

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫЕ СВОЙСТВА НООПЕПТА (ДИПЕПТИДНОГО НООТРОПА ГВС-111)

Л. П. Коваленко, М. Г. Мирамедова, С. В. Алексеева, Т. А. Гудашева, Р. У. Островская,
С. Б. Середенин¹

При однократном введении ноопепта внутривенно (0,5 и 5 мг/кг), внутрь (10; 50 и 100 мг/кг) и курсовом пероральном введении в течение 10 дней в дозе 5 мг/кг выявлено дозозависимое подавление реакции воспаления стопы мышей линии СВА на конканавалин А. Через 3 ч после внутривенного введения в дозе 5 мг/кг ноопепт подавлял острое неиммунное воспаление стопы крыс на каррагенан (на 62,2%). Наиболее выраженное противовоспалительное действие дипептида установлено на модели адьювантного артрита при введении крысам препарата в течение 25 дней в дозах 0,5 мг/кг внутримышечно и 5 мг/кг внутрь (12-й день хронического иммунного воспаления — на 94,03 и 74,13%). В опытах на нейтрофильных лейкоцитах крови мышей F₁ (СВА С57BL/6) при однократном введении ноопепта в дозе 5 мг/кг внутривенно получено 5 – 6-кратное подавление хемилюминесценции, стимулированной опсонизированным зимозаном или форболмирилатацетатом. Наличие противовоспалительных свойств у ноопепта, вероятно, обусловлено его антиоксидантным действием.

Ключевые слова: конканавалин А, каррагенан, адьювантный артрит, хемилюминесценция, опсонизированный зимозан, форболмирилатацетат

ВВЕДЕНИЕ

Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина) является пептидным аналогом пирасетама с выраженными ноотропными и нейропротективными свойствами [4, 5, 7]. В экспериментах на крысах в условиях гипокинезии у дипептида выявлено антиоксидантное действие на синаптические мембраны нейронов коры головного мозга [1]. Исследования последних лет показали большую роль полиморфноядерных лейкоцитов (ПМЯЛ), иммунологических и провоспалительных цитокинов [IL-1, IL-6, TNF- α] в патогенезе ревматоидного артрита [3] и различных форм ишемии мозга [8]. Целью настоящей работы явилось изучение противовоспалительных свойств ноопепта на моделях острого неиммунного и хронического иммунного воспаления, а также его влияние на активность нейтрофильных лейкоцитов крови мышей в тесте хемилюминесценции.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

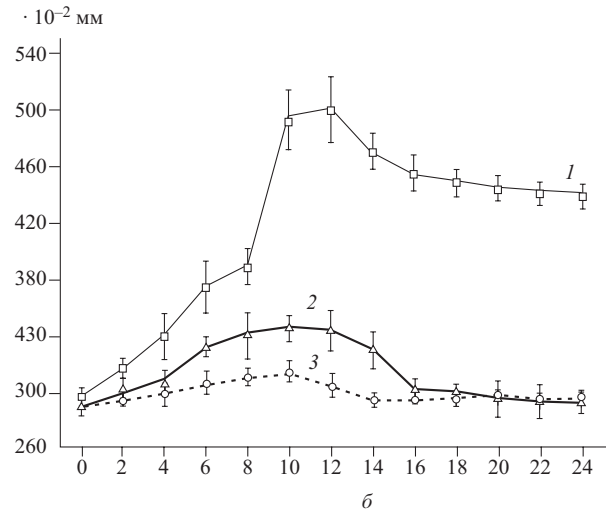
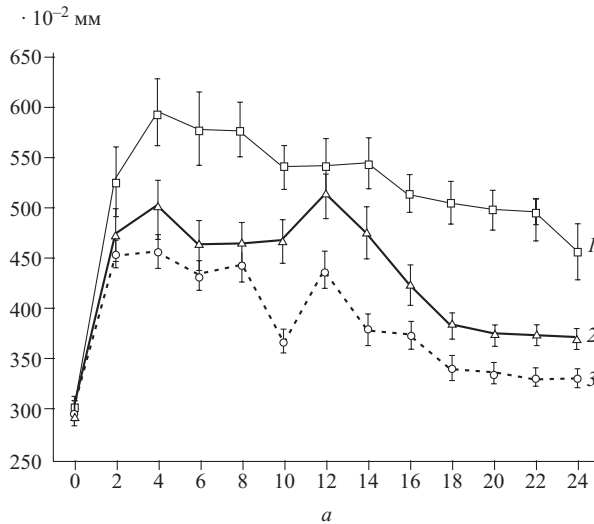
При изучении противовоспалительного действия ноопепта использована модель экссудативного отека стопы мышей, вызванного конканавалином А (Кон А, "Serva"). Опыты проведены на мышцах самцах линии СВА массой 18 – 20 г. В первой серии опытов мышам линии СВА однократно внутривенно или внутрь вводили ноопепт в дозах 0,5 и 5 мг/кг, а также в течение 10 дней внутрь в дозе 5 мг/кг, контрольным животным — физиологический раствор. Во второй серии экспериментов ноопепт и препарат сравнения — ибупрофен вводили однократно внутрь (ноопепт — в дозах 10; 50 и 100 мг/кг, ибупрофен — 10 мг/кг). Затем, учитывая данные по фармакокинетике препарата, через 15 мин (при внутривенном введении) или 30 мин

