

# ТОКСИКОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

## ДОКЛИНИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БЕЗОПАСНОСТИ ДИПЕПТИДНОГО СОЕДИНЕНИЯ ГБ-115

А. В. Сорокина, С. В. Алексеева, Е. П. Немова, Л. П. Коваленко, Н. М. Смольникова, Е. В. Шипаева, О. В. Шредер, И. А. Мирошкина, С. А. Дюкова, Н. О. Даугель-Дауге, А. В. Кулакова, Л. Г. Колик, А. Д. Дурнев, С. Б. Середенин<sup>1</sup>

Проведено доклиническое исследование безопасности синтезированного в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН дипептидного соединения ГБ-115 (амид N-фенилгекса-ноил-глицил-L-триптофана), являющегося антагонистом холецистокининовых рецепторов и обладающего анксиолитическими свойствами. ГБ-115, вводимый однократно, внутрь в максимально возможных дозах (6000 мг/кг мышам и 3500 мг/кг крысам), не вызывал гибели животных. Вводимый внутрь кроликам и крысам обоего пола в дозах 0,1 и 10 мг/кг в течение 6 месяцев не вызывал необратимых патологических изменений в обследованных органах и системах животных, не проявлял аллергенной, иммунотропной и мутагенной активности, не влиял на генеративную функцию, антенатальное и постнатальное развитие потомства. ГБ-115 (10 мг/кг) подавлял реакцию воспаления в ответ на введение конканавалина А.

**Ключевые слова:** ГБ-115, безопасность, токсичность, аллергенность, иммунотоксичность, тератогенность, мутагенность, лабораторные животные

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время анксиолитики являются наиболее широко применяемыми психотропными препаратами в условиях стационарного и амбулаторного лечения. Часто их используют практически здоровые люди для снятия чувства эмоциональной напряженности и повышенной раздражительности. От 10 до 15 % населения в различных странах мира раз в год получают рецепты на тот или иной анксиолитик [2]. В психоневрологических диспансерах анксиолитики бензодиазепинового ряда назначают 82,8 % больных с психическими расстройствами, из них на срок от 6 месяцев и более — 94,4 % [10]. В США около 2 % населения применяли бензодиазепины более 12 месяцев [11].

В связи с широкой распространенностью бензодиазепины лидируют по частоте отравлений препаратами, угнетающими ЦНС [3]. До 1 – 2 % аллергических реакций на медикаменты приходится на анксиолитики [1, 14]. Кроме того, имеются указания на повышение под влиянием бензодиазепинов тератогенного риска [12]. Постнатальные нарушения высшей нервной деятельности потомства, “поведенческий тератогенез” установлены в многочисленных экспериментальных исследованиях на животных, получавших бензодиазепины [7]. В цитогенетических тестах *in vivo* показана мутагенная активность диазепамы на мышах [13]. Современные исследования, направленные на разработку и создание новых анксиолитиков, безусловно, должны учитывать вопросы безопасности последующего применения лекарственного препарата.

Целью настоящей работы явилось изучение острой и хронической токсичности, возможных тератогенных, аллергизирующих, противовоспалительных, иммунотоксических и мутагенных эффектов нового дипептидного аналога эндогенного тетрапептида холецистокинина соединения ГБ-115 с выраженными анксиолитическими свойствами [4 – 6], синтезированного в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дипептидное соединение ГБ-115 (амид N-фенилгекса-ноил-глицил-L-триптофана) синтезировано в НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН.

Экспериментальные животные (мыши, крысы, морские свинки, кролики), полученные из питомников РАМН, содержались в стандартных условиях вивария НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, отвечающих действующим санитарным правилам. Мыши, крысы и морские свинки содержались группами в пластиковых клетках, кролики — в индивидуальных металлических клетках. Всем животным был обеспечен свободный доступ к сбалансированному брикетированному комбикорму и воде.

Во всех вариантах эксперимента животным контрольных групп вводили 1 % раствор крахмала в объемах, равных таковым, используемым при введении препарата. Внутривенное введение раствора крахмала или суспензии препарата, приготовленной на 1 % растворе крахмала, осуществляли с помощью специального металлического зонда в дозах 0,1 мг/кг (ED<sub>50</sub>) и 10 мг/кг (100 ED<sub>50</sub>). Кроликам введение осуществляли непосредственно в ротовую полость с помощью обычного шприца для инъекций.

<sup>1</sup> НИИ фармакологии им. В. В. Закусова РАМН, Москва, 125315, ул. Балтийская, 8.

