

РАЩЕНКО АНДРЕЙ ИГОРЕВИЧ

**ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА НОВОГО
ОБЕЗБОЛИВАЮЩЕГО СРЕДСТВА ПРОИЗВОДНОГО БЕНЗИМИДАЗОЛА**
(экспериментальное исследование)

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Волгоград - 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН, з.д.н. РФ

Спасов Александр Алексеевич

Научный консультант:

доктор биологических наук,
зав. лабораторией фармакокинетики

Смирнова Людмила Андреевна

Официальные оппоненты:

Павел Александрович Галенко-Ярошевский

доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Кубанский государственный медицинский университет», заведующий кафедрой

Нелия Марсовна Насыбуллина

доктор фармацевтических наук, профессор, ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармацевтической технологии, профессор кафедры

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»

Защита состоится “__” 2014 г. в “__” часов на заседании диссертационного совета в Д 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1; адрес сайта: volgmed.ru)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте (www.volgmed.ru) ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Автореферат разослан “_____” _____ 2014 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета,
доктор биологических наук

Бугаева Любовь Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Наиболее часто в клинической практике используют наркотические обезболивающие препараты, которые неселективно действуют на различные подтипы опиоидных рецепторов. Однако, данные средства обладают рядом серьезных нежелательных реакций таких как: развитие пристрастия и привыкания, эйфория, угнетение дыхательного центра, обстипация, седация [Петров В.И. 2009, Звартау Э.Э. 2007, Игнатов Ю.Д. 2001, Lahmaiah M. et al 2012]. Следует отметить, что при длительном использовании опиоидных анальгетиков развивается толерантность к обезболивающему эффекту, что в итоге приводит к необходимости повышать дозу применяемого препарата, а их свойство вызывать физическую и психическую зависимость может стать причиной сложной социальной адаптации после окончания терапии [Savage S.R., Kirsh K. L. et al, 2008]. В связи с этим, большое значение имеет разработка опиоидных обезболивающих средств, не вызывающих побочные эффекты, которые развиваются при активации μ -рецепторов [Kivell B., Prisinzano T.E., 2010]. К подобным веществам относятся соединения, обладающие каппа-агонистической активностью [Guzman D.S., 2014].

В результате исследований, проведенных на базе ВолгГМУ совместно с НИИ ФОХ Южного федерального университета, были выявлены вещества с каппа-агонистическими свойствами [А.А. Спасов, О.Ю. Гречко, 2007, Н.В. Елисеева, 2011], одно из которых конденсированное производное морфолиноэтилимидазобензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205, проявляет антиноцицептивные свойства и характеризуется агонистической активностью по отношению к каппа-опиоидным рецепторам [А.А. Спасов и др., 2013]. Так, было установлено, что в анальгетических тестах соединение РУ-1205 развивает обезболивающий эффект, ингибируемый специфическим блокатором каппа-опиоидных рецепторов – норбинаторфмином и неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов – налоксоном.

Необходимо отметить, что для оценки фармакодинамических параметров новых лекарственных препаратов, принципиально важно знать их фармакокинетические свойства, такие как всасывание, распределение по органам и тканям, метаболизм и выведение [Каркищенко Н.Н. и др., 2001]. Знание данных

процессов позволяет дать объективную оценку связи концентрации лекарственных веществ в крови с величиной и продолжительностью терапевтического действия, что может иметь большое значение для обоснованной разработки схем дозирования нового лекарственного средства и их корректировки [Смирнова Л.А. 2004].

Данная работа является продолжением серии исследований фармакологических свойств соединения РУ-1205 и представляет собой экспериментальное изучение его фармакокинетических свойств при внутривенном, пероральном и подкожном введении в виде субстанции и лекарственных форм.

Степень разработанности. Применяемые в клинической практике опиоидные анальгетики характеризуются рядом нежелательных побочных эффектов таких как: развитие пристрастия и привыкания, эйфория, угнетение дыхательного центра и др. Создание обезболивающих средств, лишенных данных побочных реакций, остается актуальной задачей. Подобные препараты создаются на основе агонистов каппа-опиодных рецепторов. На сегодняшний день на российском фармацевтическом рынке отсутствуют отечественные аналоги таких лекарственных средств. Кроме того, зарубежные каппа-агонисты (буторфанола тартрат, пентазоцин) обладают низкой биодоступностью при пероральном введении и применяются в основном в виде инъекций.

Цель исследования. Исследование фармакокинетических свойств нового обезболивающего вещества РУ-1205 и его лекарственных форм.

Задачи исследования

1. Разработать метод количественного определения соединения РУ-1205 в биологическом материале.
2. Изучить фармакокинетические свойства исследуемого вещества в плазме крови крыс при внутривенном пути введения.
3. Исследовать фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 при пероральном пути введения. Рассчитать значение абсолютной биодоступности.
4. Определить фармакокинетические свойства исследуемого вещества при подкожном введении. Рассчитать значение абсолютной биодоступности.
5. Исследовать распределение соединения РУ-1205 по органам и тканям крыс.

6. Изучить процессы экскреции субстанции соединения РУ-1205.
7. Определить взаимосвязь между фармакокинетическими и обезболивающими свойствами исследуемого вещества.
8. Исследовать возможный метаболизм соединения РУ-1205 *in silico*, а также *in vivo* по результатам взаимодействия изучаемого вещества со специфическими тест-субстратами цитохромов Р450.
9. Изучить фармакокинетические свойства таблеток, покрытых оболочкой, капсул соединения РУ-1205 при пероральном введении и его лиофилизата при внутривенном и подкожном путях введения. Рассчитать их относительную биодоступность лекарственных форм изучаемого вещества.

Научная новизна. Впервые разработан метод количественного определения соединения РУ-1205 в биологических тканях, исследованы фармакокинетические свойства при внутривенном, пероральном и подкожном путях введения у крыс, при этом определены основные параметры распределения и элиминации изучаемого вещества. Впервые были рассчитаны величины абсолютной биодоступности соединения при внесосудистых путях введения были изучены возможные процессы биотрансформации производного имидазобензимидазола. Впервые экспериментально определена зависимость фармакодинамических свойств соединения РУ-1205 от его фармакокинетики в плазме крови, оценены фармакокинетические свойства таблеток, покрытых оболочкой, капсул при пероральном пути введения, а также лиофилизата при внутривенной и подкожной инъекции соединения РУ-1205. Определены параметры относительной биодоступности лекарственных форм изучаемого вещества

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены данные о фармакокинетических процессах соединения РУ-1205 в организмах крыс и кроликов. Установлены принципиальные параметры – абсолютная биодоступность субстанции изучаемого вещества и относительная биодоступность его лекарственных форм при внутривенном, пероральном и подкожном путях введения. Определена взаимосвязь между фармакокинетическими и антиноцицептивными свойствами соединения РУ-1205, а также получены данные о возможных путях его метаболизма.

