



Исследование фармакокинетики и токсикокинетики структурного аналога апелина-12 на кроликах

Куликов А. Л.¹, Сидорова М. В.², Писаренко О. И.², Студнева И. М.², Гуреев В. В.², Авдеева Е. В.³,
Веселова О. М.², Серебрякова Л. И.², Палькеева М. Е.², Молокоедов А. С.², Авдеев Д. В.²

¹ НИИ Фармакологии живых систем ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация

³ ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», Курск, Российская Федерация

Аннотация

Актуальность. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) — одна из основных причин смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в РФ и зарубежных странах.

Цель. Изучение фармакокинетических и токсикокинетических свойств лекарственной формы препарата метилин, разработанного для лечения ХСН.

Материалы и методы. Пептид метилин (H-(N^oMe)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH) получен путём автоматического твёрдо-фазного синтеза с использованием Fmoc-методологии. Очистка препарата проведена методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), химическая структура охарактеризована с помощью ¹H-ЯМР-спектроскопии и ESI-МС масс-спектрометрии. Концентрацию метилина в плазме кроликов определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ МС/МС).

Результаты. Исследование фармакокинетики показало, что метилин характеризуется коротким временем пребывания в организме (период полувыведения 5,13±2,9 мин, среднее время пребывания 6,86±3,86 мин) и низким объёмом распределения (2,70±1,07 л/кг). При оценке линейности отклика «концентрация/доза» для 1 мг/кг отмечены более высокие значения, чем для 5 мг/кг и 10 мг/кг, что, вероятно, связано с насыщением связывания метилина с транспортными белками. При многократном введении в течение 30 дней наблюдалось статистически значимое увеличение AUC и изменение в характере элиминации, указывающее на кумуляцию метилина в тканях, однако значимых токсических эффектов и физиологических отклонений в состоянии животных не отмечалось.

Заключение. Результаты работы демонстрируют быструю элиминацию и предсказуемую, дозозависимую кумуляцию метилина при длительном введении, что косвенно подтверждает благоприятный токсикокинетический профиль. Основываясь на полученных данных, можно планировать I фазу клинических испытаний препарата.

Ключевые слова: метилин; твердофазный синтез; готовая лекарственная форма; ВЭЖХ МС/МС; кролики; фармакокинетика; токсикокинетика

Для цитирования:

Куликов А. Л., Сидорова М. В., Писаренко О. И., Студнева И. М., Гуреев В. В., Авдеева Е. В., Веселова О. М., Серебрякова Л. И., Палькеева М. Е., Молокоедов А. С., Авдеев Д. В. Исследование фармакокинетики и токсикокинетики структурного аналога апелина-12 на кроликах. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2026;(3):106–116. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2026-3-106-116>. EDN: DWNGNL

Поступила: 30.06.2026. В доработанном виде: 30.07.2026. Принята к печати: 06.08.2026. Опубликовано: 30.09.2026.

Preclinical study of pharmacokinetics and toxicokinetics of innovative peptide drug metilin

Alexander L. Kulikov¹, Mariya V. Sidorova², Oleg I. Pisarenko², Irina M. Studneva², Vladimir V. Gureev², Elena V. Avdeeva³, Oksana M. Veselova², Larisa I. Serebryakova², Marina E. Palkeeva², Alexander S. Molokoedov², Dmitry V. Avdeev²

¹ Research Institute of Pharmacology of Living Systems, Belgorod State University, Belgorod, Russian Federation

² E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

³ Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

Abstract

Relevance. Chronic heart failure (CHF) is one of the leading causes of cardiovascular mortality in Russia and abroad.

Objective. To investigate the pharmacokinetic and toxicokinetic properties of a formulation of metilin, developed for the treatment of CHF.

Materials and methods. Peptide metilin (H-(N^oMe)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH) was obtained by automated solid-phase synthesis using Fmoc-methodology. The drug was purified by high-performance liquid chromatography (HPLC), and its chemical structure was characterized using ¹H-NMR spectroscopy and ESI-MS mass spectrometry. Metilin concentration in rabbit plasma was determined using high-performance liquid chromatography with tandem mass-selective detection (HPLC MS/MS).

Results. A pharmacokinetic study showed that metilin is characterized by a short residence time in the body (half-life 5.13±2.9 min, mean residence time 6.86±3.86 min) and a low volume of distribution (2.70±1.07 L/kg). When assessing the linearity of the concentration/dose response, higher values were noted for 1 mg/kg than for 5 mg/kg and 10 mg/kg, which is likely due to saturation of metilin binding to transport proteins. With repeated administration for 30 days, a statistically significant increase in AUC and a change in the elimination pattern were observed, indicating metilin accumulation in tissues; however, no significant toxic effects or physiological abnormalities in the condition of the animals were noted.

Conclusion. The study's results demonstrate rapid elimination and predictable dose-dependent accumulation of metilin during long-term administration, indirectly confirming its favorable toxicokinetic profile. Based on these data, phase I clinical trials of the drug can be planned.

Keywords: metilin; solid-phase synthesis; finished dosage form; HPLC MS/MS; rabbits; pharmacokinetics; toxicokinetics

For citations:

Kulikov AL, Sidorova MV, Pisarenko OI, Studneva IM, Gureev VV, Avdeeva EV, Veselova OM, Serebryakova LI, Palkeeva ME, Molokoedov AS, Avdeev DV. Preclinical study of pharmacokinetics and toxicokinetics of innovative peptide drug metilin. *Farmakokinetika i farmakodinamika* = *Pharmacokinetics and pharmacodynamics*. 2026;(3): 106–116. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2026-3-106-116>. EDN: DWNGNL

Received: 30.06.2026. **Revision received:** 30.07.2026. **Accepted:** 06.08.2026. **Published:** 30.09.2026.