Острую токсичность ГБ-115 оценивали на самцах и самках мышей и крыс при введении внутрь. Хроническую токсичность оценивали на самцах и самках беспородных белых крысах и кроликах породы шиншилла. Препарат вводили ежедневно, однократно, в утренние часы, на протяжении шести месяцев. Для оценки обратимости возможных патологических изменений при введении крысам препарата в дозе 10 мг/кг часть животных была обследована спустя 1 мес после окончания курсового введения (“отставленная” группа). Обследование животных контрольных и экспериментальных групп проведено в соответствии со стандартным протоколом, рекомендованным МЗ РФ [9].

Аллергизирующие свойства ГБ-115 исследовали путем оценки его анафилактической активности и реакции гиперчувствительности замедленного типа на морских свинках альбиносах. При изучении анафилактических свойств ГБ-115 была выбрана модель сенсибилизации морских свинок 2% раствором белка куриного яйца (БКЯ), основным аллергическим компонентом которого является овальбумин. Кроме того, оценивали влияние препарата на реакцию воспаления, индуцированную введением конканавалина А у мышей линии СВА [9].

Иммунотоксичность препарата определяли в экспериментах, проведенных на мышцах F1 (СВА-С57ВL/6), СВА и С57ВL/6. На гибридных животных оценивали влияние препарата на массу и клеточность органов иммунной системы, фагоцитарную активность, хемиллюминесцентный ответ нейтрофилов крови на опсонизированный зимозан и форболмиристацетат, а также реакцию гиперчувствительности замедленного типа.

Влияние ГБ-115 на гуморальный иммунный ответ изучали, используя реакцию гемагглютинации (РПГА). Реакция основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, агглютинировать эритроциты барана (ЭБ), используемые в качестве антигена. Определение антител в РПГА к ЭБ провели на мышцах двух оппозитно реагирующих на ЭБ линий СВА и С57ВL/6.

Опыты по изучению репродуктивной токсичности ГБ-115 проведены на беспородных белых крысах. При оценке влияния на антенатальное развитие плода препарат вводили внутрь с 1-го по 19-й день беременности в дозах 0,1 и 10 мг/кг. При исследовании влияния на постнатальное развитие потомства препарат вводили беременным самкам беспородных крыс, начиная с 6-го дня беременности до родов, в дозе 10 мг/кг. Наблюдение за крысятами осуществляли до 60-го дня жизни. Наблюдение за влиянием ГБ-115 на генеративную функцию осуществляли при 15-дневном (три эстральных цикла) введении препарата в дозе 10 мг/кг самкам и 48-дневном (период сперматогенеза) введении препарата в дозе 10 мг/кг самцам крыс [9].

Мутагенность ГБ-115 оценивали в тесте Эймса и цитогенетическом тесте *in vivo*.

В тесте Эймса с метаболической активацией и без метаболической активации (*Salmonella typhimurium*, штаммы TA 97, TA 98 и TA 100) использовали препарат, разведенный в диметилсульфоксиде (фирма “Panac”, Испания), в концентрациях 10000, 1000, 100, 10 и 1 мг/мл.

Эксперимент сопровождали положительными и отрицательными контролями.

В цитогенетическом тесте препарат вводили внутрь в суспензии твина-80 в дозах 0,1 и 10 мг/кг.

Планирование исследования, выполнение экспериментов и обработка полученных результатов проведены в соответствии с существующими методическими рекомендациями по доклинической оценке безопасности фармакологических веществ [8]. При статистическом анализе использованы стандартные подходы Statistica-5.0 Windows 95 [9].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГБ-115, вводимый однократно внутрь в максимально возможных дозах (в диапазоне доз 4500, 5000, 5500 и 6000 мг/кг или 2000, 2500, 3000 и 3500 мг/кг мышам и крысам, соответственно), не вызывал гибели экспериментальных животных. Токсическое действие препарата у животных выражалось в преходящем угнетении двигательной активности в течение 6–12 ч. Увеличение доз ГБ-115 было невозможно из-за нерастворимости препарата и достижения максимума возможного объема инъекций.

При изучении хронической токсичности ГБ-115 не выявлено существенного влияния на внешний вид, динамику массы тела и поведение животных. В тесте “открытое поле” отмечено увеличение горизонтальной и вертикальной двигательной активности у самцов крыс, получавших ГБ-115 в дозе 0,1 мг/кг. Исследовательская активность самок крыс, получавших препарат в дозе 10 мг/кг, была существенно снижена по сравнению с контролем. Показатель эмоциональной реакции у самок крыс опытных групп был выше, чем у самок контрольной группы. Выявленные поведенческие эффекты с большой долей вероятности обусловлены специфической фармакологической активностью препарата ГБ-115.

