / C. Krintel, K. Harpsøe, L.G. Zachariassen, et al. // *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*. – 2013. – Vol. 69, № 9. – P. 1645-1652.
177. Kumar, J. Innovative Approaches and Therapies to Enhance Neuroplasticity and Promote Recovery in Patients with Neurological Disorders: A Narrative Review / J. Kumar, T. Patel, F. Sugandh, et al. // *Cureus*. – 2023. – Vol. 15(7). – P. e41914.
178. Köhler, G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity / G. Köhler, C. Milstein // *Nature*. – 1975. – Vol. 256(5517). – P. 495-7.
179. Lambert, D.G. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential / D.G. Lambert // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2008. – Vol. 7, № 8. – P. 694-710.
180. Lamprecht, R. cAMP response element-binding protein in the amygdala is required for long- but not short-term conditioned taste aversion memory / R. Lamprecht, S. Hazvi, Y. Dudai // *Journal of Neuroscience*. – 1997. – Vol. 17, № 21. – P. 8443–8450.
181. Lauterborn, J.C. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons / J.C. Lauterborn, G. Lynch, P. Vanderklish // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30, № 25. – P. 8688–8697.
182. Lauterborn, J.C. Positive modulation of AMPA receptors increases neurotrophin expression by hippocampal and cortical neurons / J.C. Lauterborn, G. Lynch, P. Vanderklish, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2000. – Vol. 20, № 1. – P. 8–21.
183. Lebrun, C. Effects of S 18986-1, a novel cognitive enhancer, on memory performances in an object recognition task in rats / C. Lebrun, E. Pillière, P. Lestage // *European Journal of Pharmacology*. – 2000. – Vol. 401, № 2. – P. 205-212.
184. Ledonne, A. Current Concepts on the Physiopathological Relevance of Dopaminergic Receptors / A. Ledonne, N.B. Mercuri // *Front Cell Neurosci*. – 2017. – Vol. 11. – P. 27.
185. Lee, H.K. NMDA induces long-term synaptic depression and dephosphorylation of the GluR1 subunit of AMPA receptors in hippocampus / H.K. Lee, K. Kameyama, R.L. Huganir, et al. // *Neuron*. – 1998. – Vol. 21, № 5. – P. 1151-1162.

186. Legutko, B. Regulation of BDNF expression in primary neuron culture by LY392098, a novel AMPA receptor potentiator / B. Legutko, X. Li, P. Skolnick // *Neuropharmacology*. – 2001. – Vol. 40, № 8. – P. 1019–1027.
187. Leker, R.R. Fate and manipulations of endogenous neural stem cells following brain ischemia / R.R. Leker // *Expert Opinion on Biological Therapy*. – 2009. – Vol. 9(9). – P. 1117–25.
188. Leker, R.R. Growth factors improve neurogenesis and outcome after focal cerebral ischemia / R.R. Leker, V. Lasri, D. Chernoguz // *Journal of Neural Transmission*. – 2009. – Vol. 116(11). – P. 1397–402.
189. Lemmens, R. The dark side of neural stem cell therapy in stroke: a meta-analysis of preclinical studies / R. Lemmens, G.K. Steinberg, K.S. Christopherson // *Stroke*. – 2021. – Vol. 52, № 2. – P. 665–673.
190. Levine, D.A. Ineffective neuronal reconnection following traumatic brain injury despite apparent structural plasticity: a longitudinal diffusion tensor imaging study / D.A. Levine, J.T. Becker, K.M. Hayden, et al. // *Brain Injury*. – 2018. – Vol. 32, № 10. – P. 1238–1252.
191. Livingston-Thomas, J.M. Failed synaptic remodeling following stroke: targeting the disconnect between structural and functional neuroplasticity / J.M. Livingston-Thomas, R.A. Tasker, S. Eldabe, et al. // *Brain Research Bulletin*. – 2019. – Vol. 152. – P. 285–292.
192. Lynch G. Glutamate-based therapeutic approaches: ampakines / G. Lynch // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2006. – Vol. 6, № 1. – P. 82-88.
193. Lynch, G. Ampakines and the threefold path to cognitive enhancement / G. Lynch, C.M. Gall // *Trends in Neurosciences*. – 2006. – Vol. 29, № 10. – P. 554–562.
194. Lynch, G. Evidence that a positive modulator of AMPA-type glutamate receptors improves delayed recall in aged humans / G. Lynch, R. Granger, J. Ambros-Ingerson, et al. // *Experimental Neurology*. – 1997. – Vol. 145, № 1. – P. 89-92.
195. Machado-Vieira, R. Targeting glutamatergic signaling for the development of novel therapeutics for mood disorders / R. Machado-Vieira, G. Salvadore, L.A. Ibrahim, et al. // *Current Pharmaceutical Design*. – 2009. – Vol. 15, № 14. – P. 1595-1611.
196. Mackowiak, M. An AMPA receptor potentiator modulates hippocampal expression of BDNF: an in vivo study / M. Mackowiak, M.J. O'Neill, C.A. Hicks, et al. // *Neuropharmacology*. – 2002. – Vol. 43, № 1. – P. 1–10.
197. Mallimo, E.M. The role of orphanin FQ/nociceptin in neuroplasticity: relationship to stress, anxiety and neuroinflammation / E.M. Mallimo, A.W. Kusnecov // *Frontiers in Cellular Neuroscience*. – 2013. – Vol. 7. – P. 173.

198. Mansour, M. Heteromeric AMPA receptors assemble with a preferred subunit stoichiometry and spatial arrangement / M. Mansour, N. Nagarajan, R.B. Nehring, et al. // *Neuron*. – 2001. – Vol. 32, № 5. – P. 841-853.
199. Martinez-Yamout, M.A. Glutamine-rich regions of the disordered CREB transactivation domain mediate dynamic intra- and intermolecular interactions / M.A. Martinez-Yamout, I. Nasir, S. Shnitkind, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2023. – Vol. 120, № 47. – P. e2313835120.
200. Matthews, J. Synthesis and modulatory activity of 3-acetyl-7-(benzofuran-5-carbonyl)-1,5-dimethyl-3,7-diazabicyclo [3.3.1] nonan-9-one on ampa receptors / J. Matthews, P.N. Veremeeva, E.A. Golubeva, et al. // *Chemistry of Heterocyclic Compounds*. – 2024. – Vol. 60, № 9-10. – P. 563-566.
201. Melgar-Locatelli, S. Nutrition and adult neurogenesis in the hippocampus: Does what you eat help you remember? / S. Melgar-Locatelli, M. de Ceglia, M.C. Mañas-Padilla [и др.] // *Frontiers in Neuroscience*. – 2023. – Vol. 17. – P. 1147269.
202. Mellor, I.R. The AMPA receptor as a therapeutic target: current perspectives and emerging possibilities / I.R. Mellor // *Future Medicinal Chemistry*. – 2010. – Vol. 2. – P. 877–891.
203. Miu, P. Novel AMPA receptor potentiators LY392098 and LY404187: effects on recombinant human AMPA receptors in vitro / P. Miu, K.R. Jarvie, V. Radhakrishnan, et al. // *Neuropharmacology*. – 2001. – Vol. 40. – P. 976–983.
204. Montminy, M.R. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response element of the somatostatin gene / M.R. Montminy, L.M. Bilezikjian // *Nature*. – 1987. – Vol. 328, № 6126. – P. 175-178.
205. Mony, L. Allosteric modulators of NR2B-containing NMDA receptors: molecular mechanisms and therapeutic potential / L. Mony, J.N. Kew, M.J. Gunthorpe, et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2009. – Vol. 157, № 8. – P. 1301-1317.
206. Moon, H.Y. Physical Activity and Brain Plasticity / H.Y. Moon, H.V. Praag // *Journal of Exercise Nutrition & Biochemistry*. – 2019. – Vol. 23, № 4. – P. 23-25.
207. Moreno-Jiménez, E.P. Adult hippocampal neurogenesis is abundant in neurologically healthy subjects and drops sharply in patients with Alzheimer's disease / E.P. Moreno-Jiménez, M. Flor-García, J. Terreros-Roncal [и др.] // *Nature Medicine*. – 2019. – Vol. 25, № 4. – P. 554-560.
208. Morris, R.G.M. Memory storage in a distributed model of hippocampal formation / R.G.M. Morris, B.L. McNaughton // *Trends in Neurosciences*. – 1987. – Vol. 10. – P. 408.
209. Morris, R.G. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5 / R.G. Morris, E. Anderson, G.S. Lynch, et al. // *Nature*. – 1986. – Vol. 319. – P. 774.

210. Morrow, J.A. Recent advances in positive allosteric modulators of the AMPA receptor / J.A. Morrow, J.K.F. MacLean, C. Jamieson // *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. – 2006. – Vol. 9. – P. 571–579.
211. Mortelmans, K. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay / K. Mortelmans, E. Zeiger // *Mutation Research*. – 2000. – Vol. 455, № 1-2. – P. 29-60.
212. Mostany, R. Limited axonal sprouting accompanies aging despite extensive dendritic remodeling and neuroprotective treatments / R. Mostany, T.G. Chowdhury, D.G. Johnston, et al. // *Nature Communications*. – 2020. – Vol. 11, № 1. – P. 4695–4710.
213. Motin, V.G. N-(5-hydroxynicotinoyl)-L-glutamic acid calcium salt modifies responses of rat hippocampal CA1 pyramidal neurons during orthodromic stimulation / V.G. Motin, A.V. Kiselev, I.S. Stovbun, et al. // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. – 2018. – Vol. 165, № 1. – P. 27-30.
214. MRC European Carotid Surgery Trial: interim results for symptomatic patients with severe (70-99%) or with mild (0-29%) carotid stenosis. European Carotid Surgery Trialists' Collaborative Group // *Lancet*. – 1991. – Vol. 337, № 8752. – P. 1235-1243.
215. Muglia, J.J. Phase 1 clinical trials / J.J. Muglia, J.J. DiGiovanna // *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery*. – 1998. – Vol. 2, № 4. – P. 236-241.
216. Murray, T.K. LY503430, a novel alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid receptor potentiator with functional, neuroprotective and neurotrophic effects in rodent models of Parkinson's disease / T.K. Murray, K. Whalley, C.S. Robinson, et al. // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 2003. – Vol. 306, № 2. – P. 752-762.
217. Nations, K.R. Bursi, R., Dogterom P., Ereshefsky L., Gertsik L., Mant T., & Schipper J. Maximum tolerated dose evaluation of the AMPA modulator Org 26576 in healthy volunteers and depressed patients: a summary and method analysis of bridging research in support of phase II dose selection / K.R. Nations // *Drugs in R&D*. – 2012. – Vol. 12, № 3. – P. 127-139.
218. Nations, K.R. Examination of Org 26576, an AMPA receptor positive allosteric modulator, in patients diagnosed with major depressive disorder: an exploratory, randomized, double-blind, placebo-controlled trial / K.R. Nations, P. Dogterom, R. Bursi, et al. // *Journal of Psychopharmacology*. – 2012. – Vol. 26, № 12. – P. 1525-1539.
219. Nestler, E.J. *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* / E.J. Nestler, S.E. Hyman, R.C. Malenka. – 2-е изд. – McGraw Hill Professional, 2008. – 650 с. – ISBN 007164119X, 9780071641197.
220. Neuman, D.A. Immunotoxicity testing and risk assessment: Summary of 1994 Workshop Immunology Technical Committee / D.A. Neuman // *Food and Chemical Toxicology*. – 1995. – Vol. 33, № 10. – P. 887-894.

221. Neuroinflammation, Resolution, and Neuroprotection in the Brain / A.A. Farooqui. – Academic Press, 2021. – 332 с. – ISBN 032388461X, 9780323884617. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1016/C2020-0-03383-9>
222. Nomura, S. A new behavioral test for antidepressant drugs / S. Nomura, J. Shimizu, M. Kinjo, et al. // *European Journal of Pharmacology*. – 1982. – Vol. 83, № 3-4. – P. 171-175.
223. Oertel, B.G. Selective antagonism of opioid-induced ventilatory depression by an ampakine molecule in humans without loss of opioid analgesia / B.G. Oertel, L. Felden, P.V. Tran, et al. // *Clinical Pharmacology & Therapeutics*. – 2010. – Vol. 87, № 2. – P. 204-211.
224. Olanow, C.W. Continuous dopamine-receptor treatment of Parkinson's disease: scientific rationale and clinical implications / C.W. Olanow, J.A. Obeso, F. Stocchi // *The Lancet Neurology*. – 2006. – Vol. 5, № 8. – P. 677-687.
225. Olivares-Hernández, J.D. Growth Hormone (GH) Enhances Endogenous Mechanisms of Neuroprotection and Neuroplasticity after Oxygen and Glucose Deprivation Injury (OGD) and Reoxygenation (OGD/R) in Chicken Hippocampal Cell Cultures / J.D. Olivares-Hernández, J.E. Balderas-Márquez, M. Carranza, et al. // *Neural Plasticity*. – 2021. – Vol. 2021. – P. 9990166.
226. Olivero, G. Presynaptic Release-regulating Metabotropic Glutamate Receptors: An Update / G. Olivero, M. Vergassola, F. Cisani, et al. // *Current Neuropharmacology*. – 2020. – Vol. 18, № 7. – P. 655-672.
227. O'Neill, M.J. AMPA receptor potentiators as cognitive enhancers / M.J. O'Neill, S. Dix // *IDrugs*. – 2007. – Vol. 10, № 3. – P. 185–192.
228. O'Neill, M.J. AMPA receptor potentiators for the treatment of CNS disorders / M.J. O'Neill, D. Bleakman, D.M. Zimmerman, et al. // *Current Drug Targets - CNS & Neurological Disorders*. – 2004. – Vol. 3, № 3. – P. 181–194.
229. Papouin T. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists / Papouin T., Ladépêche L., Ruel J., et al. // *Cell*. – 2012. – Vol. 150, № 3. – P. 633–646.
230. Partin, K.M. AMPA receptor potentiators: from drug design to cognitive enhancement / K.M. Partin // *Current Opinion in Pharmacology*. – 2015. – Vol. 20. – P. 46–53.
231. Peng, X. Innovations in electrical stimulation harness neural plasticity to restore motor function / X. Peng, J.L. Hickman, S.G. Bowles, et al. // *Bioelectron Med (Lond)*. – 2018. – Vol. 1(4). – P. 251-263.
232. Pettinger, W.A. Side effects of vasodilator therapy / W.A. Pettinger, H.C. Mitchell. – DOI 10.1161/01.hyp.11.3_pt_2. ii34 // *Hypertension*. – 1988. – Vol. 11, № 3, Pt. 2. – P. II34-36.
233. Pilters, R. The popliteal lymph node assay: a tool for predicting drug allergies / R. Pilters // *Toxicology*. – 2001. – Vol. 158, № 1-2. – P. 65-69.

234. Pirotte, B. AMPA receptor positive allosteric modulators: a patent review / B. Pirotte, P. Francotte, E. Goffin, et al. // *Expert Opinion on Therapeutic Patents*. – 2013. – Vol. 23. – P. 615–628.
235. Porrino, L.J. Facilitation of task performance and removal of the effects of sleep deprivation by an ampakine (CX717) in nonhuman primates / L.J. Porrino, J.B. Daunais, G.A. Rogers, et al. // *PLoS Biology*. – 2005. – Vol. 3, № 9. – P. e299.
236. Principles and methods for assessing direct immunotoxicity associated with exposure to chemicals // *Environmental Health Criteria*. – Geneva: WHO, 1996. – Vol. 180. – 390 p.
237. Puderbaugh, M. Neuroplasticity / M. Puderbaugh, P.D. Emmady // *StatPearls* [Internet]. – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2025. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557811/>
238. Pérez-Mato, M. New Perspectives in Neuroprotection for Ischemic Stroke / M. Pérez-Mato, E. López-Arias, A. Bugallo-Casal, et al. // *Neuroscience*. – 2024. – Vol. 550. – P. 30-42.
239. Pöpplau, J.A. Reorganization of adolescent prefrontal cortex circuitry is required for mouse cognitive maturation / J.A. Pöpplau, T. Schwarze, M. Dorofeikova, et al. // *Neuron*. – 2024. – Vol. 112(3). – P. 421-440.e7.
240. Qneibi, M. Affecting AMPA Receptor Biophysical Gating Properties with Negative Allosteric Modulators / M. Hawash, N. Jaradat, S. Bdir // *Molecular Neurobiology*. – 2022. – Vol. 59, № 9. – P. 5264-5275.
241. Quirk, J.C. Ly404187: A novel positive allosteric modulator of AMPA receptors / J.C. Quirk, E.S. Nisenbaum // *CNS Drug Reviews*. – 2002. – Vol. 8, № 3. – P. 255-282.
242. Radin, D.P. Preclinical Pharmacology of CX1837, a High-Impact Ampakine with an Improved Safety Margin: Implications for Treating Alzheimer’s Disease and Ischemic Stroke / D.P. Radin, S. Zhong, R. Cerne, et al. // *Current Alzheimer Research*. – 2024. – Vol. 21, № 10. – P. 745-754.
243. Rajgor, D. The Coordination of Local Translation, Membranous Organelle Trafficking, and Synaptic Plasticity in Neurons / D. Rajgor, T.M. Welle, K.R. Smith // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2021. – Vol. 9. – Статъя 711446. – Режим доступа: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.711446>
244. Redondo, R.L. Synaptic tagging and capture: differential role of distinct calcium/calmodulin kinases in protein synthesis-dependent long-term potentiation / R.L. Redondo, H. Okuno, P.A. Spooner, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 2010. – Vol. 30, № 14. – P. 4981-4989.
245. Reuillon, T. 7.11 - Modulating AMPA Receptors for the Treatment of CNS Disorders / T. Reuillon, S.E. Ward, P. Beswick // *Comprehensive Medicinal Chemistry III* / S. Chackalamannil, D. Rotella, S.E. Ward. – Oxford: Elsevier, 2017. – P. 447–480.