Методология и методы исследования. Согласно поставленным задачам выбраны современные методические подходы, имеющиеся в ВолгГМУ. В качестве объекта исследования использованы субстанция соединения РУ-1205 и его лекарственные формы, представленные в виде таблеток, покрытых оболочкой, капсул, а также лиофилизата. Основные методы исследования: физико-химический - высокоэффективная жидкостная хроматография (изучение количественного содержания исследуемого вещества в биологическом материале); исследование конкурентного взаимодействия соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами цитохромов Р450; компьютерный метод *in silico* (прогноз возможных метаболитов изучаемого вещества), статистический анализ результатов.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработан метод количественного определения соединения 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205 в биологическом материале. Изучаемое вещество определяется на ВЭЖХ-хроматографе с УФ-детектором при длине волны 205 нм, Температура термостатирования колонки 50 °С. Мобильная фаза: ацетонитрил:КН₂РО₄ (рН=5,0) 1:1 (v:v). Скорость потока мобильной фазы – 1 мл/мин. При этом чувствительность метода составила - 0,5 мкг/мл. Средняя ошибка измерения – 11,85 %, а воспроизводимость и повторяемость метода 15 % и 20 % соответственно;
2. При внутривенном введении в дозе 10 мг/кг соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Установлено, что пик концентрации наблюдается через 5 минут после введения и составляет 1,58 мкг/мл. Экскретируется преимущественно почками на протяжении 72 часов;
3. При пероральном введении в дозе 50 мг/кг изучаемое вещество наблюдается в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Выявлено, что максимальная концентрация наблюдается через 1 час после начала эксперимента и составляет 1,04 мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при данном пути введения у крыс составляет 37,34 %. Выводится преимущественно через почки в течение 96 часов;
4. При подкожном введении в дозе 50 мг/кг соединения РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Максимальная концентрация наблюдается через 30 минут после введения и составляет 10,20

мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при подкожной инъекции составляет 49,02 %. Экскретируется в основном почками на протяжении 72 часов;

5. Время достижения максимальной концентрации соединения РУ-1205 в крови крыс опережает время наступления максимального обезболивающего эффекта при пероральном введении на 3 часа и при подкожном – на 30 минут;

6. Относительная биодоступность для лекарственных форм соединения РУ-1205 составила: для таблеток, покрытых оболочкой - $105,3 \pm 11,70$ %; для капсул - $109,53 \pm 6,76$ %; для лиофилизата при внутривенном введении - $98,72 \pm 8,72$ %; для лиофилизата при подкожном введении - $81,94 \pm 10,12$ %.

Внедрение результатов исследования. Данные о фармакокинетических и фармакодинамических свойствах нового агониста к-опиоидных рецепторов используются в лекционном материале на кафедре фармакологии, кафедре фармакологии и биофармации ФУВ, кафедре фармацевтической химии Волгоградского государственного медицинского университета. В работе НИИ фармакологии ВолгГМУ, Волгоградского научного медицинского центра применяется метод количественного определения соединения РУ-1205.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена по ФЦП «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» в рамках госконтракта № 11411.1008700.13.090 от 13.09.2011 по теме «Доклинические исследования лекарственного средства с каппа-опиоидной агонистической активностью на основе производного имидазобензимидазола».

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным объемом экспериментальных исследований, выполненных на большом количестве крыс и кроликов. Используются современные методы и методические подходы для изучения фармакокинетических процессов, высокотехнологичное оборудование (ВЭЖХ), а также выбраны адекватные критерии для статистической обработки результатов с использованием параметрических и непараметрических критериев.

Основные положения диссертации представлены на IV съезде фармакологов России «Инновации в современной фармакологии» (Казань, 2012); IV

Всероссийском научно-практическом семинаре для молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств», Волгоград 2012; первой всероссийской научно-практической конференции молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств» (Москва, 2013); XVIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 2013 г; 70,71,72-й итоговой научных конференциях студентов и молодых ученых Волгоградского государственного медицинского университета, Волгоград 2012, 2013, 2014 гг.; IV Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2014).

По теме диссертации опубликовано 16 работ, в том числе 3 в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ.

Личный вклад автора.

Автором самостоятельно проведен поиск и анализ зарубежных и отечественных источников литературы по теме: «Фармакодинамика и фармакокинетика каппа-агонистов». Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии на всех этапах исследования по изучению фармакокинетических свойств нового конденсированного производного бензимидазола – соединения РУ-1205: решения поставленных задач, обсуждения результатов, разработке практических рекомендаций. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований на всех его этапах. При написании диссертационной работы автором лично выполнен сбор первичных данных, статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов, формулировка выводов и практических рекомендаций, оформление рукописи.

Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на страницах машинописного текста и состоит из введения, 5 глав, выводов и списка литературы, включающего отечественных и зарубежных источников. Работа иллюстрирована таблицами и рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В первой главе представлен анализ отечественной и зарубежной научной литературы на тему фармакодинамика и фармакокинетика каппа-опиоидных агонистов. В первом разделе рассмотрены современные представления о

фармакологии агонистов каппа-опиоидных рецепторов, подробно охарактеризован спектр их действия и побочные эффекты. Основной раздел обзора литературы посвящен анализу фармакокинетических свойств селективных каппа-агонистических средств, где представлены данные о биодоступности данных препаратов, их распределении по органам и тканям животных, метаболизме и экскреции.

Вторая глава диссертации посвящена описанию материалов и методов исследования. Объект исследования - субстанция соединения 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазол¹ под лабораторным шифром РУ-1205, а также его лекарственные формы: пероральные – таблетки, покрытые оболочкой, и капсулы; и парентеральная – лиофилизат для приготовления инъекционных растворов.