Электрокардиографическое исследование крыс, проведенное через 3, 6, а у животных “отставленной” группы через 7 месяцев от начала введения ГБ-115, не выявило каких-либо свидетельств негативного воздействия препарата на сердечную деятельность.

Изучение периферической крови крыс показало, что шестимесячное введение ГБ-115 в дозе 0,1 мг/кг не приводило к существенным изменениям ее картины. Исключением были самцы этой группы, в крови которых обнаружено повышение числа эритроцитов. При введении ГБ-115 внутрь крысам в дозе, стократно превышающей фармакологически эффективную — 10 мг/кг, не наблюдалось статистически значимых различий между гематологическими показателями опытных и контрольной групп.

При изучении периферической крови кроликов, которым вводили ГБ-115 в дозе 0,1 мг/кг, выявлено, что морфологические показатели их крови не имели существенных различий с таковыми у животных контрольной группы. У кроликов, получавших препарат в дозе 10 мг/кг, не выявлено значимых изменений показателей по сравнению с контролем.

Биохимические показатели сыворотки крови крыс при введении ГБ-115 в дозе 0,1 мг/кг не имели существенных различий с показателями контрольной группы животных,

за исключением значимого понижения на 22 % уровня мочевины у самок. При введении крысам препарата в дозе 10 мг/кг отмечалось повышение уровня глюкозы у самок на 25 %, которое, однако, не выходило за границы физиологической нормы. Отмечено также значимое повышение содержания креатинина у животных обоего пола, не выходящее за пределы нормы для данного вида животных. Значимо повышенный уровень мочевины у самцов этой группы отличался на 35 % от аналогичного показателя контрольной группы.

Через один месяц после заключительного введения крысам ГБ-115 в дозе 10 мг/кг ("отставленная" группа) в сыворотке крови самцов отмечалось понижение уровня глюкозы на 23 %, а также повышение содержания мочевины — у самок на 53 %, у самцов на 61 %. Однако эти показатели остались в границах референтных значений.

Биохимическое исследование мочи экспериментальных крыс, получавших ГБ-115 в дозах 0,1 и 10 мг/кг, позволило установить, что все изученные показатели не выходят за границы референтных величин.

Биохимические исследования сыворотки крови экспериментальных кроликов свидетельствуют о том, что все изученные показатели находятся в пределах физиологических колебаний для данного вида животных и не носят дозозависимого характера.

Совокупность полученных результатов биохимических исследований свидетельствует, что ГБ-115 не вызывает выраженных изменений физико-химических свойств мочи и биохимических показателей сыворотки крови.

Патоморфологические исследования крыс и кроликов всех экспериментальных групп, включающие как патологоанатомическое вскрытие с макроскопической оценкой состояния важнейших органов и систем организма, так и микроскопическое изучение их строения, не выявило значимых патологических изменений, спровоцированных введением препарата.

Клиническое исследование экспериментальных животных, крыс и кроликов, а также последующее патологоанатомическое, макроскопическое и микроскопическое изучение органов их пищеварительной системы - пищевода, желудка, тонкого и толстого отделов кишечника, не выявило признаков местного раздражающего действия препарата ГБ-115.

В экспериментах по оценке возможного аллергизирующего действия ГБ-115 показано, что внутрибрюшинное его введение в дозах 0,1 и 10 мг/кг не приводит к усилению реакции общей анафилаксии у животных опытной группы на белок куриного яйца.

После иммунизации морских свинок-альбиносов адъювантом Фрейнда и препаратом ГБ-115 вводили разрешающую дозу препарата. Через 24 ч и 48 ч после внутрикожного введения 0,05 мл ГБ-115 в концентрации 1 мг/мл не наблюдали аллергических реакций замедленного типа.

Однократное введение ГБ-115 внутрь в дозе 0,1 мг/кг мышам линии СВА не оказывало значимого влияния на реакцию воспаления на конканавалин А. Введение препарата в дозе 10 мг/кг вызывало подавление реакции воспаления на конканавалин А на 76,1 %.

Введение ГБ-115 в течение 14 дней внутрь мышам F1 (СВА · С57BL/6) в дозах 0,1 и 10 мг/кг приводило к достоверному увеличению массы лимфоузлов на 33,3 и 55,6 %. Значимого влияния двухнедельного введения ГБ-115 на массу селезенки и тимуса не выявлено.

Введение ГБ-115 внутрь в дозах 0,1 и 10 мг/кг не вызывало значимого изменения фагоцитарного индекса по сравнению с контролем.