246. Rivers-Auty, J. Anti-inflammatories in Alzheimer's disease-potential therapy or spurious correlate? / J. Rivers-Auty, A.E. Mather, R. Peters, et al. // *Brain Communications*. – 2020. – Vol. 2, № 2. – P. fcaa109.
247. Rosenberg, T. The paradoxical association between protein synthesis and functional recovery following neuroprotective interventions in neurodegenerative models / T. Rosenberg, S. Gal-Ben-Ari, D.C. Dieterich, et al. // *Molecular Neurodegeneration*. – 2020. – Vol. 15, № 4. – P. 1–19.
248. Rossetti, C. New Insights into the Pivotal Role of CREB-Regulated Transcription Coactivator 1 in Depression and Comorbid Obesity / C. Rossetti, A. Cherix, L.F. Guiraud, et al. // *Frontiers in Molecular Neuroscience*. – 2022. – Vol. 15. – P. 810641.
249. Rubenstein, J. Cellular Migration and Formation of Axons and Dendrites: Comprehensive Developmental Neuroscience / J. Rubenstein, P. Rakic, B. Chen, K.Y. Kwan, A. Kolodkin, E. Anton. – Elsevier, 2020. – 609 c.
250. San-Juan, D. Transcranial Direct Current Stimulation in Epilepsy / D. San-Juan, L. Morales-Quezada, A.J. Orozco Garduño, et al. // *Brain Stimul*. – 2015. – Vol. 8(3). – P. 455-64.
251. Sandset, E.C. The angiotensin-receptor blocker candesartan for treatment of acute stroke (SCAST): a randomised, placebo-controlled, double-blind trial / E.C. Sandset, P.M. Bath, G. Boysen, et al. // *Lancet*. – 2011. – Vol. 377, № 9767. – P. 741-750.
252. Schmitt, A. A splice variant of glutamate transporter GLT1/EAAT2 expressed in neurons: cloning and localization in rat nervous system / A. Schmitt, E. Asan, K.P. Lesch, et al. // *Neuroscience*. – 2002. – Vol. 109, № 1. – P. 45–61.
253. Sekiguchi, M. A desensitization-selective potentiator of AMPA-type glutamate receptors / M. Sekiguchi, K. Nishikawa, S. Aoki, et al. // *British Journal of Pharmacology*. – 2002. – Vol. 136, № 7. – P. 1033-1041.
254. Shrestha, P. Spatiotemporally resolved protein synthesis as a molecular framework for memory consolidation / P. Shrestha, E. Klann // *Trends in Neurosciences*. – 2022. – Vol. 45, № 4. – P. 297–311.
255. Simmons, D.A. Brief ampakine treatments slow the progression of Huntington's disease phenotypes in R6/2 mice / D.A. Simmons, R.A. Mehta, J.C. Lauterborn, et al. // *Neurobiology of Disease*. – 2011. – Vol. 41, № 2. – P. 436-444.
256. Sirbu, C.A. A new era for monoclonal antibodies with applications in neurology (Review) / C.A. Sirbu, M.C. Ghinescu, A.D. Axelerad, et al. // *Exp Ther Med*. – 2021. – Vol. 21(1). – P. 86.
257. Skaria, A.P. The economic and societal burden of Alzheimer disease: managed care considerations / A.P. Skaria // *American Journal of Managed Care*. – 2022. – Vol. 28, № 10 Suppl. – P. S188-S196.

258. Smith, J.A. Failed neuroprotection in chronic cerebral ischemia model: Transcranial direct current stimulation shows no benefit on functional outcomes / J.A. Smith, K.L. Green, R.B. Thomas, et al. // *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. – 2019. – Vol. 39, № 5. – P. 876–889.
259. Speranza, L. di Porzio U., Viggiano D., de Donato A., Volpicelli F. Dopamine: The Neuromodulator of Long-Term Synaptic Plasticity, Reward and Movement Control / L. Speranza // *Cells*. – 2021. – Vol. 10(4). – P. 735.
260. Squire, L.R. Conscious and unconscious memory systems / L.R. Squire, A.J. Dede // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2015. – Vol. 7, № 3. – P. a021667.
261. Squire, L.R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans / L.R. Squire // *Psychological Review*. – 1992. – Vol. 99, № 2. – P. 195-231.
262. Stephenson, D.T. Neuropharmacology and neurochemistry of LY451646, a novel allosteric potentiator of AMPA receptor function and a potential treatment for neuropsychiatric disorders / D.T. Stephenson, S.P. Arneric, A. Ghavami, et al. // *Neuropharmacology*. – 2012. – Vol. 62, № 2. – P. 1082-1095.
263. Sung, C.M. The effect of cognitive training on domains of attention in older adults with mild cognitive impairment and mild dementia: A meta-analysis of randomised controlled trials / C.M. Sung, H.J. Jen, D. Liu, et al. // *Journal of Global Health*. – 2023. – Vol. 13. – P. 04078.
264. Supplisson, S. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus oocytes* / S. Supplisson, C. Bergman // *Journal of Neuroscience*. – 1997. – Vol. 17, № 12. – P. 4580–4590.
265. Surget, A. Adult hippocampal neurogenesis shapes adaptation and improves stress response: a mechanistic and integrative perspective / A. Surget, C. Belzung // *Molecular Psychiatry*. – 2022. – Vol. 27, № 1. – P. 403-421.
266. Suzuki, H. Cognitive intervention through a training program for picture book reading in community-dwelling older adults: a randomized controlled trial / H. Suzuki, M. Kuraoka, M. Yasunaga, et al. // *BMC Geriatrics*. – 2014. – Vol. 14. – P. 122.
267. Sánchez-Rodríguez, I. Hippocampal long-term synaptic depression and memory deficits induced in early amyloidopathy are prevented by enhancing G-protein-gated inwardly rectifying potassium channel activity / I. Sánchez-Rodríguez, S. Djebbari, S. Temprano-Carazo, et al. // *Journal of Neurochemistry*. – 2020. – Vol. 153, № 3. – P. 362-376.
268. Südhof, T.C. Towards an Understanding of Synapse Formation / T.C. Südhof // *Neuron*. – 2018. – Vol. 100, № 2. – P. 276-293.
269. Thall, P.F. A review of phase 2-3 clinical trial designs / P.F. Thall // *Lifetime Data Analysis*. – 2008. – Vol. 14, № 1. – P. 37-53.

270. Thiels, E. Transient and persistent increases in protein phosphatase activity during long-term depression in the adult hippocampus in vivo / E. Thiels, E.D. Norman, G. Barrionuevo, et al. // *Neuroscience*. – 1998. – Vol. 86, № 4. – P. 1023–1029.
271. Timm, D.E. Structural and functional analysis of two new positive allosteric modulators of GluA2 desensitization and deactivation / D.E. Timm, M. Benveniste, A.M. Weeks, et al. // *Molecular Pharmacology*. – 2011. – Vol. 80, № 2. – P. 267-280.
272. Tobin, M.K. Human Hippocampal Neurogenesis Persists in Aged Adults and Alzheimer's Disease Patients / M.K. Tobin, K. Musaraca, A. Disouky [и др.] // *Cell Stem Cell*. – 2019. – Vol. 24, № 6. – P. 974-982.e3.
273. Torres-Saavedra, P.A. An Overview of Phase 2 Clinical Trial Designs / P.A. Torres-Saavedra, K.A. Winter // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. – 2022. – Vol. 112, № 1. – P. 22-29.
274. Tournier, A.L. Scientific guidelines for preclinical research on potentised preparations manufactured according to current pharmacopoeias-the PrePoP guidelines / A.L. Tournier, L.V. Bonamin, S. Buchheim-Schmidt, et al. // *Journal of Integrative Medicine*. – 2024. – Vol. 22, № 5. – P. 533-544.
275. Tricco, A.C. Efficacy and safety of cognitive enhancers for patients with mild cognitive impairment: a systematic review and meta-analysis / A.C. Tricco, C. Soobiah, S. Berliner, et al. // *Canadian Medical Association Journal*. – 2013. – Vol. 185, № 16. – P. 1393-1401.
276. Trueman, R.C. Repair of the CNS using endogenous and transplanted neural stem cells / R.C. Trueman, A. Klein, H.S. Lindgren, et al. // *Curr Top Behav Neurosci*. – 2013. – Vol. 15. – P. 357-98.
277. Trzepacz, P.T. Mibampator (LY451395) randomized clinical trial for agitation/aggression in Alzheimer's disease / P.T. Trzepacz, J. Cummings, T. Konechnik, et al. // *International Psychogeriatrics*. – 2013. – Vol. 25, № 5. – P. 707-719.
278. Tulving, E. Priming and human memory systems / E. Tulving, D.L. Schacter // *Science*. – 1990. – Vol. 247, № 4940. – P. 301-306.
279. Ubaldi, M. Role of Nociceptin/Orphanin FQ-NOP Receptor System in the Regulation of Stress-Related Disorders / M. Ubaldi, N. Cannella, A.M. Borruto, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22, № 23. – P. 12956.
280. Valis, M. The effects of donepezil treatment in Alzheimer's disease: a systematic review of the evidence from randomized controlled trials / M. Valis, D. Herman, N. Vanova, et al. // *Neuropsychiatric Disease and Treatment*. – 2019. – Vol. 15. – P. 543-554.

281. van der Schaar, P.J. Intranasal galantamine nanoparticles showing the potential for nose-to-brain delivery as a therapeutic strategy for Alzheimer's disease / P.J. van der Schaar, J. Hoekman, H.S. Broekhuizen-de Gast, et al. // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 262. – P. 31-37.
282. Vialko, A. Positive AMPA and Kainate Receptor Modulators and Their Therapeutic Potential in CNS Diseases: A Comprehensive Review / A. Vialko, P. Chałupnik, E. Szymańska // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2025. – Vol. 26, № 13. – P. 6450.
283. Vijay, U. Microbial Mutagenicity Assay: Ames Test / U. Vijay, S. Gupta, P. Mathur, et al. // *Bio-protocol*. – 2018. – Vol. 8, № 6. – P. e2763.
284. Viosca, J. Enhanced CREB-dependent gene expression increases the excitability of neurons in the basal amygdala and primes the consolidation of contextual and cued fear memory / J. Viosca, M. Lopez de Armentia, D. Jancic, et al. // *Learning & Memory*. – 2009. – Vol. 16, № 3. – P. 193–197.
285. Vivar, C. All about running: synaptic plasticity, growth factors and adult hippocampal neurogenesis / C. Vivar, M.C. Potter, H. van Praag // *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. – 2013. – Vol. 15. – P. 189-210.
286. Wahl, A.S. Asynchronous therapy restores motor control by rewiring of the rat corticospinal tract after stroke / A.S. Wahl, W. Omlor, J.C. Rubio, et al. // *Science Translational Medicine*. – 2021. – Vol. 13, № 604. – P. eabb4639.
287. Wallace, T.L. Targeting the nicotinic alpha7 acetylcholine receptor to enhance cognition in disease / T.L. Wallace, R.H. Porter // *Biochemical Pharmacology*. – 2011. – Vol. 82, № 8. – P. 891-903.
288. Wang, J. Effects of candesartan in acute stroke patients: pooled analysis of SCAST and SCANDINAVIA / J. Wang, W. Pei, D. Guo, et al. // *Journal of the American Society of Hypertension*. – 2018. – Vol. 12, № 3. – P. 215-222.
289. Wang, S. Efficacy and safety assessment of acupuncture and nimodipine to treat mild cognitive impairment after cerebral infarction: a randomized controlled trial / S. Wang, H. Yang, J. Zhang, et al. // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 361.
290. Wang, S. Targeting NMDA Receptors in Emotional Disorders: Their Role in Neuroprotection / S. Wang, L. Bian, Y. Yin, et al. // *Brain Sciences*. – 2022. – Vol. 12, № 10. – P. 1329.
291. Wang, Y. Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death / Y. Wang, Z.H. Qin // *Apoptosis*. – 2010. – Vol. 15, № 11. – P. 1382–1402.
292. Ward, S.E. Integration of lead optimization with crystallography for a membrane-bound ion channel target: Discovery of a new class of AMPA receptor positive allosteric modulators / S.E. Ward, M. Harries, L. Aldegheri, et al. // *Journal of Medicinal Chemistry*. – 2010. – Режим доступа: <https://doi.org/10.1021/jm100679e>

293. Wenthold, R.J. Evidence for multiple AMPA receptor complexes in hippocampal CA1/CA2 neurons / R.J. Wenthold, R.S. Petralia, J. Blahos II, et al. // *Journal of Neuroscience*. – 1996. – Vol. 16, № 6. – P. 1982-1989.
294. Whitlock, J.R. Learning induces long-term potentiation in the hippocampus / J.R. Whitlock, A.J. Heynen, M.G. Shuler, et al. // *Science*. – 2006. – Vol. 313. – P. 1093–1097.
295. Wilms, H. Neuroprotection with angiotensin receptor antagonists: a review of the evidence and potential mechanisms / H. Wilms, P. Rosenstiel, T. Unger, et al. // *American Journal of Cardiovascular Drugs*. – 2005. – Vol. 5, № 4. – P. 245-253.
296. Wilson, R.H. Negative outcomes of repetitive transcranial magnetic stimulation in a randomized controlled trial of post-stroke recovery: lack of neuroprotective effects despite neuroplasticity modulation / R.H. Wilson, M.D. Patel, P.F. Morgan, et al. // *Brain Stimulation*. – 2020. – Vol. 13, № 4. – P. 1112–1124.
297. Winiarska-Mieczan A., Anti-Inflammatory, Antioxidant, and Neuroprotective Effects of Polyphenols-Polyphenols as an Element of Diet Therapy in Depressive Disorders / M. Kwiecień, K. Jachimowicz-Rogowska, et al. // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24, № 3. – P. 2258.
298. Witkin, J.M. The biology of Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) related to obesity, stress, anxiety, mood, and drug dependence / J.M. Witkin, M.A. Statnick, L.M. Rorick-Kehn, et al. // *Pharmacology & Therapeutics*. – 2014. – Vol. 141, № 3. – P. 283-299.
299. Wong, W. Economic burden of Alzheimer disease and managed care considerations / W. Wong // *American Journal of Managed Care*. – 2020. – Vol. 26, № 8 Suppl. – P. S177-S183.
300. Wyllie, D.J. A rise in postsynaptic Ca²⁺ potentiates miniature excitatory postsynaptic currents and AMPA responses in hippocampal neurons / D.J. Wyllie, T. Manabe, R.A. Nicoll // *Neuron*. – 1994. – Vol. 12, № 1. – P. 127–138.
301. Xu, Y. Tyrosinase mRNA is expressed in human substantia nigra / Y. Xu, A.H. Stokes, W.M. Freeman, et al. // *Molecular Brain Research*. – 1997. – Vol. 45, № 1. – P. 159-162. – DOI: 10.1016/S0169-328X(96)00308-7.
302. Yagensky, O. Multipronged functional proteomics approaches reveal novel molecular mechanisms of neuronal death triggered by oxidative stress / O. Yagensky, M. Kohansal-Nodehi, S. Gunaseelan [и др.] // *Nature Communications*. – 2023. – Vol. 14. – P. 3077.
303. Yamada, K.A. Benzothiadiazides inhibit rapid glutamate receptor desensitization and enhance glutamatergic synaptic currents / K.A. Yamada, C.M. Tang // *Journal of Neuroscience*. – 1993. – Vol. 13, № 9. – P. 3904-3915.

304. Yamada, K.A. The diazoxide derivative IDRA-21 enhances ischemic hippocampal neuron injury / K.A. Yamada, D.F. Covey, C.Y. Hsu, et al. // *Annals of Neurology*. – 1998. – Vol. 43, № 5. – P. 664-669.
305. Yang, W. Current and projected future economic burden of Parkinson's disease in the U.S. / J.L. Hamilton, C. Kopil, et al. // *NPJ Parkinsons Disease*. – 2020. – Vol. 6. – P. 15.
306. Yu, J. Mindfulness intervention for mild cognitive impairment led to attention-related improvements and neuroplastic changes: Results from a 9-month randomized control trial / J. Yu, I. Rawtaer, L. Feng, et al. // *Journal of Psychiatric Research*. – 2021. – Vol. 135. – P. 203–211.
307. Yu, S.P. Extrasynaptic NMDA receptors in acute and chronic excitotoxicity: implications for preventive treatments of ischemic stroke and late-onset Alzheimer's disease / S.P. Yu, M.Q. Jiang, S.S. Shim, et al. // *Molecular Neurodegeneration*. – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 43.
308. Zarate, C.A. Jr. Regulation of cellular plasticity cascades in the pathophysiology and treatment of mood disorders: role of the glutamatergic system / C.A. Jr. Zarate, J. Du, J. Quiroz, et al. // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2003. – Vol. 1003. – P. 273-291.
309. Zaveri, N.T. The nociceptin/orphanin FQ receptor (NOP) as a target for drug abuse medications / N.T. Zaveri // *Current Topics in Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 11, № 9. – P. 1151-1156.
310. Zhang, Q.G. Positive modulation of AMPA receptors prevents downregulation of GluR2 expression and activates the Lyn-ERK1/2-CREB signaling in rat brain ischemia / Q.G. Zhang, D. Han, S.Q. Hu, et al. // *Hippocampus*. – 2010. – Vol. 20. – P. 65–77.
311. Zhang, X. Neonatal exposure to ketamine disrupts developmental synapse unsilencing and predisposes adult mice for stressor-evoked anxiety / X. Zhang, Y. Kong, G. He, et al. // *Neuropharmacology*. – 2020. – Vol. 180. – P. 108300.
312. Zheng, Y. Effects of the putative cognitive-enhancing ampakine, CX717, on attention and object recognition memory / Y. Zheng, S. Balabhadrapatruni, C. Masumura, et al. // *Current Alzheimer Research*. – 2011. – Vol. 8, № 8. – P. 876-82.
313. Zhou, H. Social Support and Depression among Stroke Patients: A Topical Review / H. Zhou, E.R. Kulick // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2023. – Vol. 20, № 24. – P. 7157.
314. Zhou, Y. CREB regulates excitability and the allocation of memory to subsets of neurons in the amygdala / Y. Zhou, J. Won, M.G. Karlsson, et al. // *Nature Neuroscience*. – 2009. – Vol. 12, № 11. – P. 1438–1443.
315. Zhu, J.J. Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity / J.J. Zhu, J.A. Esteban, Y. Hayashi, et al. // *Nature Neuroscience*. – 2000. – Vol. 3, № 11. – P. 1098-1106.

316. Zivkovic, D. 7-chloro-3-methyl-3,4-dihydro-2H-1,2,4 benzothiadiazine s,s-dioxide (idra21): A benzothiadiazine derivative that enhances cognition by attenuating dl-amino-2,3-dihydro-5-methyl-3-oxo-4-isoxazolepropanoic acid (ampa) receptor desensitization / D. Zivkovic, D.M. Thompson, M. Bertolino, et al. // *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. – 1995. – Vol. 272. – P. 300-309.
317. Zmijewski, M. Application of biocatalysis to drug metabolism: Preparation of mammalian metabolites of a biaryl-bis-sulfonamide ampa (alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid) receptor potentiator using *actinoplanes missouriensis* / M. Zmijewski, T.A. Gillespie, D.A. Jackson, et al. // *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. – 2006. – Vol. 34, № 6. – P. 925-931.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А. Фармакокинетические и токсикологические исследования

Фармакокинетические исследования на животных

Фармакокинетические исследования проводили на белых крысах-самцах линии Вистар с массой тела около 200 г. гидроксиникотиноилглутамат кальция вводили натошак (животные не получали пищи в течение 8 ч до введения препарата) в/в в дозах 20, 100 и 500 мг/кг или в/м – в дозе 100 мг/кг. Растворы гидроксиникотиноилглутамат кальция в изотоническом растворе хлорида натрия готовили непосредственно перед введением препарата. Объем вводимого раствора рассчитывали, дозируя по массе животного.

Пробы крови отбирались в соответствии с заранее согласованным интервалом до, а также через 5, 15, 30 минут, 1, 2, 4 и 6 часов после инъекции (по 5 животных для каждой временной точки). Образцы периферических тканей (головной мозг, печень, почки) забирались аналогичным образом до введения препарата и через 15, 30 минут, 1, 2, 4 и 8 часов после его введения. Кровь извлекалась из подключичной артерии, помещалась в термостат при температуре 37°C на 20 минут, затем центрифугировалась при 3000 об/мин в течение 15 минут при 25°C. Полученная сыворотка крови распределялась по пробиркам. Органы извлекались у животных сразу после декапитации. Пробы сыворотки крови и тканей были сохранены в замороженном состоянии при температуре -20°C до анализа.