Исследование фармакокинетики соединения РУ-1205 проводилось на 175 белых беспородных крысах-самцах, 20 белых беспородных мышах-самцах и 30 кроликах-самцах породы шиншилла, полученных из питомника РАМТН, Москва. Животные содержались в условиях вивария на стандартной диете (гранулированный комбикорм, гранулы 5 мм, ГОСТ 51899-02), при соблюдении правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 1000.4-96), а также правил и Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). За 12 ч до эксперимента животные не получали пищу без ограничения доступа к воде. Все эксперименты выполняли согласно заключению этической экспертизы (протокол № 155-2012 от 23 марта 2012 года, Региональный Независимый Этический Комитет).

Для количественного определения соединения РУ-1205 в биологическом материале использовали оригинальный метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектором на хроматографе Shimadzu. Условия хроматографирования: аналитическая колонка SUPELCOSIL LC-18 - 100 x 4,6 мм, диаметр частиц 5 мкм. Колонку термостатировали при 50 °С. Подвижная фаза: раствор А и раствор В в соотношении 1:1. Раствор А: 50 мМ раствор

¹ Субстанция синтезирована в НИИ ФОХ Южного федерального университета под руководством старшего научного сотрудника, к.х.н. В.А. Анисимовой.

однозамещенного фосфата калия $pH=5,0$, оттитрованный $0,5\text{ M}$ раствором $NaOH$; раствор В: ацетонитрил. Скорость потока подвижной фазы – 1 мл/мин . Перед хроматографированием подвижную фазу дегазировали на ультразвуковой бане и фильтровали. Детектирование проводили при длине волны 205 нм . Время удерживания при данных условиях составило $8,00 - 8,80\text{ мин}$.

Изучение фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 выполнялось согласно методическим рекомендациям по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств [А.А Фирсов, В.П. Жердев, Ю.А. Портной, Г.Б. Колыванов, А.А. Литвин, Е.Ю. Барманова, 2012]. Для оценки фармакокинетических свойств изучаемого вещества рассчитывали следующие параметры: площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» (AUC), клиренс (Cl), константу элиминации (K_{el}), общий объем распределения (V_d), период полувыведения ($T_{1/2}$), среднее время удерживания (MRT), тканевая доступность (ft), коэффициент распределения (Kd), абсолютная и относительная биодоступность (F_{abs} , $F_{отн}$).

Прогноз возможных метаболитов соединения РУ-1205 проводили с помощью программы «PALLAS 3.00» (CompuDrug Chemistry Ltd.).

Для подробного изучения влияния *соединения РУ-1205 на систему цитохрома P450* использовались тесты взаимодействия с гексеналом (изоформы CYP2C9, CYP2B1 и CYP2B2) [Omiecinski C.J. et al., 1999; Nebert D.W. et al., 2002], мидазоламом (изоформы CYP3A1 и CYP2C) [Warrington J.S., et al., 2000] и альпразолам (изоформ CYP3A1) [Никитин Н.А., 2002]. Для изучения влияния соединения РУ-1205 на вторую фазу биотрансформации использовался тест хлоралгидратного сна, так как хлоралгидрат является тест-субстратом глюкоронилтрансферазы. [Лакин К.М. и др., 1981].

При исследовании *взаимосвязи фармакокинетики и фармакодинамики* соединения РУ-1205 в качестве фармакодинамического показателя был выбран обезболивающий тест. Проведение экспериментов по исследованию уровня болевой чувствительности проводили на модели электрического раздражения хвоста крыс [Carrol N.M., 1960]. Корреляцию между фармакокинетическими и обезболивающими свойствами соединения РУ-1205 описывали в виде зависимости антиноцицептивного эффекта от концентрации вещества в плазме крови.

Исследование *фармакокинетических свойств лекарственных форм* соединения РУ-1205 проводили при внутривенном и подкожном введении изучаемого вещества в виде лиофилизата, а также при пероральном – в виде таблеток, покрытых оболочкой, и капсул. Лекарственные формы созданы в лаборатории технологии лекарственных форм НИИ фармакологии им. В.В. Закусова РАМН под руководством профессора Б.М. Пятина.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием парного t-критерия Стьюдента, критерия Манна-Уитни (Newman-Keulstest) с использованием табличного редактора Microsoft Excel и пакета прикладных программ «GraphPad Prism 5.00» [Гланц С., 1998] с предварительной проверкой выборки на нормальность распределения.

Третья глава (Экспериментальная фармакокинетика)

Разработанный хроматографический метод анализа характеризуется достаточной селективностью и позволяет определять в биологических пробах изучаемое вещество (Табл. 1). Валидация метода проводилась согласно «Guideline on bioanalytical method validation» (EMA, 2012).

Таблица 1

Основные аналитические параметры метода ВЭЖХ количественного определения соединения РУ-1205.

Параметр	Значение
Внутридневные колебания (Повторяемость)	20%
Междневные колебания (воспроизводимость)	15%
Точность	87,85 %
Чувствительность	500 нг/мл
Предел обнаружения	200 нг/мл
Средняя ошибка измерения	11,86 %

Соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов независимо от пути введения. При этом максимальная концентрация изучаемого вещества при пероральном введении наблюдается через 1 час от начала эксперимента, а при подкожном – через 30 минут (Табл 2). Абсолютная биодоступность соединения РУ-1205 при пероральном введении составила 37 %, при подкожном – 49 %.

Для изучаемого вещества характерно интенсивное распределение в органы и ткани, концентрация в которых превышает таковую в плазме крови крыс.

Соединение РУ-1205 характеризуется наибольшей тропностью к головному мозгу – органу мишени ($ft=5,97$), печени ($ft=5,69$) и почкам ($ft=3,33$) – органам элиминации, а также к жировой ткани ($ft=4,89$).

Таблица 2

Фармакокинетические параметры соединения РУ-1205 в плазме крови крыс после однократного внутривенного, перорального и подкожного введения

Параметр	Способ введения		
	Внутривенный (10 мкг/кг)	Пероральный (50 мг/кг)	Подкожный (50 мг/кг)
$AUC_{0-\infty}$, мкг*мл/час	14,76	27,56	36,18
K_{el} , ч ⁻¹	0,08	0,04	0,24
$T_{1/2}$, ч	8,49	17,76	3,36
MRT, ч	7,14	7,85	3,14
Cl, л/ч*кг	0,87	1,81	1,38
Vd, л/кг	8,30	43,88	5,71
T_{max} , ч	0,089	1,00	0,50
C_{max} , мкг/мл	1,56±0,05	1,04±0,03	13,40±1,11
F_{abs} , %		37,34	49,02

Установлено, что выведение соединения РУ-1205 происходит на протяжении 72-96 часов в зависимости от пути введения. Было отмечено, что неизменная субстанция обнаруживается в экскретах суммарно в количествах равных порядка 0,7 % от введенной дозы при каждом пути введения. Также было обнаружено, что большее количество изучаемого вещества экскретируется через почки (0,5%), чем через ЖКТ (0,2%). Однако выявлено, что внепочечный (метаболический) клиренс (при в/в введении = 0,67; при введении внутрь = 2,36; при п/к = 1,38) соединения РУ-1205 значительно превышает почечный (при в/в введении = 0,003; при введении внутрь = 0,003; при п/к = 0,001). Известно, что преобладание метаболического клиренса над ренальным свидетельствует об активном метаболизме изучаемого вещества [А.А. Упницкий, 2000].

