

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© Коллектив авторов, 2017  
УДК 615.21.015.44  
DOI:10.23888/PAVLOVJ2017130-36

**АНАЛИЗ ПРИНАДЛЕЖНОСТИ ПРЕПАРАТА НООПЕПТ  
К СУБСТРАТАМ И МОДУЛЯТОРАМ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ  
АВСВ1-БЕЛКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO***

*И.В. Черных, А.В. Шулькин, Е.Н. Якушева, М.В. Гацанога, Н.М. Попова*

Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова,  
ул. Высоковольтная, 9, 390026, г. Рязань, Российская Федерация

В статье проанализировано влияние ноотропного препарата Ноопепт (N-фенил-ацетил-L-пролилглицина этиловый эфир) на функциональную активность АВСВ1-белка и изучена его принадлежность к субстратам белка-транспортера на кроликах-самцах породы Шиншилла. Функционирование белка-транспортера оценивали по фармакокинетике его маркерного субстрата – фексофенадина. Фексофенадин вводили однократно внутривентрикулярно в дозе 67,5 мг/кг до и после 14-дневного введения животным Ноопепта в дозе 10 мг/кг массы 3 раза в день. Количественное определение вещества проводили методом ВЭЖХ по разработанной ранее методике.

Для оценки принадлежности Ноопепта к субстратам АВСВ1-белка сравнивали его фармакокинетические параметры до и после курсового введения кроликам-самцам верапамила – известного ингибитора данного белка-транспортера в дозе 20 мг/кг 3 раза в день. Фармакокинетическую Ноопепта изучали по оригинальной методике ВЭЖХ.

Выявлено, что курсовое введение Ноопепта не приводило к достоверному изменению фармакокинетических параметров маркерного субстрата АВСВ1-белка – фексофенадина, что может свидетельствовать о сохранении функциональной активности данного белка-транспортера на исходном уровне. Установлено, что фармакокинетика Ноопепта не изменяется при курсовом введении кроликам ингибитора АВСВ1-белка – верапамила, т.е. ноопепт не является субстратом данного белка-транспортера.

*Ключевые слова:* АВСВ1-белок, гликопротеин-Р, ноопепт, фексофенадин, фармакокинетика, верапамил, субстрат.

**ANALYSIS OF ATTRIBUTION OF NOOPEPT TO SUBSTRATES AND MODULATORS  
OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF ABCB1-PROTEIN IN *IN VIVO* EXPERIMENT**

*I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva, M.V. Gatsanoga, N.M. Popova*

Ryazan State Medical University, Vysokovoltnaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

In the article the influence of nootropic drug Noopept (N-phenyl-acetyl-L-prolylglycine ethyl ester) on the functional activity of ABCB1-protein is analyzed and attribution of this drug to the transport protein substrates is studied on male Chinchilla rabbits. Functioning of the transport protein was estimated by the pharmacokinetics of its marker substrate – fexofenadine. Fexofenadine was introduced intragastrically one time in the dose 67,5 mg/kg b.w. before and after 14-day introduction of Noopept in the dose 10 mg/kg b.w. 3 times a day. The

quantity of the substance was determined by HPLC method according to the previously developed procedure.

Belonging of Noopept to ABCB1-protein substrates was estimated by comparison of its pharmacokinetic parameters before and after a course of introduction of verapamil (the known inhibitor of the ABCB1-protein) into male rabbits in the dose 20 mg/kg b.w. 3 times a day. The pharmacokinetics of Noopept was studied by the original HPLC method.

It was found that the course of Noopept introduction did not lead to any reliable changes in the pharmacokinetic parameters of the ABCB1-protein marker substrate – fexofenadine, which may evidence preservation of the functional activity of the given transport protein at the initial level. It was also found that the pharmacokinetics of Noopept remained unchanged after a course of introduction of ABCB1-protein inhibitor – verapamil – in to the male rabbits, that is, Noopept is not a substrate of the given transport protein.

**Keywords:** ABCB1-protein, P-glycoprotein, Noopept, fexofenadine, pharmacokinetics, verapamil, substrate.

ABCB1-белок (гликопротеин-P) – это мембранный АТФ-зависимый эффлюксный белок-транспортер, удаляющий из клетки широкий спектр эндогенных и экзогенных субстратов, включая лекарственные средства различных фармакологических и химических групп [1].

ABCB1-белок локализуется на мембранах эпителиоцитов слизистой оболочки тонкого кишечника и проксимальных канальцев нефронов почек, гепатоцитов, эндотелиоцитов гистогематических барьеров. Транспортер препятствует всасыванию лекарственных веществ, являющихся его субстратами в кишечнике, участвует в процессах распределения, способствует их выведению в желчь и мочу. Таким образом, от функциональной активности данного белка-транспортера зависит фармакокинетика лекарственных веществ-субстратов ABCB1-белка, а значит эффективность и безопасность фармакотерапии [2]. Высокая активность ABCB1-белка приводит к неэффективности лечения веществом-субстратом, а низкая активность – к передозировке.

Ноопепт (N-фенил-ацетил-L-пролил-глицина этиловый эфир) – дипептидный аналог пираретама, являющийся современным оригинальным ноотропным и нейропротективным препаратом, разработанным в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова. Ноопепт применяется для терапии хронических ишемических поражений мозга, ряда нейродегенеративных заболеваний, шизофрении, эпилепсии [3].