Кроме того, после в/в введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах 5, 20 и 100 мг/кг у крыс собирали суточную мочу, измеряли ее объем, после чего пробы также замораживали.

Фармакокинетические исследования проводили на белых крысах-самцах линии Вистар с массой тела около 200 г. гидроксиникотиноилглутамат кальция вводили натошак (животные не получали пищи в течение 8 ч до введения препарата) в/в в дозах 20, 100 и 500 мг/кг или в/м – в дозе 100 мг/кг. Растворы гидроксиникотиноилглутамат кальция в изотоническом растворе хлорида натрия готовили непосредственно перед введением препарата. Объем вводимого раствора дозировали по массе тела животного.

Пробы крови забирали до введения препарата и через 5, 15, 30 мин, 1, 2, 4 и 6 ч после введения (по 5 животных на каждую временную точку). Пробы периферических тканей (головной мозг, печень, почки) отбирали также до введения препарата и через 15, 30 мин, 1, 2, 4 и 8 ч после его введения. Кровь отбирали из подключичной артерии, выдерживали в термостате при температуре 37°C в течение 20 мин, а затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре. Полученную сыворотку крови разливали по пробиркам. Органы извлекали у животных сразу после декапитации. Пробы сыворотки крови и тканей были сохранены в замороженном состоянии при температуре -20°C до анализа.

Кроме того, после в/в введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах 5, 20 и 100 мг/кг у крыс собирали суточную мочу, измеряли ее объем, после чего пробы также замораживали.

Фармакокинетические исследования также проводили на кроликах-самцах породы Шиншилла с массой тела от 2 кг до 3 кг. Препарат вводили голодным животным, последний прием пищи за 8 ч до введения препарата в/в или в/м в дозе 50 мг/кг. Растворы гидроксиникотиноилглутамат кальция в изотоническом растворе хлорида натрия готовили непосредственно перед введением препарата. Объем вводимого кроликам раствора дозировали по массе тела животного. Забор крови объемом 2–2,5 мл отбирали непосредственно из краевой вены уха кролика. Забор крови начинался непосредственно перед введением препарата и через 5, 15, 30 мин, 1, 2, 4, 8 и 24 ч после введения. Последующую обработку проб осуществляли так же, как описано в предыдущем разделе.

Разделение компонентов плазмы крови кроликов проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) согласно методике, описанной в [42]. Температура эксперимента была комнатной. Была применена колонка Lichrosorb NH₂ с длиной 250 мм и диаметром 4 мм, с частицами размером 6 мкм. В качестве подвижной фазы применяли смесь этилового спирта, ацетонитрила и буфера с рН 2,2 в соотношении 6:2:2. Скорость подачи подвижной фазы составляла 1 мл/мин. Для регистрации результатов разделения применяли флуоресцентный детектор, настроенный на длину волны возбуждения 285 нм и длину волны испускания 405 нм.

В связи с тем, что сорбенты на основе силикагеля с привитой аминогруппой являются более лабильными по сравнению с сорбентами с другими привитыми фазами (например, C₈, C₁₈, фенил или др.), особенно при низком значении рН, были разработаны хроматографические условия определения гидроксиникотиноилглутамат кальция в биологических пробах с использованием колонки Luna C₁₈ (2) размером 250 × 4,6 мм, стабильной в диапазоне рН от 1,5 до 10,0.

Выбор подвижной фазы проводили исходя из структуры молекулы гидроксиникотиноилглутамат кальция, содержащей ароматический амин и две карбоксильные группы. Для полного отделения пика гидроксиникотиноилглутамат кальция от посторонних пиков биопроб были оптимизированы параметры подвижной фазы. Для увеличения содержания органической составляющей в подвижной фазе было решено проводить хроматографическое разделение в условиях ион-парной хроматографии с использованием основных (содержащих аминофункцию) ион-парных реагентов при нейтральном или слабощелочном значении рН.

Получение хроматограмм разделения гидроксиникотиноилглутамат кальция в одинаковых хроматографических условиях с помощью УФ-детектора (Waters 481, Waters, США)

при 292 нм (максимуме поглощения вещества, спектрофотометр Helios Gamma Thermo Scientific, Thermo, США)) и с помощью флуоримера (ABI 980, ABI, США), при $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм.

Для определения содержания гидроксиникотиноилглутамат кальция в биологических пробах животных были выбраны следующие условия и приборы:

жидкостной хроматограф (Gilson, Франция);

колонка: Luna C18(2) размером $4,6 \times 250$ мм, 5 мкм (Phenomenex, США);

подвижная фаза: раствор 5 мМ цетилтриметиламмония бромида и 17 мМ фосфата калия двузамещенного (рН 7,0) - ацетонитрил (1:1);

детектор: флуоример ABI 980 (ABI, США), длина волны возбуждения - 310 нм, длина волны испускания - 389 нм;

температура колонки: 35°C;

скорость подачи подвижной фазы: 1,2 мл/мин; объем наносимой пробы: 3 или 10 мкл.

Подготовка образцов сыворотки крови. Белки сыворотки крови осаждали равным или двукратным количеством ацетонитрила. Полученные растворы центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин (центрифуга Eppendorf MiniSpin, Eppendorf, США). Супернатант упаривали в вакууме (вакуумная центрифуга Savant SC-210A, Savant, США), после чего сухой остаток растворяли в подвижной фазе. Анализировали надосадочные растворы, полученные после непосредственного осаждения ацетонитрилом и после растворения, упаренного супернатанта. Было установлено, что для определения гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови животных достаточно осадить белки сыворотки равным объемом ацетонитрила.

Подготовка образцов тканей. Для анализа образец ткани массой 400 мг взвешивали на высокоточных весах Sartorius CPA225D американского производства. Далее навеску помещали в 5-миллилитровую пробирку, добавляли 1,6 мл раствора, состоящего из 0,5 мл хлороводородной кислоты на 1 литр этанола, и измельчали 1 минуту с на гомогенизаторе Heidolph Diax 100, на скорости 25000 оборотов в минуту. Полученную смесь подвергали центрифугированию при 10000 оборотов в минуту в течение 5 минут. Супернатант, то есть верхний слой жидкости, после центрифугирования вводили в хроматограф для дальнейшего анализа.

Подготовка образцов мочи. Определению гидроксиникотиноилглутамат кальция в моче мешало большое количество сопутствующих веществ. Были предприняты неудачные попытки удаления примесей экстракцией их в хлороформ или этилацетат при подщелачивании в присутствии ацетонитрила - в процессе подготовки проб терялась часть вещества. В результате проведенных исследований был выбран следующий способ подготовки проб мочи для анализа методом ВЭЖХ: определение свободного гидроксиникотиноилглутамат кальция в образцах мочи (не связанного с глюкуроновой кислотой): к 200 мкл мочи добавляли 200 мкл 100 мМ фосфатного буфера (рН 6,0), встряхивали, инкубировали при 37°C в течение 24 ч и упаривали

досуха на вакуумной центрифуге при 40°C. К сухому остатку добавили 700 микролитров этилового спирта. Затем смесь встряхнули на специальной ультразвуковой бане (Bronson 1510, Bronson, США) до тех пор, пока осадок полностью не растворился. После этого смесь отцентрифугировали со скоростью 10000 оборотов в минуту в течение 5 минут. Чтобы определить общее количество гидроксиникотиноилглутамат кальция в образцах мочи (свободного и связанного с веществом глюкуроновой кислотой), нужно выполнить следующие шаги:

К 200 микролитрам мочи добавили 200 микролитров 100 миллимолярного фосфатного буфера с уровнем кислотности 6,0. Затем добавили 50 микролитров β -глюкуронидазы из кишечной палочки *E. coli* K 12 (Roche, Германия). Смесь встряхнули и оставили на инкубацию при температуре 37°C на 24 часа. После этого смесь высушили до полного удаления жидкости с помощью вакуумной центрифуги при температуре 40°C. К сухому остатку прибавляли 700 мкл этилового спирта, встряхивали до полного суспендирования осадка, центрифугировали при 10000 об/мин в течение 5 мин.

Статистический анализ. Анализ результатов определения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови и тканях, а также параметров фармакокинетики предусматривал расчет среднеарифметических (МА) или среднегеометрических [$MG = \exp(MA, \ln)$] значений и их интервальной оценки, вычисляемой как $(MA \pm SD)$, где SD - стандартное отклонение, в случае среднеарифметического или [$\exp(MA, \ln \pm SD\ln)$] - в случае среднегеометрического. МА, \ln и $SD\ln$ – соответственно, среднеарифметическое и стандартное отклонение выборки после логарифмического преобразования ее вариант.

Индивидуальные профили изменения концентрации (С) гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови животных во времени (t), зарегистрированные после введения препарата кроликам, и усредненные профили (кролики и крысы), построенные по средним геометрическим значениям концентрации препарата в каждый момент времени после его в/в введения, описывали биэкспоненциальным уравнением двухчастевой модели:

$$C(t) = B1 \exp(-\alpha t) + B2 \exp(-\beta t), \quad (1)$$

где B1, B2, α и β - комплексные параметры [235].

Параметры уравнения 1 рассчитывали методом нелинейного регрессионного анализа (программа TOPFIT V. 1.1). Фармакокинетические профили характеризовали значениями параметров α и β , а также значениями констант скорости переноса препарата из основной камеры в периферическую (k_{12}) и в обратном направлении (k_{21}), а также константы скорости элиминации препарата из основной камеры (k_{el}). С использованием программы TOPFIT были

определены такие параметры, как площадь под кривой (AUC), общий клиренс (Cl), стационарный объем распределения (V_{ss}), среднее время удержания препарата в системном кровотоке (MRT) и период полувыведения (T_{1/2}). С целью выяснения характера всасывания гидроксиникотиноилглутамат кальция при в/м введении крысам и кроликам использовали процедуру деконволюции (метод Loo-Riegelman), позволяющую реконструировать кинетические кривые всасывания препарата в предположении о независимости системных фармакокинетических параметров от пути его введения [38]. Для этого кинетические кривые всасывания представляли в координатах «ln(1-At/A_∞) – время», где At и A_∞ - количество всосавшегося препарата в момент времени t и при t→∞, соответственно.

Индивидуальные фармакокинетические профили гидроксиникотиноилглутамат кальция в сыворотке крови, полученные после его в/м введения кроликам, характеризовали значениями максимальной концентрации препарата - C_{max}, площади под фармакокинетической кривой в пределах от нуля до момента отбора последней пробы, содержащей препарат в доступных для измерения количествах (AUC_t), - рассчитаны методом трапеций - и отношением C_{max}/AUC_t как мерой скорости всасывания. Индивидуальные профили, а также профиль, полученный по усредненным данным, описывали трехэкспоненциальным уравнением двучастевой модели, предусматривающей моноэкспоненциальное поступление препарата из места введения в системный кровоток:

$$C(t) = B_1 \exp(-\alpha t) + B_2 \exp(-\beta t) - B_3 \exp(-k_a t), \quad (2)$$

где k_a – константа скорости всасывания [284].

Параметры уравнения 2 рассчитывали также при помощи программы TOPFIT. Во всех случаях профили изменения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция во времени характеризовали значениями AUC, MRT и T_{1/2}.

Интенсивность проникновения гидроксиникотиноилглутамат кальция в периферические ткани характеризовали тканевой доступностью (f_T; применительно к тканям головного мозга – терапевтической доступностью), определяемой отношением значения AUC_t в ткани (AUC_t^T) к соответствующей величине AUC_t в сыворотке крови:

$$f_T (\%) = \times 100 / AUC_t. \quad (4)$$

Биодоступность гидроксиникотиноилглутамата кальция после внутримышечного введения (f) оценивалась путем сравнения значения AUC_t, полученного после введения препарата этим способом (AUC_t^{BM}), к соответствующему значению AUC_t, полученному после его в/в введения:

$$f = / AUC_t. \quad (5)$$

Для прогнозирования фармакокинетики гидроксиникотиноилглутамата кальция в сыворотке крови крыс при ежедневном внутривенном введении препарата в течение 5 дней использовали программу TOPFIT.

С целью межвидовой экстраполяции фармакокинетических данных использовали аллометрический подход Дедрика [285]. В соответствии с этим подходом фармакокинетические профили лекарственного средства, различающиеся у млекопитающих разных видов, могут быть сведены к одному, если для каждого вида используется не хронологическое, а «фармакокинетическое время» [68]. Для отображения фармакокинетических профилей в координатах Дедрика хронологические времена отбора проб крови животных пересчитывали в соответствующие фармакокинетические времена по уравнению:

$$t_{pk} = t/m^{0,25}, \quad (6)$$

где t_{pk} – «фармакокинетическое время», m – масса тела крысы или кролика, в кг.

Межвидовое прогнозирование периода полувыведения гидроксиникотиноилглутамат кальция у человека по данным, полученным на животных, проводили по уравнению:

$$T_{1/2, \text{ человек}} = T_{1/2, \text{ рк}} \times M^{0,25}, \quad (7)$$

где $T_{1/2, \text{ рк}}$ – период полувыведения, выраженный в фармакокинетическом времени (рассчитан по результатам анализа фармакокинетических данных в координатах Дедрика), а M – масса тела человека, кг.

Исследование токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция на при однократном внутрибрюшинном, внутримышечном и внутрижелудочном введении мышам линии BALB/c и крысам Wistar

Исследования проведены на 242 мышах линии BALB/c (обоюго пола, масса тела 18-20 г), и 145 крысах Wistar (обоюго пола, масса тела 200 +/- 15 г), которых получали из ГНЦ Биомедицинских технологий РАМН. Они были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Мышей содержали в клетках Т-3, крыс в клетках Т-4 по 8-10 особей, в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-20°C и относительной влажности 60-65%, на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные имели свободный доступ к корму и водопроводной питьевой воде. Для питья использовали поилки (500-мл стеклянные бутылки с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Животные получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1, изготавливаемый ООО «Лабораторснаб». При исследовании токсичности препарата при внутривенном и внутримышечном способах введения субстанцию препарата растворяли в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия и в виде 1-2% растворов в различных дозах

в диапазоне 120-2200 мг/кг вводили животным. При введении препарата в желудок готовили суспензию препарата на 1% крахмальном геле и исследовали токсичность в диапазоне 500-2500 мг/кг. Контрольные животные получали соответствующие количества физиологического раствора или 1 % крахмального геля. Длительность наблюдения за подопытными животными после введения препарата составляла 14 дней. Изучение параметров токсичности субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутривенном, внутримышечном или внутривентральном введении мышам и крысам проведено с использованием двухэтапного метода, который предусматривает определение ориентировочной ЛД₅₀ на ограниченном количестве животных методом Дейхмана и ЛеБланка, с последующим установлением точных показателей ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД_{50±m} и ЛД₈₄ на втором этапе исследований в развернутом эксперименте с использованием метода пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксону.

Исследование переносимости субстанции гидроксиникотиноилглутамат кальция при однократном внутривенном введении кроликам

Эксперименты были проведены на десяти кроликах вида Шиншилла (самцы, вес тела 2,6–3,0 кг). Каждому из них однократно вводили 1% раствор препарата в дозе 13,4 мг/кг через краевую вену уха. Раствор был приготовлен на основе стерильного 0,9% раствора хлорида натрия. Испытанная при этом доза препарата в 20 раз превышала высшую терапевтическую дозу для человека (50 мг/человека или 0,67 мг/кг). Раствор препарата в стерильном физиологическом растворе в указанной дозе в асептических условиях медленно вводили в краевую вену уха кроликов.

В виварии животных содержали отдельно в клетках. Была создана имитация дня и ночи с 12-часовым циклом светлого и темного времени, так же дополнительная вентиляция (12 смен воздуха в час), температуру 17-19 °С и относительную влажность 60-65%, соответствующие естественным условиям. У животных был открытый доступ к питьевой воде очищенной и гранулированному корму К-122 от ООО «Лабораторснаб».

Перед началом эксперимента и через 4 и 24 часа после парентерального введения препарата оценивали общее внешнее состояние и физиологическое поведение животных. Проверяли внешний вид, существующую двигательную активность, а также проводили гематологические и биохимические тесты. Был проведен полный Гематологический анализ и полный Биохимический анализ. Для анализа брали кровь из краевой вены правого уха кроликов в объеме 2,0-2,5 мл.

Подсчет форменных элементов крови осуществляли с помощью гематологического анализатора Abacus Junior Vet (Австрия). Уровень общего белка определяли с использованием наборов фирмы «Corma» (Польша), содержание мочевины — с помощью наборов ЗАО

«Диакон-ДС» (Россия), глюкозы, креатинина, общего холестерина, триглицеридов, активности лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы, аспартат- и аланинаминотрансферазы — с помощью наборов фирмы «Diasys» (Германия), а общий билирубин — с помощью набора «Эко сервис» (Санкт-Петербург).

Биохимические показатели и активность ферментов исследовали на биохимическом полуавтоматическом анализаторе ФП-901 «Labsystems» (Финляндия). Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ «BioStat 2007» и «Excel 2000».

Изучение токсичности гидроксиникотиноилглутамат кальция при внутрижелудочном введении в условиях трехмесячного хронического эксперимента на крысах

Исследование токсичности гидроксиникотиноилглутамата кальция в условиях хронического эксперимента было проведено на крысах Wistar. В эксперименте приняли участие три группы по 20 животных обоего пола с исходной массой тела 190–220 граммов. Они были разделены на три группы: группа номер 1 — контрольная, группа номер 2 получала препарат в дозе 6,7 мг/кг (10-кратная высшая терапевтическая доза для человека), группа номер 3 — в дозе 13,4 мг/кг (20-кратная высшая расчетная терапевтическая доза, пересчитанная на животного). Рекомендованная высшая терапевтическая доза для человека составляет 50 мг или 0,67 мг/кг.

Препарат готовили *ex tempore*, растворяя его в свежеприготовленной воде. Были приготовлены 0,5% и 1% растворы, которые каждый день в одно и тоже время вводили в желудок крысам с помощью зонда.

Молодые крысы Wistar были получены из питомника лабораторных животных ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАМН, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Животных содержали в клетках типа Т-4, по 10 особей в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, при температуре 18-20°C и относительной влажности 50-65% на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу.

Животные имели свободный доступ к корму и водопроводной питьевой воде. Для питья использовали поилки (500-мл стеклянные бутылки с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре).

Животные получали стандартный брикетированный корм ПК-120-1, изготавливаемый ООО «Лабораторснаб».

На протяжении длительного эксперимента оценивали общее состояние и физиологическое поведение животных, включая голод, физическую активность, длину и плотность шерстного покрова и скорость прироста массы тела. Перед экспериментом, а также

через 1 и 3 календарных месяца после введения препарата, исследовали морфологический состав периферической крови и биохимические показатели сыворотки крови.

Для анализа этих показателей кровь у крыс брали из хвостовой вены в объеме 1,0-1,5 мл. Подсчет форменных элементов производился с помощью гематологического анализатора Abacus junior vet (Австрия), а биохимические показатели определялись на анализаторе ФП-901 "Labsystems" (Финляндия). Уровень общего белка измерялся с использованием наборов фирмы «Cormay» (Польша), содержание мочевины — с помощью наборов ЗАО «Диакон-ДС» (Россия), а уровни глюкозы, креатинина, общего холестерина, триглицеридов, активность лактатдегидрогеназы, щелочной фосфатазы и аспартат- и аланинаминотрансферазы — с помощью наборов фирмы «Diasys» (Германия). Уровень общего билирубина определялся с помощью набора «Эко сервис» (Санкт-Петербург).

