Биомедицинская химия, 2018 том 64, вып. 5, с. 455-458.

©Коллектив авторов

ФАРМАКОКИНЕТИКА НООПЕПТА И ЕГО АКТИВНОГО МЕТАБОЛИТА ЦИКЛОПРОЛИЛГЛИЦИНА У КРЫС

С.С. Бойко*, В.П. Жердев, Р.В. Шевченко

Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова,
125315, Москва, ул. Балтийская, 8; *эл. почта: svboyko@gmail.com

Исследование фармакокинетики новых лекарственных средств и выявление активных метаболитов является необходимым этапом для оценки эффективного и безопасного применения в клинике. Это особенно важно для пептидных лекарственных препаратов в связи с их энзиматической неустойчивостью, низкой биодоступностью и плохой проницаемостью через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ). Известна роль эндогенных нейропептидов, содержащих в качестве концевых фрагментов циклические аминокислоты – пролин, пироглутаминовую кислоту, а также глицина, в регуляции процессов памяти. Разработка ноотропных лекарственных препаратов на основе природных нейропептидов с высокой фармакологической активностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами (энзиматической стабильностью, высокой биодоступностью и хорошей проницаемостью через ГЭБ) представляет актуальную проблему современной нейропсихофармакологии. Указанным требованиям удовлетворяют разрабатываемые на основе природных нейропептидов с нейротропной активностью коротких (ди- и три-) пептидов. В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова разработан и внедрён в медицинскую практику в качестве ноотропного средства ноопепт – этиловый эфир N-фенилацетил-пролил-L-глицина. При изучении его фармакокинетики у крыс показано, что обнаруженный в плазме и мозге крыс метаболит ноопепта – цикло-пролил-L-глицин (ЦПГ) по своим фармакокинетическим параметрам значительно отличается от ноопепта, но в то же время обладает сходным с ноопептом многокомпонентным спектром фармакологического действия, а именно влиянием на высшие интегративные функции памяти.

Ключевые слова: ноопепт; циклопролилглицин (ЦПГ); фармакокинетические параметры; биодоступность

DOI: 10.18097/PBMC20186405455

ВВЕДЕНИЕ

В связи с большим ростом нейропсихических расстройств, сопровождающихся нарушением когнитивных функций (гипоксия, ишемия, травмы головного мозга, нарушение мозгового кровообращения, инсульты, инфекционные и возрастные заболевания) актуальной является разработка и внедрение в медицинскую практику новых ноотропных лекарственных средств. Исследование их фармакокинетики и выявление активных метаболитов является необходимым этапом для эффективного и безопасного применения новых лекарственных средств в клинике [1]. Это направление исследований особенно важно для пептидных лекарственных препаратов в связи с их энзиматической неустойчивостью и низкой биодоступностью. Имеются литературные данные о том, что природные нейропептиды такие как вазопрессин, АКТГ, тиролиберин, нейропептид Y, субстанция P, ИФР-1 и др., содержащие в качестве концевых фрагментов циклические аминокислоты – пролин, пироглутаминовую кислоту, а также глицин – являются эндогенными регуляторами процессов памяти [2-4]. В то же время данные литературы свидетельствуют о быстром и интенсивном метаболизме пептидных соединений, низкой величине их биодоступности, плохой проницаемости через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ), при этом в процессе их пресистемной элиминации возможно образование метаболитов, обладающих собственной фармакологической активностью. В связи с вышеизложенным, внедрение в медицинскую практику модифицированных новых лекарственных средств на основе природных нейропептидов с высокой ноотропной активностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами – энзиматической устойчивостью и высокой биодоступностью – для лечения нейропсихических расстройств, сопровождающихся нарушением когнитивных функций, является актуальным для современной психофармакологии. При изучении фармакокинетики ноотропного препарата ноопепта – этилового эфира N-фенил-ацетилпролил-L-глицина в эксперименте у крыс было показано, что обнаруженный в плазме и мозге крыс метаболит цикло-пролил-L-глицин (ЦПГ) по своим фармакокинетическим параметрам значительно отличается от ноопепта, но в то же время обладает сходным с ноопептом многокомпонентным спектром фармакологического действия, а именно влиянием на высшие интегративные функции памяти [6].