Введение / Introduction

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) — одна из основных причин смертности от сердечно-сосудистых заболеваний в РФ и зарубежных странах [1]. Создание новых лекарственных средств для профилактики и лечения ХСН остаётся одной из актуальных задач современной молекулярно-клеточной кардиологии. В ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» разработан инновационный препарат пептидной природы метилин, направленный на повышение эффективности фармакологических способов лечения больных с ХСН. Метилин представляет собой химически модифицированный аналог С-концевого фрагмента природного апелина-12 следующей структурной формулы: H-(N^αMe) Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH. Он является лигандом трансмембранного APJ рецептора, экспрессирующегося в кардиомиоцитах, гладкомышечных и эндотелиальных клетках сосудов. Основные механизмы его действия связаны с запуском сигнальных каскадов MEK1/2-/ERK1/2 и PI3K-Akt, активацией эндотелиальной NO-синтазы, митохондриальных АТФ-зависимых K⁺-каналов, сарколеммальных переносчиков Na⁺/H⁺ и Ca²⁺/Na⁺ и АТФазы саркоплазматического ретикула SERCA [2]. Под действием метилина улучшается сократимость, энергетическое и антиоксидантное состояние повреждённого сердца. Эффективность метилина была подтверждена при моделировании ХСН и ишемического/реперфузионного повреждения (ИРП) сердца на изолированных кардиомиоцитах и фибробластах, перфузируемом сердце крысы, сердце крысы *in situ*, на крысах и кроликах *in vivo* [3, 4]. Токсикологическое изучение метилина продемонстрировало безопасность, отсутствие мутагенного и алергизирующих эффектов, эмбриотоксического и тератогенного действия, негативного влияния препарата на репродуктивную функцию подопытных животных. Предполагается использование метилина для лечения острой сердечной недостаточности и декомпенсированной ХСН.

Цель / Objective

Целью настоящей работы явилось изучение фармакокинетических и токсикокинетических свойств лекарственной формы метилина, которые входят в комплекс доклинических исследований, необходимых для регистрации препарата в Российской Федерации и в рамках Евразийского экономического союза [5, 6].

Для ее выполнения был синтезирован метилин и получена его готовая лекарственная форма, а также была разработана методика определения препарата в плазме крови животных, основанная на методе высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemным масс-селективным детектированием (ВЭЖХ МС/МС).

Материалы и методы / Materials and methods

Синтез и хроматография метилина. Fmoc-защищённые производные аминокислот были приобретены у BLDPharm (Китай) и Bachem (Швейцария). Реагенты для синтеза пептидов были приобретены у компании Fluka Chemie GmbH (Швейцария). Метилин был получен с использованием пептидного синтезатора Tribute-UV (Protein Technologies Inc., США) в соответствии со стандартной программой однократной конденсации N^α-9-флуоренилметилоксикарбонил-(Fmoc)-аминокислот методом урониевых солей [7] на полимерном носителе с 2-хлортритилхлоридной якорной группой (Iris Biotech GmbH, Германия). По окончании твёрдофазного синтеза пептид был отщеплён от полимерного носителя с одновременным деблокированием боковых функциональных групп действием трифторуксусной кислоты со скевенджерами и очищен препаративной ВЭЖХ до 98,7 % чистоты по данным аналитической ВЭЖХ, которую проводили на хроматографе Knauer Smartline (Knauer, Германия) с колонкой Diasphere-110-5 C18 (4,0 × 250 мм, 5 мкм, БиоХимМак S&T, Россия). Структура пептида была подтверждена методом протонного магнитного резонанса (¹H-ЯМР) и масс-спектрометрии. Спектры ¹H-ЯМР регистрировали на спектрометре WH-500 Bruker 500 МГц (Bruker GmbH, Германия) в DMSO-d₆ при 300 °К. Химические сдвиги измеряли относительно тетраметилсилана. Масс-спектрометрический анализ проводили на приборе Amazon (Bruker Daltonik GmbH) методом электрораспылительной ионизации (ESI) в режиме обнаружения положительных ионов. Диапазон сканирования масс *m/z* составлял 70–2200.

Готовая лекарственная форма (ГЛФ) «Метилин лиофилизат для приготовления раствора для инфузий 40 мг» во флаконах ёмкостью 10 мл получена на Экспериментальном предприятии биомедицинских препаратов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова» в соответствии с требованиями ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств» Good manufacturing practice for medicinal products (GMP) и соответствует требованиям Государственной

Таблица 1

Количественные характеристики готовой лекарственной формы метилина

Table 1

Quantitative characteristics of the finished dosage form of metilin

Последовательность, брутто-формула	Масса, г/моль	ESI+, m/z	Растворимость, мг/мл	ВЭЖХ, % ***	pH*	Вода %, **	Сумма примесей (ВЭЖХ), %
H-(N ^α Me)Arg-Pro-Arg-Leu-Ser-His-Lys-Gly-Pro-Nle-Pro-Phe-OH, C ₆₆ H ₁₀₇ N ₂₁ O ₁₆	1418,70	709,972+	>100 (вода)	98,77	5,85	5,3	1,23

Примечания: * — pH 0,1 % водного раствора определяли потенциометрически; ** — воду определяли методом К. Фишера; *** — условия аналитической ВЭЖХ: колонка Diasphere-110-5 C18 (4,0 × 250 мм, BioChemMack S&T, Россия); мобильная фаза — буфер А: 0,05 М КН₂РO₄, pH 3,0; буфер В: 70 % ацетонитрил в буфере А. Пептид элюировали градиентом буфера В в буфере А от 20 до 80 % за 30 мин со скоростью 0,75 мл/мин, детекция — при 220 нм.

Notes: * — pH of 0.1 % aqueous solution was determined potentiometrically; ** — water was determined by the Karl Fischer method; *** — analytical HPLC conditions: Diasphere-110-5 C18 column (4,0 × 250 mm, BioChemMack S&T, Russia); mobile phase — buffer A: 0,05 M KН₂РO₄, pH 3,0; buffer B: 70 % acetonitrile in buffer A. The peptide was eluted with a gradient of buffer B in buffer A from 20 to 80 % over 30 min at a flow rate of 0,75 ml/min, detection — at 220 nm.

Фармакопеи РФ. ГЛФ метилина представляет собой стерильную белую пористую массу, не содержащую механических включений, легкорастворимую в воде и физиологическом растворе (время растворения менее 1 мин) с получением прозрачного бесцветного раствора. Основные физико-химические характеристики ГЛФ метилина приведены в табл. 1.