В научной литературе отсутствуют исследования по оценке принадлежности Ноопепта к числу субстратов, индукторов и ингибиторов ABCB1-белка. Однако, исходя из химической структуры и физических свойств Ноопепта, можно предположить участие ABCB1-белка в его фармакокинетике или наличие у препарата способности модулировать его функциональную активность. Ранее среди модуляторов транспортера были обнаружены вещества пептидной структуры [4]. Описан механизм изменения функциональной активности ABCB1-белка веществами пептидной природы за счет непосредственного взаимодействия с частями его молекулы с модификацией его пространственной структуры [5].

Целью работы явилась оценка влияния Ноопепта на функциональную активность ABCB1-белка и принадлежность препарата к субстратам белка-транспортера.

#### Материалы и методы

Исследование выполнено на 12 половозрелых кроликах-самцах породы Шиншилла массой 3500-4300 г [6]. Работа с животными проводилась в соответствии с правилами лабораторной практики (Приложение к приказу Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 года 708н).

Животные были разделены на 2 серии: в первой серии (n=6) исследовали влияние Ноопепта на функциональную активность ABCB1-белка, во второй (n=6) – оценивали принадлежность Ноопепта к субстратам транспортера.

Животные первой серии получали фексофенадин (таблетки, покрытые оболочкой, Телфаст, 180 мг, Aventis Pharma, Италия) однократно внутривенно в дозе 67,5 мг/кг массы [7] до и после 14-дневного введения препарата Ноопепт (таблетки Ноопепт, 10 мг, ЗАО «ЛЕККО», Россия) в дозе 10 мг/кг массы 3 раза в день, а также на 5-й день его отмены [8]. Последнее введение Ноопепта выполняли утром за 20 мин до введения маркерного субстрата для возможности оценки прямого влияния препарата на ABCB1-белок (выбор времени обусловлен  $T_{max}$  ноопепта -15 мин). После этого у кроликов забирали кровь из краевой вены уха в объеме 5 мл в гепаринизированные пробирки, центрифугировали при 3000 об./мин в течение 10 мин для получения плазмы. В плазме крови определяли концентрацию фексофенадина методом ВЭЖХ на хроматографе «Stayer» (Россия) по методике, описанной ранее [9].

Животным второй серии вводили тестируемый препарат Ноопепт в дозе 50 мг/кг массы внутривенно в форме суспензии на воде очищенной однократно до и после введения ингибитора ABCB1-белка. Образцы крови забирали через 5, 10, 20, 30, 45, 60 и 90 мин после введения тестируемого препарата [10] с последующим анализом его фармакокинетики методом ВЭЖХ. Использовали хроматограф «Stayer» с УФ-спектрофотометрическим детектором при длине волны 206 нм. Состав подвижной фазы: вода деионизированная – ацетонитрил – ледяная уксусная кислота (50-50-0,1). Хроматографическая колонка Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250x4,6) с зернением 4 мкм. В качестве ингибитора ABCB1-белка животные получали верапамил (таблетки, покрытые оболочкой, 80 мг, Валента Фармацевтика ОАО, Россия) в дозе 20 мг/кг 3 раза в день [7] курсом 14-дней. Последнее введение верапамила выполняли утром – за 1 час до введения Ноопепта (время обусловлено  $T_{max}$  верапамила 1-2 ч).

Фармакокинетические параметры фексофенадина и ноопепта рассчитывали, используя модельно-независимый метод, с применением программы «Kinetics 5.0».

Полученные результаты обрабатывали с помощью программы «Stat Soft Statistica 7.0». Статистическую значимость различий между фармакокинетическими параметрами оценивали исходя из представления о лог-нормальном распределении данных. Сравнение изучаемых фармакокинетических параметров проводили с применением дисперсионного анализа повторных измерений (ANOVA) после их логарифмирования. Статистически значимыми принимали различия при значении  $p < 0,05$ . Дополнительно рассчитывали двухсторонний 90% доверительный интервал отношения геометрических средних значений фармакокинетических параметров на фоне введения исследуемых веществ (верапамила и Ноопепта) к параметрам интактных животных. Согласно рекомендациям U.S. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research [11] значимыми считаются различия между фармакокинетическими параметрами, если двухсторонний 90% доверительный интервал их отношения находится вне диапазона 0,8-1,25 (80-125%). Полученные результаты представлены в таблицах в виде среднего геометрического и его 95% доверительного интервала.

#### Результаты и их обсуждение

14-дневное введение кроликам-самцам Ноопепта не вызвало статистически значимых изменений ни одного из исследованных фармакокинетических параметров фексофенадина (табл. 1).

14-дневное введение кроликам-самцам ингибитора ABCB1-белка – верапамила не приводило к достоверному изменению фармакокинетики Ноопепта по сравнению с исходными параметрами (табл. 2).

В нашем исследовании в качестве маркерного субстрата ABCB1 белка выбран рекомендуемый FDA гистаминолитик III поколения – фексофенадин, который не метаболизируется в организме, а его всасывание в кишечнике, распределение и элиминация зависят от функционирования данного транспортера. Поэтому динамика концентрации фексофенадина в крови характеризует функциональную активность ABCB1 белка [7, 11, 12].