Целью данной работы явилось изучение экспериментальной фармакокинетики ноопепта и его активного метаболита ЦПГ в плазме и мозге крыс после перорального введения субстанции ноопепта.

МЕТОДИКА

Исследование фармакокинетики и метаболизма ноопепта проводили на беспородных крысах-самцах массой 180-220 г после перорального введения водного раствора субстанции ноопепта в дозе 50 мг/кг. Дизайн

* - адресат для переписки

эксперимента, одобренного этическим комитетом НИИ фармакологии имени В.В. Закусова представлен на рисунке 1. Животных декапитировали в дискретные интервалы времени (через 5, 10, 15, 20, 30 мин и 1, 2, 4, 6 ч после введения ноопепта), собирали кровь и извлекали мозг, проводили экстракцию исследуемых соединений ацетонитрилом и хлороформом из опытных и контрольных образцов плазмы и мозга крыс. Идентификацию обнаруженного метаболита, количественное определение ноопепта и ЦПГ проводили методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием [5]. На основе полученных данных рассчитывали основные фармакокинетические параметры исследуемых соединений. Все процедуры эксперимента соответствовали требованиям международных правил гуманного отношения к животным, отражённых в санитарных правилах по отбору и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении фармакокинетики ноопепта было показано, что, несмотря на его быстрый и интенсивный метаболизм под влиянием пептидаз и эстераз ЖКТ, препарат обнаруживается в неизмененном виде в плазме крови крыс в течение 25-30 мин после введения, что значительно дольше по сравнению с природными нейропептидами, время обнаружения которых в плазме составляет всего 2-5 мин. Кроме того, в процессе биотрансформации ноопепта образуется метаболит циклической структуры – ЦПГ, содержание и время определения которого в плазме было значительно больше по сравнению с ноопептом. Согласно данным литературы, циклические дипептиды, структурно происходящие из природных концевых фрагментов нейропептидов, обладают собственной фармакологической активностью; к тому же они значительно более резистентны к энзиматическому воздействию [5]. В связи с этим, приоритетным направлением наших последующих исследований было изучение фармакокинетики ноопепта и его метаболита ЦПГ, которое показало, что фармакокинетика и фармакокинетические параметры ЦПГ значительно отличались от фармакокинетических параметров ноопепта [5].

Схема метаболизма ноопепта представлена на рисунке 2, который показывает образование ЦПГ в ходе метаболизма ноопепта.

Основные фармакокинетические параметры ноопепта и ЦПГ в плазме крови и мозге крыс представлены в таблице. Из представленных в таблице фармакокинетических параметров, характеризующих элиминацию ноопепта и ЦПГ, видно, что период полувыведения метаболита из плазмы и мозга крыс более продолжителен по сравнению с аналогичным параметром ноопепта, что находится в соответствии с более низкой величиной константы элиминации ЦПГ как в плазме, так и в мозге крыс, это указывает на энзиматическую резистентность циклической структуры метаболита. Величины площадей под фармакокинетическими кривыми ЦПГ значительно выше как в плазме, так и в мозге крыс по сравнению с аналогичным параметром ноопепта. Более высокое значение площади под фармакокинетической кривой как ноопепта, так и ЦПГ в мозге по сравнению с этим параметром в плазме крови свидетельствует о хорошей проницаемости указанных соединений через ГЭБ крыс с высокими значениями