При исследовании зависимости фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 от обезболивающего эффекта при пероральном и подкожном путях введения установлено, что время достижения максимального значения и пиковой концентрации изучаемого вещества в плазме крови существенно отличаются. Установлено, что при подкожном введении через 8 часов исследования

наблюдается вторая волна антиноцицептивного эффекта без возрастания концентрации соединения РУ-1205 в плазме крови (Рис. 1).

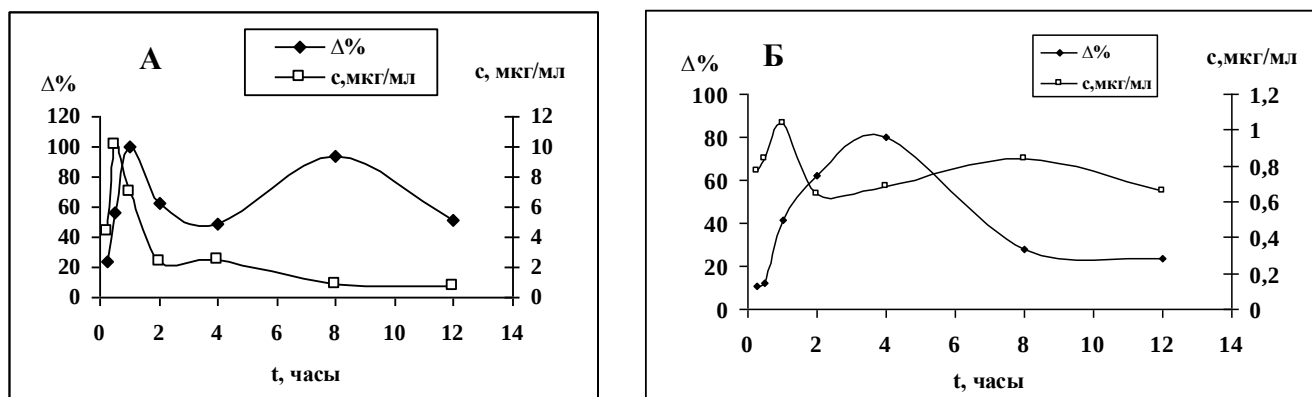


Рис. 1 Зависимость порога болевой чувствительности (в % по отношению к контролю) от содержания соединения в плазме крови и времени после перорального введения крысам. А – При подкожном введении; Б – при пероральном введении.

Обозначения: по оси абсцисс – время (часы), по левой оси ординат – изменение порога болевой чувствительности ($\Delta\%$ по отношению к контролю), по правой оси ординат – концентрация соединения в плазме крови ($\mu\text{g/mL}$).

При внутрижелудочном введении отмечается обезболивающий эффект, несмотря на то, что при разработанных хроматографических условиях соединение РУ-1205 при данном пути введения в центральной нервной системе обнаружено не было. Необходимо отметить, что в проведенных ранее исследованиях установлено вероятное проникновение изучаемого вещества через гематоэнцефалический барьер. Так, было выявлено, что в анальгетических тестах, характеризующих центральный механизм действия соединения РУ-1205, наблюдалось развитие антиноцицептивного эффекта, ингибируемого специфическим блокатором каппа-опиоидных рецепторов – норбинаторфимином и неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов – налоксоном [А.А. Спасов и др., 2013].

На основании полученных данных можно предположить, что соединение РУ-1205 подвергается активным процессам биотрансформации в организме животных. При анализе корреляционной зависимости между фармакокинетическими и обезболивающими свойствами изучаемого вещества установлено, что разница во времени достижения максимального анальгетического эффекта и пиковой концентрации отличается на 3 часа при пероральном введении и на 15 минут при подкожном. Подобные расхождения можно объяснить временем, необходимым для преодоления изучаемым веществом гематоэнцефалического

барьера. Кроме того, при подкожной инъекции на 8 часу исследования наблюдается повторное незначительное увеличение антиноцицептивного эффекта без повышения концентрации соединения РУ-1205 в плазме крови, что свидетельствует о возможном наличии активных продуктов метаболизма.

При прогнозе метаболизма изучаемого вещества *in silico* в программе «PALLAS 3.00» были выявлены 7 возможных метаболитов, которые являются продуктами реакций окисления и, в частности – гидроксирования. При этом было отмечено, что у 6 молекул в химической структуре сохранены фрагменты, возможно участвующие в развитии анальгетического действия – морфолиноэтильный у 9 атома азота и фторфенильный – у второго атома углерода. Также при компьютерном анализе было установлено, что в процессе метаболизма возможен отрыв морфолинового цикла.

С целью изучения возможности соединения РУ-1205 в процессе биотрансформации образовывать конъюгаты с эндогенными кислотами был проведен ферментативный, кислотный и щелочной гидролиз в экскретах крыс. Полученные пробы инкубировали с β -глюкуронидазой и арилсульфатазой. Также проводился щелочной и кислотный гидролиз с добавлением 5М раствора NaOH [Dix K.J. et al., 1999] и 5М раствора HCl [Manini P. Et al., 1999] соответственно. Однако при дальнейшем количественном исследовании биопроб на хроматограммах не было выявлено пиков, характеризующих исходную структуру соединения РУ-1205. Необходимо отметить, что по результатам компьютерного прогноза также не было выявлено продуктов второй фазы биотрансформации. На основании чего можно предположить малую вероятность синтетических реакций в процессах элиминации соединения РУ-1205.