По завершении хронического эксперимента проводилась эвтаназия крыс с использованием диэтилового эфира. Затем выполнялось патоморфологическое исследование внутренних органов и тканей. Вскрытие животных осуществлялось сразу после их смерти по полной патологоанатомической схеме, что предотвращало возможный аутолиз тканей и позволяло проводить дополнительные исследования. На каждое животное составлялся полный протокол вскрытия с описанием патологоанатомических изменений во всех органах и системах организма.

Для патоморфологического анализа срезы свежих тканей помещались в 10% нейтрализованном растворе формалина. Обезвоживание, обезжиривание и проводка тканей с их уплотнением в парафинах (температура плавления 37-57°C) проводились на микропроцессорном автомате «Сакура» (Япония) по заранее утвержденной программе. Заливку тканей в парафин с воском и формирование тканевых блоков осуществляли сотрудники. Микротомирование парафиновых блоков проводилось с использованием санного микротом (Россия) и ротационных микротомов (Райхерт, Австрия; АО 820, США), что позволяло получать серийные срезы. После депарафинирования срезы окрашивались гематоксилин-эозином, заключались в пихтовый бальзам под покровные стекла и готовились для визуального просмотра в виде постоянных микропрепаратов.

Микроскопическое исследование проводилось на световом микроскопе Nikon Eclipse E 200 при увеличениях 10x10 и 10x20. Полученные комплексные патоморфологические данные от крыс, получавших препарат, сравнивались с данными контрольных животных.

Статистическая обработка количественных данных осуществлялась с использованием программ «BioStat 2007» и «Excel 2000», где вычислялись выборочное среднее значение и стандартная ошибка среднего ($\pm m$). Для оценки достоверности межгрупповых различий (раздельно для самцов и самок) применялся критерий t Стьюдента.

Изучение мутагенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция на микроорганизмах в тесте Эймса

Оценка мутагенной активности гидроксиникотиноилглутамата кальция была проведена методом, который измеряет способность вещества вызывать генные мутации у индикаторных микроорганизмов в системе метаболической активации (*in vitro*) и без неё. Для этого использовался чашечный метод учета мутаций, разработанный Эймсом и его коллегами [47,117], с модификацией, описанной в [28]. Этот метод является обязательным в соответствии с Методическими рекомендациями по проведению доклинических исследований лекарственных средств МЗ России.

В качестве индикаторных микроорганизмов применялись ауксотрофные по гистидину штаммы *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 и TA1537. О мутагенном действии препарата судили по его способности индуцировать обратные мутации от ауксотрофности по гистидину к прототрофности.

Штамм TA98 имеет мутацию *his* D3052, которая используется для подтверждения способности исследуемого вещества вызывать мутации типа сдвига рамки считывания. В качестве позитивного контроля для этой мутации применялся 4-нитрохинолин-1-оксид (4 NQO).

Мутация *his* C3076 у штамма TA1537 представляет собой сдвиг рамки считывания. Хотя последовательность ДНК мутанта *his* C3076 не определена, известно, что она включает один дополнительный цитозин в ряду из трех цитозинов и подавляется супрессором *sufl* В. В качестве позитивного контроля для этой мутации использовался 9-аминоакридин.

Штамм TA100 имеет мутацию *his* G46, которая является миссенс-мутацией, ревертируемой под действием различных мутагенов, вызывающих замены пар оснований. Азид натрия применялся в качестве положительного контроля для этой мутации.

Данный метод позволяет исследовать как прямое воздействие исследуемого вещества на тестовые штаммы, так и эффект его потенциальных метаболитов, в случае если таковые образуются под влиянием микросомальной фракции печени крысы, индуцированной "Соволом".

Перед началом эксперимента штаммы проверялись на ауксотрофность по гистидину, наличие плазмиды рКМ 101 у штаммов TA98 и TA100, а также мутацию *rfa*.

Для проведения теста Эймса готовили разведения гидроксиникотиноилглутамата кальция следующим образом: препарат разводили дистиллированной водой, фильтровали через фильтры Millipore с диаметром пор 0,45 мкм и наносили на чашки Петри. Исследовались концентрации препарата в диапазоне от 0,14 до 1400 мкг/чашку.

Селективный полуобогатенный агар (2 мл) плавил в СВЧ-печи, охлаждали до 44-45°C на водяной бане. В пробирки вносили 100 мкл раствора препарата, 100 мкл суспензии ночной

культуры бактерий, 100 мкл микросомальной фракции печени крысы (S9) и кофакторы. Микросомальную фракцию S9 получали из печени крысы, индуцированной "Соволом", по методу Garner et al. [292]. Эксперимент проводили как с полной микросомальной активирующей смесью (ПАМС), так и с неполной активирующей микросомальной смесью (НАМС).

Эти смеси вносили в пробирки после извлечения из водяной бани и немедленно наносили полужидкий агар на слой минимального агара на чашках Петри. После застывания агара чашки помещали в термостат при 37°C. На каждую дозу препарата делали по три повторности с ПАМС и три повторности с НАМС. Через 48 часов инкубации при 37°C проводили учет прототрофных ревертантов.

Результаты оценивали по алгоритму, описанному в "Методических рекомендациях". Для каждого варианта рассчитывали среднее геометрическое число ревертантов с определением

$$X_i = \sqrt[3]{x_{i1} * x_{i2} * x_{i3}}, \quad (8)$$

где X_i - число ревертантов в чашках Петри 1,2,3 на дозе i .

Для каждого опытного варианта определяли кратность превышения среднего геометрического числа ревертантов по сравнению с контролем и сравнивали с критическим значением, указанным в Методических рекомендациях (1,9 для штамма TA1537, 1,5 для штаммов TA98 и TA100).

Как видно из представленных в Таблицах данных, бактериальные штаммы увеличивали число ревертантов под воздействием веществ, используемых в качестве положительных контролей. Это свидетельствует об объективности экспериментальных данных. В то же время исследуемый препарат не приводил к достоверному увеличению числа ревертантов.

Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на индукцию доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей

Использовались мыши-гибриды F1 (СВАхС57В16) являются рекомендуемым для этих исследований объектом. Животных получали из питомника ГУ НЦ Биомедицинских технологий РАМН. Они были здоровы, имели ветеринарный сертификат качества и состояния здоровья. Перед экспериментом животных содержали в карантине в течение 2 недель для выявления неконтролируемых беременностей у самок. Животных содержали в клетках типа Т-3, в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, температуре 20-22°C и относительной влажности 50-65% на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные получали водопроводную питьевую воду. Для питья использовали поилки (500-мл стеклянные бутылки с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре). Животные получали

стандартный брикетированный корм ПК-120-1, производимый ООО «Лабораторснаб». Корм и воду животные получали без ограничений. Самцов содержали в клетках по 1 особи. До подсадки к самцам самок содержали в клетках по 7-8 особей. Препарат вводили самцам парентерально однократно в дозе 33,5 мг/кг, это соответствует 50 кратной терапевтической дозе для человека (0,67 мг/кг). Контрольная группа получала внутривенно однократно стерильный 0,9% раствор NaCl в таком же объеме.

В экспериментальной группе было 15 самцов, а в контрольной — также 15 животных аналогичного пола. После введения препарата каждому самцу подсаживали по три небеременных молодых самки. Каждые семь дней самок забирали и заменяли новыми. Отобранных самок вскрывали на 16-й день беременности и подсчитывали количество живых и мертвых эмбрионов.

Результаты вскрытия фиксировали для каждой самки отдельно и затем подсчитывали. Основным показателем уровня доминантных летальных мутаций был уровень постимплантационных смертей, который показывал постимплантационную выживаемость. Его определяли по формуле:

$$A = \frac{d}{l + d}, \text{ где} \quad (9)$$

d - число погибших эмбрионов,

l - число живых эмбрионов.

В случае превышения значения показателя постимплантационных потерь в опытной группе по отношению к контрольной определялась достоверность различий в опытной и контрольной группах с помощью критерия χ^2 по формуле:

$$\chi^2 = \frac{([ad - bc] - 0.5N)^2 N}{(a + b)(c + d)(a + c)(b + d)}, \text{ где} \quad (10)$$

a - мертвые эмбрионы, контроль

b - мертвые эмбрионы, опыт

c - живые эмбрионы, контроль

d - живые эмбрионы, опыт

$N = a + b + c + d$

Исследование цитогенетической активности гидроксиникотиноилглутамат кальция методом учета хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей

Этот метод оценивает воздействие исследуемого вещества на генетическую структуру клеток костного мозга животных. Данный вид клеток особенно подвержен химическим и

физическим воздействиям. Хромосомные aberrации анализировались после введения препарата в соответствии с методикой, изложенной в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», Москва, 2005. В эксперименте использовались мыши-гибриды F1 (СВАх С57В16) с массой тела 18-20 г. Животные были выращены в стандартизированных условиях в питомнике ГУ НЦ Биомедицинских технологий РАМН. Животные были обследованы и идентифицированы как здоровые. До эксперимента животные провели в карантине 2 недели. Животных содержали в клетках типа Т-3, в условиях искусственного освещения (по 12 часов светлого и темного времени), принудительной 12-кратной в час вентиляции, температуре 20-22⁰С и относительной влажности 50-65% на подстилке из древесных стружек, простерилизованных в сухожаровом шкафу. Животные получали очищенную питьевую воду. Для питья использовали стандартные поилки, сделанные из 500-мл стеклянных бутылей с конической пробкой из нержавеющей стали с отверстием в центре. Животные получали полноценный стандартный брикетированный корм ПК-120-1. Корм и воду животные получали в клетках в свободном доступе.

Исследуемый препарат вводили инъекционно в физиологическом растворе однократно в дозе 33,5 мг/кг, что в 50 раз превышало реассчитанную высшую терапевтическую дозу для человека (0,67 мг/кг). Контрольной группе вводили внутривентриально только 0.9% раствор натрия хлорида.

Параллельно проводили подострый эксперимент, при котором препарат вводили внутривентриально в дозе 6,7 мг/кг (что эквивалентно 10-кратной высшей терапевтической дозе для человека) ежедневно в течение 5 дней. После окончательного введения препарата животных умерщвляли через 6 часов. В обеих группах — опытной и контрольной — использовали по 5 животных. За час до забоя мышам внутривентриально вводили колхицин (производитель — "Serva") в дозе 4,8 мкг/г массы тела.

Для приготовления хромосомных препаратов из клеток костного мозга применялась методика с некоторыми модификациями. Суспензию клеток костного мозга, полученную из крупных костей, ресуспендировали в физиологическом растворе Хенкса и центрифугировали 7 минут при 1000 об/мин. Супернатант убирали, осадок ресуспендировали в нагретом (37 °С) гипотоническом растворе 0,075 М КСl и инкубировали в нём 50 минут. Затем декантант вновь размешивали и центрифугировали, удаляя супернатант. К осадку с низкой скоростью доливали холодный фиксатор Карнуа (смесь абсолютного метилового спирта и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1). Суспензию помещали на 30 минут в холодильник при -40 °С, после чего ресуспендировали, центрифугировали и удаляли супернатант. Клетки ресуспендировали и трёхкратно отмывали новыми порциями фиксатора Карнуа. После последнего отмыва весь надосадок удаляли, и в 0,2–0,5 мл осадка (в зависимости от объёма клеточной суспензии)

добавляли свежий фиксатор. Суспензию наносили на охлажденные предметные стёкла и прогревали до суха над открытым пламенем. Препараты окрашивали азур-эозином. Метафазы анализировали на наличие хромосомных aberrаций в соответствии с рекомендациями ВОЗ.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью сравнения распределений по t критерию Стьюдента.

Исследование эмбриотоксических и тератогенных свойств гидроксиникотиноилглутамат кальция

Исследование эмбриотоксических и тератогенных свойств гидроксиникотиноилглутамата кальция было проведено в соответствии с рекомендациями Фармакологического Государственного Комитета Росздрава, изложенными в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (Москва, 2005). Эксперименты осуществлялись на 40 беременных крысах линии Wistar, разделённых на две группы по 20 особей в каждой: первая группа — контрольная, вторая группа получала гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг, что соответствует десятикратной расчетной максимальной терапевтической дозе для человека. Препарат вводился внутримышечно ежедневно в течение всей беременности (с 1 по 19 день гестации) один раз в сутки. Субстанцию гидроксиникотиноилглутамата кальция растворяли в стерильном растворе 0.9% натрия хлорида. Контрольной группе вводилось сопоставимое количество стерильного физиологического раствора. На 20-й день беременности проводили эвтаназию 70% беременных крыс путём дислокации шейных позвонков. После этого исследовали костный скелет и внутренние органы плодов, а также определяли показатели предимплантационной и постимплантационной гибели по соответствующим формулам:

$$\text{Предимплантационная гибель, \%} = \frac{(\text{Количество желтых тел} - \text{Количество мест имплантации}) * 100}{\text{Количество желтых тел}},$$

$$\text{Постимплантационная гибель, \%} = \frac{(\text{Количество мест имплантации} - \text{Количество живых плодов}) * 100}{\text{Количество мест имплантации}}$$

После оценки жизнеспособности плодов и измерения их массы проводили анализ внешних аномалий (подкожные кровоизлияния, отек подкожной клетчатки) и пороков развития (искривление конечностей и позвоночного столба, изменения глазных яблок и ушных раковин).

После наружного осмотра часть плодов фиксировали в 96 % спирте, затем просветляли раствором щелочи, промывали водой и окрашивали ализарином. Далее их обезвоживали в смесях

глицерина с 96 % спиртом и изучали костный скелет по методу Доусона. Другую группу плодов (примерно 1/3) фиксировали в жидкости Буэна и исследовали внутренние органы на микроанатомических срезах по методике Вильсона-Дыбана (на уровне вибрисс, глазных яблок, боковых и четвертого желудочков головного мозга, выше и ниже передних лап, на уровне сердца и легких, желудка, печени, почек). Также изучали мочевой пузырь, мочеточники и органы репродуктивной системы.

30 % беременных самок оставляли для родов. В течение первого месяца постнатального периода у крысят изучали смертность, динамику массы тела и физическое развитие.

Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на репродуктивную функцию крыс

Эксперименты проводились на 90 крысах линии Wistar (масса тела до эксперимента 180-200 г), из 60 были самками, а 30 — самцами. Гидроксиникотиноилглутамат кальция вводился внутримышечно в дозе 6,7 мг/кг, что соответствует 10 кратной терапевтической дозе для человека.

Группа самок (60 особей) была разделена на две различные группы в соотношении 2:1; контрольную (40 животных) и опытную (20 животных). Самки первой группы получали препарат ежедневно в течение двух недель (3-4 эстральных цикла). Группа самцов (30 особей) также была разделена на две подгруппы: контрольную (20 животных) и опытную (10 животных). Самцам опытной группы препарат вводился каждый день в течение 10 недель (примерно 2-3 цикла созревания сперматозоидов). Животные контрольной подгруппы получали такое же количество стерилизованного раствора 0.9% натрия хлорида, использованного для разведения препарата.

После окончания введения препарата сформировали три группы животных:

- первая к 10 контрольным самцам подсаживали 20 контрольных самок;
- вторая (гидроксиникотиноилглутамат кальция) – к 10 контрольным самцам подсаживали 20 опытных самок;
- третья (гидроксиникотиноилглутамат кальция) – к 10 опытным самцам подсаживали 20 контрольных самок.

В течение двух эстральных циклов проматривали вагинальные мазки. Отмечали стадии проэструс, эструс, метаэструс и диэструс. Обнаружение в вагинальных мазках сперматозоидов считали первым днем беременности. По истечении 10 дней из беременных самок в каждой из трех групп создавали две подгруппы. Первые подгруппы самок забивали на 20 день беременности. Подсчитывали количество плодов, резорбций, мест имплантации в полости матки, желтых тел в яичниках. На основании полученных данных вычисляли показатели предимплантационной и постимплантационной гибели по формуле:

$$\text{Предимплантационная гибель, \%} = \frac{(\text{Количество желтых тел} - \text{Количество мест имплантации}) \times 100}{\text{Количество желтых тел}},$$

$$\text{Постимплантационная гибель, \%} = \frac{(\text{Количество мест имплантации} - \text{Количество живых плодов}) \times 100}{\text{Количество мест имплантации}},$$

а также индекс плодовитости — это отношение количества подсаженных самок к числу самок, у которых были обнаружены сперматозоиды в вагинальных мазках, индекс беременности — это соотношение самок с обнаруженными сперматозоидами в вагинальных мазках к числу животных, которые успешно завершили беременность:

$$\text{Индекс плодовитости, \%} = \frac{\text{Количество оплодотворенных самок} \times 100}{\text{Количество ссаженных самок}},$$

$$\text{Индекс беременности, \%} = \frac{\text{Количество беременных самок} \times 100}{\text{Количество оплодотворенных самок}}.$$

При осмотре плодов регистрировали патологические изменения (подкожные кровоизлияния и отек подкожной клетчатки, нарушения развития скелета, глазных яблок).

Вторые подгруппы беременных самок оставляли на роды, наблюдая за животными, 1 раз в неделю их взвешивали и отмечали прибавку массы тела. Фиксировали дату родов, количество крысят в помете и массу тела новорожденных крысят. На 21 день со дня родов вычисляли процент смертности, отмечали общий и средний вес крысят.

Исследование анафилактической активности гидроксиникотиноилглутамат кальция

Исследования выполнены на 15 пестрых морских свинках (самцы, масса тела 270-320 г), которые были разделены на 3 группы по 5 животных в каждой: 1 группа – контроль (физиологический раствор), 2 группа - гидроксиникотиноилглутамат кальция 3,35 мг/кг, 3 группа – гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг. Использованные дозы препарата соответствовали 5- и 10- кратной высшей терапевтической дозе, рекомендованной для человека (0,67 мг/кг). Животных сенсибилизировали 5-кратным с интервалом в 1 день внутрибрюшинным введением гидроксиникотиноилглутамат кальция в указанных выше дозах. Контрольные животные получали соответствующие количества стерильного физиологического раствора,

использованного для приготовления растворов препарата. Тест-введения (разрешающие дозы) гидроксиникотиноилглутамат кальция и физиологического раствора вводили внутривентриально морским свинкам на 14 и 21 дни после последней сенсибилизации.

Реакция гиперчувствительности III типа на морских свинках

Исследования выполнены на 15 пестрых с большими белыми участками кожи морских свинках (самцы, масса тела 260-310 г), которые были разделены на 3 группы по 5 животных в каждой: 1 группа – контроль, 2 группа – гидроксиникотиноилглутамат кальция 3,35 мг/кг, 3 группа - гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг. Используемые дозы изучаемого препарата соответствовали 5- и 10-кратным высшим терапевтическим дозам, рекомендованным для человека. Животных сенсибилизировали 5-кратным с интервалом 5 дней внутримышечным введением препарата в указанных дозах. Контрольные животные получали внутримышечно соответствующие количества физиологического раствора. На 10-й день после последней сенсибилизации у животных на коже спины на участке 3х3 см выстригали шерсть и внутрикожно в одну точку вводили по 0,05 мл растворов гидроксиникотиноилглутамат кальция, использованных для сенсибилизации, в другую точку- такой же объем физиологического раствора. Учет реакции кожи оценивали визуально по шкале кожных проб С.В. Суворова через 1, 4 и 24 часа после внутрикожного введения разрешающей дозы.