Животные. Использовали самцов кроликов породы советская Шиншилла массой 4,2–4,5 кг. Животные содержались в помещениях вивария с контролируемыми параметрами микроклимата (температура 20–26 °С, относительная влажность 30–70 %, воздухообмен 15–20 объёмов комнаты в час, световой режим день/ночь). Кролики имели свободный доступ к воде и комбикорму для лабораторных животных «Чара» (ЗАО «Ассортимент-Агро»). Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам руководства [8]. Для изучения фармакокинетики препарата кролики были предварительно катетеризированы в правую ушную вену для забора образцов крови в течение всего эксперимента. За 12 часов до начала эксперимента животных лишали корма, оставляя свободный доступ к воде. На третий день после катетеризации вводили метилин.

Все экспериментальные процедуры с животными были одобрены Этическим комитетом НИИ Фармакологии живых систем ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (экспертное заключение № 01-08и/25 от 01.08.2025) и выполнены в соответствии с принципами гуманного обращения с животными, изложенными в Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях, и ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными».

Приготовление раствора метилина для внутривенного введения. Раствор для введения готовили путём растворения метилина (Метилин, лиофилизат для приготовления раствора для внутривенного введения 40 мг) в воде для инъекций. Разведение проводили непосредственно перед введением (готовый раствор хранили не более 3 минут).

Изучение фармакокинетики метилина. На первом этапе исследования было проведено предварительное изучение фармакокинетики метилина и определены необходимые временные интервалы отбора проб. Для этого был проведён пилотный эксперимент на шести кроликах самцах. Вторым этапом исследования было проведение оценки линейности фармакокинетики метилина при его однократном введении в трёх дозах — 1,0 мг/кг, 5,0 мг/кг и 10,0 мг/кг. Эксперимент был проведён на 18 кроликах-самцах (3 группы по 6 животных). Третьим этапом исследования было изучение фармакокинетики метилина при многократном введении. Опыты проводили на 12 кроликах-самцах (2 группы по 6 животных). В течение пяти дней, животным внутривенно болюсно вводили метилин в дозах 1,0 мг/кг и 10,0 мг/кг. Образцы крови кроликов отбирали на 1- и 5-й дни эксперимента.

Изучение токсикокинетики метилина. Токсикокинетику метилина изучали при его длительном 30-дневном внутривенном, болюсном введении кроликам-самцам. Исследование проводилось на двух группах животных (по 6 животных в каждой) в дозах 1,0 мг/кг и 10,0 мг/кг. Образцы крови отбирали в первый и тридцатый день введения препарата. Были отобраны животные без признаков отклонений внешнего вида, разброс по исходной массе не превышал ±20 %. Эксперименты проводились в соответствии с основными правилами, изложенными в основополагающих документах, регламентирующих проведение экспериментов на лабораторных животных.

и условия их содержания (Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 21 мая 2020 г. № 10 «О Руководстве по проведению доклинических исследований токсичности при повторном (многократном) введении действующих веществ лекарственных препаратов для медицинского применения»).

Отбор крови и приготовление плазмы. Образцы крови отбирали из краевой вены уха кролика с помощью предварительно установленного гепаринизированного внутривенного катетера в пробирки с антикоагулянтom K₃ЭДТА в объёме 0,7 мл на каждую временную точку (минимальный объём, позволяющий получить биоматериал в количестве достаточном для дальнейшего анализа). Общий объём крови, собранный за сутки, составлял 6,3 мл (менее 10 % от объёма циркулирующей крови). Отбор проб крови на первом и втором этапах исследования фармакокинетики проводили в следующие

временные интервалы: 0 (до ввода); 2 мин; 4 мин; 6 мин; 10 мин; 20 мин, 40 мин, 80 мин и 160 мин после введения. Кровь центрифугировали незамедлительно после отбора в течение 10 мин при 3000 g и +4 °C. Плазму стабилизировали, добавляя раствор хлорной кислоты из расчёта 100 мкл/мл (0,1 %) плазмы (pH около 3,5) и замораживали при –70 °C.

Определение концентраций метилина. Концентрацию метилина определяли с помощью разработанной методики ВЭЖХ-МС/МС. Краткая характеристика метода приведена в табл. 2.

Расчёт концентраций проводили в специализированной программе Thermo Fisher Scientific Xcalibur 2.2 Sp 1 build 48. Площади пиков метилина переносили в пакет Microsoft Office Excel, где рассчитывали уравнение калибровочной кривой, статистически оценивали отклонения и графически отображали результаты. Концентрации

Таблица 2

Условия определения концентрации метилина в плазме кроликов методом ВЭЖХ-МС/МС

Table 2

Conditions for determining the concentration of metilin in rabbit plasma by HPLC-MS/MS

Прибор	
Хроматограф жидкостный	Thermo Fisher Scientific UltiMate 3000 RS
Детектор	Thermo Fisher Scientific Velos Pro
Хроматографические условия	
Колонка	ZORBAX SB C8, 4,6 × 150 мм, 3,5 мкм (кат. № 863953-906)
Режим разделения	Изократический
Подвижная фаза	0,05 % Муравьиная кислота: CH ₃ CN:IPA (780:176:44 об/об)
Скорость подвижной фазы	0,7 мл/мин
Температура образцов	20 °C
Температура колонки	40 °C
Объём инъекции	5 мкл
Время удерживания метилина	Около 2,1 мин
Время удерживания внутреннего стандарта	Около 4,7 мин
Тип ионизации	ESI, SRM «+», режим ионизации CID — для МЛТ ESI, SRM «+», режим ионизации CID — для IS
Режим ионизации	CID
Детектируемые ионы	МЛТ: 355,47 (+4H ⁺) → 344,42; 386,50 IS: 235,0 ([M] ⁺) → 86,0
Температура источника	120 °C
Температура капилляра	220 °C
Напряжение на источнике	3000 V
Энергия соударения (CE)	МЛТ — 30; IS — 25;
Газ соударений	гелий
Поток Sheath газа	30
Поток Aux газа	10
Поток Sweep газа	1
Остальные параметры в соответствии с автоматической оптимизацией прибора	

метилина в исследуемых объектах рассчитывали по калибровочной кривой. Резко выделяющиеся результаты (выбросы) у животных в каждой временной точке выявляли с помощью статистического критерия Граббса [9].

