НЕЙРОТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СОЕДИНЕНИЯ РУ-891 С АНТИТРОМБОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ

**А.А. Спасов^{1,2}, А.Ф. Кучерявенко¹, Д.В. Мальцев^{1,2}, М.В. Мирошников¹,
В.С. Сиротенко¹, К.Т. Султанова¹, К.А. Гайдукова¹, М.О. Скрипка¹**

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
кафедра фармакологии и биоинформатики;
²ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр»,
Лаборатория экспериментальной фармакологии

В настоящем исследовании представлены результаты изучения нейротоксикологического профиля нового соединения РУ-891 с антитромботическими свойствами. Использовалась методика многотестового наблюдения по «S. Irwin». Показатели тестов оценивали в параллельных группах, получавших вещество в дозах, начинающихся со средней эффективной (ЭД₅₀) и с кратным увеличением в 10, 20, 50 раз. В результате проведенного изучения выявлено, что для нейротоксикологических свойств соединения РУ-891 характерна дозозависимая активность. Было установлено, что при введении животным соединения РУ-891 в средней эффективной дозе – 23 мг/кг и дозах, превышающих эффективную в 10 и 20 раз, нейротоксикологические изменения в поведении животных не наблюдаются и состояние животных соотносится с таковым контрольной группы. Наиболее значимые эффекты при введении изучаемого соединения – пассивность, угнетение рефлекторных реакций, нарушение тонуса конечностей – развивались в высоких дозах, превышающих эффективную в 20 и 50 раз. Были определены границы минимальной токсической дозы (ТД_{мин}) для соединения РУ-891 при пероральном введении: 230 мг/кг < ТД_{мин} ≤ 460 мг/кг.

Ключевые слова: РУ-891, антиагрегантная терапия, нейропсихотропная активность, методика многотестового наблюдения по «S. Irwin».

DOI 10.19163/1994-9480-2019-3(71)-116-119

NEUROTOXICOLOGICAL PROPERTIES COMPOUND OF RU-891 WITH ANTITHROMBOGENIC ACTIVITY

**A.A. Spasov^{1,2}, A.F. Kucherjavenko¹, D.V. Mal'cev^{1,2}, M.V. Miroshnikov¹,
V.S. Sirotenko¹, K.T. Sultanova¹, K.A. Gajdukova¹, M.O. Skripka¹**

¹FSBEI HE «Volgograd State Medical University» of Public Health Ministry of the Russian Federation,
Department of pharmacology and bioinformatics;
²SBI «Volgograd Medical Scientific Centre», Laboratory of experimental pharmacology

This study presents the results of studying the neurotoxicological profile of the new compound RU-891 with antithrombotic properties. Is-used technique mnogorazovogo observations «S. Irwin». Test parameters were evaluated in parallel groups, receiving the substance in doses beginning with the average effective (ED₅₀) and with a multiple increase of 10, 20, 50 times. The study revealed that the neurotoxicological properties of compound RU-891 are characterized by dose-dependent activity. It was found that the introduction of animal compounds PY-891 in the average effective dose-23 mg/kg and a dose exceeding the effective 10 and 20 times neurotoxicological changes in animal behavior are not observed and the state of the animals correlated with that of the control group. The most significant effects in the introduction of the studied compound – passivity, inhibition of reflex reactions, impaired limb tone-developed in high doses, exceeding the effective 20 and 50 times. The borders were identified, the minimum toxic dose (TD_{min}) to connect PY-891 when administered orally: 230 mg/kg < TD_{min} ≤ 460 mg/kg.

Key words: RU-891, antiplatelet therapy, neuropsychotherapy activity, methods «S. Irwin».

Тромбообразованию отводится ключевая роль в патогенезе ишемической болезни сердца, инсульта, осложнений сахарного диабета и других нарушений кровоснабжения органов и тканей [9]. Для снижения риска таких нарушений используют различные методы и препараты, уменьшающие повышенную функциональную активность тромбоцитов, так как именно агрегация последних выполняет первостепенную роль в начальных, пусковых механизмах свертывания крови [8, 10]. Поэтому антиагрегантная терапия способна уменьшать риск развития тромбозов и предотвращать острую коронарную смерть. Современные антиагрегантные средства

не всегда удовлетворяют предъявляемым к ним требованиям ввиду наличия побочных эффектов.