Исследование влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на клеточность подколенного лимфоузла у мышей

Исследования выполнены на 10 мышках-гибридах F1(СВАхС57В16) (самцы, масса тела 18-20 г), которым в подушечку правой задней лапы вводили 50 мкл стерильного физиологического раствора (контроль). В подушечку контрлатеральной лапы инъецировали 50 мкл гидроксиникотиноилглутамат кальция (6,7 мг/кг, 10-кратная высшая терапевтическая доза для человека). Через 7 дней у мышей определяли клеточность правого и левого подколенных лимфоузлов, вычисляли относительный индекс путем деления показателей левого лимфоузла на аналогичные показатели правого лимфоузла.

Исследование влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на число антителообразующих клеток в селезенке

Для изучения влияния препарата на число антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей использовали прямой метод локального гемолиза, который позволяет определить клетки, образующие иммуноглобулин М – антитела с высокой гемолитической активностью [153].

Исследования выполнены на 35 мышах гибридах F1(СВАхС57В16) (самцы, масса тела 18-20 г), которые были разделены на 7 групп по 5 животных в каждой. Мышей иммунизировали внутривенным введением эритроцитов барана (ЭБ), отмытых в стерильном физиологическом растворе, в оптимальной иммуногенной дозе 5×10^8 клеток/мышь.

Мышам групп 1 и 2 за сутки до иммунизации ЭБ (день “-1”) внутрибрюшинно вводили препарат в дозах соответственно 13,4 и 6,7 мг/кг. Мышам групп 3 и 4 внутрибрюшинно вводили препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг в день иммунизации (через 1 час после иммунизации, день “0”). Животные групп 5 и 6 получали препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг через 24 часа после иммунизации ЭБ (день “+1”). Контрольным мышам в день «+1» внутрибрюшинно вводили соответствующие количества физиологического раствора (группа 7). Испытанные дозы препарата в 10 и в 20 раз превышали высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для введения человеку.

На 4 сутки после иммунизации определяли число АОК в селезенке мышей по методу Ерне.

Оценка влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на количество ядродержащих клеток в селезенке мышей.

Исследования выполнены на 35 мышах линии F1(СВАхС57В16) (самцы, масса тела 18-20 г), которые были разделены на 7 групп по 5 животных в каждой. Мышей иммунизировали внутривенным введением эритроцитов барана (ЭБ) в дозе 5×10^8 клеток/мышь. Мышам групп 1 и 2 за сутки до иммунизации ЭБ (день “-1”) внутрибрюшинно вводили гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозах соответственно 13,4 и 6,7 мг/кг. Мышам групп 3 и 4 внутрибрюшинно вводили препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг в день иммунизации (через 1 час после иммунизации, день “0”). Животные групп 5 и 6 получали препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг через 24 часа после иммунизации ЭБ (день “+1”). Контрольным мышам в день «+1» внутрибрюшинно вводили соответствующие количества физиологического раствора (группа 7). Испытанные дозы препарата в 10 и в 20 раз превышали высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для введения человеку.

На 4 сутки после иммунизации мышей забивали дислокацией шейных позвонков, извлекали селезенку и определяли в ней количество ядродержащих клеток.

Для определения клеточности селезёнку дезинтегрировали в гомогенизаторе типа стекло/стекло в растворе Хенкса. Суспензию клеток отделяли от элементов стромы фильтрованием через 2-слойный капроновый фильтр, 3-кратно отмывали и центрифугировали при 200 g в течение 5 минут. После лизиса клеток эритроидного ряда 3% уксусной кислотой в полученной суспензии подсчитывали количество кариоцитов на счетчике клеток «Пикоскель» (Венгрия). Для снижения вероятности спонтанной гибели клеточных элементов всю процедуру выделения клеток проводили на холоде.

Изучение влияния гидроксиникотиноилглутамат кальция на реакцию гиперчувствительности замедленного типа

Исследования выполнены на 35 мышах-гибридах F₁(СВАхС₅₇В1₆) (самцы, масса тела 18-20 г), которые были разделены на 7 групп, по 5 животных в каждой. Мышей иммунизировали подкожным введением в межлопаточную область эритроцитов барана в дозе 2x10⁸ клеток/мышь. Мышам групп 1 и 2 за сутки до иммунизации ЭБ (день "-1") внутрибрюшинно вводили препарат в дозах соответственно 13,4 и 6,7 мг/кг. Мышам групп 3 и 4 внутрибрюшинно вводили препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг в день иммунизации (через 1 час после иммунизации, день "0"). Животные групп 5 и 6 получали препарат соответственно в дозах 13,4 и 6,7 мг/кг через 24 часа после иммунизации ЭБ (день "+1"). Контрольным мышам в день «+1» внутрибрюшинно вводили соответствующие количества физиологического раствора (группа 7). Испытанные дозы препарата в 10 и в 20 раз превышали высшую терапевтическую дозу, рекомендованную для введения человеку.

На 5-е сутки после иммунизации все животные получали субплантарно в левую заднюю лапу разрешающую инъекцию ЭБ в дозе 1x10⁸ клеток/мышь в объеме 50 мкл («опытная лапа»). В подушечку контралатеральной лапы («контрольная лапа») инъецировали 50 мкл стерильного физиологического раствора. Результаты реакции регистрировали через 24 часа путем взвешивания «контрольной» и «опытной» лап.

Разница в массе «опытной» и «контрольной» лап характеризовала величину отека и интенсивность реакции гиперчувствительности замедленного типа. Индекс реакции вычисляли по формуле:

$$U = \frac{P_0 - P_k}{P_k} \times 100\% \quad (11)$$

где P_0 – масса опытной лапы, P_k – масса контрольной лапы.

Хроматограммы образцов биологических жидкостей животных, содержащих и не содержащих гидроксиникотиноилглутамат кальция:

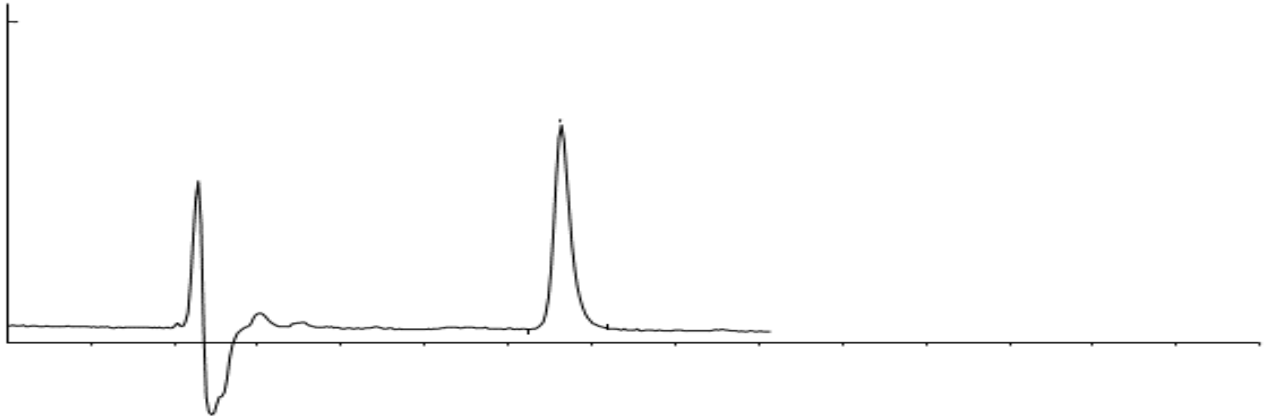


Рисунок ПА-1 - Хроматограмма раствора гидроксиникотиноилглутамат кальция. Колонка: Luna C18(2) 250× 4,6 мм; Объем пробы: 10 мкл; Детектор: УФ, 292 нм.

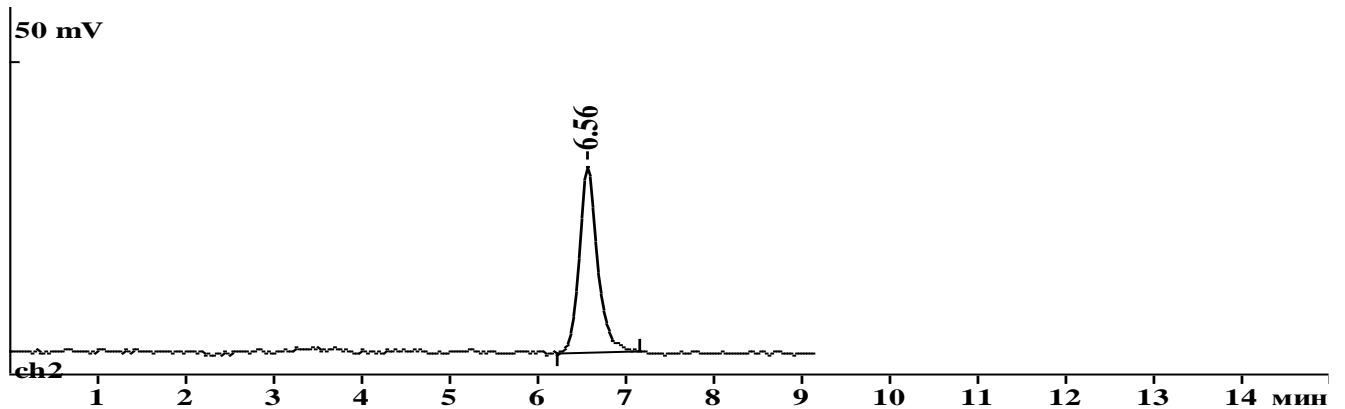


Рисунок ПА-2 - Хроматограмма раствора гидроксиникотиноилглутамат кальция. Колонка: Luna C18(2) 250× 4,6 мм; Объем пробы: 10 мкл; Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм.

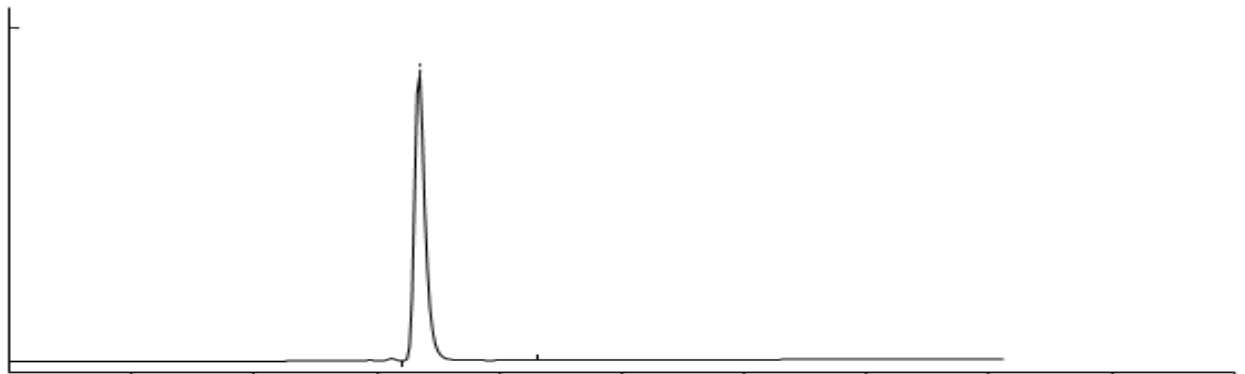


Рисунок ПА-3 - Хроматограмма раствора гидроксиникотиноилглутамат кальция. Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; Состав подвижной фазы (ПФ): 100 мМ фосфатный буфер – ацетонитрил (85 : 15); Детектор: УФ, 292 нм; Объем пробы: 10 мкл.

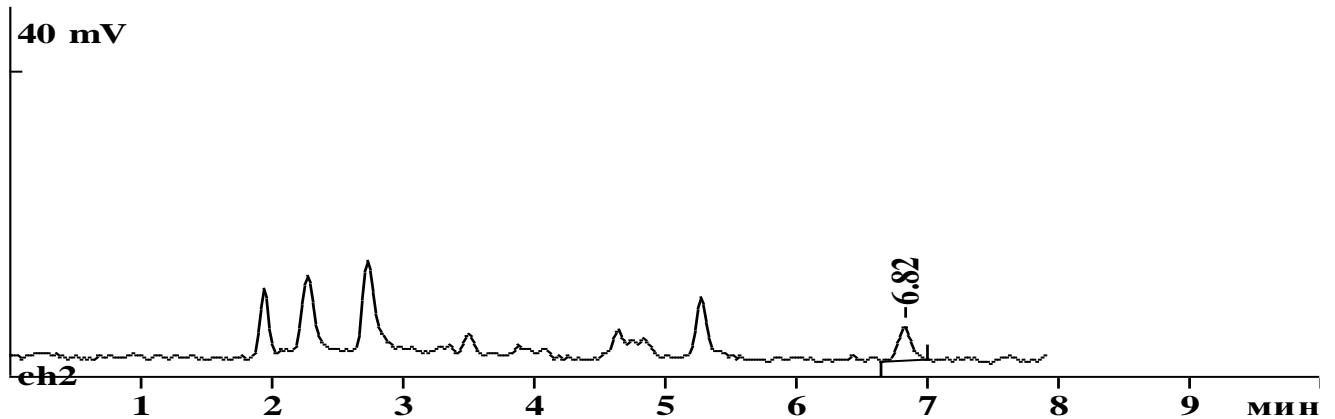


Рисунок ПА-4 - Хроматограмма образца сыворотки крови крыс, не содержащей гидроксиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 10 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1 : 1); Объем пробы: 10 мкл.

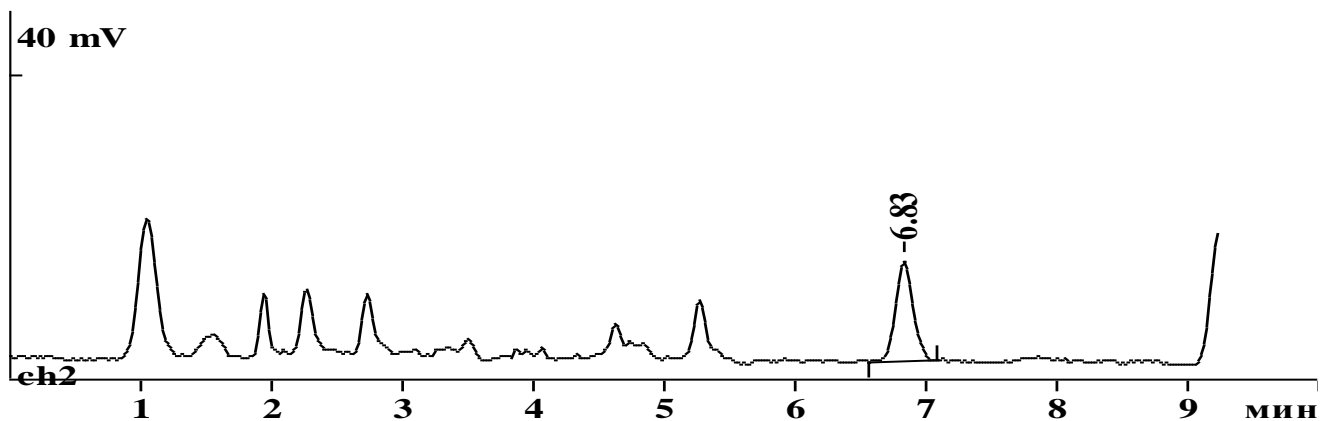


Рисунок ПА-5 - Хроматограмма образца сыворотки крови крыс, содержащего гидроксиникотиноилглутамат кальция е. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 10 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

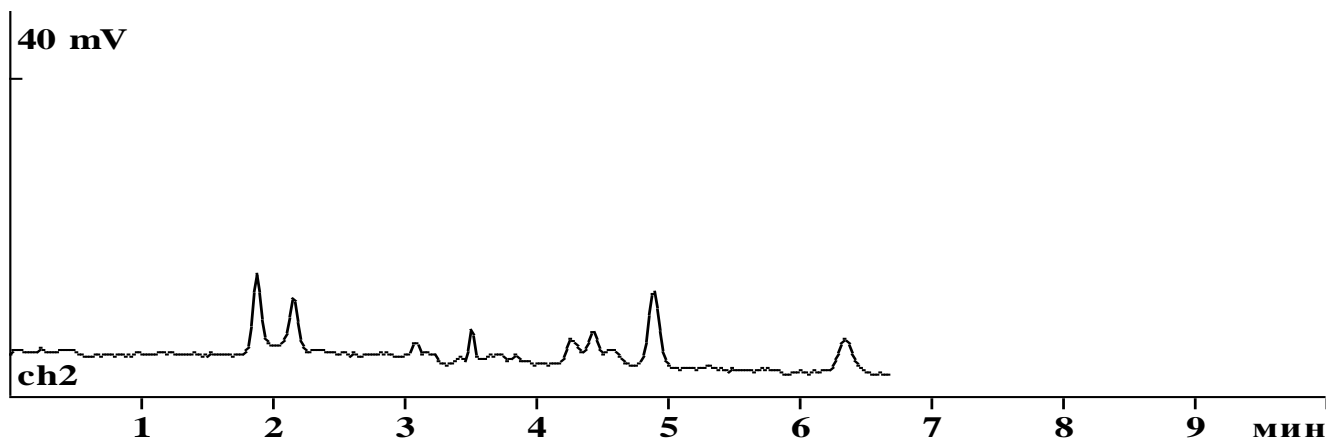


Рисунок ПА-6 - Хроматограмма образца сыворотки крови крыс, не содержащего гидросиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

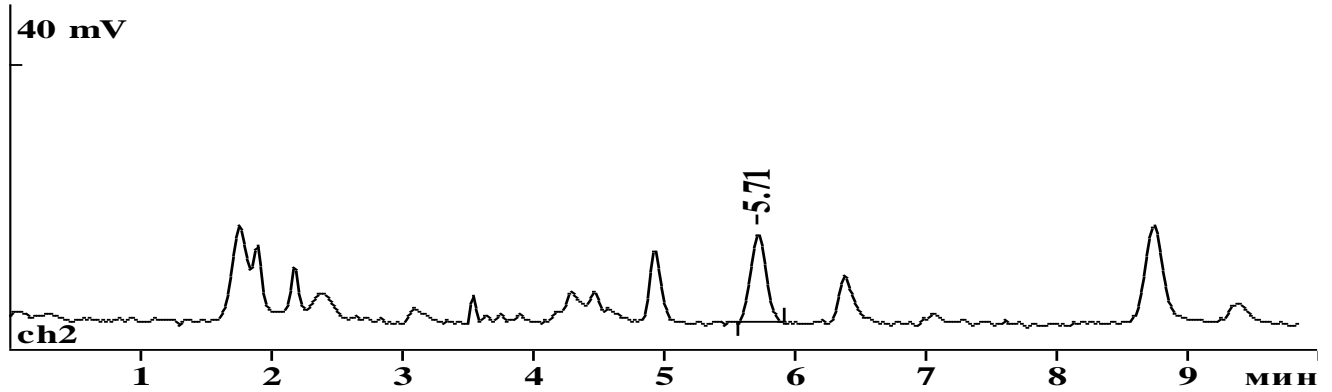


Рисунок ПА-7 - Хроматограмма пробы сыворотки крови крысы после введения гидросиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмоний-бромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

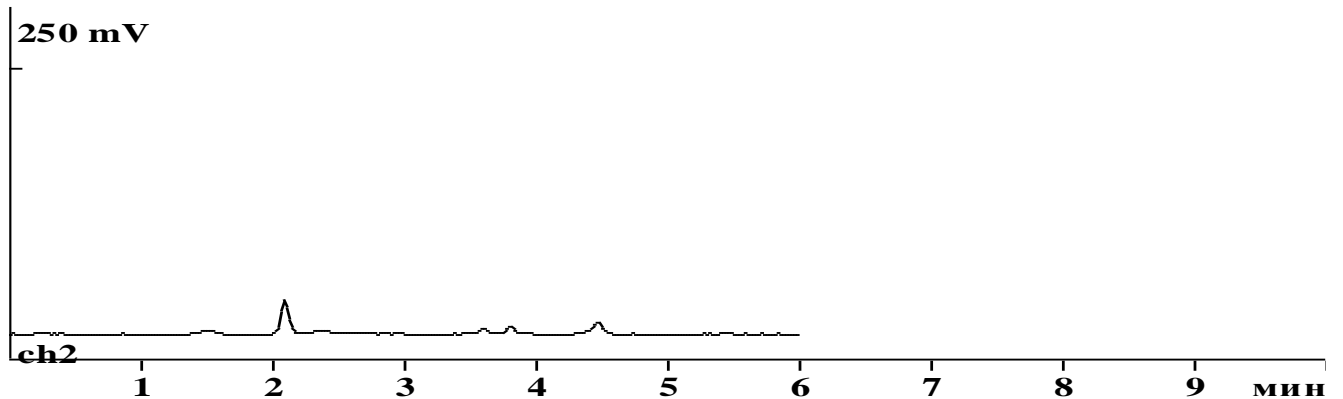


Рисунок ПА-8 - Хроматограмма образца сыворотки крови кроликов, не содержащей гидросиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмоний-бромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1 : 1); Объем пробы: 10 мкл.