Курсовое введение ГБ-115 внутрь в дозах 0,1 и 10 мг/кг не изменяло интенсивность хемилюминесцентного ответа нейтрофилов, стимулированных опсонизированным зимозаном, не вызывало достоверного изменения фагоцитарного индекса.

Влияние ГБ-115 на гуморальный иммунитет изучали, используя реакцию гемагглютинации. Результаты опытов свидетельствуют, что двухнедельное введение ГБ-115 внутрь в дозах 0,1 и 10 мг/кг мышам линии СВА приводило к значимому увеличению показателей гуморального иммунного ответа на 25, 47 и 16 % соответственно. Введение препарата мышам линии СВА в дозе 0,1 мг/кг не приводило к статистически достоверному изменению антителообразования.

Влияние ГБ-115 на клеточный иммунный ответ изучали по реакции гиперчувствительности замедленного типа в опытах на мышах-гибридах F1(СВА · С57BL/6). После введения ГБ-115 внутрь в дозах 0,1 и 10 мг/кг в течение 14 дней не обнаружено статистически достоверного изменения реакции гиперчувствительности замедленного типа по сравнению с контролем.

В ходе исследований репродуктивной токсичности ГБ-115 оценивали его возможное эмбрио- и фетотоксическое действие, регистрируемое в антенатальном периоде развития плодов. В результате проведенных исследований установлено, что ГБ-115 при внутрижелудочном введении в дозах 0,1 и 10 мг/кг не изменяет общего состояния и поведения беременных животных. Прирост массы беременных крыс не отличается от контрольных величин.

ГБ-115 при внутрижелудочном введении в дозах 0,1 и 10 мг/кг не повышает показателей спонтанной эмбриональной пред- и постимплантационной гибели. Масса тела плодов, подвергнутых антенатальному воздействию ГБ-115 в дозе 0,1 мг/кг, была несколько меньше, чем в контроле. Такого эффекта не отмечено при использовании препарата в дозе 10 мг/кг.

ГБ-115 в дозах 0,1 и 10 мг/кг при внутрижелудочном введении не оказывает эмбриотоксическое и тератогенное действие: не повышает спонтанную эмбриональную гибель по сравнению с контрольными показателями, не влияет на массу и кранио-каудальный размер плодов, не вызывает аномалий развития внутренних органов и дефектов скелета. Скорость окостенения скелета не отличается от контрольных показателей.

ГБ-115 при введении беременным крысам в дозе 10 мг/кг не оказывает существенного влияния на физическое развитие и поведение крысят в течение двухмесячного срока наблюдения.

При изучении возможного влияния препарата на репродуктивную функцию крыс проведено две серии экспериментов: на самках и самцах.

Данные первой серии экспериментов, полученные на самках, которые были подвергнуты воздействию препарата в течение трех эстральных циклов, свидетельствуют, что индекс фертильности при применении ГБ-115 в дозе 10 мг/кг составлял 91,7 %, а в контроле — 95 %.

Во второй серии экспериментов, где самцам крыс вводили ГБ-115 полный период сперматогенеза, установлено следующее. У самок, спаренных с самцами, получавшими ГБ-115 в дозе 10 мг/кг, не наблюдалось увеличения показателей пред- и постимплантационной гибели, хотя и наблюдалось некоторое снижение числа желтых тел, мест имплантаций и живых плодов. Индекс фертильности составлял 89 %, в контроле — 95 %.

Наблюдение за развитием потомства в течение месяца не выявило существенных различий в поведении, динамике массы и показателях гибели контрольных и подопытных крысят в обеих сериях эксперимента.

ГБ-115 в дозе 10 мг/кг в опытах на самках и самцах не влияет на способность животных к спариванию и оплодотворению и не изменяет показателей спонтанной эмбриональной гибели. Наблюдение за развитием потомства в течение месяца не выявило существенных различий в поведении, динамике массы и показателях гибели контрольных и подопытных крысят.

ГБ-115 не индуцирует генных мутаций в тесте Эймса и не проявляет цитогенетических эффектов в клетках костного мозга самцов и самок мышей при однократном и ежедневном пятидневном введении внутрь в дозах 0,1 и 10 мг/кг.

## ВЫВОДЫ

1. ГБ-115 не вызывает летальности у мышей и крыс при однократном введении внутрь в дозах до 6 г/кг и 3,5 г/кг соответственно.

2. ГБ-115 при ежедневном шестимесячном введении внутрь в дозах 0,1 и 10 мг/кг не вызывает необратимых патологических изменений в обследованных органах и системах крыс и кроликов обоего пола.