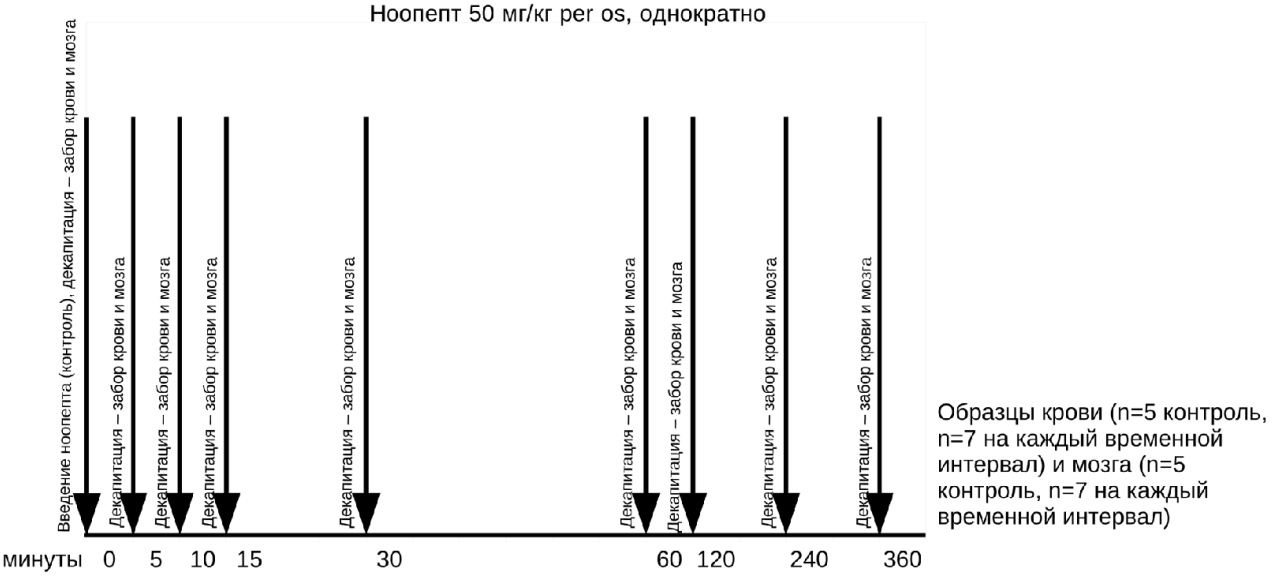

Рисунок 1. Дизайн эксперимента. На рисунке представлена временная шкала хода эксперимента. На 0 день эксперимента крысам вводили перорально водный раствор субстанции ноопепта в дозе 50 мг/кг однократно. Контрольных и опытных животных декапитировали через 5, 10, 15, 30 мин и 1, 2, 4, 6 ч после введения препарата, забирали кровь в пробирки с гепарином и извлекали мозг, проводили экстракцию и пробоподготовку образцов. Количественное определение изучаемых соединений проводили методом ВЭЖХ, идентификацию метаболита проводили методом ВЭЖХ-масс-спектрометрии.

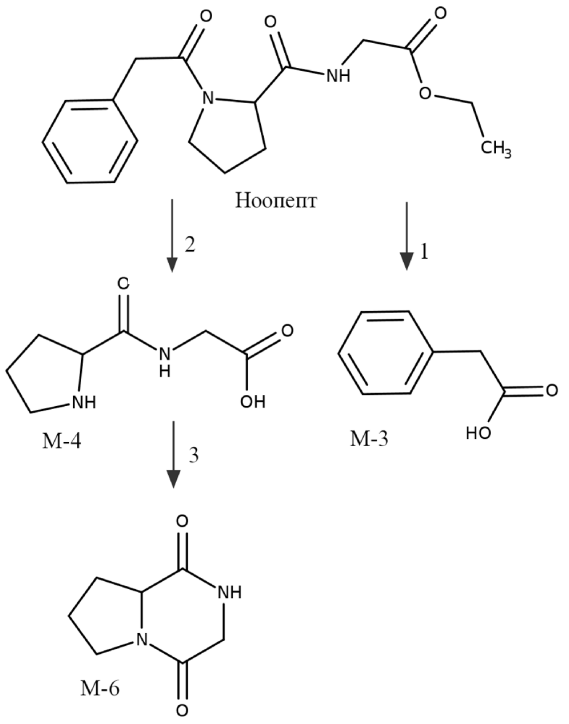

Рисунок 2. Предполагаемая схема метаболизма ноопепта. Расщепление пептидной связи под влиянием пептидаз ЖКТ между фенильным циклом и пролилглициновым фрагментом молекулы ноопепта приводит к образованию фенилуксусной кислоты (М-3) и этилового эфира пролилглицина (М-4), который превращается в циклическую форму – циклопролилглицин (М-6).