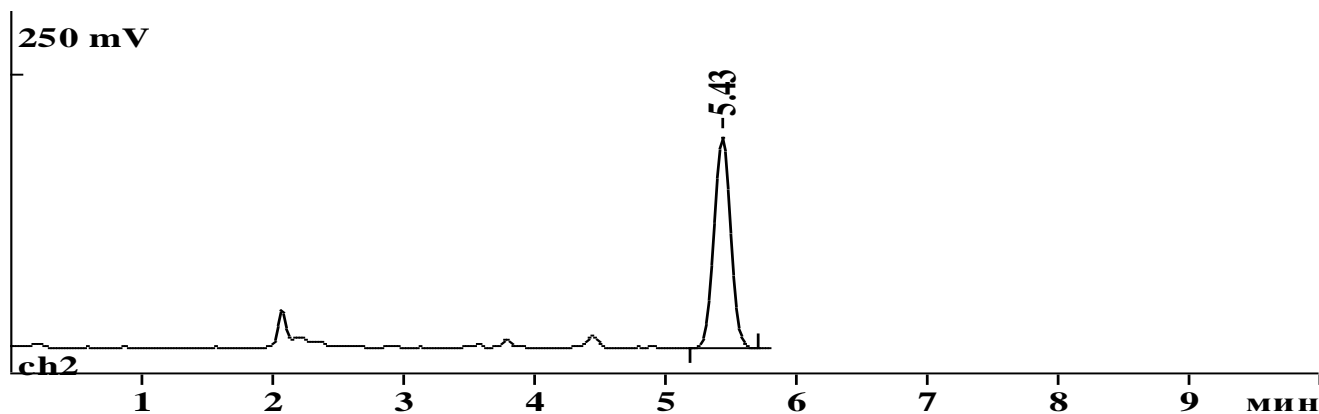


Рисунок ПА-9 - Хроматограмма пробы сыворотки крови кролика, получавшего гидроксиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмоний-бромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

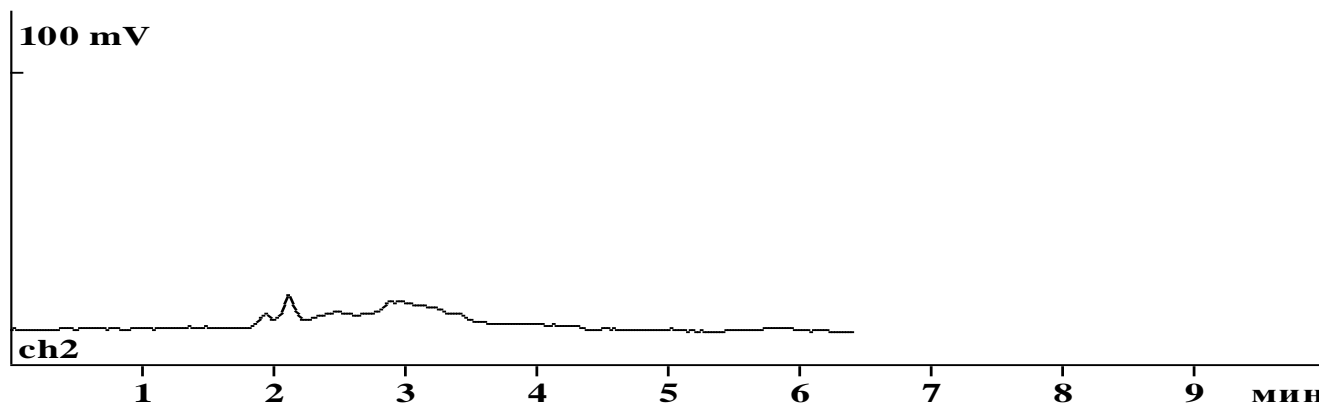


Рисунок ПА-10 - Хроматограмма образца головного мозга крысы, не содержавшего гидроксиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

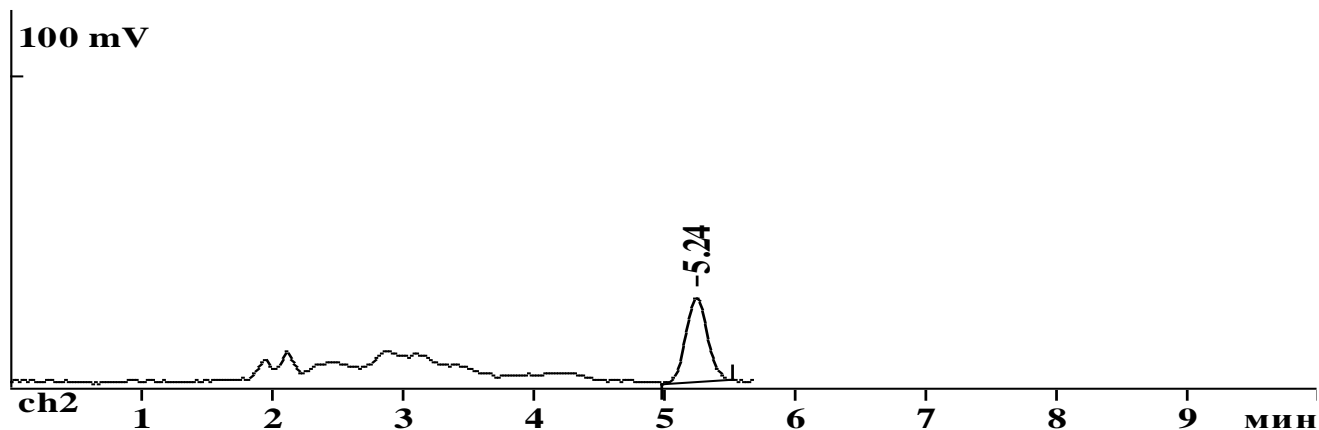


Рисунок ПА-11 - Хроматограмма пробы головного мозга крысы, получавшей гидроксиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

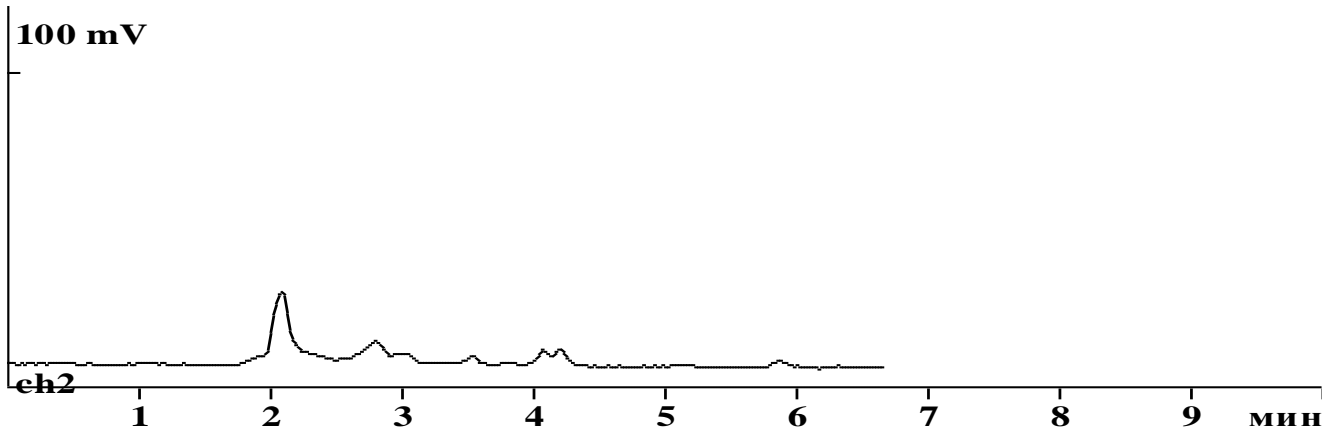


Рисунок ПА-12 - Хроматограмма образца почки крысы, не содержащей гидроксиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1 : 1); Объем пробы: 10 мкл.

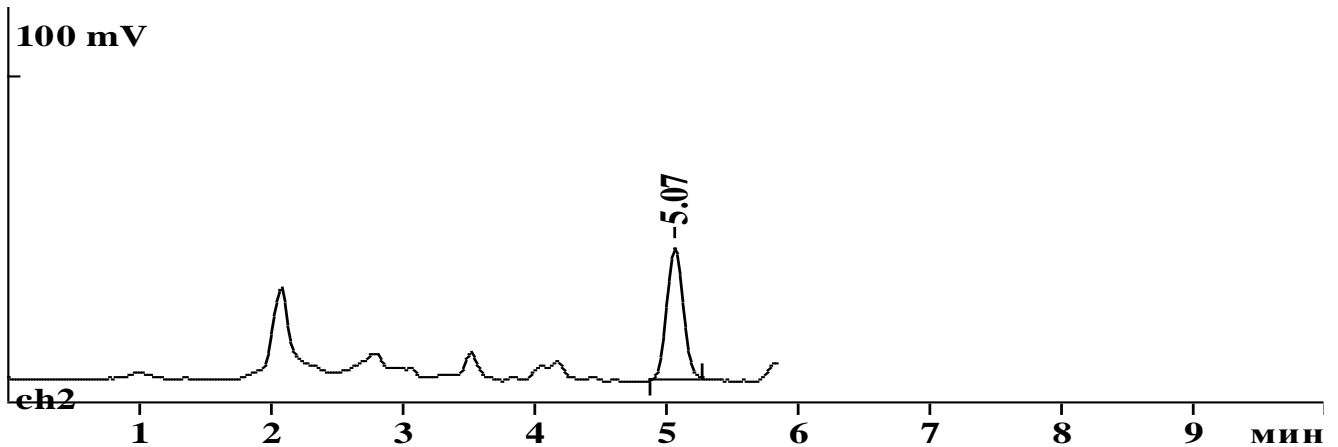


Рисунок ПА-13 - Хроматограмма пробы почки крысы, получавшей гидроксиникотиноилглутамат кальция. Колонка: Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

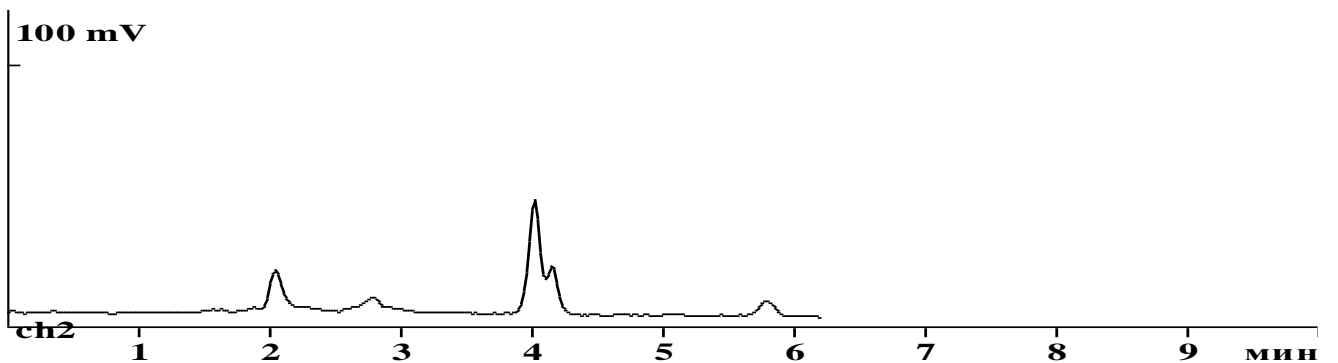


Рисунок ПА-14 - Хроматограмма образца печени крысы, не содержащей Ампассе. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

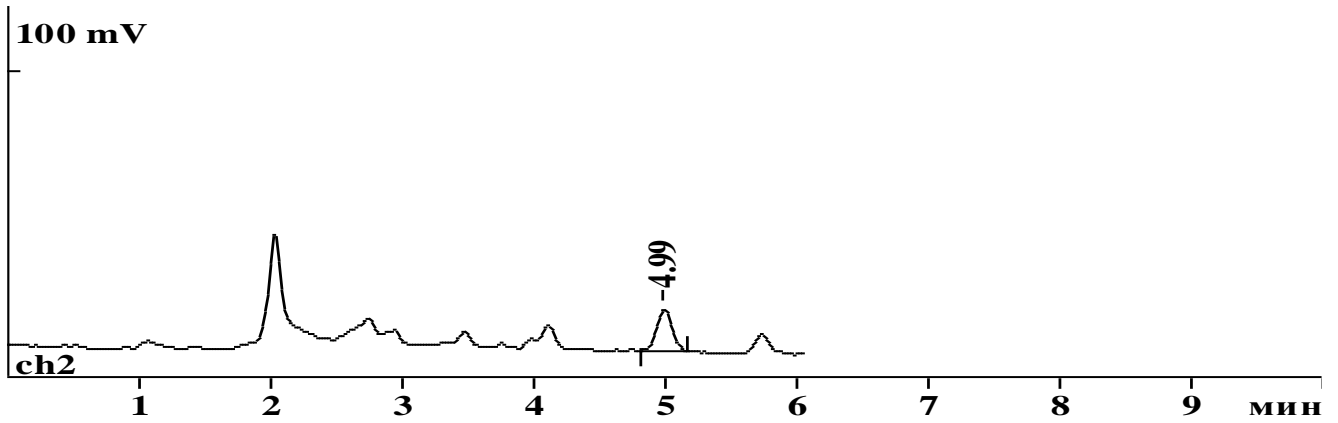


Рисунок ПА-15 - Хроматограмма пробы печени крысы, получавшей Ампассе. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 10 мкл.

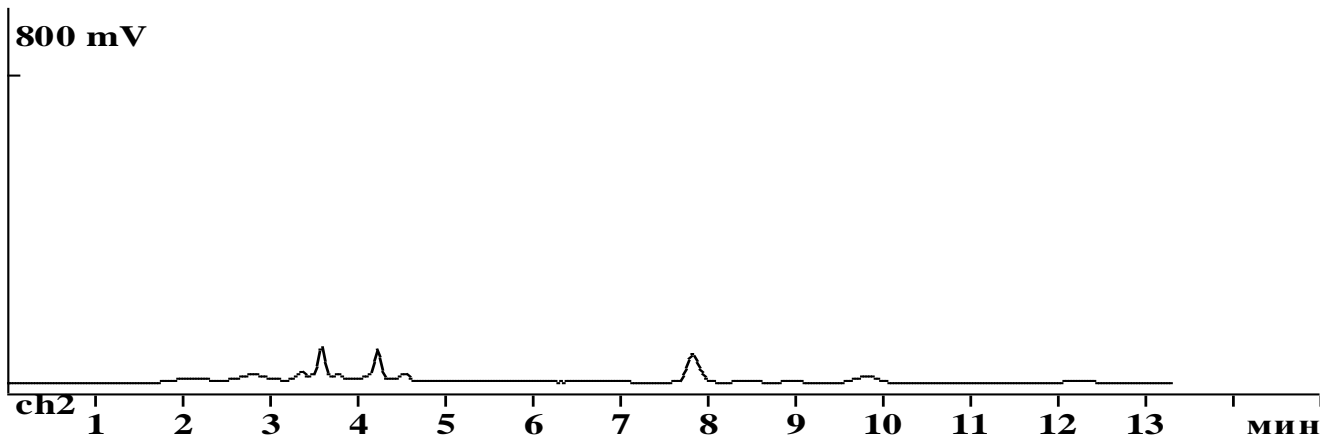


Рисунок ПА-16 - Хроматограмма образца мочи крысы, не содержащей гидроксиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1 : 1); Объем пробы: 3 мкл.

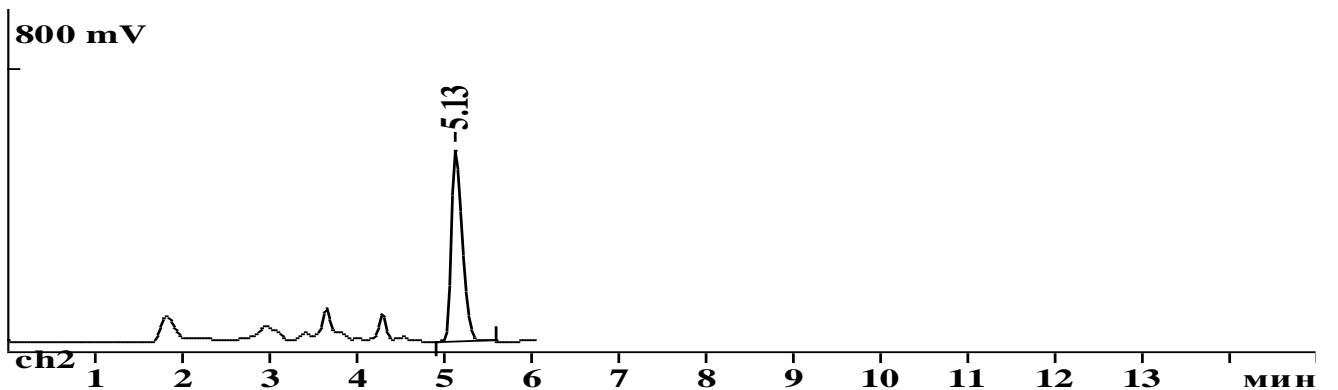


Рисунок ПА-17 - Хроматограмма пробы мочи крысы, получавшей гидроксиникотиноилглутамат кальция. Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 3 мкл.