Таблица 1

**Фармакокинетические параметры фексофенадина (67,5 мг/кг) до и после введения Ноопепта (10 мг/кг 3 раза в день 14 дней)**

Фармакокинетический параметр фексофенадина	Интактные животные (n=6)	Животные после введения Ноопепта (n=6)	Животные на 5-й день отмены Ноопепта (n=6)
$C_{max}$ , нг/мл	241,3 (138,2; 421,2)	360,7 (171,8; 757,5)	331,2 (209,0; 524,9)
$AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл	2520,4 (1012,9; 6271,1)	3023,9 (1682,7; 5433,9)	2799,5 (2318,1; 3380,8)
$AUC/t_{1/2}$	203,9 (85,6; 486,3)	247,2 (106,2; 575,4)	219,6 (99,3; 485,6)
$Cl$ , л*ч <sup>-1</sup> *кг <sup>-1</sup>	15,8 (4,8; 52,3)	13,9 (6,4; 30,3)	15,8 (11,2; 22,3)

*Примечание:* данные представлены в виде среднего геометрического и его 95% доверительного интервала

Таблица 2

**Фармакокинетические параметры Ноопепта (50 мг/кг) до и после введения верапамила (20 мг/кг 3 раза в день 14 дней)**

Фармакокинетический параметр Ноопепта	Интактные животные (n=6)	Животные после введения верапамила (n=6)
$C_{max}$ , нг/мл	44,43 (25,20; 78,33)	26,16 (11,47; 59,70)
$AUC_{0-беск}$ , нг*мин/мл	1133,36 (599,19; 2143,74)	932,89 (501,66; 1734,81)
$AUC_{0-t}$ , нг*ч/мл	1111,39 (596,81; 2069,63)	854,067 (417,11; 1748,77)
$Cl$ , л*мин <sup>-1</sup> *кг <sup>-1</sup>	44,12 (23,32; 83,45)	53,60 (28,82; 99,67)
$AUC/t_{1/2}$	80,75 (38,38; 169,90)	62,97 (21,36; 185,68)

*Примечание:* данные представлены в виде среднего геометрического и его 95% доверительного интервала

Отсутствие статистически значимых изменений фармакокинетики фексофенадина после курсового введения кроликам Ноопепта свидетельствует о том, что скорость абсорбции маркерного субстрата в кишечнике и интенсивность его экскреции не изменялись, что показывает сохранение функциональной активности ABCB1-белка на исходном уровне.

Ранее было установлено, что Ноопепт (10 мкМ) увеличивает ДНК-связывающую активность NF-1 [13] – транскрипционного фактора, повышающего экспрессию ABCB1-белка [14]. Полученные нами результаты не согласуются с этими данными, видимо, потому, что мы использовали Ноопепт в условиях нормы у интактных животных и изучали функционирование транспортера на уровне целостного организма, а не в культуре клеток.

Возможной причиной отсутствия влияния Ноопепта на функциональную активность ABCB1-белка на уровне целост-

ного организма, установленное в нашем исследовании, может являться короткий период его полувыведения, который по данным литературы составляет у кроликов  $0,3 \pm 0,03$  ч [10], что минимизирует возможность его прямого взаимодействия с белком-транспортером и изменения его активности. Кроме того, на уровне целостного организма ABCB1-белок испытывает влияние множества факторов (клеточное окружение, гормональный фон и пр.), в то время как *in vitro* они отсутствуют.

Оценка принадлежности лекарственных веществ к субстратам ABCB1-белка *in vivo* проводится следующим образом. Фармакокинетика тестируемого препарата оценивается до и после введения классических ингибитора и индуктора ABCB1-белка. Если курсовое введение кроликам-самцам ингибитора транспортера – верапамила приводит к увеличению плазменной концентрации тестируемого вещества и снижению его экскреции, а курсовое введение индук-

тора ABCB1-белка – рифампицина – к обратной динамике – делается вывод о принадлежности препарата к субстратам белка-транспортера [15]. В данной работе при пероральном введении Ноопепта intactным животным в дозе 50 мг/кг массы его максимальная концентрация в плазме крови составила 44,43 (25,20; 78,33) нг/мл. При этом, в случае принадлежности Ноопепта к субстратам ABCB1-белка, введение рифампицина дополнительно снизит его плазменную концентрацию, что не позволит детектировать ее применяемым нами способом. В связи с указанным ограничением, в нашей работе вводился только ингибитор белка-транспортера – верапамил, который повышает концентрацию в крови тестируемых субстратов.

Отсутствие достоверных различий между фармакокинетическими параметрами Ноопепта до и после курсового введения кроликам верапамила свидетельствует о том, что тестируемый препарат не является субстратом ABCB1-белка или вовлечение данного транспортера в процессы всасывания, распределения и экскреции тести-

руемого вещества не имеет существенного значения для его фармакокинетики.

Независимость фармакокинетики Ноопепта от функционирования ABCB1-белка, а также отсутствие влияния препарата на функциональную активность транспортера позволяет безопасно и без корректировки дозы назначать его совместно с препаратами, являющимися маркерными субстратами белка-транспортера (дигоксин, дабигатрана этаксилат, талинолол и др.) с минимальной вероятностью нежелательных межлекарственных взаимодействий.

#### Выводы

1. Курсовое введение Ноопепта в дозе 10 мг/кг массы 3 раза в день в течение 14 дней кроликам-самцам не приводит к изменению функциональной активности ABCB1-белка, оцениваемой по фармакокинетике его маркерного субстрата фексофенадина.

2. Ноопепт не является субстратом ABCB1-белка по результатам тестирования *in vivo*, что подтверждается отсутствием значимых изменений его концентрации на фоне ингибитора ABCB1-белка – верапамила.

*Конфликт интересов отсутствует.*

#### Литература

1. Montanari F., Ecker G.F. Prediction of drug-ABC-transporter interaction – Recent advances and future challenges // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2015. Vol. 86. P. 17-26.

2. Якушева Е.Н., Черных И.В., Щулькин А.В., Попова Н.М. Гликопротеин-P: структура, физиологическая роль и молекулярные механизмы модуляции функциональной активности // *Успехи физиологических наук.* 2014. Т. 45, №4. С. 89-98.