Статистический анализ. Статистическую обработку всех полученных количественных данных проводили с помощью статистических программ «BioStat 2007». Полученные данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро–Уилка и критерия Шпигельхальтера (библиотека normtest), оценку равенства дисперсии производили с помощью критерия Левене (библиотека lawstat). В зависимости от типа распределения признаков и равенства дисперсий значимость полученных результатов оценивали с применением параметрического (ANOVA) или непараметрического (критерий Краскела–Уоллиса) однофакторного дисперсионного анализа, а в качестве *post-hoc* анализа для выявления различий при межгрупповых сравнениях использовали непарный *t*-критерий Стьюдента или критерий Манна–Уитни соответственно. Результаты считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение / Results and discussion

Пилотное фармакологическое исследование показало, что при использовании дозы метилина 1 мг/кг величина $C_{\max}$ составляет $472,7 \pm 119,9$ нг/мл на второй минуте после введения препарата (рис. 1). На четвёртой минуте после введения среднее значение $C_{\max}$ составляет $265,6 \pm 88,4$ нг/мл, а в течение двух последующих минут концентрация метилина уменьшается ещё на 42,5 %. К 80-й минуте эксперимента метилин не обнаруживается в крови экспериментальных животных. Следует отметить высокую индивидуальную вариацию концентраций. Так, коэффициент вариации CV для $C_{\max}$ равен 25,4 %, для 6-й минуты эксперимента составляет 38,8 %, а для 10-й минуты — 77,7 %.

При расчёте фармакокинетических показателей для метилина было выяснено, что скорость выведения препарата из организма влияет на показатель $AUMC_{(0-160) \text{ iv}}$ и в среднем составляет $3064,35 \pm 1884,034$ (нг/мл) $\times$ мин. Оценивая полученные результаты пилотного эксперимента, можно отметить достаточность данных для расчёта основных фармакокинетических показателей. Было выяснено, что минимальное значение $C_{\max}$ составляет 271,60 нг/мл плазмы крови, а максимальное значение равно 573,10 нг/мл плазмы. Нижний предел количественного определения метилина для использованной аналитической методики составляет 12,03 нг/мл плазмы крови, что составляет 4,4 % от минимального значения $C_{\max}$ (271,60 нг/мл). Это позволило уверенно отслеживать концентрацию препарата на протяжении большей части времени его нахождения в организме, включая значительную часть фазы элиминации. Для расчёта константы скорости элиминации $K_{el \text{ iv}}$ было использовано достаточно данных (минимум 3 точки, не считая $C_{\max}$).

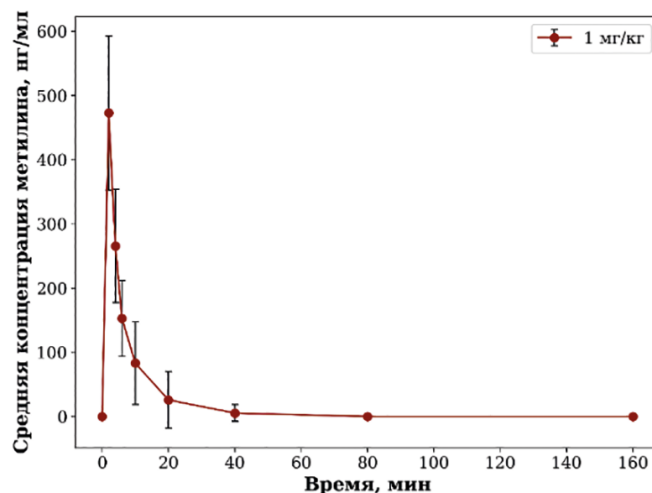


Рис. 1. Фармакокинетическая кривая зависимости концентрации метилина от времени введения для дозы 1 мг/кг

Fig. 1. Pharmacokinetic curve of metilin concentration versus time of administration for a dose of 1 mg/kg

Примечание: Указаны средние значения концентрации метилина в плазме крови, выраженные как $M \pm SD$ для группы из 6 животных.

Note: The mean values of metilin concentration in blood plasma are shown, expressed as $M \pm SD$ for a group of 6 animals

Фармакокинетика молекулы метилина в организме кролика имеет особый характер: обращает на себя внимание время пребывания — $MRT_{(0-160) \text{ iv}}$ всего $6,86 \pm 3,86$ мин и низкая величина стационарного объёма распределения V_{ss} , которая составляет $2,70 \pm 1,07$ л/кг (табл. 3). Эти данные косвенно указывают на высокую скорость метаболизма метилина. Физико-химические свойства исследуемого пептидного препарата позволяют сделать предположение о его связывании с транспортными белками организма. Поэтому время пребывания метилина в организме не является недостатком и компенсируется быстрым транспортом к мишени. Таким образом, от лекарственного препарата метилин стоит ожидать быстрых фармакологических эффектов, связанных с запуском каскадных процессов. При этом не требуется применения больших доз, метилин быстро метаболизирует, практически не оказывая токсического действия.

На втором этапе эксперимента изучались показатели фармакокинетики при внутривенном введении в трёх возрастающих дозах метилина — 1,0 мг/кг, 5,0 мг/кг и 10,0 мг/кг. На основании полученных данных была выдвинута гипотеза линейности фармакокинетики метилина в интервале исследуемых доз. Для проверки этой гипотезы была оценена статистическая достоверность отклонения от нуля свободного члена линейной регрессии $AUC_{(0-160)}$. Данные представлены на рис. 2. Полученные результаты показали, что свободный член значимо отличается от нуля, коэффициент корреляции менее 0,95, из чего следует, что гипотезу линейности необходимо отвергнуть.

Таблица 3

Основные фармакокинетические показатели метилина при внутривенном введении дозы 1 мг/кг кроликам

Table 3

Main pharmacokinetic parameters of metilin after intravenous administration of a dose of 1 mg/kg to rabbits

AUC _{(0-160) iv} (нг/мл)×мин	AUMC _{(0-160) iv} (нг/мл)×мин ²	MRT _{(0-160) iv} мин	K _{el iv} мин ⁻¹	T _{1/2 iv} , мин	C _{max} /AUC ₍₀₋₁₆₀₎ мин ⁻¹	V _{ss} , л/кг
3064,35±1884,03	26779,89±13839,5	6,86±3,86	0,16±0,056	5,13± 2,92	0,173±0,055	2,70±1,07

Примечание: значения показателей выражены как M±SD для групп из 6 животных.
Note: the values of the parameters are expressed as M±SD for groups of 6 animals.