коэффициента распределения $К_{мозг/плазма}$, что может указывать на непосредственное влияние изучаемых соединений на внутриклеточные структуры ЦНС, в том числе, связанные с процессами памяти. Это предположение получило экспериментальное подтверждение при последующем изучении фармакологических эффектов исследуемых соединений. В исследованиях фармакологической активности, выполненных под руководством Р.У. Островской было показано, что оба изучаемых соединения обладают ноотропной активностью, которая проявлялась в тестах УРПИ (условная реакция пассивного избегания) и УРАИ (условная реакция активного избегания), особенно у плохо обучающихся животных, и нейропротективным действием у животных с ишемией мозга [6, 7]. Показано также наличие у ноопепта и его метаболита антигипоксического и анксиолитического эффектов [8]. Кроме того, и ноопепт и его метаболит оказывают положительное влияние на гематологические показатели крови: они обладают антикоагулянтным и фибринолитическим действием и улучшают мозговое кровообращение в условиях ишемии мозга [7]. Указанные эффекты ноопепта и ЦПГ, по-видимому, связаны с наличием в их структуре остатков пролина и глицина, которые улучшают гемореологические показатели крови, что сопровождается нейропротективным эффектом [3, 4].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В результате проведённых исследований было установлено, что ноопепт быстро метаболизируется в организме крыс после перорального введения субстанции препарата с образованием активного метаболита ЦПГ, который по фармакокинетическим параметрам значительно отличается от ноопепта как в плазме, так и мозге экспериментальных животных. Так, его период полувыведения более продолжителен по сравнению с аналогичным параметром ноопепта, что свидетельствует о большей энзиматической устойчивости ЦПГ за счёт циклической структуры в отношении аминопептидаз ЖКТ по сравнению с ноопептом. Кроме того, величина площади под фармакокинетической кривой ЦПГ в плазме и, особенно, в мозге по сравнению с аналогичным параметром ноопепта указывает на его более высокую биодоступность, в том числе, к ткани мозга. По соотношению величин площадей под фармакокинетическими кривыми следует сделать заключение о том, что как ноопепт, так и ЦПГ обладают высокой тропностью к ткани мозга крыс и проникают через ГЭБ. Полученные данные о фармакокинетике ноопепта и ЦПГ, а также об их фармакологических свойствах свидетельствуют о возможном непосредственном влиянии изучаемых соединений на высшие интегративные функции мозга, связанные с памятью.

Таблица. Фармакокинетические параметры ноопепта и ЦПГ в плазме крови и мозге крыс после перорального введения ноопепта в дозе 50 мг/кг

Параметры, Размерность	Ноопепт, плазма	Ноопепт, мозг	$К_{мозг/плазма}$ ноопепта	ЦПГ, плазма	ЦПГ, мозг	$К_{мозг/плазма}$ ЦПГ
C_{max}, мкг/мл	0,82±0,22	1,29±0,25	–	–	–	–
$AUC_{0\rightarrow t}$, мкг/мл × ч	0,31±0,08	0,50±0,09	1,61	3,78±0,75	5,22±0,87	1,38
K_{el}, л/ч	3,68±0,38	3,47±0,65	–	0,17±0,06	0,24±0,06	–
$T_{1/2}$, ч	0,19±0,08	0,215±0,05	–	3,99±0,67	2,87±0,65	–

Примечание. Фармакокинетические параметры: C_{max}, мкг/мл - максимальная концентрация ноопепта и ЦПГ, $AUC_{0\rightarrow t}$, мкг/мл×ч - площадь под фармакокинетической кривой, K_{el} - константа элиминации - скорость, с которой выводится изучаемое соединение из организма, $T_{1/2}$ - период полувыведения - время, за которое выводится 50% от введённой дозы препарата, $К_{мозг/плазма}$ ноопепта - биодоступность ноопепта к ткани мозга крыс, $К_{мозг/плазма}$ ЦПГ - коэффициент распределения, биодоступность ЦПГ к ткани мозга крыс.