3. Островская Р.У., Вахитова Ю.В., Салимгареева М.Х., Ямиданов Р.С., Садовников С.В., Капица И.Г., Середенин С.Б. К механизму действия ноопепта: снижение активности стресс-индуцируемых протеинкиназ и активация экспрессии нейротрофинов // *Экспериментальная и клиническая фармакология.* 2010. Т. 73, №12. С. 2-5.

4. Новиков С.А. Гидрофильные гексапептиды – новый класс регуляторов АТФ-зависимых транспортных белков

множественной лекарственной устойчивости: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2008. 24 с.

5. Carrigos M., Mir L.M., Orłowski S. Competitive and Non-Competitive Inhibition of the Multidrug-Resistance-Associated P-glycoprotein ATPase // *Eur. J. Biochem.* 1997. Vol. 244, №2. P. 664-673.

6. Гацанога М.В., Черных И.В., Щулькин А.В., Якушева Е.Н., Попова Н.М. Можно ли оценивать принадлежность лекарственных веществ к субстратам гликопротеина-P на самках кроликов породы шиншилла // *Наука молодых (Eruditio Juvenium).* 2016. №3. С. 5-10.

7. Колхир С.В. Клиническое значение изучения активности транспортера лекарственных средств гликопротеина-P для оптимизации фармакотерапии: автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2007. 21 с.

8. Коваленко Л.П., Смольникова Н.М., Алексеева С.В., Немова Е.П., Соро-

кина А.В., Мирамедова М.Г. и др. Доклиническое изучение токсичности ноопепта // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2002. Т. 65, №1. С. 62-64.

9. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В., Титов Д.С. Функциональная активность и экспрессия гликопротеина-Р при экспериментальных манипуляциях // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. 2014. №2. С. 74-77.

10. Бойко С.С., Жердев В.П., Гудашева Т.А., Островская Р.У., Коротков С.А., Кравцова О.Ю. Биодоступность ноопепта – нового ноотропного препарата дипептидной структуры // Химико-фармацевтический журнал. 2004. Т. 38, №12. С. 3-5.

11. Guidance for Industry Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2012. 75 p. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>.

12. Ohura K., Nakada Y., Kotani S., Imai T. Design of Fexofenadine Prodrugs Based on Tissue-Specific Esterase Activity and Their Dissimilar Recognition by P-Glycoprotein // J. Pharm. Sci. 2015. Vol. 104, №9. P. 3076-3083.

13. Vakhitova Y.V., Sadovnikov S.V., Borisevich S.S., Ostrovskaya R.U., Gudasheva T.A., Seredenin S.B. Molecular Mechanism Underlying the Action of Substituted Pro-Gly Dipeptide Noopept // Acta Naturae. 2016. Vol. 8, №1. P. 82-89.

14. Ding Z., Yang L., Xie X., Xie F., Pan F., Li J. et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells // Cancer Res. Clin. Oncol. 2010. Vol. 136, №11. P. 1697-1707.

15. Якушева Е.Н., Щулькин А.В., Черных И.В. Оценка принадлежности мексидола к субстратам, ингибиторам или индукторам гликопротеина-Р // Экспериментальная и клиническая фармакология. 2015. Т. 78, №5. С. 19-23.

## References

1. Montanari F, Ecker GF. Prediction of drug-ABC-transporter interaction – Recent advances and future challenges. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2015; 86: 17-26.

2. Yakusheva EN, Chernyh IV, Shchul'kin AV, Popova NM. Glikoprotein-P: struktura, fiziologicheskaya rol' i molekulyarnye mekhanizmy modulyacii funkcional'noj aktivnosti [P-Glycoprotein: Structure, Physiological Role and Molecular Mechanisms of Modulation Functional Activity]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk [Success of Physiological Sciences]*. 2014; 45 (4): 89-98. (in Russian)

3. Ostrovskaya RU, Vahitova YuV, Salimgareeva MH, Yamidanov RS, Sadovnikov SV, Kapica IG, Seredenin SB. K mekhanizmu dejstviya noopepta: snizhenie aktivnosti stress-induciruemyh proteinkinaz i aktivaciya ehkspressii nejrotrofinov [On the mechanism of noopept action: decrease in activity of stress-induced kinases and increase in expression of neurotrophins]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya [Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology]*. 2010; 73 (12): 2-5. (in Russian)

4. Novikov SA. *Gidrofil'nye geksapeptidy – novyj klass reguljatorov ATF-zavisimyh transportnyh belkov mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti [Hydrophilic hexapeptides – a new class of regulators ATP-dependent multidrug resistance transport proteins]*: Cand. Diss. (Med. Sci.). Moscow; 2008. (in Russian)

5. Carrigos M, Mir LM, Orłowski S. Competitive and Non-Competitive Inhibition of the Multidrug-Resistance-Associated P-glycoprotein ATPase. *Eur. J. Biochem.* 1997; 244 (2): 664-673.