(при введении внутрь) мышам всех подопытных и контрольной групп микрошприцами фирмы "Hamilton" субплантарно (в подушечку задней стопы) вводили Кон А в дозе 100 мкг/20 г массы тела (20 мкл раствора в концентрации 5 мг/мл), в контрольную конечность — тот же объем физиологического раствора. Через 1 ч мышей забивали, определяли массу лап и подсчитывали индекс реакции воспаления (Ир) [2].

Противовоспалительная активность ноопепта изучена также на модели отека стопы крыс, вызванного каррагенаном. В опытах использовали самцов беспородных белых крыс массой 150 – 170 г. Животным опытной группы за 30 мин до введения каррагенана вводили в вену препарат в дозе 5 мг/кг. Затем животным контрольной и опытных групп в правую подушечку задней стопы вводили 0,1 мл 1% раствора каррагенана ("Sigma") и в течение 5 ч животным каждый час измеряли отек правой стопы микрометром. При моделировании адьювантного артрита у крыс использовали метод, предложенный J. Jiang и соавт. [6]. Беспородным крысам самцам массой 150 – 160 г субплантарно в левую заднюю лапу вводили по 100 мкл полного адьюванта Фрейнда (ПАФ) ("Difco", USA, 1 мг Mycobact. tub. в 1 мл), в каждый мл которого было добавлено по 5 мг убитых прогреванием микобактерий штамма БЦЖ-1. День введения ПАФ и первого введения дипептида считали 0 днем опыта. Отек лапы измеряли 1 раз в 2 дня инженерным микрометром. Ноопепт вводили животным двух опытных групп (по 10 самцов в каждой группе) в течение 25 дней внутрь в дозе 5 мг/кг или в мышцу левой и правой задней конечности через день в дозе 0,5 мг/кг. Контрольным животным вводили физиологический раствор.

Генерацию активных форм кислорода в суспензии нейтрофильных гранулоцитов оценивали методом люминолзависимой клеточной хемилюминесценции (ХЛ). Показатели ХЛ регистрировали через 15 мин после введения ноопепта в вену в дозе 5 мг/кг. В качестве стимуляторов ХЛ были использованы опсонизированный мышинной сывороткой зимозан и форболмирилатацетат (ФМА). ХЛ регистрировали на хемилуминометре Bioorbit 1251 (Швеция) при постоянном перемешивании и температуре 37 °С. Среда измерения включала: 130 мМ NaCl, 5 мМ глюкозы, 5 мМ KCl, 1,5 мМ MgSO₄, 0,5 мМ Na₂HPO₄, 0,5 мМ KH₂PO₄, 4 мМ NaHCO₃, 1 мМ CaCl₂, 0,65 мМ люминола (рН 7,4). Общий объем кюветы для измерения составлял 1 мл. В кювету прибора помещали люминольную среду и клеточную

¹ Лаборатория лекарственной токсикологии (зав. — проф. А. Д. Дурнев) НИИ фармакологии РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.



Влияние ноопепта на воспаление (адьювантный артрит) неиммунное (а, левая лапа с ПАФ) и иммунное (б, правая лапа).

По оси абсцисс — день введения; по оси ординат — отек стопы, мм. 1 — контроль, 2 — 5 мг/кг внутрь, 3 — 0,5 мг/кг внутримышечно.

взвесь в таких объемах, что конечная концентрация нейтрофилов составляла $2 \cdot 10^5$ кл/мл. Спонтанный уровень ХЛ измеряли в течение 15 мин, затем к содержимому кюветы добавляли 10 мкл раствора ФМА в ДМСО в концентрации 0,1 мг/мл или 10 мкл зимозана в концентрации 10 мг/мл. При регистрации ХЛ учитывали следующие параметры: $I_{сп}$ — максимум спонтанной вспышки ХЛ; $I_{макс}$ — максимальную величину ХЛ после добавления стимула; I — интенсивность стимулированной ХЛ (разница между $I_{макс}$ и $I_{сп}$); S — интегральный показатель

светосуммы ХЛ за 5 мин измерения после добавления ФМА и за 20 мин после добавления зимозана; $t_{макс}$ — время достижения максимальной интенсивности ХЛ после добавления стимула. Измерение хемилуминесцентной реакции нейтрофильных гранулоцитов проводили не менее чем в двух-трех повторах. Статистический анализ данных проводили с помощью t -критерия Стьюдента и непараметрического критерия Манн – Уитни (U-тест) (при изучении ХЛ-ответа нейтрофилов крови на опсонизированный зимозан).