По результатам взаимодействия соединения РУ-1205 со специфических тест-субстратов некоторых изоформ системы CYP450 было выявлено, что под влиянием соединения РУ-1205 статистически значимо пролонгируется гексеналовый (CYP2C9, CYP2B1 и CYP2B2) и алпразоламовый (CYP3A1) сны на 37,29 % ($p \leq 0,05$) и 60,85 % ($p \leq 0,05$) соответственно. Однако при совместном введении изучаемого вещества с мидазоламом (CYP3A1, CYP2C) наблюдается снижение продолжительности сна на 28,74 % ($p \leq 0,05$). При конкурентном взаимодействии соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами изоформ P450 было

выявлено, что изучаемое вещество, вероятнее всего, метаболизируется за счет цитохрома CYP3A1 (окисление ксенобиотиков). Семейство цитохромов CYP2B (гидроксилирование ксенобиотиков) участвует в метаболизме с меньшей вероятностью. И незначительное изменение продолжительности мидазоламового сна свидетельствует о невовлеченности в процесс метаболизма цитохромов семейства CYP2C (окисление ксенобиотиков). Также незначительное изменение хлоралгидратного сна доказывает отсутствие глюкоронилконъюгированных метаболитов.

Таким образом, на основании исследования метаболизма соединения РУ-1205 можно предположить, что биотрансформация протекает в основном по реакциям первой фазы с образованием окисленных форм исходной молекулы. При этом установлено, что наиболее вероятно метаболизм исследуемого вещества происходит в основном под влиянием цитохрома семейства CYP3A1. Также отмечено, что соединение РУ-1205 по-видимому не подвергается метаболизму во второй фазе и не происходит образование конъюгатов.

Четвертая глава (Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 в виде лекарственных форм)

Одним из важных этапов фармакокинетического изучения нового фармакологически активного соединения является исследование его относительной биодоступности. Основной целью таких исследований является получение доказательств идентичности фармакокинетических свойств лекарственных форм изучаемого вещества по отношению к субстанции (А.А. Фисенко, В.П. Жердев и др., 2013).

Было установлено, что при введении изучаемого вещества в виде таблеток и капсул отличается время достижения максимальной концентрации в сравнении с субстанцией (табл. 3). Однако при введении таблеток значение пика концентрации не отличается от такового у субстанции. На основании анализа фармакокинетических параметров таблеток и субстанции было показано, что при введении лекарственной формы статистически значимо отличаются среднее время удерживания одной молекулы соединения РУ-1205 в организме кроликов и кажущийся объем распределения. Вероятнее всего, вспомогательные компоненты – лактоза, лудипресс и магния стеарат, входящие в состав таблеток, улучшают

растворение соединения РУ-1205 в организме кроликов и, в результате, изучаемое вещество подвергается более интенсивным процессам элиминации. При введении соединения РУ-1205 в виде капсул максимальная концентрация ниже в 1,2 раза, чем у субстанции. При этом фармакокинетические показатели не имеют статистически значимых отличий от таковых при введении субстанции. Установлено, что входящие в состав пероральных лекарственных форм вспомогательные компоненты не оказывают существенного влияния на фармакокинетические процессы соединения РУ-1205. Разницу во времени достижения максимальной концентрации можно объяснить распадаемостью, растворением и всасыванием в желудочно-кишечном тракте таблеток и капсул соединения РУ-1205 [Пятин Б.М, 2013].

Таблица 3

Фармакокинетические свойства соединения РУ-125 в виде твердых лекарственных форм в сравнении с субстанцией после однократного перорального введения кроликам в дозе 50 мг/кг ($M \pm m$).

Фармакокинетический параметр	Субстанция	Таблетки, покрытые оболочкой	Капсулы
AUC (мкг/мл)*ч	14,7 $\pm$ 1,20	15,6 $\pm$ 1,40	16,09 $\pm$ 1,28
T _{1/2} , час	10,0 $\pm$ 1,25	7,6 $\pm$ 2,40	10,60 $\pm$ 1,44
Kel	0,07 $\pm$ 0,007	0,09 $\pm$ 0,025	0,06 $\pm$ 0,008
MRT, час	7,3 $\pm$ 0,30	6,0 $\pm$ 0,95*	7,27 $\pm$ 0,39
Cl, л/час/кг	3,4 $\pm$ 0,30	3,2 $\pm$ 0,30	3,11 $\pm$ 0,24
Vd, л/кг	49,2 $\pm$ 2,30	34,8 $\pm$ 7,5*	47,37 $\pm$,70
F _{отн} , %	-	105,3 $\pm$ 11,70	109,53 $\pm$ 6,76

* - статистически значимо по отношению к группе животных, которым вводили субстанцию соединения РУ-1205 ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

При внутривенном введении лиофилизата выявлено, что максимальная концентрация изучаемого вещества наступает через пять минут после введения, как и при инъекции субстанции (табл. 4). Однако наблюдается разница в значении максимальной концентрации – при внутривенном введении пик концентрации в 1,3 раза превышает данное значение у субстанции. При анализе фармакокинетических параметров установлено, что статистически значимо отличаются период полувыведения и среднее время удерживания одной молекулы соединения РУ-1205 в организме кроликов. При подкожном введении инъекционной лекарственной формы и субстанции изучаемого вещества было показано, что время достижения максимальной концентрации соединения РУ-1205 в плазме крови кроликов

совпадает в обоих случаях. Но при подкожном введении пик концентрации превышает данный параметр при введении субстанции в 1,8 раза. Все фармакокинетические параметры при введении лекарственной формы статистически значимо отличаются от соответствующих при введении субстанции. Входящий в состав лекарственной формы вспомогательный компонент манит, являющийся коррегентом изотоничности [Ного М.С., Рана Р.К., 1992], а также солюбилизатором [Пятин .Б.М., 2013] повышает растворимость соединения РУ-1205 и увеличивает всасываемость в месте инъекции при подкожном введении. Под воздействием солюбилизатора также увеличивается скорость элиминации изучаемого соединения как в случае внутривенного, так и в случае подкожного пути введения.

Таблица 4

Фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 в виде инъекционной лекарственной форме в сравнении с субстанцией после однократного внутривенного и подкожного введения кроликам в дозах 10 мкг и 25 мг/кг соответственно ($M \pm m$).