1. Установлено, что ноопепт метаболизируется в организме крыс с образованием активного метаболита ЦПГ, который вследствие своей циклической структуры значительно отличается от ноопепта по энзиматической стабильности и имеет более высокую биодоступность.

2. Ноопепт и ЦПГ проникают через ГЭБ с высоким коэффициентом распределения мозг/плазма, что может свидетельствовать об их прямом влиянии на структуры мозга, принимающие участие в реализации фармакологических эффектов ноопепта.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Фирсов А.А., Жердев В.П., Портной Ю.А., Колыванов Г.Б., Литвин А.А., Барманова Е.Ю.* (2013) В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая (Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., ред.), Гриф и К, Москва, с. 843-853.
2. *Гусев Е.И., Скворцова В.И.* (2001) Ишемия головного мозга, Медицина, М.
3. *Ashmarin I.P.* (2007) Neurochemical J., **1**(3), 173-175. DOI: 10.1134/S1819712407030014
4. *Samonina G.E., Ashmarin I.P., Lyapina L.A*. (2002) Pathophysiology, **8**(4), 229-234. DOI:10.1016/S0928-4680(02)00018-4
5. *Бойко С.С., Жердев В.П., Коротков С.А., Островская Р.У., Гудашева Т.А.* (2001) Хим.-фарм. журн., **35**(9), 11-13.
6. *Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А., Середенин С.Б.* (2002) Экспер. клин. фармакол., **65**(5), 66-72. DOI:10.30906/0869-2092-2002-65-5-66-72
7. *Островская Р.У., Ляпина Л.А., Пасторова В.Е., Мирзоев Т.Х., Гудашева Т.А., Середенин С.Б.* (2002) Экспер. клин. фармакол., **65**(2), 34-37. DOI:10.30906/0869-2092-2002-65-2-34-37.
8. *Середенин С.Б., Гудашева Т.А., Бойко С.С. и др.* (2002) Бюлл. экспер. биол. мед., **133**(4), 360-362. DOI: 10.1023/A:1016293904149

Поступила: 11. 10. 2018.
Принята к печати: 16. 10. 2018.

PHARMACOKINETICS OF NOOPEPT AND ITS ACTIVE METABOLITE CYCLOPROLYL GLYCINE IN RATS

S.S. Boyko*, V.P. Zherdev, R.V. Shevchenko

Zakusov Research Institute of Pharmacology,
8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315 Russia; *e-mail: svboyko@gmail.com

The study of the pharmacokinetics of new drugs and the identification of active metabolites is a necessary step for effective and safe use in the clinical practice. It is especially important for peptide drugs due to their enzymatic instability, low bioavailability and poor permeability through the blood-brain barrier (BBB). The role of endogenous neuropeptides containing cyclic amino acids, proline, pyroglutamic acid, and glycine, in the regulation of memory processes is known as terminal peptide fragments. The development of nootropic drugs based on natural neuropeptides with high pharmacological activity and improved pharmacokinetic properties (enzymatic stability, high bioavailability, and good permeability through the BBB) is an important problem of modern neuropsychopharmacology. Developed drugs – representing short (di- and tri-) peptides appear to meet these requirements. In the Zakusov Research Institute of Pharmacology a nootropic agent noopept (N-phenylacetyl-prolyl-L-glycine ethyl ester), was developed and introduced into medical practice, studies of its pharmacokinetics in ratsrevealed that the noopept metabolite found in the rat plasma and brain, cyclo-prolyl-L-glycine (CPG), differed significantly in its pharmacokinetic parameters from noopept, but at the same time it had similar noopept multi-component spectrum of pharmacological action, namely the influence on higher integrative functions of memory.

Key words: noopept; cycloprolyl-glycine (CPG); pharmacokinetic parameters; bioavailability