6. Gacanoga MV, Chernyh IV, Shchul'kin AV., Yakusheva EN, Popova NM. Možno li ocenivat' prinadlezhnost' lekarstvennyh veshchestv k substratam glikoproteina-R na samkah krolikov porody shinshilla [The method of assessment of drugs belonging to the substrates of P-glycoprotein on female rabbits *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium) [Science of young (Eruditio Juvenium)]*. 2016; 3: 5-10. (in Russian)

7. Kolhir SV. *Klinicheskoe znachenie izucheniya aktivnosti transportera lekarstven-*

*nyh sredstv glikoproteina-R dlya optimizacii farmakoterapii [Clinical importance of studying the activity of the P-glycoprotein drug transporter to optimization of pharmacotherapy]: Cand. Diss. (Med. Sci.). Moscow; 2008. (in Russian)*

8. Kovalenko LP, Smol'nikova NM, Alekseeva SV, Nemova EP, Sorokina AV, Miramedova MG. i dr. Doklinicheskoe izuchenie toksichnosti noopepta [Preclinical characterization of the toxicity of noopept]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya [Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology]*. 2002; 65 (1): 62-64. (in Russian)

9. Yakusheva EN, Shchul'kin AV, Chernyh IV, Titov DS. Funkcional'naya aktivnost' i ehkspressiya glikoproteina-P pri ehksperimental'nyh manipulyatsiyah [Functional activity of P-glycoprotein during experimental manipulations]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]*. 2014; 2: 74-77. (in Russian)

10. Bojko SS, ZHerdev VP, Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Korotkov SA, Kravcova OYu. Biodostupnost' noopepta – novogo nootropnogo preparata dipeptidnoj struktury [Bioaccessibility of the new dipeptide nootropic drug noopept]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal [Pharmaceutical Chemistry Journal]*. 2004; 38 (12): 3-5. (in Russian)

11. FDA. 2012. Available at: [http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance/compliance/regulatory\\_information/guidances/ucm292362.pdf](http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidance/compliance/regulatory_information/guidances/ucm292362.pdf).

12. Ohura K, Nakada Y, Kotani S, Imai T. Design of Fexofenadine Prodrugs Based on Tissue-Specific Esterase Activity and Their Dissimilar Recognition by P-Glycoprotein. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104 (9): 3076-3083.

13. Vakhitova YV, Sadovnikov SV, Borisevich SS, Ostrovskaya RU, Gudasheva TA, Seredenin SB. Molecular Mechanism Underlying the Action of Substituted Pro-Gly Dipeptide Noopept. *Acta Naturae*. 2016; 8, (1): 82-89. (in Russian)

14. Ding Z, Yang L, Xie X, Xie F, Pan F, Li J et al. Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells. *Cancer Res. Clin. Oncol.* 2010; 136 (11): 1697-1707.

15. Yakusheva EN, Shchul'kin AV, Chernyh IV. Ocenka prinadlezhnosti meksidola k substratam, ingibitoram ili induktoram glikoproteina-P [Assessment of the Attribution of Mexidol to P-Glycoprotein Substrates, Inhibitors, or Inductors]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya [Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology]*. 2015; 78 (5): 19-23. (in Russian)

---

Черных И.В. – к.б.н., ассистент кафедры общей и фармацевтической химии ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

Щулькин А.В. – к.м.н., ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

Якушева Е.Н. – д.м.н., проф., зав. кафедрой фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Гацанога М.В. – аспирант кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

Попова Н.М. – к.м.н., ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации ФДПО ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, г. Рязань.

© Коллектив авторов, 2017  
УДК 615.21.015.44  
DOI:10.23888/PAVLOVJ2017137-41

**ANALYSIS OF ATTRIBUTION OF NOOPEPT TO SUBSTRATES  
AND MODULATORS OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF ABCB1-PROTEIN  
IN IN VIVO EXPERIMENT**

*I.V. Chernykh, A.V. Shchulkin, E.N. Yakusheva, M.V. Gatsanoga, N.M. Popova*

Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov,  
Vysokovoltnaya str., 9, 390026, Ryazan, Russian Federation

**In the article the influence of nootropic drug Noopept (N-phenyl-acetyl-L-prolylglycine ethyl ester) on the functional activity of ABCB1-protein is analyzed and attribution of this drug to the transport protein substrates is studied on male Chinchilla rabbits. Functioning of the transport protein was estimated by the pharmacokinetics of its marker substrate – fexofenadine. Fexofenadine was introduced intragastrically one time in the dose 67,5 mg/kg b.w. before and after 14-day introduction of Noopept in the dose 10 mg/kg b.w. 3 times a day. The quantity of the substance was determined by HPLC method according to the previously developed procedure.**

**Belonging of Noopept to ABCB1-protein substrates was estimated by comparison of its pharmacokinetic parameters before and after a course of introduction of verapamil (the known inhibitor of the ABCB1-protein) into male rabbits in the dose 20 mg/kg b.w. 3 times a day. The pharmacokinetics of Noopept was studied by the original HPLC method.**

**It was found that the course of Noopept introduction did not lead to any reliable changes in the pharmacokinetic parameters of the ABCB1-protein marker substrate – fexofenadine, which may evidence preservation of the functional activity of the given transport protein at the initial level. It was also found that the pharmacokinetics of Noopept remained unchanged after a course of introduction of ABCB1-protein inhibitor – verapamil – into the male rabbits, that is, Noopept is not a substrate of the given transport protein.**

**Keywords:** *ABCB1-protein, P-glycoprotein, Noopept, fexofenadine, pharmacokinetics, verapamil, substrate.*

ABCB1-protein (P-glycoprotein) is a membrane ATP-dependent efflux transport protein that removes a wide range of endogenous and exogenous substances including medical drugs of different pharmacological and chemical groups, from a cell [1].

ABCB1-protein localizes on the membranes of epithelial cells of small intestinal mucosa and of the proximal tubules of nephron, of hepatocytes and endothelial cells of histohematic barriers. The transporter prevents absorption in the intestine of medical drugs that are its substrates, participates in their dis-

tribution and facilitates their excretion into the bile and urine. Thus, the functional activity of this transport protein determines the pharmacokinetics of medical drugs – substrates of ABCB1-protein, and, finally, determines the effectiveness and safety of pharmacotherapy [2]. High activity of ABCB1-protein makes treatment with the substrate substance ineffective, and its low activity leads to overdosage.