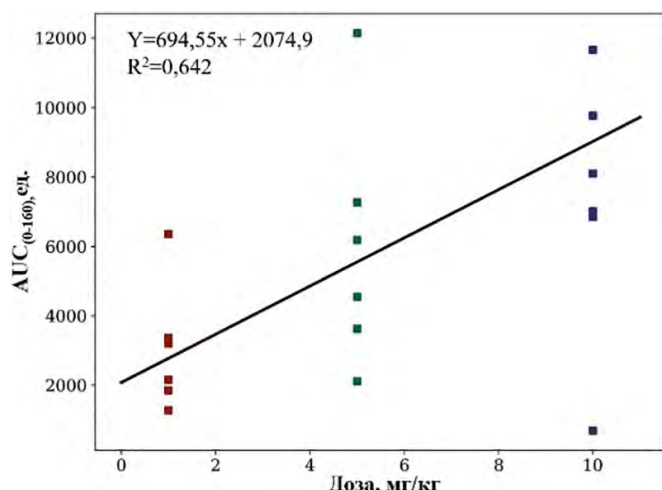


Рис. 2. Оценка линейной зависимости AUC₍₀₋₁₆₀₎ от дозы метилина

Fig. 2. Evaluation of the linear dependence of AUC₍₀₋₁₆₀₎ on the dose of metilin

Для понимания природы отклонения от линейности были построены усреднённые фармакокинетические кривые, нормированные на дозу (рис. 3).

Из рис. 3 видно, что нормированные концентрации для разных дозировок имеют одинаковый характер, но этот показатель для дозы 1 мг/кг существенно выше, чем для доз 5 мг/кг и 10 мг/кг. Для доз 5 мг/кг и 10 мг/кг характер и величина показателя идентичны. Вероятно, данная зависимость обусловлена тем, что связывание метилина с транспортными белками не линейно зависит от вводимой дозы. Перспективным представляется более подробное изучение доз метилина менее 3 мг/кг.

Результаты расчёта основных фармакокинетических показателей при многократном введении метилина в течение 5 дней в дозах 1 мг/кг и 10 мг/кг представлены в табл. 4.

Численные различия между фармакокинетическими показателями в первый и последний день введения не достоверны. Оценивая эти результаты, можно констатировать, что насыщения тканей за 5 дней не произошло при использовании двух возрастающих доз (1 мг/кг и 10 мг/кг).

Токсикокинетику метилина при многократном введении изучали после 30 дней ежедневного внутривен-

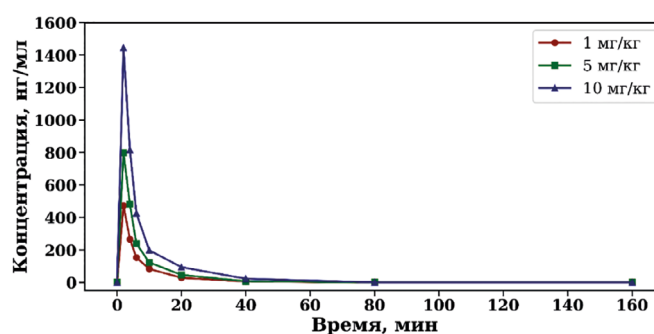


Рис. 3. Усреднённые фармакокинетические кривые метилина в плазме крови кроликов после однократного введения, нормированные на дозу

Fig. 3. Average pharmacokinetic curves of metilin in rabbit blood plasma after a single administration, normalized to the dose

ного, болюсного введения кроликам в двух дозировках 1,0 мг/кг и 10,0 мг/кг [10]. Основной целью токсикокинетических исследований была оценка экспозиции дозы, поэтому использовали ключевые фармакокинетические показатели C_{max} и AUC. Эти показатели для обеих доз представлены в табл. 5 в первый и тридцатый день эксперимента. Можно отметить тенденцию к увеличению средних значений показателей в последний день дозирования по сравнению с первым.

Для количественной оценки использовали статистические подходы, которые позволяют выявить достоверную разницу. В качестве первоначального анализа использовали графическое построение усреднённых фармакокинетических кривых в полулогарифмической системе координат. Такой подход используется в оценке биоэквивалентности лекарственных средств для демонстрации элиминации аналита. Результаты представлены на рис. 4.

Оценивая графики, можно отметить изменение наклона кривой на терминальном участке для дозы 1 мг/кг. Это указывает на наличие более медленной фазы элиминации после многократного введения, которая, вероятно, обусловлена процессами перераспределения вещества. Можно предположить, что при данной дозе происходит частичное накопление метилина в периферических тканях с последующим медленным высвобождением обратно в кровоток. Для дозы 10 мг/кг характерно общее пропорциональное увеличение концентраций аналита на всех

Таблица 4

Основные фармакокинетические показатели метилина при его введении в течение 5 дней

Table 4

Main pharmacokinetic parameters of metilin when administered for 5 days

$C_{\max}$, нг/мл				$AUC_{(0-160) \text{ iv}}$, нг/мл х мин			
Доза 1 мг/кг		Доза 10 мг/кг		Доза 1 мг/кг		Доза 10 мг/кг	
1-й день введения	5-й день введения	1-й день введения	5-й день введения	1-й день введения	5-й день введения	1-й день введения	5-й день введения
400,9±120,20	429,0±146,2	1201,5±296,9	1334,2±305,7	2003,4±570,41	1971,9±515,64	7913,4±2288,36	9578,8±3892,57

Примечание: значения показателей выражены как $M \pm SD$ для групп из 6 животных.
Note: the values of the parameters are expressed as $M \pm SD$ for groups of 6 animals.

Таблица 5

Фармакокинетические показатели $C_{\max}$ и AUC в первый и тридцатый день введения метилина в дозе 1,0 мг/кг и 10,0 мг/кг

Table 5

Pharmacokinetic parameters $C_{\max}$ and AUC on the first and thirtieth day of administration of metilin at a dose of 1.0 mg/kg and 10.0 mg/kg

Показатель	Доза 1 мг/кг		Доза 10 мг/кг	
	1-й день	30-й день	1-й день	30-й день
$C_{\max}$, нг/мл	400,9±120,2	463,6±182,8	1201,5±296,9	1445,9±396,8
$AUC_{(0-160) \text{ iv}}$, нг/мл × мин	2003,4±579,4	2539,1±1050,0	7913,4±2288,4	9170,1±2379,8

Примечание: значения показателей выражены как $M \pm SD$ для групп из 6 животных.
Note: the values of the parameters are expressed as $M \pm SD$ for groups of 6 animals.