Фармакокинетический параметр	Внутривенное введение		Подкожное введение	
	Субстанция	Лиофилизат	Субстанция	Лиофилизат
AUC (мкг/мл)*ч	11,93±0,47	11,65±0,65	17,18±0,60	14,035±1,29*
T _{1/2} , час	5,12±0,10	4,55±0,06*	15,09±0,72	10,31±1,12*
Kel	0,13±0,0013	0,15±0,002	0,04±0,002	0,065±0,004*
MRT, час	5,2±0,13	7,01±0,24*	8,38±0,26	7,55±0,34*
Cl, л/час/кг	0,83±0,03	0,85±0,45	1,46±0,03	1,78±0,17*
Vd, л/кг	5,2±0,16	5,65±0,33	31,94±1,69	26,51±0,68*
F _{отн} , %	-	98,72±8,72	-	81,94±10,12

* - статистически значимо по отношению к группе животных, которым вводили субстанцию соединения РУ-1205 ($p \leq 0,05$) по t-критерию Стьюдента.

Пятая глава (обсуждение результатов)

Для идентификации изучаемого вещества в биологических пробах использовался высокоэффективный жидкостной хроматограф (Shimadzu, Япония) с УФ-детектором. Подбор условий хроматографирования осуществлялся на основе ранее разработанных методов количественного определения производных бензимидазола в биологических тканях. Так, например, препараты ритмидазол, амфедазол, бемитил, дибазол и соединение РУ-64 также идентифицируются в условиях ВЭЖХ с использованием УФ-детектора, однако при длинах волн от 254 нм до 280 [Л. А. Смирнова, 2004]. Для сравнения, соединение РУ-1205

определяется при $\lambda=205$ нм. Также в результате анализа было установлено, что в качестве мобильной фазы для выше указанных соединений используется смесь ацетонитрила с ацетатным буфером в различных соотношениях, в то время как для соединения РУ-1205 оптимальной является комбинация фосфатного буфера и ацетонитрила. Следует отметить, что для большинства идентификации производных бензимидазола используются хроматографические колонки с присадкой С18 [Смирнова Л.А, 1999].

При исследовании фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 установлено, что изучаемое вещество циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов при внутривенном, пероральном и подкожном пути введения. По результатам полученных экспериментальных данных было показано, что абсолютная биодоступность субстанции соединения РУ-1205 составляет 37 %. Для сравнения, применяемый в клинике агонист каппа-опиоидных рецепторов буторфанола тартрат, в эксперименте на животных имеет низкое значение биодоступности при пероральном введении, составляющее менее 10 %, В связи с этим данный препарат используется, только в виде инъекционных и интраназальных лекарственных форм [D.S. Guzman, K. Flamer, 2014]. По литературным данным [И.А Шабашева, 1997] некоторые производные бензимидазола характеризуются достаточно высокими показателями абсолютной биодоступности при внутрижелудочном введении. Так, например, у антиаритмического препарата ритмидазол данный показатель составляет 47,15 %. При подкожном введении субстанции соединения РУ-1205 абсолютная биодоступность исследуемого вещества составляет 49 %. Распределяется по всем изученным органам и тканям организма крыс, обладая наибольшей тропностью к головному мозгу – органу мишени, печени и почкам, а также к жировой ткани. В данных органах отмечаются более высокие концентрации соединения РУ-1205, чем в плазме крови. Меньшие количества обнаруживаются в высоковазкуляризированных тканях – сердце, легких и селезенке. Наименьшие количества изучаемого вещества отмечаются в мышечной ткани. Однако при пероральном введении в данных хроматографических условиях соединение РУ-1205 в ЦНС обнаружено не было.

Исследуемое соединение экскретируется преимущественно почками независимо от пути введения. При этом неизмененного вещества суммарно выводится 0,5 - 0,7 % от введенной дозы. Однако было выявлено, что внепочечный (метаболический) клиренс соединения РУ-1205 значительно превышает почечный. Известно, что преобладание метаболического клиренса над ренальным свидетельствует об активном метаболизме изучаемого вещества [А.А. Упницкий, 2000]. В ранее проведенных экспериментальных исследованиях установлено, что производные бензимидазола подвергаются активному метаболизму в организме животных [А.А. Спасов, 2001].

При исследовании зависимости фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 от обезболивающего эффекта при пероральном и подкожном путях введения установлено, что время достижения максимального значения обезболивающего эффекта и пиковой концентрации изучаемого вещества в плазме крови существенно отличаются. Установлено, что при подкожном введении на 8 часу исследования наблюдается вторая волна антиноцицептивного эффекта без возрастания концентрации соединения РУ-1205 в плазме крови. При внутрижелудочном введении отмечается обезболивающий эффект, несмотря на то, что при разработанных хроматографических условиях соединение РУ-1205 при данном пути введения в центральной нервной системе обнаружено не было. Необходимо отметить, что в проведенных ранее исследованиях установлено вероятное проникновение изучаемого вещества через гематоэнцефалический барьер. Так, было выявлено, что в аналгетических тестах, характеризующих центральный механизм действия соединения РУ-1205, наблюдалось развитие антиноцицептивного эффекта, ингибируемого специфическим блокатором каппа-опиоидных рецепторов – норбинаторфимином и неспецифическим блокатором опиоидных рецепторов - налоксоном [А.А. Спасов и др., 2013].

В процессе изучения возможных метаболитов соединения РУ-1205 было задействовано три метода. При прогнозе метаболизма изучаемого вещества *in silico* были выявлены 7 возможных метаболитов, которые являются продуктами реакций окисления и, в частности – гидроксирования. При этом было отмечено, что у 6 молекул в химической структуре сохранены фрагменты, возможно участвующие в

развитии анальгетического действия. Также при компьютерном анализе было установлено, что в процессе метаболизма возможен отрыв морфолинового цикла.

При конкурентном взаимодействии соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами изоформ Р450 было выявлено, что продуктами реакций биотрансформации соединения РУ-1205 также служат окисленные формы метаболитов. Наиболее вероятно образование гидроксилированных производных.

Накопленный материал позволяет заключить, что исследуемое соединение подвергается активным процессам биотрансформации в организме животных. Данный вывод подтверждается низкими значениями концентрации неизмененного вещества, относительно введенной дозы, в плазме крови, также низким содержанием исходной субстанции в экскретах крыс. Результаты анализа зависимости фармакокинетических свойств от фармакодинамики подтверждают наличие возможной биотрансформации соединения РУ-1205, в том числе с образованием активных метаболитов. Результаты анализа метаболизма *in silico* и *in vivo* изучаемого вещества показали, что с большой вероятностью происходит образование окисленных продуктов реакции.