Химический класс замещенных гетероциклических азотосодержащих соединений считается перспективным для создания на его основе новых препаратов, о чем свидетельствует широкий спектр проявляемой биологической активности [2, 3]. В ранее проведенных исследованиях установлена способность нового производного бензимидазола соединения РУ-891 снижать тромбогенный потенциал крови [5, 6]. Данные результаты позволяют судить о достаточно высокой эффективности выявленного соединения и о необходимости дальнейшего

углубленного изучения спектра его свойств, а также возможных токсических эффектов [7]. При рассмотрении нейротоксикологического профиля производных бензимидазола [4], к которым относится и соединение РУ-891, отмечается значительная степень возникновения различных нейropsychотропных эффектов: анксиолитических, анальгетических, антидепрессантных, снотворных, амнестических и миорелаксирующих. Данная широта фармакологического действия влечет за собой необходимость подробного изучения функционально-поведенческого статуса животных, нейросоматического и психотропного качеств. В рамках дальнейшего изучения и определения широты терапевтического диапазона соединения РУ-891 в настоящей работе были исследованы его нейротоксикологические свойства – с использованием многотестового наблюдения по «S. Irwin» [1]. Используемая модификация метода S. Irwin позволяет изучить влияние фармацевтической субстанции на общеклиническое состояние животных и оценить ее нейротоксический потенциал.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить нейротоксикологические свойства соединения РУ-891 при пероральном введении половозрелым мышам-самцам с использованием многотестового наблюдения по «S. Irwin».

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на половозрелых мышах-самцах, массой от 18 до 22 г, в количестве 36 особей, из которых было сформировано 5 экспериментальных групп – одна контрольная и 4 опытных. Все процедуры с животными в исследовании проведены в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (1986) и с учетом Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997), а также требований Директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22.09.2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Экспериментальное исследование одобрено Региональным исследовательским этическим комитетом Волгоградской области (регистрационный номер IRB 00005839 IORG 0004900 (OHRP)) протокол № 2032-2017 от 26.06.2017 г.

Соединение РУ-891 гидробромид 9-[2-(3,4-диоксифенил)-2-оксоэтил]-2,3-дигидроимидазо[1,2-a] бензимидазол было синтезировано в НИИ ФОХ ЮФУ г. Ростов на Дону, О.Н. Жуковской.

При изучении общетоксических свойств тестируемый образец растворяли в дистиллированной воде и вводили мышам перорально (атравматичным металлическим зондом) в средней эффективной дозе 23 мг/кг, условно принятую за терапевтическую,

а также в дозе 230 мг/кг (в 10 раз превышающей терапевтическую дозу), 460 мг/кг (в 20 раз превышающей терапевтическую дозу) и 1150 мг/кг (в 50 раз превышающей терапевтическую дозу). Контрольной группе животных вводился растворитель. Объем вводимых образцов был рассчитан индивидуально для каждой особи, исходя из массы ее тела – 0,1 мл на 100 г живого веса. Исследование нейротоксикологического профиля соединения РУ-891 проводилось по методу «S. Irwin» в модификации [1]. Оценивали спектр изменений поведенческих реакций (настороженность, пассивность, агрессия, беспокойство, спонтанная двигательная активность), нервно-мышечных (судороги, парезы, тремор, реакции на раздражители) и вегетотропных эффектов (размер зрачка, птоз верхнего века, урикации, дефекации, саливации, цвет кожи, частота дыхания, температура тела). Каждый параметр в норме был приравнен к 4 баллам; изменение его на 25 % обозначалось в 1 балл. Возрастание внешних признаков функционирования препарата указывалось по шкале от 4 до 8 баллов, а снижение – от 4 до 0. В шкале оценок токсического профиля вещества для признаков, отсутствующих в норме или присутствующих незначительно, активность выражалась от 0 до 8 баллов (0 – отсутствие эффекта). Прогнозировалась доклиническая степень безопасности, обозначалась минимальная токсическая доза ($T_{\text{Дмин}}$).