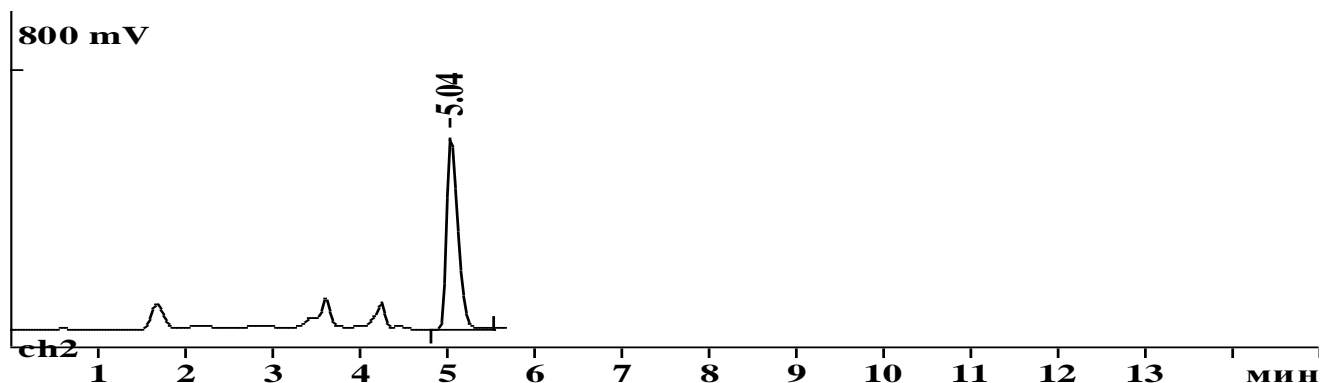


Рисунок ПА-18 - Хроматограмма пробы мочи крысы, получавшей гидроксиникотиноилглутамат кальция (инкубирование с β -глюкуронидазой). Детектор: флуориметр, $E_x = 310$ нм, $E_m = 389$ нм; Колонка: Luna C18(2) 250×4,6 мм; ПФ: 5 мМ цетилтриметиламмонийбромид, 17 мМ K_2HPO_4 (рН 7,0) – ацетонитрил (1:1); Объем пробы: 3 мкл.

Приложение Б. Результаты определения концентрации гидроксиникотиноилглутамат кальция в биологических жидкостях животных.

Таблица ПБ-1 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/мл) в сыворотке крови крыс после в/в введения в дозе 20 мг/кг

№	Время после введения								
	П/П	0	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	6 ч
	нпч ¹	36,2	24,6	9,96	2,21	0,113	нпч	нпч	
	нпч	22,6	21,3	4,36	1,22	нпч	нпч	нпч	
	нпч	33,3	20,0	7,06	1,18	0,06	нпч	нпч	
	нпч	18,6	28,2	8,02	2,02	нпч	нпч	нпч	
	нпч	36,8	19,6	5,66	1,08	0,116	нпч	нпч	
	M_d					0,058			
	SD					0,057			
	M_G	28,5	22,5	6,74	1,47				
	Интервальная оценка	20,9÷ 38,8	19,3÷ 26,3	4,90÷ 9,27	1,05÷ 2,06				

Примечание - ¹Ниже порога чувствительности метода

Таблица ПБ-2 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/мл) в сыворотке крови крыс после в/в введения в дозе 100 мг/кг

№№	Время после введения
----	----------------------

п/п	0	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	4 ч	6 ч
1	нпч	283	82,0	40,0	18,5	0,07	нпч
2	нпч	70,5	78,2	26,9	34,2	0,25	нпч
3	нпч	284	70,6	29,6	13,2	нпч	нпч
4	нпч	298	85,3	37,2	11,5	нпч	нпч
5	нпч	256	101	31,1	17,7	0,44	нпч
M_A						0,15	
SD						0,20	
M_G		280	83,0	32,7	17,6		
Интервальная оценка		263÷298	73÷94	27,8÷38,3	11,6÷26,8		

Таблица ПБ-3 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/мл) в сыворотке крови крыс после в/в введения в дозе 500 мг/кг

№№	Время после введения							
	п/п	0	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч
1	нпч	2450	829	523	345	56,1	4,65	нпч
2	нпч	2430	875	501	325	45,9	4,12	нпч
3	нпч	1980	2116	467	360	50,1	3,88	нпч
4	нпч	1870	1060	573	121	190,9	4,42	нпч
5	нпч	1910	38,7 ⁱ	451	320	155	3,03	нпч
M_G		2110	1130	501	274	82,5	3,98	
Интервальная оценка		1850÷2410	733÷1740	456÷551	173÷435	41,8÷163	3,37÷4,70	

Таблица ПБ-4 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/г) в головном мозге крыс после в/в введения препарата в дозе 500 мг/кг

№№	Время после введения						
	п/п	0	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч
1	нпч	152	57,0	-	70,0	4,4	нпч
2	нпч	110	103	-	9,9	2,8	нпч

3	нпч	68,5	74,0	44,5	12,7	1,5	нпч
4	нпч	213	120	7,40	17,9	2,1	нпч
5	нпч	13,5 ⁱⁱ	37,6	48,2	18,5	2,3	нпч
M_G		80,3	72,3	25,1	19,7	2,5	
Интервальная оценка		27,3÷236	45,3÷115	8,7÷72,6	9,27÷41,8	1,7÷3,7	

Таблица ПБ-5 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/г) в печени крыс после в/в введения препарата в дозе 500 мг/кг

№ /п	Время после введения						
	0	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч
нпч	291	199	-	65,7	9,9	нпч	
нпч	322	296	-	64,5	6,4	0,5	
нпч ^н	188	223	120	36,3	3,7	1,2	
нпч ^н	262	190	150	76,1	4,2	нпч	
нпч ^н	18,8 ⁱⁱ	170	168	36,1	5,9	1,5	
M_A							0,64
SD							0,69
M_G	261	212	145	53,1	5,7		
Интервальная оценка	206÷329	171÷261	122÷172	37,2÷75,7	3,8÷8,3		

Таблица ПБ-6 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/г) в почках крыс после в/в введения препарата в дозе 500 мг/кг

№ п/п	Время после введения						
	0	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч
нпч	1090	900	-	546	10,2	нпч	

	нпч	1930	740	-	120	16,8	0,76
	пч ^н	895	1430	-	219	6,35	1,2
	пч ^н	2480	1410	107	336	28,4	0,75
	пч ^н	17,3 ⁱⁱ	1110	3290	169	16,5	4,81
	<i>M_A</i>						1,5
	<i>SD</i>						1,9
	<i>M_G</i>	1470	1100	594	240	14,4	
Интервальная оценка		91 2÷2370	82 9÷1447	52,6÷ 6700	13 3÷435	7,95 ÷25,5	

Таблица ПБ-7 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/г) в тканях крыс через 1 ч после/в введения препарата в дозе 100 мг/кг

№№ п/п	Ткань		
	Головной мозг	Печень	Почки
1	8,95	30,7	54,0
2	3,53	17,5	100
3	2,53	11,7	36,0
4	5,65	14,8	47,1
5	3,13	17,9	48,3
<i>M_G</i>	4,27	17,5	53,7
Интервальная оценка	2,57÷7,09	12,3÷25,0	36,7÷78,5

Таблица ПБ-8 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция в моче крыс и объемы суточной мочи, собранные после в/в введения препарата

№№ крысы	Доза в мг/кг								
	5			20			100		
	Концентрация препарата, мкг/мл		Объем мочи, мл	Концентрация препарата, мкг/мл		Объем мочи, мл	Концентрация препарата, мкг/мл		Объем мочи, мл
	До обработки глюкуро- нидазой	После обработки глюкуро- нидазой		До обработки глюкуро- нидазой	После обработки глюкуро- нидазой		До обработки глюкуро- нидазой	После обработки глюкуро- нидазой	

1	351	350	2,4	1400	1520	2,4	3520	3460	3,7
2	572	545	2,4	1180	985	5,2	5530	5707	3,5
3	223	319	4,4	745	734	6,7	1910	1890	3,1
4							5000	4570	3,8
5							3570	4450	3,4

Таблица ПБ-9 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/мл) в сыворотке крови крыс после в/м введения в дозе 100 мг/кг

№№ п/п	Время после введения							
	0	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	6 ч
1	нпч	157	113	137	73	8,4	нпч	нпч
2	нпч	116	164	91	60	3,7	нпч	нпч
3	нпч	90	115	116	69	6,3	нпч	нпч
4	нпч	138	160	126	59	6,7	нпч	нпч
5	нпч	138	140	140	42	6,2	нпч	нпч
M_G		126	137	121	60	6,05		
Интервальная оценка		101÷ 156	115÷ 163	101÷ 144	48÷ 74	4,48÷ 8,18		

Таблица ПБ-10 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/мл) в сыворотке крови кроликов после в/в введения препарата в дозе 50 мг/кг

№№ п/п	Время после введения								
	0	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч	24 ч
1	нпч	102	51,8	25,3	6,01	1,42	0,99	0,74	нпч
2	нпч	179	48,3	19,7	6,66	1,30	0,22	0,51	0,12
3	нпч	241	121	14,3	12,4	0,53	0,55	0,22	нпч
4	нпч	62	75,8	71,7	13,4	11,60	2,60	0,54	нпч
5	нпч	210	40,3	75,2	12,8	2,30	2,20	0,49	нпч
6	нпч	126	72,3	37,7	10,6	6,47	0,39	нпч	нпч

M_A							0,42	
SD							0,26	
M_G	139	63,7	33,6	9,83	2,35	0,80		
Интервальная оценка	83,4÷ 231	42,8÷ 94,7	17,0÷ 66,6	6,91÷ 14,0	0,76÷ 7,29	0,30÷ 2,13		

Таблица ПБ-11 - Концентрация гидроксиникотиноилглутамат кальция (мкг/г) в сыворотке крови кроликов после в/м введения препарата в дозе 50 мг/кг

№№ п/п	Время после введения								
	0	5 мин	15 мин	30 мин	1 ч	2 ч	4 ч	8 ч	24 ч
1	нпч	63,0	37,9	41,7	15,3	4,36	0,91	0,089	нпч
2	нпч	55,4	45,7	25,4	14,0	6,56	0,88	0,064	нпч
3	нпч	63,0	55,0	41,7	27,8	14,8	2,38	0,097	нпч
4	нпч	40,6	28,4	18,9	14,1	10,8	2,43	нпч	нпч
5	нпч	37,0	35,4	26,6	24,3	8,34	1,86	0,232	нпч
6	нпч	30,2	36,1	30,1	9,36	14,8	2,0	нпч	нпч
M_A								0,080	
SD								0,085	
M_G	46,4	38,9	29,6	16,3	9,09	1,61			
Интервальная оценка	34,1÷ 63,1	31,0÷ 48,8	21,8÷ 40,2	11,0÷ 24,4	5,62÷ 14,7	1,00÷ 2,56			

Приложение В Количественное определение гидроксиникотиноилглутамат кальция

Таблица ПБ-1 - Метрологические характеристики метода определения гидроксиникотиноилглутамината

Дата анализа	Q1 / Q3 массы, а.е.	Уравнение градуировочного графика	Диапазон линейности, мкг/мл	Коэффициент корреляции	ПО, мкг/мл	ПКО, мкг/мл
18.04.2012	269,2 / 122,3	$Y=9,31e-4 \cdot X$	0,03-10	0,9995	10	30
19.04.2012	269,2 / 122,3	$Y=8,57e-4 \cdot X$	0,1-6	0,9995	10	30

Таблица ПБ-2 - Валидация метода по показателю «Точность»

Концентрация, мкг/мл	Введено, мкг/мл	Точность в течение одного дня (19.04.2012)			Вывод
		Найдено, мкг/мл	Точность, %	Критерий пригодности	
0,1	0,1	0,095	95	Не менее 85% и не более 115%	Метод является точным в интервале концентраций 0,1 – 10 мкг/мл
	0,1	0,104	104		
	0,1	0,0952	95,2		
	0,1	0,0949	94,9		
	0,1	0,0996	99,6		
1,0	1,0	0,973	97,3		
	1,0	1,00	100		
	1,0	0,994	99,4		
	1,0	1,02	102,0		
	1,0	1,03	103,0		
10	10,0	10,4	104,0		
	10,0	10,5	105,0		
	10,0	10,6	106,0		
	10,0	9,85	98,5		
	10,0	9,41	94,1		

Таблица ПБ-3 - Валидация метода по показателю «Стабильность»

Введение контрольно го раствора	Концентрация в контрольном растворе, мкг/мл	Определено, мкг/мл	Точность,%	Критерий пригодности	
Контроль 1 после 60 и.о.	1,0	0,905	91	Не менее 85% и не более 115%	
		0,847	85		
Контроль 2 после 120 и.о.		0,86	86		
		0,86	86		
Контроль 3 после 216 и.о.		0,91	91		
		0,91	91		
Контроль 4 после 300 и.о.		1,5	1,56		104
			1,63		109
	1,54		103		

Контроль 5 после 360 и.о.		1,68	112	
Контроль 6 после 420 и.о.		1,75	117	
		1,84	123	
Контроль 4 после 480 и.о.		1,65	110	
Вывод: калибровочная зависимость стабильна в ходе проведенного исследования				

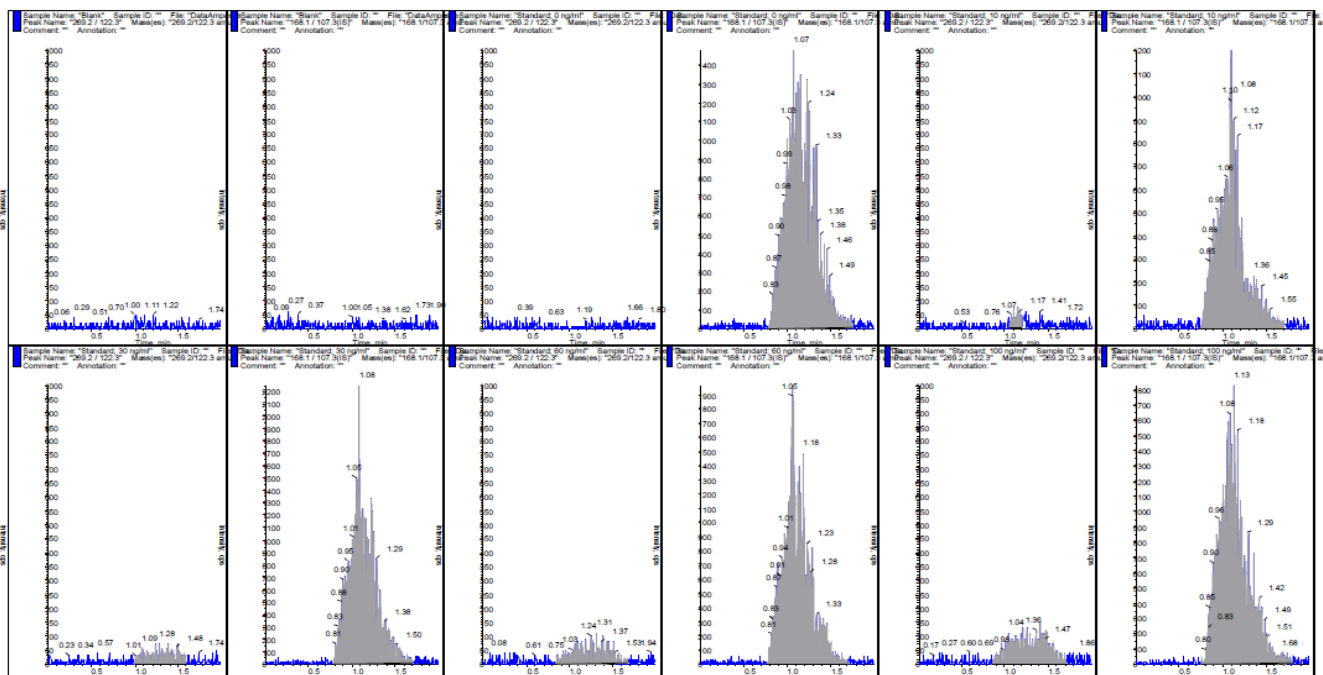


Рисунок ПБ-4 - Хроматограммы интактной плазмы крови (1-3); плазмы крови с введением 10, 30, 60 и 100 нг/мл гидроксиникотиноилглутамината (5, 7, 9, 11 соответственно); на четных хроматограммах (кроме второй) наблюдается пик внутреннего стандарта.

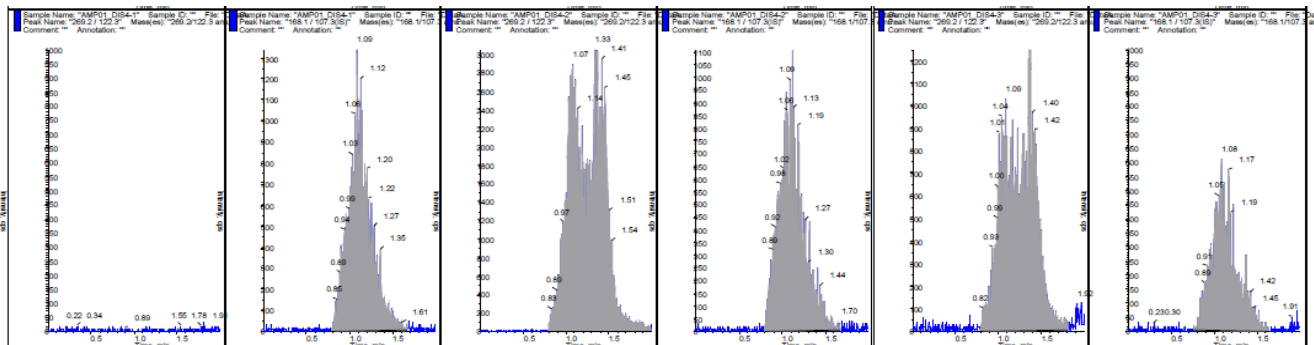


Рисунок ПБ-5 - Хроматограммы образцов плазмы № 1 – 3 добровольца с № 4 после приема исследуемого препарата (на хроматограммах 1, 3, 5 – пик гидроксиникотиноилглутамината, а на хроматограммах 2, 4, 6 – пик внутреннего стандарта).

Приложение В. Макро и микроскопические исследования

Макроскопическое исследование I группы (контроль, самцы и самки) показало:

неповрежденные кожные покровы и костный скелет; обычное расположение внутренних органов; гладкие, влажные, серые, блестящие в виде пленки серозные оболочки; наполненные темной жидкой кровью полости сердца, вены и венозные синусы;

головной мозг с извилинами и бороздами; оболочки мозга тонкие, гладкие, блестящие, полнокровные, четкие границы серого и белого вещества головного и спинного мозга;

ткань мозга блестит на разрезах, очаговые изменения в ней отсутствуют (в соответствии с Таблица ПВ-1).

Макроскопическое исследование II группы (гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг (самцы и самки)) (в соответствии с Таблица ПВ-2).

По данным макроскопического исследования токсического действия гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 6,7 мг/кг на данную группу животных не выявлено.

Макроскопическое исследование III группа: гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг (самцы и самки)) показало: слизистые оболочки влажные, блестящие. Неповрежденные кожные покровы и костный скелет, обычное расположение внутренних органов. Серозные покровы тонкие, гладкие, блестящие, влажные, серые, наполненные темной жидкой кровью полости сердца, вены и венозные синусы. (в соответствии с Таблица ПВ-3). Патологических изменений не обнаружено. По данным макроскопического исследования токсического поражения внутренних органов под влиянием гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг у животных данной группы не выявлено.