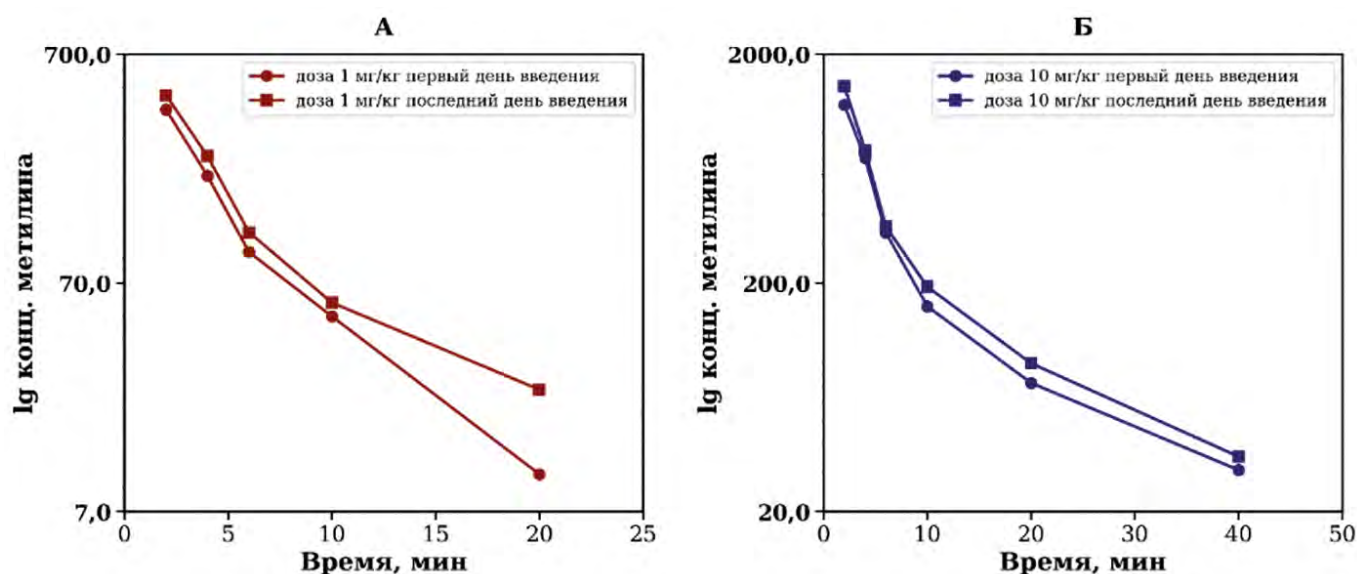


Рис. 4. Усреднённые фармакокинетические кривые метилина в плазме крови кроликов в полулогарифмической системе координат (А — в дозе 1 мг/кг, Б — в дозе 10 мг/кг)

Fig. 4. Average pharmacokinetic curves of metilin in the blood plasma of rabbits in a semi-logarithmic coordinate system (A — at a dose of 1 mg/kg, B — at a dose of 10 mg/kg)

участках фармакокинетической кривой без изменения характера. Такое поведение может характеризоваться стабилизацией процессов насыщения периферических органов и тканей в сравнении с дозой 1 мг/кг.

Сравнительный анализ фармакокинетических кривых подтверждает кумуляцию метилина при многократном дозировании в течение 30 дней. Накопление в разных дозах различается на терминальных стадиях.

С точки зрения накопления токсических эффектов, метилин обладает кумуляцией в организме, но кумуляция предсказуемая, концентрационно-зависимая.

При проведении токсикокинетического исследования выполнялся физикальный осмотр животных. На протяжении 30-дневного исследования потребление корма и воды не изменялось, не было отмечено особенностей в поведении

животных. Интенсивность и характер двигательной активности не менялись, судороги отсутствовали, координация движений и тонус скелетных мышц животных не нарушались. У всех животных реакция на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители была адекватной. Частота и глубина дыхательных движений в начале и конце эксперимента не различались. Изменений в состоянии волосяного, кожного покровов и нарушений функционирования органов чувств не было зарегистрировано ни у одного животного, находящегося под наблюдением в течение 30 дней после начала введения метилина. Во время 30-дневного введения препарата метилин в изучаемых дозах видимые слизистые оболочки оставались бледно-розового цвета, влажность их не изменялась, симптомы бронхита, конъюнктивита и ринита отсутствовали. Частота дефекации и мочеиспускания, консистенция фекальных масс, окраска мочи подопытных животных за время эксперимента были неизменными.

Оценивая полученные результаты, можно констатировать достижение требуемой экспозиции метилина на организм кролика в двух дозах (1 мг/кг и 10 мг/кг) после 30 дней ежедневного внутривенного болюсного введения. Основные показатели, характеризующие фармакологическое действие (C_{max} , AUC), подтверждены на 1-й и 30-й день эксперимента. Для дозы 1 мг/кг отмечается заметная разница между первым и последним днём введения, что обусловлено депонированием исследуемой молекулы в ткани. Состояние животных за 30 дней не изменялось. Таким образом, при ежедневном введении метилина в двух дозах (1 мг/кг и 10 мг/кг) выраженного токсического эффекта у кроликов не обнаружено. Токсикокинетический профиль может быть использован в прогностических целях для расчёта режим/доза при планировании клинических исследований.

Ограничения исследования / Study limitations

Настоящее исследование имеет ряд ограничений, которые необходимо учитывать при интерпретации полученных результатов.

1. Вид и пол животных. Эксперименты выполнены только на самцах кроликов породы советская Шиншилла. Это ограничивает экстраполяцию данных на другие виды (включая человека) и на женский пол, что особенно важно, поскольку фармакокинетика пептидов может зависеть от гормонального фона и массы тела.

2. Небольшой размер выборки. В каждой группе использовано по 6 животных. Хотя такой объём статистически допустим для доклинических РК/ТК-исследований, он не позволяет полностью нивелировать индивидуальную вариабельность, что подтверждается высокими коэффициентами вариации (CV) концентраций метилина (до 77,7 % на 10-й минуте). Полученные данные требуют подтверждения на более крупных когортах.