Статистическая обработка полученных данных производилась с применением критерия Краскелла – Уоллиса и посттестом Данн в программе GraphPad Prism v.5.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении общетоксических свойств у животных, получавших соединение РУ-891 в терапевтической дозе (23 мг/кг), отмечалось снижение реакции на болевой раздражитель ко второму часу наблюдения (рис. 1). Других значимых изменений изучаемых показателей данного многопараметрового тестирования не наблюдалось.

При исследовании соединения РУ-891 в дозе 230 мг/кг регистрируемые параметры, характеризующие поведенческие реакции и функциональное состояние вегетативной нервной системы, соответствовали установленной для данной тест-системы норме. Из показателей, описывающих нервно-мышечную возбудимость, через 2 часа после введения тестируемого образца у животных продолжало фиксироваться развитие анальгетического действия. Остальные параметры, в сравнении с группой контроля, не изменились. При введении соединения РУ-891 в дозе 460 мг/кг регистрировались изменения спонтанной двигательной активности, повышение пассивности и настороженности животного, отмечались случаи вокализации. Со стороны вегетативной нервной системы фиксировалось снижение частоты дыхательных движений. На фоне общей седации поведенческих реакций

наблюдалось общее расстройство походки и снижение тонуса конечностей, также снижались реакция на прикосновение и боль.

Рис. 1. Влияние соединения РУ-891 в исследуемых дозах на нейротоксические симптомы у мышей (в баллах, $M \pm m$): 0 – исходные данные, полученные до введения вещества; 1 – значения, полученные через 1 час после введения вещества; 2 – значения, полученные через 2 часа после введения вещества

Для животных на 60-й и 120-й минутах после введения исследуемого соединения в дозе 1150 мг/кг наблюдалась следующая картина интоксикации: снижался показатель двигательной активности животных (пассивность и спонтанная двигательная активность), практически отсутствовал груминг; по сравнению с исходным значением и показателями контрольной группы угнетались рефлекторные реакции (на боль, на прикосновение и на стук), нарушался тонус конечностей, в особенности задних лап, в связи с чем нарушалась походка животного (она становилась шатающейся); указанные симптомы дополнялись снижением частоты дыхательных движений и гипотермией. В целом большинство изучаемых эффектов РУ-891 были дозозависимы. Описанная картина изменений в настоящем многопараметровом тестировании за счет совокупности указанных признаков может свидетельствовать о развитии седации с выраженной вегетотропной симптоматикой у животных. Обобщая полученные результаты, можно сделать заключение об отсутствии значимого нейротоксического влияния соединения РУ-891 в терапевтической дозе, а также в дозе, превышающей ее в 10 раз. С дальнейшим увеличением дозы от 460 мг/кг и выше при введении соединения РУ-891 у животных развивается

выраженная седация, а также отмечается снижение болевой чувствительности (рис. 2, табл.).

Рис. 2. Влияние соединения РУ-891 в исследуемых дозах на спонтанную двигательную активность животных (в баллах, $M \pm m$): 0 – исходные данные, полученные до введения вещества; 1 – значения, полученные через 1 час после введения вещества; 2 – значения, полученные через 2 часа после введения вещества

Дозозависимая динамика изменения параметров функционально-поведенческого статуса мышей при однократном внутрижелудочном введении соединения РУ-891

Показатель	РУ-891			
	ЭД ₅₀	10×ЭД ₅₀	20×ЭД ₅₀	50×ЭД ₅₀
Поведенческие реакции				
Вокализация	-	-	↑	-
Настороженность	-	-	↑	-
Пассивность	-	-	↑	↑
Груминг	-	-	-	↓
Спонтанная двигательная активность	-	-	↓	↓
Нервно-мышечная возбудимость				
Реакция на прикосновение	-	-	↓	↓
Реакция на боль	↓	↓	↓	↓
Реакция на стук	-	-	-	↓
Расстройство походки	-	-	↑	↑
Тонус конечностей	-	-	↓	↓
Вегетативные эффекты				
Температура	-	-	-	↓
ЧДД	-	-	↓	↓