При проведении исследований фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 в виде лекарственных форм было установлено, что при введении таблеток, покрытых оболочкой, и капсул отличается временем достижения максимальной концентрации по сравнению с субстанцией. Однако при введении изучаемого вещества в виде таблеток, покрытых оболочкой, значение пика концентрации не отличается от такового при введении субстанции. Входящие в состав пероральных лекарственных форм вспомогательные вещества не оказывают существенного влияния на фармакокинетические процессы соединения РУ-1205. Распадаемость, растворение и всасывание в желудочно-кишечном тракте таблеток и капсул соединения РУ-1205 объясняет разницу во времени наступления максимальной концентрации [Пятин Б.М, 2013].

При внутривенном введении соединения РУ-1205 в виде лиофилизата установлено, что профиль фармакокинетической кривой совпадает с таковым при введении субстанции. Однако наблюдается разница в значении максимальной концентрации – при внутривенном введении пик концентрации в 1,3 раза превышает данное значение у субстанции. При анализе фармакокинетических

параметров выявлено, что статистически значимо отличаются период полувыведения и среднее время удерживания одной молекулы изучаемого вещества. При подкожном введении пик концентрации превышает данный параметр при введении субстанции в 1,8 раза. При данном пути введения все фармакокинетические параметры при введении соединения РУ-1205 в виде лекарственной формы статистически значимо отличаются от соответствующих при введении субстанции. Входящий в состав лекарственной формы вспомогательный компонент манит, являющийся коррегентом изотоничности [Hora M.S., Rana R.K., 1992; Б. Зибольд, Дж. Ситвенс, 2002], а также солюбилизатором [Пятин .Б.М., 2013] повышает растворимость соединения РУ-1205 и увеличивает всасываемость в месте инъекции при подкожном введении. Под воздействием солюбилизатора также увеличивается скорость элиминации изучаемого соединения как в случае внутривенного, так и в случае подкожного пути введения.

Для соединения РУ-1205 наблюдаются различия в фармакокинетических свойствах у крыс и кроликов. Вероятно, это связано с индивидуальной активностью метаболических систем у данных видов животных [Toutain P.L. 2010].

Заключение

Разработанный метод количественного определения соединения РУ-1205 в биологических пробах является валидированным, селективным и чувствительным, что позволяет использовать его для проведения фармакокинетических исследований.

Изучаемое вещество циркулирует в организме животных на протяжении 12 часов при внутривенном, пероральном и подкожном путях введения, при этом максимальные концентрации в плазме крови и тканях животных значительно уступают исходным количествам соединения РУ-1205. Изучаемое вещество интенсивно распределяется по органам и тканям организма крыс, при этом к головному мозгу – органу потенциального действия – соединение РУ-1205 обладает наибольшей тропностью. Однако, несмотря на развитие анальгетического эффекта при пероральном введении, изучаемое вещество в центральной нервной системе при данном пути введения обнаружено не было. Исследуемое вещество экскретируется на протяжении 72-96 часов в зависимости от пути введения.

При исследовании зависимости анальгетических свойств соединения РУ-1205 от его фармакокинетики были выявлены отличия во времени достижения максимального антиноцицептивного эффекта и пиковой концентрации изучаемого вещества в плазме крови. Также установлено, что через 8 часов после подкожного введения соединения РУ-1205 отмечается вторая волна обезболивания, без увеличения его концентрации в плазме крови. На основании полученных данных можно заключить, что для изучаемого вещества вероятно образование активных метаболитов.

По результатам компьютерного прогноза метаболизма в программе «PALLAS 3.00» установлено, что для соединения РУ-1205 характерно 7 возможных, являющихся продуктами реакций окисления. При проведении реакций гидролиза изучаемого вещества с β -глюкуронидазой, арилсульфатазой, 5М HCL и 5М NaOH было установлено, что соединение РУ-1205 не подвергается реакциям биотрансформации второй фазы. При конкурентом взаимодействии исследуемого вещества со специфическими тест-субстратами цитохромов P450 выявлено, что наиболее вероятны реакции с подсемействами CYP3A1, CYP2B1 и CYP2B2.

При исследовании фармакокинетических свойств соединения РУ-1205 в виде лекарственных форм установлено, что изучаемое вещество циркулирует в плазме крови кроликов на протяжении 12 часов при внутривенном, пероральном и подкожном путях введения. Выявлено, что для пероральных лекарственных форм (соединение РУ-1205 в виде таблеток, покрытых оболочкой и капсул) относительная биодоступность составляет порядка 105 %, а для инъекционной (изучаемое вещество в виде лиофилизата) – 98 % при внутривенном и 82 % при подкожном путях введения.

Выводы

1. Разработан метод количественного определения соединения 9-(2-морфолиноэтил)-2-(4-фторфенил)имидазо[1,2- α]бензимидазола под лабораторным шифром РУ-1205 в биологическом материале с использованием ВЭЖХ. Изучаемое вещество определяется на УФ-детекторе при длине волны 205 нм, на колонке SUPELCOSIL LC-18 (100x4,6x5 мм). Температура хроматографирования 50 °С. Мобильная фаза: ацетонитрил:KН₂РO₄ (рН=5,0) 1:1 (v:v). Скорость потока

мобильной фазы – 1 мл/мин. Чувствительность метода составила - 0,5 мкг/мл. Средняя ошибка измерения – 11,85 %. воспроизводимость и повторяемость метода 15 % и 20 % соответственно;

2. При внутривенном введении (в дозе 10 мг/кг) соединение РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Пик концентрации наблюдается через 5 минут после введения и составляет 1,58 мкг/мл.

3. При пероральном введении (в дозе 50 мг/кг) изучаемое вещество циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Максимальная концентрация наблюдается через 1 час после начала эксперимента и составляет 1,04 мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при данном пути введения у крыс составляет 37,34 %.

4. При подкожном введении (в дозе 50 мг/кг) соединения РУ-1205 циркулирует в плазме крови крыс на протяжении 12 часов. Максимальная концентрация наблюдается через 30 минут после введения и составляет 10,20 мкг/мл. Величина абсолютной биодоступности при подкожной инъекции составляет 49,02 %.