Noopept (N-phenyl-acetyl-L-prolylglycine ethyl ester), a dipeptide analog of pyracetam, is a modern original nootropic and neuroprotective drug developed in V.V. Zakusov Research



Institute of Pharmacology. Noopept is used in treatment for chronic ischemic brain damages, schizophrenia, epilepsy [3].

In the scientific literature no research is found on estimation of the attribution of Noopept to substrates, inductors and inhibitors of ABCB1-protein. However, based on the chemical structure and physical properties of Noopept it is possible to suggest participation of ABCB1-protein in its pharmacokinetics, or the ability of the drug to modulate its functional activity. Earlier among the modulators of the transporter, substances of peptide nature were found [4]. The mechanism of alteration of the functional activity of ABCB1-protein by substances of peptide nature is described. It consists in their direct interaction with parts of the protein molecule with modification of its spatial structure [5].

The aim of the work is estimation of the influence of Noopept on the functional activity of ABCB1-protein and determination of belonging of the drug to the transport protein substrates.

#### Materials and methods

The research was conducted on 12 viripotent male Chinchilla rabbits of 3500-4300 g mass [6]. The work with the animals was conducted according to the good laboratory practice (Supplement to the Order of Ministry of Health and Social Development of Russian Federation of August 23, 2010, 708H).

The animals were divided to 2 series: in the first series (n=6) the influence of Noopept on the functional activity of ABCB1-protein was studied, in the second series (n=6) belonging of Noopept to the transporter substrates was determined.

The animals of the first series received fexofenadine (coated tablets, Telfast, 180 mg, Aventis Pharma, Italy) intragastrically one time in the dose 67,5 mg/kg b.w. [7] before and after 14-day introduction of Noopept (Noopept tablets, 10 mg, ZAO (CJSC) «LEK-KO», Russia) in the dose 10 mg/kg b.w. 3 times a day, and also on the 5<sup>th</sup> day after its withdrawal [8]. The last introduction of Noopept was in the morning 20 min. before introduction of the marker substrate, to evaluate the direct influence of the drug on ABCB1-protein (the period of time was determined by  $T_{max}$  of Noopept – 15 min.). After that blood was taken from the marginal veins of the rabbits' ears

into heparinized test tubes in the quantity 5 ml with subsequent centrifugation at 3000 rpm for 10 min. to obtain plasma. Concentration of fexofenadine in the blood plasma was determined by HPLC method on «Stayer» chromatograph (Russia) according to the earlier described procedure [9].

The second series animals received the test drug Noopept intragastrically in the dose 50 mg/kg b.w. in the form of suspension prepared on purified water one time before and after introduction of ABCB1-protein inhibitor. Blood samples were taken in 5, 10, 20, 30, 45, 60 and 90 min after introduction of the test drug [10] with the subsequent analysis of its pharmacokinetics by HPLC method. «Stayer» chromatograph was used with UV-spectrophotometric detector with 206 nm wavelength. Composition of the mobile phase: deionized water – acetonitrile – glacial acetic acid (50 – 50 – 0.1). Chromatographic column Phenomenex Synergi 4u Polar-RP 80A (250 x 4.6, 4  $\mu$ m). The inhibitor to ABCB1-protein was verapamil (coated tablets, 80 mg, OAO (JSC) Valenta Pharmaceutica, Russia) given in the dose 20 mg/kg b.w. 3 times a day [7] in 14-day course. The last introduction of verapamil was conducted in the morning 1 hour before introduction of Noopept (the time is determined by  $T_{max}$  of verapamil 1-2 h).

Pharmacokinetic parameters of fexofenadine and Noopept were calculated by non-compartmental method using Kinetica 5.0 program.

The obtained results were processed using StatSoft Statistica 7.0 program. The statistical significance of the differences between the pharmacokinetic parameters was evaluated on the basis of the concept of the lognormal distribution of data. The test pharmacokinetic parameters were compared using dispersion analysis of repeated measurements (ANOVA) after taking their logarithms. Statistically significant were assumed the differences at the meaning of  $p < 0.05$ . Additionally, two-tailed 90% confidence interval of the ratio of the mean geometrical values of the pharmacokinetic parameters with introduction of the test substances (verapamil and Noopept) to the parameters of intact animals was calculated. According to recommendations of Drug Evalua-

tion and Research Center of U.S. Food and Drug Administration [11], the differences between pharmacokinetic parameters are considered significant if the two-tailed 90% confidence interval of their ratio lies beyond the range 0,8-1,25 (80-125%). The obtained results are given in the tables as the geometrical mean and its 95% confidence interval.

## Results and Discussion

14-Day introduction of Noopept to the male rabbits did not cause any statistically significant changes in any of the test pharmacokinetic parameters of fexofenadine (tabl. 1).

14-Day introduction of ABCB1-protein inhibitor – verapamil – did not lead to any reliable changes in the pharmacokinetics of Noopept in comparison with the initial parameters (tabl. 2).