Примечание. ЭД₅₀ – средняя эффективная доза РУ-891/доза эквивалентная средней эффективной дозе РУ-891; ↓ – изменения, связанные с ослаблением тестируемого показателя; ↑ – изменения, связанные с усилением тестируемого показателя; «-» – отсутствие изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате исследования общетоксических свойств соединения РУ-891 установлено, что в средней эффективной дозе и дозе, превышающей среднюю эффективную в 10 раз, не характерно влияние на функциональное состояние вегетативной

нервной системы и поведение животных, а среди спектра исследуемых эффектов нервно-мышечного статуса отмечается снижение чувствительности к болевому раздражению. Доза 460 мг/кг при внутривенном введении у мышей-самцов предварительно, условно, может быть обозначена как начальная, вызывающая токсические реакции, и может быть рекомендована для более детального исследования при изучении хронической токсичности на следующем этапе доклинического исследования. Выявленные изменения нейрофункционального статуса у мышей позволяют предварительно обозначить минимальную токсическую дозу (ТД_{мин}) для соединения РУ-891 при пероральном введении: 230 мг/кг < ТД_{мин} ≤ 460 мг/кг, а также охарактеризовать клиническую картину возможной передозировки РУ-891. Наиболее значимыми из симптомов являются: седация, снижение рефлекторных реакций на внешние раздражители и тонуса мышц; со стороны вегетативной нервной системы – брадикардия и гипотермия. По результату проведенного исследования можно сделать вывод, что соединение РУ-891, обладающее способностью снижать тромбогенный потенциал крови, является низкотоксичным веществом, перспективным для углубленного доклинического изучения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бугаева Л.И. Нейротоксикологические свойства препарата «Бендазол» / Л.И. Бугаева, Е.А. Кузубова, М.В. Букатин, А.А. Спасов // Вестник ВолгГМУ. – 2012. – № 2. – С. 83–86.
2. Кучерявенко А.Ф. Антиагрегантная активность нового производного бензимидазола / А.Ф. Кучерявенко, А.А. Спасов, В.И. Петров и др. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 156, № 12. – С. 760–762.
3. Кучерявенко А.Ф. Антиагрегантная активность нового трициклического производного 2,3,4,5-тетрагидро [1,3]дiazеино[1,2-а]бензимидазола / А.Ф. Кучерявенко, В.А. Анисимова, К.А. Гайдукова, Л.Н. Диваева, А.А. Спасов и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2016. – Т. 79, № 5. – С. 29–32.
4. Спасов А.А. и др. Анксиолитический потенциал нового ряда производных diaзепинобензимидазола // Вестник ВолгГМУ. – 2018. – № 3 (67).
5. Спасов А.А. Анти тромботическая активность нового производного бензимидазола на модели тромбоза у мышей / А.А. Спасов, А.В. Смирнов, А.Ф. Кучерявенко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2014. – Т. 157, № 5. – С. 595–598.
6. Спасов А.А. Анти тромботическая активность соединения РУ-891 / А.А. Спасов и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2013. – Т. 76, № 6. – С. 25–26.
7. Спасов А.А. Кальций-зависимый механизм антиагрегантного действия соединения РУ-891 / А.А. Спасов, А.Ф. Кучерявенко, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 3. – С. 16–19.
8. Anisimova V.A. Synthesis and biological activity of n-acylmethyl derivatives of 9h-2,3-dihydroimidazo- and 10h-2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazoles and their reduction products / V.A. Anisimova, A.F. Kucheryavenko, A.A. Spasov, et al. // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2006. – Vol. 40, № 5. – P. 261–267.
9. Anisimova V.A. Synthesis and pharmacological activity of 3-aroyl and 3-hetaroylimidazo[1,2-a] benzimidazoles / V.A. Anisimova, A.A. Spasov, O.V. Ostrovskii, G.P. Dudchenko, V.A. Kosolapov, A.F. Kucheryavenko, et al. // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2002. – Vol. 36, № 12. – P. 637–642.
10. Mozaffarian D. Heart disease and stroke statistics (a report from the American Heart Association) / D. Mozaffarian, E.J. Benjamin, A.S. Go, D.K. Arnett, M.J. Blaha, et al. // Circulation. – 2016. – № 133. – P. 38–60.