5. Изучаемое соединение интенсивно распределяется в органы и ткани крыс: головной мозг > печень > сальник > селезенка > легкие > почки > сердце > мышцы;

6. Соединение РУ-1205 элиминирует из организма животных на протяжении 3 - 4 суток в зависимости от пути и дозы введения. Экскреция происходит преимущественно через почки, чем через ЖКТ. При этом неизмененного вещества суммарно выделяется порядка 0,7 % от введенной дозы;

7. Время достижения максимальной концентрации соединения РУ-1205 в крови крыс опережает время наступления максимального обезболивающего эффекта при пероральном введении на 3 часа и при подкожном – на 30 минут;

8. В результате компьютерного анализа *in silico* с помощью программы «PALLAS 3.00» было установлено, что в процессе метаболизма возможно образование 7 метаболитов. Продуктами биотрансформации в основном являются окисленные и, в частности, гидроксилированные метаболиты. При совместном введении соединения РУ-1205 со специфическими тест-субстратами цитохромов семейства CYP450 наблюдается пролонгация гексеналового и алпразоламового сна

на 60,85 % и 37,29 % соответственно и укорачивается на 28,74 % сон, вызванный мидазоламом. Однако, не отмечалось статистически значимого изменения продолжительности хлоралгидратного сна, что свидетельствует о возможном отсутствии конъюгированных метаболитов соединения РУ-1205. Эти данные также подтверждаются ранее проведенным компьютерным прогнозом метаболизма и результатами ферментативного, кислотного и щелочного гидролиза экскретов крыс, при котором на хроматограммах не было обнаружено пиков, характеризующих базовую структуру соединения РУ-1205.

9. Относительная биодоступность для лекарственных форм соединения РУ-1205 составила: для таблеток, покрытых оболочкой - $105,3 \pm 11,70$ %; для капсул - $109,53 \pm 6,76$ %; для лифилизата при внутривенном введении - $98,72 \pm 8,72$ %; для лиофилизата при подкожном введении - $81,94 \pm 10,12$ %.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных Минобрнауки РФ:

1. Абсолютная биодоступность производного морфолиноэтилимидазобензимидазола у крыс / А. А. Спасов, Л. А. Смирнова, **А. И. Ращенко**, К. А. Кузнецов, В. А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77, № 1. – С. 17-19.

2. Изучение рецепторного механизма анальгетического действия соединения РУ-1205 / О.Ю. Гречко, А.А. Спасов, Д.М. Штарёва, **А.И. Ращенко** // Вестник ВолгГМУ. -2014, №1(49) – С. 61-63.

3. Фармакокинетические и обезболивающие свойства нового производного имидазобензимидазола - соединения ру-1205 - с каппа-агонистической активностью в таблетированной лекарственной форме / А.А. Спасов, Л.А. Смирнова, О.Ю. Гречко, **А.И. Ращенко**, Д.М. Штарева, В.А. Анисимова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. Т. 77, № 7. – С. 27-30.

Статьи в журналах и сборниках материалов конференций:

4. Изучение анальгетической активности нового производного бензимидазола / Чикун Д.М., **Ращенко А.И.**, Елисеева Н.В. // Материалы юбилейной 70-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины», Волгоград, 11-14 апреля 2012 г. – С. 339.

5. Производные бензимидазола-новый класс к-агонистов / Гречко О.Ю., Елисеева Н.В., Чикун Д.М., **Ращенко А.И.**, Анисимова В.А. // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 18-21 сентября 2012 г. – С. 50-51.

6. Количественное определение нового агониста к-опиоидных рецепторов производного бензимидазола / Л.А. Смирнова, **А.И. Ращенко**, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов, Е.А. Сучков // Материалы IV съезда фармакологов России «Инновации в современной фармакологии», Казань, 18-21 сентября 2012 г. – С. 171-172.

7. Количественное определение соединения РУ-1205 в биологических пробах / Л. А. Смирнова, **А. И. Ращенко**, А. Ф. Рябуха, К. А. Кузнецов, Е. А. Сучков // Волгоградский научно-медицинский журнал 2/2012. – С. 15-17.

8. Распределение морфолиноэтилимидазобензимидазола в организме крыс / **А.И. Ращенко**, Е.А. Сучков // Первая Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых «Проблемы разработки новых лекарственных средств», НИИ им. Закусова, г. Москва, 3-5июня 2013 г. – С. 98

9. Компьютерная оценка различных классов азотсодержащих гетероциклических соединений как источников веществ с каппа-опиоидной парциальной агонистической активностью / Брилькова М.Е., Чикун Д.М., Елисеева Н.В., **Ращенко А.И.** // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. Приложение (Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств»), Волгоград, сентябрь 2012 г. – С. 11-12.

10. Анальгетическая активность нового производного морфолиноэтилимидазобензимидазола / Штарёва Д.М., **Ращенко А.И.**/ Вестник ВолгГМУ. - 2013. Прил. – С. 152-153.

11. Фармакологические и фармакодинамические свойства соединения РУ-

1205 / **Ращенко А.И.**, Штарёва Д.М., Сучков Е.А. / Вестник ВолгГМУ. -2013. Прил. – С. 108-109.

12. Производное бензимидазола – агонист каппа-опиоидных рецепторов /Гречко О.Ю., Спасов А.А., Смирнова Л.А., Штарёва Д.М., **Ращенко А.И.**, Анисимова В.А. /Академическая наука-проблемы и достижения.-2014, С.44-47.

13. Фармакокинетика лекарственных форм производного имидазобензимидазола – соединения РУ-1205 / **А. И. Ращенко**, Е.А. Сучков // IV Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», СПХВА, г. Санкт-Петербург, 14-15 апреля, 2014 г. - С. 525-527.

14. Количественное определение и фармакокинетические свойства соединения РУ-1205 / **А.И. Ращенко**, Е.А. Сучков, К.А. Кузнецов, А.Ф. Рябуха, Л.А. Смирнова // Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств.», г. Волгоград, Вестник ВолгГМУ. – 2012. Прил. – С. 163

15. Аналитические особенности количественного определения производных бензимидазола методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / Л.А. Смирнова, А.А. Спасов, **А.И. Ращенко**, Е.А. Сучков, А.Ф. Рябуха, К.А. Кузнецов // Волгоградский научно-медицинский журнал 2/2012. – С. 9-14.

16. Особенности разработки методов ВЭЖХ количественного определения новых лекарственных веществ в биологических пробах / К.А. Кузнецов, Е.А. Сучков, **А.И. Ращенко** // Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара молодых ученых с с международным участием «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств.», г. Волгоград, Вестник ВолгГМУ. – 2012. Прил. – С. 209.