Table 1

### *Pharmacokinetic Parameters of Fexofenadine (67,5 mg/kg) before and after Introduction of Noopept (10 mg/kg 3 times a day within 14 days)*

Pharmacokinetic parameter of fexofenadine	Intact animals (n=6)	Animals after introduction of Noopept (n=6)	Animals on the 5 <sup>th</sup> day after withdrawal of Noopept (n=6)
C <sub>max</sub> , ng/ml	241,3 (138,2; 421,2)	360,7 (171,8; 757,5)	331,2 (209,0; 524,9)
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/ml	2520,4 (1012,9; 6271,1)	3023,9 (1682,7; 5433,9)	2799,5 (2318,1; 3380,8)
AUC/t <sub>1/2</sub>	203,9 (85,6; 486,3)	247,2 (106,2; 575,4)	219,6 (99,3; 485,6)
Cl, l*h <sup>-1</sup> *kg <sup>-1</sup>	15,8 (4,8; 52,3)	13,9 (6,4; 30,3)	15,8 (11,2; 22,3)

Note: the data are presented as the geometrical mean and its 95% confidence interval

Table 2

### *Pharmacokinetic Parameters of Noopept (50 mg/kg) before and after Introduction of Verapamil (20 mg/kg 3 times a day within 14 Days)*

Pharmacokinetic parameter of Noopept	Intact animals (n=6)	Animals after introduction of verapamil (n=6)
C <sub>max</sub> , ng/ml	44,43 (25,20; 78,33)	26,16 (11,47; 59,70)
AUC <sub>0-60сек</sub> , ng*min/ml	1133,36 (599,19; 2143,74)	932,89 (501,66; 1734,81)
AUC <sub>0-t</sub> , ng*h/ml	1111,39 (596,81; 2069,63)	854,067 (417,11; 1748,77)
Cl, l*min <sup>-1</sup> *kg <sup>-1</sup>	44,12 (23,32; 83,45)	53,60 (28,82; 99,67)
AUC/t <sub>1/2</sub> ,	80,75 (38,38; 169,90)	62,97 (21,36; 185,68)

Note: the data are presented as the geometrical mean and its 95% confidence interval

Fexofenadine is H<sub>1</sub>-histamin receptor blocker of the III generation which is recommended by FDA as the marker substrate of ABCB1-protein; it is not metabolized in an organism, and its absorption in the intestine, distribution and elimination depend on the functioning of the transporter. Thus, the changes of the concentration of fexofenadine in blood characterizes the functional activity of ABCB1-protein [7, 11, 12].

Absence of any statistically significant alterations in the pharmacokinetics of fexofenadine after a course of administration of Noopept into rabbits shows that the rate of absorption of the marker substrate in the intestine and the intensity of its excretion did not change that means

preservation of the functional activity of ABCB1-protein at the initial level.

Earlier in vitro was found that Noopept (10 μM) increases DNA-binding activity of HIF-1 [13] – transcription factor that enhances expression of ABCB1-protein [14]. Our results do not agree with these data probably because we used Noopept in normal intact animals and studied functioning of the transporter at the level of the whole organism and not in cell culture.

A probable reason for absence of the influence of Noopept on the functional activity of ABCB1-protein at the level of the whole organism found in our research, may be its short half-life period which, according to the literature, in rabbits is 0,3±0,03 h [10] which minimizes the

probability for its direct interaction with the transport protein and for changing its activity. Besides, at the level of the whole organism ABCB1-protein is under the influence of many factors (surrounding cells, hormonal background, etc.) that are absent *in vitro*.

Belonging of medical drugs to ABCB1-protein substrates is estimated *in vivo* in the following way. Pharmacokinetics of the test drug is estimated before and after administration of the classic inhibitor and inductor of ABCB1-protein. If after a course of introduction to male rabbits of the transporter inhibitor (verapamil) the concentration of the test substance in plasma increases and its excretion decreases, and after a course of introduction of ABCB1-protein inductor (rifampicin) the opposite dynamics is observed, the conclusion is made about the drug belonging to the transport protein substrates [15]. In this work the maximal concentration of Noopept in blood plasma after its oral administration into intact animals in the dose 50 mg/kg b.w. was 44,43 (25,20; 78,33) ng/ml. Here, if Noopept belongs to ABCB1-protein substrates, introduction of rifampicin will further decrease its concentration in plasma that will not permit its detection by the method used by us. Because of this limitation, in our work only the transport protein inhibitor was introduced – verapamil, which increases concentration of the test substrates in blood.

*In relation to this article reported no potential conflicts of interest.*

### References

1. Montanari F, Ecker GF. Prediction of drug-ABC-transporter interaction – Recent advantages and future challenges. *Adv. Deliv. Rev.* 2015; 86: 17-26.
2. Yakusheva EN, Chernyh IV, Shchul'kin AV, Popova NM. Glicoprotein-P: struktura, fiziologicheskaya rol' i molekulyarnye mekhanizmy modulyacii funkcional'noj aktivnosti [P-Glycoprotein: Structure, Physiological Role and Molecular Mechanisms of Modulation of Functional Activity]. *Uspekhi fiziologicheskikh nauk [Success of Physiological Sciences]*. 2014; 45 (4): 89-98. (in Russian)
3. Ostrovskaya RU, Vahitova YuV, Salimgareeva MH, Yamidanov RS, Sadovnikov SV, Kapitsa IG et al. K mekhanizmu dejstviya noopepta: snizhenie aktivnosti stress-induciruemyh proteinkinaz i aktivaciya

Lack of any reliable differences between pharmacokinetic parameters of Noopept before and after a course of introduction of verapamil into rabbits means that the test drug is not a substrate of ABCB1-protein, and the involvement of the given transporter into the processes of absorption, distribution and excretion of the test substance produces no significant influence on its pharmacokinetics.

Independence of Noopept pharmacokinetics of ABCB1-protein functioning, as well as absence of any influence of the drug on the functional activity of the transporter permits to safely administer the drug together with drugs that are substrates of the transport protein (digoxin, dabigatran etexilate, talinolol, etc.) without correction of its dose with the minimal probability for undesired drug-drug interactions.