Таблица 1. Противовоспалительное действие ноопепта на модели реакции на конканавалин А

Препарат, доза	Число животных в группе	Ир	
<i>Введение однократно, внутривенно</i>			
Контроль (физиологический раствор)	8	28,214	7,762
Ноопепт, 0,5 мг/кг	8	17,800	4,453*
Ноопепт, 5 мг/кг	8	13,849	5,942*
<i>Введение однократно, внутрь</i>			
Контроль (физиологический раствор)	8	25,970	6,979
Ноопепт, 0,5 мг/кг	8	27,377	8,153
Ноопепт, 5 мг/кг	8	19,806	8,598
Контроль (физиологический раствор)	10	25,294	6,518
Ноопепт, 10 мг/кг	10	13,052	4,817*
Ноопепт, 50 мг/кг	10	11,422	4,944*
Ноопепт, 100 мг/кг	10	8,388	3,698*
Ибупрофен, 10 мг/кг	9	12,272	4,028*
<i>Введение внутрь в течение 10 дней</i>			
Контроль (физиологический раствор)	10	16,653	4,556
Ноопепт, 5 мг/кг	13	7,935	3,797*

Примечание. Индекс реакции (Ир) = $(R_{оп} - R_{к}) / R_{к} \cdot 100\%$, где $R_{оп}$ — масса стопы, в подушечку которой вводили Кон А, $R_{к}$ — физиологический раствор. * — отличия от контроля статистически значимы ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении противовоспалительного действия ноопепта на модели экссудативного отека на Кон А показано, что однократное введение препарата внутрь в дозах 0,5 и 5 мг/кг не вызывало достоверного снижения Ир воспаления (табл. 1). При курсовом введении препарата в течение 10 дней внутрь в дозе 5 мг/кг выявлено значительное подавление Ир воспаления на Кон А (на 52,35% по сравнению с контролем). Введение препарата в вену в дозе 0,5 мг/кг вызывало подав-

Таблица 2. Показатели хемилуминесцентного ответа на форболмирилатацетат (ФМА) и опсонизированный зимозан

Доза ноопепта	I , мВ		S , (ед.)	
<i>ФМА</i>				
Контроль (11)	10,8	1,7	1937,7	238,6
5мг/кг (9)	1,8	0,4	505,2	82,5
	$p < 0,01$		$p < 0,01$	
<i>Зимозан</i>				
Контроль (10)	12,1	4,4	13322,4	488,8
5 мг/кг (9)	2,1	0,5	2961,4	647,9
	$p < 0,05$		$p < 0,05$	

Примечание. В скобках — количество животных. I — показатель уровня активированной ХЛ; S — интегральный показатель ХЛ; $p < 0,05$ — статистически значимые отличия от контрольных показателей по критерию Манн-Уитни, $p < 0,01$ — по t -критерию Стьюдента. 5 мг/кг — однократное внутривенное введение.

ление реакции воспаления на 36,91%, в дозе 5 мг/кг — на 50,91% по сравнению с контролем. Во второй серии экспериментов в качестве препарата сравнения был взят ибупрофен, который вводили однократно внутрь в дозе 10 мг/кг. Введение ибупрофена вызывало подавление реакции воспаления на 51,5%, ноопепта в дозе 10 мг/кг — подавление экссудативного отека на 48,4%, в дозе 50 мг/кг — на 54,5%, в дозе 100 мг/кг — на 66,8%.

При исследовании противовоспалительной активности ноопепта на модели отека стопы крыс на каррагенан выявлено, что внутривенное введение дипептида в дозе 5 мг/кг через 3 ч после введения (пик реакции) вызывало статистически достоверное подавление реакции на каррагенан на 62,2% по сравнению с контролем, через 4 ч — на 61,5%, через 5 ч — на 69,3%.

Влияние ноопепта на разные типы воспалительных реакций изучено на модели адьювантного артрита у крыс. Препарат подавлял неиммунное воспаление (рисунок, а, пик реакции 3–4-й день) и хроническое иммунное воспаление (см. рисунок, б, пик реакции 12-й день) на пике реакции и в течение всего опыта. Неспецифический воспалительный отек подавлялся при курсовом введении препарата в дозе 5 мг/кг внутрь на 4-й день опыта на 30,6%, в конце опыта — на 50,3%, при введении в мышцу в дозе 0,5 мг/кг — на 4-й день на 46,7%, в конце введения — на 79,6%. Иммунологически индуцированный отек правой стопы на 12-й день опыта при введении внутрь в дозе 5 мг/кг подавлялся на 74,1%, в конце опыта — на 99,9%, при введении ноопепта в мышцу в дозе 0,5 мг/кг на 12-й день опыта — на 94,0%, в конце опыта — на 97,8%.