3. Отсутствие прямого измерения концентрации в тканях. Вывод о кумуляции метилина при 30-дневном введении сделан на основании косвенных признаков (изменение AUC и характера терминальной элиминации).

Непосредственное определение содержания пептида в органах и тканях не проводилось, что не позволяет однозначно подтвердить депонирование вещества и идентифицировать органы-мишени.

4. Короткий период наблюдения в токсикокинетическом эксперименте. Хотя 30 дней ежедневного введения достаточны для оценки субхронической токсичности, они не дают информации о возможных кумулятивных эффектах при более длительном применении (например, 3–6 месяцев), что может быть актуально для хронической сердечной недостаточности.

5. Методологическое ограничение анализа. В разработанной ВЭЖХ-МС/МС методике нижний предел количественного определения (12,03 нг/мл) позволил надёжно детектировать метилин до 80-й минуты, однако для некоторых животных концентрации в поздние временные точки были ниже предела, что могло повлиять на точность расчёта константы элиминации и площади под кривой в терминальной фазе.

Данные ограничения не умаляют значимости полученных результатов, но указывают на необходимость дальнейших исследований, включая изучение фармакокинетики на других биологических моделях, у самок, а также с применением прямых методов оценки тканевого распределения.

Заключение / Conclusion

Пилотное изучение фармакокинетики метилина у кроликов в дозе 1 мг/кг позволило рассчитать основные фармакокинетические показатели метилина. Было отмечено короткое время пребывания в организме молекулы анализита — период полувыведения метилина составляет $5,13 \pm 2,9$ мин. Учитывая область фармакологического применения препарата (внутривенное введение пациентам с ХСН), рекомендовано его использовать в виде инфузий. Исследования линейности фармакокинетики в трёх возрастающих дозировках метилина (1 мг/кг, 5 мг/кг и 10 мг/кг) выявили отклонения в корреляциях. Дозы метилина 5 мг/кг и 10 мг/кг обнаруживали существенно меньшее отношение концентрация метилина в плазме/доза по сравнению с дозой 1 мг/кг. При многократном введении метилина в течении 5 дней на основании изменения основных фармакокинетических показателей не было выявлено его распределения в органах и тканях кроликов. Токсикокинетические исследования позволили численно подтвердить экспозицию двух последовательных доз 1 мг/кг и 10 мг/кг при ежедневном введении метилина в течение 30 дней. Анализ данных физикального осмотра выявил отсутствие выраженного токсического эффекта у препарата. Полученные результаты будут использованы при разработке протокола клинических исследований метилина для проведения I фазы исследования этого препарата на добровольцах.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, о которых необходимо сообщить в связи с публикацией данной статьи.

Участие авторов

Все авторы внесли существенный вклад в подготовку работы, прочли и одобрили финальную версию статьи перед публикацией. *Куликов А. Л.* — фармакокинетика метилина; *Сидорова М. В.* — подтверждение структуры метилина, подготовка статьи; *Писаренко О. И.* — дизайн исследования, подготовка статьи; *Студнева И. М.* — статистическая обработка данных; *Гуреев В. В.* — подготовка статьи; *Авдеева Е. И.* — обзор литературы; *Веселова О. М.* — приготовление растворов метилина; *Серебрякова Л. И.* — физикальный осмотр животных; *Палькеева М. Е.* — синтез пептида метилина; *Молокоедов А. С.* — ВЭЖХ анализ и хроматографическая очистка метилина; *Авдеев В. Д.* — синтез пептида, подготовка иллюстраций.

Финансирование

Министерство здравоохранения РФ, рег. № научно-исследовательской работы 123022803024-3.

ADDITIONAL INFORMATION

Conflict of interests

The authors declare that they have no obvious or potential conflicts of interest to disclose in connection with the publication of this article.

Authors' participation

All authors made a significant contribution to the preparation of the work, read and approved the final version of the article before publication. *Kulikov AL* — metilin pharmacokinetics; *Sidorova MV* — confirmation of metilin structure, article preparation; *Pisarenko OI* — study design, article preparation; *Studneva IM* — statistical data processing; *Gureev VV* — article preparation; *Avdeeva EV* — literature review; *Veselova OM* — preparation of metilin solutions; *Serebryakova LI* — physical examination of animals; *Palkeyeva ME* — metilin peptide synthesis; *Molokoedov AS* — HPLC analysis and chromatographic purification of metilin; *Avdeev VD* — peptide synthesis, preparation of illustrations.

Funding

Ministry of Health of the Russian Federation, research work registration number 123022803024-3.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ / ABOUT THE AUTHORS

Куликов Александр Леонидович — к. б. н., н. с. НИИ Фармакологии живых систем ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация
e-mail: alex-3031@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0001-6422-0377
РИНЦ SPIN-код: 1551-2094

Alexandr L. Kulikov — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Research Institute of Pharmacology of Living Systems Belgorod State National Research University, Belgorod, Russian Federation
e-mail: alex-3031@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0001-6422-0377
RSCI SPIN code: 1551-2094

Сидорова Мария Владимировна — к. х. н., в. н. с. лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация
e-mail: mvs.peptide@gmail.com
ORCID ID: 0000-0003-2540-6325
РИНЦ SPIN-код: 7749-1442

Maria V. Sidorova — PhD, Cand. Sci. (Chem.), Laboratory of Peptide Synthesis, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation
e-mail: mvs.peptide@gmail.com
ORCID ID: 0000-0003-2540-6325
RSCI SPIN code: 7749-1442

Писаренко Олег Иванович — д. б. н., г. н. с. лаборатории метаболизма сердца ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация

Автор, ответственный за переписку

e-mail: olpi@live.ru

ORCID ID: 0000-0002-1894-5761

РИНЦ SPIN-код: 7689-9541

Oleg I. Pisarenko — Dr. Sci. (Biol.), Laboratory of Cardiac Metabolism, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

Corresponding author

e-mail: olpi@live.ru

ORCID ID: 0000-0002-1894-5761

RSCI SPIN code: 7689-9541

Студнева Ирина Михайловна — к. б. н., в. н. с. лаборатории метаболизма сердца ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация

e-mail: imstudneva@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7904-3817