REFERENCES

1. Bugaeva L.I. Nejrotoksikologicheskie svojstva preparata «Bendazol» [Neurotoxicological properties of the drug «Bendazol»]. *Vestnik VolgGMU* [Journal of Volgograd State Medical University], 2012, no. 2, pp. 83–86. (In Russ.; abstr. in Engl.).
2. Kucheryavenko A.F. Antiagregantnaja aktivnost' novogo proizvodnogo ben-zimidazola [Antiplatelet activity of a new derivative of benzimidazole]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of Experimental Biology and Medicine], 2013, Vol. 156, no. 12, pp. 760–762. (In Russ.; abstr. in Engl.).
3. Kucheryavenko A.F. Antiagregantnaja aktivnost' novogo tridklicheskogo proizvodnogo 2,3,4,5-tetragidro [1,3]diazepino[1,2-a]benzimidazola [Antiplatelet activity of a new tricyclic derivative of 2,3,4,5-tetrahydro [1,3] diazepino [1,2-a] benzimidazole]. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2016, Vol. 79, no. 5, pp. 29–32. (In Russ.; abstr. in Engl.).
4. Spasov A.A. i dr. Anksioliticheskij potencial novogo rjada proizvodnyh diazepinobenzimidazola [Anxiolytic potential of a new series of diazepinobenzimidazole derivatives]. *Vestnik VolgGMU* [Journal of Volgograd State Medical University], 2018, no. 3 (67). (In Russ.; abstr. in Engl.).
5. Spasov A.A. Antitromboticheskaja aktivnost' novogo proizvodnogo benzi-midazola na modeli tromboza u myshej [Antithrombotic activity of a new derivative of benzimidazole in a model of thrombosis in mice]. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny* [Bulletin of experimental biology and medicine], 2014, Vol. 157, no. 5, pp. 595–598. (In Russ.; abstr. in Engl.).
6. Spasov A.A. Antitromboticheskaja aktivnost' soedinenija RU-891 [Antithrombotic activity of compound RU-891]. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2013, Vol. 76, no. 6, pp. 25–26. (In Russ.; abstr. in Engl.).
7. Spasov A.A. Kal'cijzavisimyj mehanizm antiagregantnogo dejstvija so-edinenija RU-891 [Calcium-dependent mechanism of antiplatelet action of the compound RU-891]. *Jeksperimental'naja i klinicheskaja farmakologija* [Experimental and Clinical Pharmacology], 2014, Vol. 77, no. 3, pp. 16–19. (In Russ.; abstr. in Engl.).
8. Anisimova V.A. Synthesis and biological activity of n-acylmethyl derivatives of 9h-2,3-dihydroimidazo- and 10h-2,3,4,10-tetrahydropyrimido[1,2-a]benzimidazoles and their reduction products. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2006, Vol. 40, no. 5, pp. 261–267.
9. Anisimova V.A. Synthesis and pharmacological activity of 3-aroyl and 3-hetaroylimidazo[1,2-a] benzimidazoles. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2002, Vol. 36, no. 12, pp. 637–642.
10. Mozaffarian D. Heart disease and stroke statistics (a report from the American Heart Association). *Circulation*, 2016, no. 133, pp. 38–60.

Контактная информация

Сиротенко Виктор Сергеевич – к. фарм. н., ст. преподаватель кафедры фармакологии и биоинформатики, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: sirotenko.viktor@yandex.ru