3. ГБ-115 в дозах 0,1 и 10 мг/кг не вызывает аллергических реакций немедленного и замедленного типа и псевдоаллергических реакций.

4. ГБ-115 в дозах 0,1 и 10 мг/кг не оказывает иммунотоксического действия.

5. ГБ-115 в дозах 0,1 и 10 мг/кг не оказывает эмбриотоксическое и тератогенное действие, не влияет на способ-

ность экспериментальных животных к спариванию и оплодотворению, не влияет на постнатальное развитие потомства.

6. ГБ-115 не обладает мутагенными свойствами.

## ЛИТЕРАТУРА

1. С. А. Андронати, В. С. Битенский, Т. А. Воронина, *Гидазепам — применение в терапии невротических и психопатических состояний*, Методическое пособие для врачей, Национальная Академия Наук Украины, Киев (1999).
2. В. И. Бородин, *Психиатр. и психофармакол.*, № 3, 72 – 74 (2000).
3. Клиническая токсикология детей и подростков, И. В. Маркова, В. В. Афанасьев, Э. К. Цыбулькин, М. В. Неженцев (ред.), *Интермедика*, Санкт Петербург (1998).
4. Л. Г. Колик, *Исследование анксиолитических и антиалкогольных свойств новых антагонистов ССК-2 рецепторов у инбредных животных с различной эмоциональностью*, Дис. канд. биол. наук, Москва (2002).
5. Л. Г. Колик, В. Н. Жуков, С. Б. Середенин, *Экспер. и клин. фармакол.*, 70, № 2, 8 – 11 (2007).
6. Л. Г. Колик, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин, *Бюл. exper. биол.*, 135, № 5, 519 – 523 (2003).
7. Д. Р. Лоуренс, П. Н. Бенитт, *Клиническая фармакология*, Медицина, Москва (1993).
8. *Международные рекомендации по проведению медико-биологических исследований с использованием животных*, Совет международных медицинских организаций, Москва (2000).
9. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Р. У. Хабриев (ред), Медицина, Москва (2005).
10. О. И. Чеберда, *Автореф. дис. канд. мед. наук*, Москва (2005).
11. M. B. Balter, *Prevalence of medical use of prescription drug. Presented at NIDA technical review. Evaluation of the impact of prescription drug diversion control systems on medical practice and patient care: possible implications for future reserch. Bethesda MD: NIDA* (1991).
12. J. González de Dios, M. Moya-Benavent, F. Carratalá-Marco, *Rev Neurol*, 29(2), 121 – 123 (1999).
13. С. Н. Leal Garza, G. G. Valenciano Cedillo, M. A. Rojas Alvarado, *Cortes Gutierrez EI, Arch Med Res.*, 29(4), 285 – 289 (1998).
14. L. Sánchez-Morillas, J. J. Laguna-Martinez, M. Reaño-Martos, E. Rojo-Andrés, P. G. Ubeda, *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 18(5), 404 – 406 (2008).

Поступила 13.11.09

## PRECLINICAL SAFETY INVESTIGATION OF GB-115 DIPEPTIDE

A. V. Sorokina, S. V. Alekseeva, E. P. Nemova, L. P. Kovalenko, N. M. Smol'nikova, E. V. Shipaeva, O. V. Shreder, I. A. Miroshkina, S. A. Dyukova, N. O. Dauge-Dauge, A. V. Kulakova, L. G. Kolik, A. D. Durnev, and S. B. Seredenin

Zakusov Institute of Pharmacology, Russian Academy of Medical Sciences, Baltiiskaya ul. 8, Moscow, 125315, Russia

Preclinical safety investigations of newly synthesized dipeptide compound GB-115 (amide N-phenylhexanoyl-glycyl-L-tryptophan), an antagonist of cholecystinin receptors, were performed. No animals were lost after GB-115 acute oral administration at a maximum dose of 6000 mg/kg in mice and at 3500 mg/kg in rats. GB-115 administered *per os* during 6 months in rabbits and rats (both males and females) at the doses of 0.1 and 10 mg/kg induced no irreversible pathological changes in organs and systems studied. The tested dipeptide exhibited no allergenic, immunotoxic and mutagenic activity, and did not affect generative function and the antenatal and postnatal development of progeny. GB-115 at a dose of 10 mg/kg produced suppression of the inflammatory reaction to concanavalin A.

**Key words:** GB-115 dipeptide, safety, toxicity, allergenic properties, immunotoxicity, teratogenicity, mutagenicity, laboratory animals