Микроскопическое исследование I группы (контроль, самцы и самки).

Светооптический анализ структур изученных органов у всех животных данной группы демонстрирует однотипные результаты (в соответствии с Таблица ПВ-4).

Микроскопические данные в совокупности с результатами макроскопического анализа свидетельствуют о том, что контрольную группу составили практически здоровые животные.

Микроскопическое исследование II группа гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг (контроль, самцы и самки) (в соответствии с Таблица ПВ-5).

Патологических изменений внутренних органов и местнораздражающего действия у животных этой группы под влиянием 3-месячного внутрижелудочного введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 6,7 мг/кг не выявлено.

Микроскопическое исследование III группа гидроксиникотиноилглутамат кальция группа 13,4 мг/кг (самцы и самки) (в соответствии с Таблица ПВ-6).

Патологических изменений во внутренних органах у животных данной группы и местнораздражающего действия под влиянием 3-месячного внутрижелудочного введения гидроксиникотиноилглутамат кальция в испытанной дозе 13,4 мг/кг не выявлено.

Таблица ПВ-1 - Макроскопическое исследование I группы (контроль, самцы и самки)

Желудочки мозга	щелевидные, с полнокровными, сосудистыми венозными сплетениями и небольшим количеством прозрачной жидкости.
Гипофиз	округлый, инкапсулированный, бледно-серый.
Щитовидная железа	обе доли расположены симметрично, полнокровные, красноватые, мелкозернистые. Выделяются 4 мелкие белесоватые паращитовидные железки. Слюнные железы инкапсулированы, плотные, серые, дольчатые.
Тимус	дольчатый
В трахее и главных бронхах	следы слизи, слизистая оболочка их гладкая, блестящая. Легкие воздушные, покрыты тонкой плеврой сероватого цвета.
Сердце	с полупрозрачными гладкими створками клапанов и тонким, гладким, блестящим эндокардом, серо-красным, сочным, без очаговых изменений, плотным миокардом, обычным рисунком расположения коронарных артерий и вен.
Интима ствола легочной артерии и аорты	гладкая, блестящая
Пищевод	с гладкой, блестящей, полнокровной слизистой оболочкой
Брюшина	гладкая, тонкая, блестящая.
Лимфатические узлы брюшины	инкапсулированы, не увеличены, плотные, на разрезе сероватые.
Селезенка	с гладкой капсулой, плотная, пульпа красная, без соскоба, фолликулы не различимы.
Печень	дольчатая, плотная, с гладкой капсулой, красно-коричневая, на разрезе полнокровная.
Поджелудочная железа	в капсуле, плотная, дольчатая, розового цвета.
Надпочечники	овальной формы, плотные, с четким делением паренхимы на мозговой и корковый слои.
Почки	плотные, с гладкой поверхностью, легко снимающейся капсулой, четкой границей красноватой коры и бледно-серого мозгового слоя, слизистая оболочка лоханок и мочевого пузыря тонкая, гладкая, блестящая.
Желудок	формы рога, с тонкими стенками, рельефными, серыми складками слизистой оболочки, без каких-либо очаговых изменений.
Кишечник	содержит окрашенный желчью химус и кашицеобразные, коричневые каловые массы, стенки его тонкие, слизистая оболочка тонкого кишечника

	бархатистая, серовато-розовая, слизистая оболочка толстого - серая, складчатая, очаговых изменений не обнаружено.
Органы репродукции	обычного строения, яички в мошонке и оболочках, упругие, светло-розовые, мелкозернистые; придатки их плотные, белесоватые. Семенные пузырьки ячеистые, белесоватые. Яичники и матка обычного строения без изменений.

Таблица ПВ-2 - Макроскопическое исследование II группы
(гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг (самцы и самки))

Головной мозг	с тонкими, прозрачными, блестящими, полнокровными оболочками. Ткань мозга блестит на разрезе, очаговые изменения в ней отсутствуют. Четкие границы серого и белого вещества.
Желудочки мозга	щелевидные, с серыми, дряблыми, сосудистыми венозными сплетениями и небольшим количеством прозрачной жидкости.
Гипофиз	округлый, бледно-серый.
Щитовидная железа	с симметричным расположением долей, красноватого цвета. На разрезе зернистая, полнокровная. В капсуле видны 4 плотные белесоватые парашитовидные железки.
Слюнные железы.	инкапсулированы, плотные, серые, дольчатые
Тимус	сероватого цвета.
В трахее и главных бронхах	следы слизи, слизистая оболочка их гладкая, блестящая, серовато-красноватого цвета.
Легкие	воздушные, покрыты тонкой, гладкой плеврой сероватого цвета.
Сердце	с полупрозрачными гладкими створками клапанов и тонким, гладким, блестящим эндокардом, серовато-красным, сочным, без очаговых изменений миокардом, обычным рисунком расположения коронарных артерий и вен.
Интима ствола легочной артерии и аорты	тонкая, гладкая, блестящая.
Пищевод.	проходим, слизистая оболочка его гладкая, полнокровная
Селезенка	с гладкой капсулой, плотная, полнокровная. На разрезе пульпа без соскоба, фолликулы не различимы.
Печень	дольчатая, с гладкой капсулой, полнокровная, красно-коричневая.
Поджелудочная железа	в прозрачной капсуле, плотная, серовато-розоватого цвета на разрезе, без изменений.
Надпочечники	овальной формы, плотные, с четким делением паренхимы на мозговой и корковый слои.
Почки	плотные, с гладкой поверхностью, легко снимающейся капсулой, четкой границей красной коры и бледно-серого мозгового слоя, гладкой, слизистой оболочкой лоханок и мочеточников. В мочевом пузыре небольшое количество прозрачной, светлой мочи, слизистая оболочка его складчатая, блестящая.
Желудок	формы рога с тонкими стенками, рельефными, серыми складками слизистой оболочки, без каких-либо очаговых изменений.

Стенки кишечника	тонкие, слизистая оболочка тонкого кишечника бархатистая, розовая, слизистая оболочка толстого - серая, складчатая, очаговых изменений не обнаружено.
Органы репродуктивной системы	обычного строения, яички в мошонке и оболочках, умеренно плотные, светло-розовые, мелкозернистые, придатки их плотные, белесоватые. Семенные пузырьки ячеистые, белесоватые. Яичники и матка обычного строения без изменений.

Таблица ПВ-3 - Макроскопическое исследование III группа:

гидроксиникотиноилглутамат кальция 13,4 мг/кг (самцы и самки))

Головной мозг	с тонкими, прозрачными, блестящими, полнокровными оболочками. Ткань мозга блестит на разрезе, очаговые изменения в ней отсутствуют. Четкие границы серого и белого вещества.
Желудочки мозга	щелевидные, с сосудистыми венозными сплетениями и небольшим количеством прозрачной жидкости.
Гипофиз	округлый, бледно-серый.
Щитовидная железа	с симметричным расположением долей, красноватого цвета. На разрезе зернистая, полнокровная. В капсуле видны 4 плотные белесоватые паращитовидные железки.
Слюнные железы	инкапсулированы, плотные, серые, дольчатые.
Тимус	сероватого цвета.
В трахее и главных бронхах	следы слизи, слизистая оболочка бронхов гладкая, блестящая, серовато-красноватого цвета.
Легкие	покрыты тонкой, гладкой плеврой сероватого цвета.
Сердце	с полупрозрачными гладкими створками клапанов и тонким, гладким, блестящим эндокардом, серовато-буроватым, сочным, без очаговых изменений миокардом, обычным рисунком расположения коронарных артерий и вен.
Интима ствола легочной артерии и аорты.	тонкая, гладкая, блестящая
Пищевод	проходим, слизистая оболочка его гладкая. полнокровная.
Селезенка	с гладкой капсулой, плотная, полнокровная, на разрезе пульпа без соскоба, фолликулы не различимы.
Печень	дольчатая, с гладкой капсулой, полнокровная, красно-коричневая.
Поджелудочная железа	в прозрачной капсуле, плотная, серовато-розоватого цвета на разрезе, без особенностей.
Надпочечники	овальной формы, плотные, с четким делением паренхимы на мозговой и корковый слои.
Почки	плотные, с гладкой поверхностью, легко снимающейся капсулой, четкой границей красной коры и бледно-серого мозгового слоя, гладкой, слизистой оболочкой лоханок и мочеточников. В мочевом пузыре небольшое количество прозрачной, светлой мочи, слизистая оболочка его складчатая, блестящая.
Желудок	формы рога с тонкими стенками, рельефными, серыми складками слизистой оболочки, без каких-либо очаговых изменений.
Стенки кишечника	тонкие, слизистая оболочка тонкого кишечника бархатистая, розовая, слизистая оболочка толстого - серая, складчатая, очаговых изменений не обнаружено.

Органы репродукции у самцов и самок обычного строения.	Патологических изменений не обнаружено. По данным макроскопического исследования токсического поражения внутренних органов под влиянием гидроксиникотиноилглутамат кальция в дозе 13,4 мг/кг у животных данной группы не выявлено.
--	--

Таблица ПВ-4 - Микроскопическое исследование I группы (контроль, самцы и самки)

В головном мозге	нейроны больших полушарий имеют пирамидальную или полигональную форму, окружены бесструктурными глиальными клетками с четким ядром. В подкорковом слое пучки нейроволокон различной природы, скопления нейронов в виде отдельных ядер.
Гипофиз	петли полнокровных капилляров в передней доле окружены секреторными клетками с преимущественно оксифильной цитоплазмой. Фолликулы в средней доле округлой формы, многочисленны, заполнены бесструктурным коллоидом. В задней доле нейропиль, единичные фолликулы.
Слюнные железы	состоят из интенсивно базофильных железистых клеток, слюновыводящие протоки свободные, выстланы призматическим эпителием, строма развита слабо.
Щитовидная железа	строма развита слабо, фолликулы выстланы кубическим эпителием, имеют овальную форму, заполнены бесструктурным коллоидом, сосуды полнокровны.
Тимус	имеет дольковое строение, лимфоциты расположены преимущественно в корковом отделе, в мозговом отделе лимфоциты менее многочисленные.
Легкие	хорошо расправленные альвеолы, просветы их свободные, стенки альвеол тонкие, сосуды полнокровные. В просветах крупных бронхов незначительное количество бесструктурного экссудата. Бронхиолы и бронхи выстланы кубическим и призматическим эпителием.
Сердце	эпикард и эндокард представлены тонкими листками соединительной ткани с включением фибробластов. Крупные субэпикардальные и интрамиокардиальные ветви коронарных артерий тонкостенные, выстланы упорядоченным эндотелием, с выраженной базальной мембраной, медией и адвентицией. Кардиомиоциты с тонкой сарколеммой, оксифильной саркоплазмой и расположенными периферически базофильными овальными ядрами.
Кора надпочечников.	мелкие железистые клетки расположены послойно. В мозговом слое - полигональные хромаффинные клетки, свободные синусы
Почки	почечные тельца округлой формы, субкапсулярная полость свободна, структура капиллярных петель сохранена. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев без изменений, петли Генле с апикально ориентированными ядрами, лоханки выстланы переходным эпителием. Сосуды полнокровны, с сохранным эндотелием.
Печень	строма развита слабо, печеночные дольки призматической и овальной формы, центральные вены свободные, гепатоциты с четкой структурой, синусоидные капилляры полнокровные. Портальные тракты имеют обычный рисунок строения.
Поджелудочная железа	равномерно базофильные экскреторные железистые клетки ацинусов, эпителиальная выстилка выводящих протоков не повреждена. Островковый

	аппарат в тонкой капсуле, содержит светлые полиморфные клетки обычной структуры.
Слизистая оболочка желудка	представлена трубчатыми железами, выстланными цилиндрическим эпителием, в котором различимы щечные, париетальные и обкладочные клетки, подслизистый слой представлен рыхлой соединительной тканью с неповрежденными сосудами, мышечная оболочка с разнонаправленными пучками гладких мышечных клеток, серозная оболочка покрыта мезотелием.
Тонкая и толстая кишки	имеют обычный рисунок строения.
Капсула и трабекулы селезенки.	не утолщены. Паренхима состоит из обширных синусов, содержащих эритроциты, лимфоциты и ретикулярные клетки, лимфоидные фолликулы обычных размеров
В лимфатических узлах	полиморфные фолликулы из мелких лимфоидных клеток, слабо развитая строма.
Органы репродуктивной системы	обычного строения.

Таблица ПВ-5 - Микроскопическое исследование II группа гидроксиникотиноилглутамат кальция 6,7 мг/кг (контроль, самцы и самки)

В головном мозге	нейроны больших полушарий имеют пирамидальную или полигональную форму, окружены бесструктурными глиальными клетками с четким ядром. Незначительный периваскулярный отек. Сосудистая сеть развита умеренно.
В передней доле гипофиза	многочисленные синусоидные капилляры, окруженные клетками с преимущественно оксифильной цитоплазмой. В средней доле небольшие фолликулы с бесструктурным коллоидом. В задней доле – нейропиль, единичные фолликулы.
Щитовидная железа	представлена крупными фолликулами, выстланными кубическим эпителием и заполненные бесструктурным коллоидом, строма развита слабо.
Железистые клетки слюнных желез	со светлой цитоплазмой, структурным ядром выстилают свободно проходимые секреторные пути.
Тимус	имеет четкое дольковое строение. В дольках различимо мозговое и корковое вещество. В коре - скопления лимфоидных клеток. В мозговом веществе - ретикулоэпителий, немногочисленные клетки лимфоидного ряда.
В легких	основное поле зрения занимают округлые, хорошо расправленные альвеолы с тонкими стенками и свободным просветом. Бронхи и бронхиолы выстланы кубическим и призматическим эпителием. Строма полнокровна.
Сердце	эпикард и эндокард представлены тонкими листками соединительной ткани с включением фибробластов. Крупные субэпикардальные и интрамиокардиальные ветви коронарных артерий тонкостенные, выстланы упорядоченным эндотелием, с выраженной базальной мембраной, медией и адвентицией. Миокард состоит из кардиомиоцитов с тонкой сарколеммой, оксифильной саркоплазмой и периферически расположенными базофильными овальными ядрами.

Экскреторный отдел поджелудочной железы	представлен базофильными железистыми клетками и ацидофильными клетками выводящих протоков. Строма развита слабо, просветы протоков свободные. Инкреторные клетки сгруппированы в виде отдельных островков слабо оксифильных клеток, ограниченных от окружающих тканей общей стромальной капсулой. Структура не нарушена.
В коре надпочечников	мелкие железистые клетки с послойным расположением. Мозговой слой представлен полигональными хромаффинными клетками, синусы свободные.
В почках	в корковом слое клубочки с сохранной структурой капиллярных петель, тонкой капсулой. Стенки канальцев нефрона имеют строение, соответствующее его отделам, просветы их свободны.
В печени	гепатоны состоят из радиально ориентированных гепатоцитов с сохранной структурой. Портальные тракты содержат артерии, вены и желчные протоки. Центральные вены свободны, стенки их тонкие.
Желудок	Основную долю стенки занимает слизистая оболочка, выстланная неповрежденным железистым эпителием, имеющая в своем составе собственные трубчатые железы. В подслизистой – рыхлая неоформленная соединительная ткань, многочисленные скопления железистых, лимфоидных клеток, густая сеть микроциркуляторного русла. Пучки гладкомышечных клеток ориентированы послойно, покрыты снаружи мезотелием.
Тонкая и толстая кишки	обычного гистологического строения.
Селезенка	состоит из обширных синусов, содержащих эритроциты, лимфоидных фолликулов обычных размеров. Капсула и трабекулы не утолщены.
Лимфатические узлы	умеренная пролиферация ретикулоэндотелиальных элементов, полнокровны, краевые синусы расширены.
Органы репродуктивной системы	обычного гистологического строения.

Таблица ПВ-6 - Микроскопическое исследование III группа гидросиникотиноилглутамат кальция группа 13,4 мг/кг (самцы и самки)

В головном мозге	нейроны больших полушарий имеют пирамидальную или полигональную форму, окружены бесструктурными глиальными клетками с четким ядром. Сосудистая сеть развита умеренно.
В передней и средней долях гипофиза	многочисленные синусоидные капилляры, окруженные клетками с преимущественно оксифильной цитоплазмой. В средней доле многочисленные фолликулы. В задней доле – нейропиль, единичные фолликулы
Щитовидная железа	представлена крупными фолликулами, выстланными кубическим эпителием и заполненные бесструктурным коллоидом, строма развита слабо.
Железистые клетки слюнных желез	со светлой цитоплазмой, структурным ядром выстилают свободно проходимые секреторные пути.
Тимус	имеет четкое дольковое строение. В дольках различимо мозговое и корковое вещество. В коре - обширные скопления лимфоидных клеток. В мозговом веществе - ретикулоэпителий, немногочисленные клетки лимфоидного ряда.

В легких	основное поле зрения занимают округлые, хорошо расправленные альвеолы с тонкими стенками и свободным просветом. Бронхи и бронхиолы выстланы кубическим и призматическим эпителием.
Сердце	эпикард и эндокард представлены тонкими листками соединительной ткани с включением фибробластов. Крупные субэпикардальные и интрамиокардиальные ветви коронарных артерий тонкостенные, выстланы упорядоченным эндотелием, с выраженной базальной мембраной, медией и адвентицией. Миокард состоит из кардиомиоцитов с тонкой сарколеммой, оксифильной саркоплазмой и периферически расположенными базофильными овальными ядрами.
Экскреторный отдел поджелудочной железы	представлен базофильными железистыми клетками и ацидофильными клетками выводящих протоков. Строма развита слабо, просветы протоков свободные. Инкреторные клетки сгруппированы в виде отдельных островков слабо оксифильных клеток, ограниченных от окружающих тканей общей стромальной капсулой. Структура не нарушена.
В коре надпочечников	послойное расположение железистых клеток, в мозговом слое – полигональные хромаффинные клетки, свободные синусы.
В почках	в корковом слое клубочки с сохранной структурой капиллярных петель, тонкой капсулой. Стенки канальцев нефрона имеют строение, соответствующее его отделам, просветы их свободны.
В печени	гепатоны состоят из радиально ориентированных гепатоцитов с сохранной структурой, синусоиды полнокровны. Портальные тракты содержат артерии вены и желчные протоки. Центральные вены свободны, стенки их тонкие.
Желудок	Основную долю стенки занимает слизистая оболочка, выстланная неповрежденным железистым эпителием, имеющая в своем составе собственные трубчатые железы. В подслизистой - рыхлая неоформленная соединительная ткань, многочисленные скопления железистых, лимфоидных клеток, густая сеть микроциркуляторного русла. Пучки гладкомышечных клеток ориентированы послойно, покрыты снаружи мезотелием.
Тонкая и толстая кишка	обычного строения.
Селезенка	состоит из обширных синусов, содержащих эритроциты, лимфоидных фолликулов обычных размеров. Капсула и трабекулы не утолщены.
Лимфатические узлы	умеренная пролиферация ретикулоэндотелиальных элементов, полнокровны, краевые синусы расширены.
Органы репродуктивной системы	обычного гистологического строения.