РИНЦ SPIN-код: 2156-4948

Irina M. Studneva — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Laboratory of Cardiac Metabolism, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

e-mail: imstudneva@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-7904-3817

RSCI SPIN code: 2156-4948

Гуреев Владимир Владимирович — д. м. н., профессор, г. н. с. лаборатории лекарственной токсикологии ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация

e-mail: produmen@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-1433-1225

РИНЦ SPIN-код: 9514-0389

Vladimir V. Gureev — Dr. Sci. (Med.), Professor, Laboratory of Medicinal Toxicology, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

e-mail: produmen@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-1433-1225

RSCI SPIN code: 9514-0389

Авдеева Елена Владимировна — д. б. н., профессор кафедры «Нормальная физиология» ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», Курск, Российская Федерация

e-mail: avdeyeva_ev@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-7152-5483

РИНЦ SPIN-код: 4796-0977

Elena V. Avdeeva — Dr. Sci. (Biol.), Professor, Department of Normal Physiology, Kursk State Medical University, Kursk, Russian Federation

e-mail: avdeyeva_ev@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-7152-5483

RSCI SPIN code: 4796-0977

Веселова Оксана Михайловна — к. б. н., с. н. с. лаборатории метаболизма сердца ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация

e-mail: oxanamma@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9132-8866

РИНЦ SPIN-код: 6366-4603

Oksana M. Veselova — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Laboratory of Cardiac Metabolism, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation

e-mail: oxanamma@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-9132-8866

RSCI SPIN code: 6366-4603

Серебрякова Лариса Ивановна — к. б. н., в. н. с. лаборатории метаболизма сердца ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация
e-mail: serebrolar09@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-0693-1669
РИНЦ SPIN-код: 3837-9719

Larisa I. Serebryakova — PhD, Cand. Sci. (Biol.), Laboratory of Cardiac Metabolism, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation
e-mail: serebrolar09@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-0693-1669
RSCI SPIN code: 3837-9719

Палькеева Марина Евгеньевна — к. х. н., с. н. с. лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация
e-mail: mpalkeeva@mail.ru
ORCID ID: 0000-0003-4893-4219
РИНЦ SPIN-код: 9016-3699

Marina E. Palkeeva — PhD, Cand. Sci. (Chem.), Senior Researcher, Peptide Synthesis Laboratory, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation
e-mail: mpalkeeva@mail.ru
ORCID ID: 0000-0003-4893-4219
RSCI SPIN code: 9016-3699

Молокоедов Александр Сергеевич — к. х. н., в. н. с. лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация
e-mail: amolokoedov@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-8534-4405
РИНЦ SPIN-код: 6637-4295

Alexander S. Molokoedov — PhD, Cand. Sci. (Chem.), Laboratory of Peptide Synthesis, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation
e-mail: amolokoedov@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-8534-4405
RSCI SPIN code: 6637-4295

Авдеев Дмитрий Викторович — к. х. н., м. н. с. лаборатории синтеза пептидов ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии имени академика Е.И. Чазова», Москва, Российская Федерация
e-mail: mityaavdeev@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0001-9788-1257
РИНЦ SPIN-код: 9765-8028

Dmitry V. Avdeev — PhD, Cand. Sci. (Chem.), M.Sc., Laboratory of Peptide Synthesis, E.I. Chazov National Medical Research Center of Cardiology, Moscow, Russian Federation
e-mail: mityaavdeev@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0001-9788-1257
RSCI SPIN code: 9765-8028

Список литературы / References

1. Драпкина О.М., Бойцов С.А., Омеляновский В.В., и др. Социально-экономический ущерб, обусловленный хронической сердечной недостаточностью, в Российской Федерации. *Российский кардиологический журнал*. 2021;26(6):4490. [Drapkina OM, Boytsov SA, Omelyanovskiy VV, et al. Socio-economic impact of heart failure in Russia. *Russian Journal of Cardiology*. 2021;26(6):4490. (In Russ.)]. doi: 10.15829/1560-4071-2021-4490.
2. Pisarenko OI, Shulzhenko VS, Studneva IM, et al. Signaling pathways of a structural analogue of apelin-12 involved in myocardial protection against ischemia/reperfusion injury. *Peptides*. 2015 Nov;73:67-76. doi: 10.1016/j.peptides.2015.09.001.
3. Sidorova M, Studneva I, Bushuev V, et al. [MeArg1, NLe10]-apelin-12: Optimization of solid-phase synthesis and evaluation of biological properties *in vitro* and *in vivo*. *Peptides*. 2020 Jul;129:170320. doi: 10.1016/j.peptides.2020.170320.
4. Pisarenko O, Shulzhenko V, Studneva I, et al. Structural apelin analogues: mitochondrial ROS inhibition and cardiometabolic protection in myocardial ischaemia reperfusion injury. *Br J Pharmacol*. 2015 Jun;172(12):2933-45. doi: 10.1111/bph.13038.

5. Федеральный закон от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (с изменениями и дополнениями). [Federal Law of 12.04.2010 No. 61-FZ "On the Circulation of Medicines" (as amended and supplemented) (In Russ.)].
6. Решение Совета ЕЭК №81 «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» от 03.11.2016 г. [Decision of the EEC Council No. 81 "On approval of the rules of good laboratory practice of the Eurasian Economic Union in the field of circulation of medicines" dated 03.11.2016. (In Russ.)].
7. Knorr R, Trzeciak A, Bannwarth W, Gillesen D. New coupling reagents in peptide chemistry. *Tetrahedron Letters*. 1989;30(15):1927-1930. doi: 10.1016/S0040-4039(00)99616-3.
8. Guide for the care and use of laboratory animals. The National Academy press. — Washington, D.C. 2011
9. Grubb's Test for Detecting Outliers. URL: <http://graphpad.com/quickcalcs/GrubbsExplain.cfm>
10. Лекарственные средства для медицинского применения — Доклинические токсикологические и фармакокинетические исследования безопасности (ГОСТ 56702 2015 (утвержден 11.11.2015)). [Medicines for medical use — Preclinical toxicological and pharmacokinetic safety studies (GOST 56702 2015 (approved on 11.11.2015)). (In Russ.)].