### Conclusions

1. A course of Noopept introduction in 10 mg/kg b.w. dose 3 times daily to male rabbits within 14 days does not lead to any changes in the functional activity of ABCB1-protein that is estimated by pharmacokinetics of its marker substrate fexofenadine.
2. By the results of *in vivo* testing, Noopept is not a substrate of ABCB1-protein that is confirmed by absence of any significant changes in its concentration after introduction of ABCB1-protein inhibitor – verapamil.

ehkspressii nejrotrofinov [On the mechanism of noopept action: decrease in activity of stress-induced kinases and increase in expression of neutrophines]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya [Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology]*. 2010; 73 (12): 2-5. (in Russian)

4. Novikov SA. *Gidrofil'nye geksapeptidy – novyj klass regulyatorov ATF-zavisimyh transportnyh belkov mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti [Hydrophilic hexapeptides – a new class of regulators of ATP-dependent multidrug resistance transport proteins]*: Cand. Diss. (Med. Sci.). Moscow; 2008. (in Russian)

5. Carrigos M, Mir LM, Orłowski S. Competitive and Non-Competitive Inhibition of the Multidrug-Resistance-Associated P-glycoprotein ATPase. *Eur. J. Biochem.* 1997; 244 (2): 664-673.

6. Gatsanoga MV, Chernykh IV, Shchul'kin AV., Yakusheva EN, Popova NM. *Mozhno li ocenivat' prinadlezhnost' lekarstvennyh veshchestv k substratam glikoproteina-R na samkah krolikov porody shinshilla* [The method of assessment of drugs belonging to the substrates of P-glycoprotein on female Chinchilla rabbits]. *Nauka molodykh (Eruditio Juvenium)* [Science of young (Eruditio Juvenium)]. 2016; 3: 5-10. (in Russian)

7. Kolkhir SV. *Klinicheskoe znachenie izucheniya aktivnosti transportera lekarstvennyh sredstv glikoproteina-R dlya optimizacii farmakoterapii* [Clinical importance of studying the activity of P-glycoprotein drug transporter for optimization of pharmacotherapy]: Cand. Diss. (Med. Sci.). Moscow; 2008. (in Russian)

8. Kovalenko LP, Smol'nikova NM, Alekseeva SV, Nemova EP, Sorokina AV, Miramedova MG et al. *Doklinicheskoe izuchenie toksichnosti noopepta* [Preclinical characterization of noopept toxicity]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology]. 2002; 65 (1): 62-64. (in Russian)

9. Yakusheva EN, Shchul'kin AV, Chernykh IV, Titov DS. *Funkcional'naya aktivnost' i ehkspressiya glikoproteina-P pri ehksperimental'nyh manipulyaciyah* [Functional activity and expression of P-glycoprotein in experimental manipulations]. *Rossijskij mediko-biologicheskij vestnik imeni akademika I.P. Pavlova* [I.P. Pavlov Russian Medical Biological Herald]. 2014; 2: 74-77. (in Russian)

10. Bojko SS, Zherdev VP, Gudasheva TA, Ostrovskaya RU, Korotkov SA, Kravcova OYu. *Biodostupnost' noopepta – novogo nootropnogo preparata dipeptidnoj struktury* [Bioaccessibility of the new dipeptide nootropic

drug noopept]. *Himiko-farmaceuticheskij zhurnal* [Pharmaceutical Chemistry Journal]. 2004; 38 (12): 3-5. (in Russian)

11. *Guidance for Industry Drug Interaction Studies – Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations* / U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2012. 75 p. Available at: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>.

12. Ohura K, Nakada Y, Kotani S, Imai T. *Design of Fexofenadine Prodrugs Based on Tissue-Specific Esterase Activity and Their Dissimilar Recognition by P-Glycoprotein*. *J. Pharm. Sci.* 2015; 104 (9): 3076-3083.

13. Vakhitova YV, Sadovnikov SV, Borisevich SS, Ostrovskaya RU, Gudasheva TA, Seredenin SB. *Molecular Mechanism Underlying the Action of Substituted Pro-Gly Dipeptide Noopept*. *Acta Naturae*. 2016; 8 (1): 82-89.

14. Ding Z, Yang L, Xie X, Xie F, Pan F, Li J et al. *Expression and significance of hypoxia-inducible factor-1 alpha and MDR1/P-glycoprotein in human colon carcinoma tissue and cells*. *Cancer Res. Clin. O.* 2010; 136 (11): 1697-1707.

15. Yakusheva EN, Shchul'kin AV, Chernykh IV. *Ocenka prinadlezhnosti meksidola k substratam, inhibitoram ili induktoram glikoproteina-P* [Assessment of the Attribution of Mexidol to P-Glycoprotein Substrates, Inhibitors, or Inductors]. *Ehksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya* [Russian Journal of Experimental and Clinical Pharmacology]. 2015; 78 (5): 19-23. (in Russian)

---

Chernykh I.V. – Cand. Biol. Sc., Assistant of General and Pharmaceutical Chemistry Department, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov.

Shchulkin A.V. – Cand. Med. Sc., Assistant of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Additional Professional Education Faculty, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov.

Yakusheva E.N. – M.D., Ph.D., D.Sc., Professor, Head of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Additional Professional Education Faculty, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov.  
E-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

Gatsanoga M.V. – Postgraduate Student of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Additional Professional Education Faculty, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov.

Popova N.M. – Cand. Med. Sc., Assistant of Pharmacology Department with Course of Pharmacy of Additional Professional Education Faculty, Ryazan State Medical University named after academician I.P. Pavlov.