Согласно полученным ранее данным [1], ноопепт обладает антиоксидантными свойствами, что подтверждено при изучении хемилюминесцентного ответа нейтрофильных лейкоцитов крови мышей. После добавления к суспензии нейтрофилов ФМА в указанной дозе уровень I у интактных животных составил 10,8 ± 1,7 мВ, что в 5,7 раз превысило спонтанный уровень свечения. Через 15 мин после однократного введения дипептида в вену в дозе 5 мг/кг выявлено выраженное снижение показателей I — в 6 раз и S —

в 3,8 раза (табл. 2). После добавления к суспензии нейтрофилов опсонизированного зимозана I у контрольных животных составил 12,1 ± 4,4 мВ, что в 5,8 раз превысило спонтанный уровень свечения. Через 15 мин после однократного введения дипептида в вену в дозе 5 мг/кг также наблюдалось подавление ХЛ-ответа нейтрофилов, стимулированных опсонизированным зимозаном: I — в 5,7 раза и S — в 4,5 раза.

Таким образом, в реализации противовоспалительного эффекта ноопепта определенную роль может играть его антиоксидантное действие. Нельзя также исключить возможность действия ноопепта на иммунологические, провоспалительные цитокины и митоген-индуцированные протеинкиназы, активность которых в эксперименте определяется метаболическим стимулом ФМА или липополисахаридом.

ВЫВОД

Выраженное дозозависимое подавление ноопептом экссудативного отека на Кон А, влияние на первичный и вторичный артриты, подавление реакции воспаления на каррагенан свидетельствуют о наличии у дипептида противовоспалительных свойств.

Работа поддержана грантом РФФИ 00-04-48624 а.

ЛИТЕРАТУРА

1. А. В. Лысенко, Н. И. Ускова, Р. У. Островская и др., *Экспер. и клин. фармакол.*, **60**(5), 15–18 (1997).
2. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Москва (2000), с. 31.
3. M. L. Foster, F. Halley, and J. E. Souness, *Drug News Perspect.*, **13**(8), 488–497 (2000).
4. T. A. Gudasheva, S. S. Boyko, R. U. Ostrovskaya, et al., *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinetics*, **22**(3), 245–252 (1997).
5. T. A. Gudasheva, T. A. Voronina, R. U. Ostrovskaya, et al., *J. Med. Chem.*, **31**(2), 151–157 (1996).
6. J. Jiang, F. Wu, J. Lu, et al., *Pharmacol. Research*, **36**(4), 309–314 (1997).
7. R. U. Ostrovskaya, G. A. Romanova, S. S. Trofimov, et al., *Behav. Pharmacol.*, **8**, 261–268 (1997).
8. X. Wang and G. Z. Feuerstein, *Drug News Perspect.*, **13**(3), 133–140 (2000).

Поступила 23.03.2001

ANTIINFLAMMATORY PROPERTIES OF THE NOOPEPT (DIPEPTIDE NOOTROPE GVS-111)

L. P. Kovalenko, M. G. Miramedova, S. V. Alekseeva, T. A. Gudasheva, R. U. Ostrovskaya, and S. B. Seredenin

Laboratory of Drug Toxicology, Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315 Russia

It is established that single intravenous (0.5 and 5 mg/kg, p.o.) or single peroral (10, 50, 100 mg/kg) and prolonged peroral (5 mg/kg, over 10 days) administration of noopept produces a dose-dependent inhibition of the model inflammatory response to concanavaline A in CBA mice. Intravenously injected (5 mg/kg) noopept suppressed the acute nonimmune carrageenan-induced foot inflammation in rats by 62.2% within 3 h. The most pronounced antiinflammatory effect of dipeptide was observed on the model of adjuvant arthritis in rats, where the drug administered over 25 days in a daily dose of 0.5 mg/kg (i.m.) or 5 mg/kg (p.o.) significantly reduced the chronic immune inflammation (on the 12th day, by 94.0 and 74.1%, respectively). The *in vitro* experiments with neutrophilic leukocytes of F1(CBA × C57BL/6) mice treated with noopept in a single dose of 5 mg/kg (i.v.) showed a 5- to 6-fold suppression of the hemiluminescence stimulated by opsonized zymosan or phorbolmyristate acetate. It is suggested that the antiinflammatory activity of noopept is probably related to its antioxidant properties.