

ISSN 2587-7836 (print)
ISSN 2686-8830 (online)

ФАРМАКО КИНЕТИКА *и* ДИНАМИКА



№ 1.2021



Главный редактор

Жердев Владимир Павлович

д. м. н., профессор, заслуженный деятель науки РФ, Москва

Зам. главного редактора

Смирнов Валерий Валерьевич

д. фарм. н., Москва

Ответственный секретарь

Литвин Александр Алексеевич

д. б. н., Москва

Редакционная коллегия

Бондарева

Ирина Борисовна

д. б. н., Москва

Воронина

Татьяна Александровна

заслуженный деятель науки
РФ, д. м. н., профессор, Москва

Громова Ольга Алексеевна

д. м. н., профессор, Москва

Дурнев Андрей Дмитриевич

член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

Ковалёв Георгий Иванович

д. м. н., профессор, Москва

Колик Лариса Геннадьевна

д. б. н., профессор РАН, Москва

Колыванов Геннадий

Борисович, д.б.н., Москва

Мирзоян Рубен Симонович

заслуженный деятель науки
РФ, д. м. н., профессор, Москва

Рудакова Алла Всеволодовна

д. фарм. н., профессор,
Санкт-Петербург

Раменская

Галина Владиславовна

д. фарм. н., профессор, Москва

Сариев Абрек

Куангалиевич

д. м. н., профессор, Москва

Спасов Александр Алексеевич

академик РАН, д. м. н.,
профессор, Волгоград

Стародубцев

Алексей Константинович

д. м. н., профессор, Москва

Сычёв Дмитрий Алексеевич

член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Москва

Тюренков Иван Николаевич

член-корр. РАН, д. м. н.,
профессор, Волгоград
д. б. н., профессор РАН, Москва

Шевченко Роман

Владимирович

к. м. н., Москва

Выпускающая группа

Белоусов

Дмитрий Юрьевич

Ответственный за выпуск
журнала

+ 7 (910) 449-22-73

e-mail: clinvest@mail.ru

Афанасьева

Елена Владимировна

Генеральный директор
ООО «Издательство ОКИ»
подписка

+ 7 (916) 986-04-65

e-mail: eva88@list.ru

сайт: www.izdat-oki.ru

Жук Елена Владимировна

Дизайн и верстка

e-mail: elenazuk70@mail.ru

Подписано в печать 20.02.2021 г. Тираж 400 экз.

Типография: ООО «Буки Веди», www.bukivedi.com

115093, г. Москва, Партийный переулок, д. 1, корп. 58, стр. 3, пом. 11

Адрес редакции: 125315, Москва, ул. Балтийская, 8 ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Тел./Факс: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Сайт журнала: www.Pharmacokinetics.ru Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор) 04.02.2021 года свидетельство о регистрации СМИ ПИ № ФС 77-80349. Авторские материалы не обязательно отражают точку зрения редакции. Редакция не несет ответственности за достоверность информации, содержащейся в рекламных материалах.

Сайты

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru

www.ClinVest.ru

www.Hospital-Apteka.ru

www.Pharmacogenetics-Pharmacogenomics.ru

Журналы

Антибиотики и Химиотерапия

Качественная клиническая практика

Дайджест «Больничная аптека»

Фармакогенетика и Фармакоэкономика

WEB-порталы

www.HealthEconomics.ru

www.Market-Access-Solutions.ru

www.izdat-Okii

Центр Фармакоэкономических Исследований

Market Access Solutions

Издательство ОКИ

КЛИНИЧЕСКАЯ ФАРМАКОКИНЕТИКА

Определение сывороточных/плазменных концентраций психотропных препаратов в терапевтическом лекарственном мониторинге

Мирошниченко И. И., Баймеева Н. В., Платова А. И. 3

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ФАРМАКОДИНАМИКИ

Сравнительная оценка эхокардиографических характеристик левого желудочка сердца у самок и самцов крыс

Ионова Е. О., Барчукова Е. И., Вититнова М. Б., Цорин И. Б., Крыжановский С. А. 14

Кардиопротекторные эффекты соединения АЛМ-802 на моделях субэндокардиальной ишемии

Цорин И. Б., Барчуков В. В., Вититнова М. Б., Лихошерстов А. М., Мокров Г. В., Крыжановский С. А. 18

Оценка противоопухолевой активности 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) у мышей C57BL/6 с трансплантированной интракраниально меланомой B16

Муразов Я. Г., Стуков А. Н., Змитриченко Ю. Г., Нюганен А. О., Точильников Г. В., Латипова Д. Х., Филатова Л. В., Семглазова Т. Ю. 23

ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

К механизму антиаритмического действия фабомотизола дигидрохлорида при алкогольной кардиомиопатии

Мирошкина И. А., Кожевникова Л. М., Цорин И. Б., Столярук В. Н., Вититнова М. Б., Крыжановский С. А., Дурнев А. Д. 30

Изучение электрофизиологических механизмов противосудорожного действия оригинального аналога леветирacetамы – соединения ГИЖ-290

Воронина Т. А., Литвинова С. А., Гладышева Н. А., Яковлева А. А. 38

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В БИОМАТЕРИАЛЕ

Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС

Мыльников П. Ю., Транова Ю., Щулькин А. В., Якушева Е. Н. 45

НЕКРОЛОГ

Памяти Юрия Николаевича Чернова 52



Chief editor

Zherdev Vladimir

Ph.D., Professor, Honored Scientist of the Russian Federation, Moscow

Deputy chief editor

Smirnov Valery

Ph.D., Moscow

Executive secretary

Litvin Alexander

Ph.D., Moscow

Editorial Board

Bondareva Irina

Ph.D., Moscow

Voronina Tatiana

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Gromova Olga

Ph.D., Professor, Ivanovo

Durnev Andrey

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Kovalev Georgy

Ph.D., Professor, Moscow

Colic Larisa

Ph.D., Professor, Moscow

Kolyanov Gennady

Ph.D., Moscow

Mirzoyan Ruben

Honored Scientist RF, Ph.D.,
Professor, Moscow

Rudakova Alla

Ph.D., Professor, St. Petersburg

Ramenskaya Galina

Ph.D., Professor, Moscow

Sariev Abrek

Ph.D., Professor, Moscow

Spasov Alexander

RAS, Ph.D., Professor, Moscow

Starodubtsev Alex

Ph.D., Professor, Moscow

Sychev Dmitry

Corresponding Member RAS,
Ph.D., Professor, Moscow

Tyurenkov Ivan

Corresponding Member PAS,
Ph.D., Professor, Volgograd

Shevchenko Roman

Ph.D., Moscow

Graduate group

Belousov Dmitry

Responsible for this issue
+ 7 (910) 449-22-73
e-mail: clinvest@mail.ru

Afanasyeva Elena

CEO in LLC «Publishing OKI»
subscription
+7(916)986-04-65
e-mail: eva88@list.ru
site: www.izdat-oki.ru

Zhuk Elena

Design and layout
e-mail: elenazuk70@mail.ru

Signed in print 20.02.2021 г. **Circulation** 400 copies.

Typography: LLC Buki Vedi, www.bukivedi.com

115093, Moscow, Partiyinyj pereulok, 1/58, bld. 3, office 11

Editorial address: 125315, Moscow, ul. Baltiyskay, 8

FSBI «ZAKUSOV INSTITUTE OF PHARMACOLOGY»

Tel./Fax: + 7 (495) 601-21-57; e-mail: zherdevpharm@mail.ru

Website: www.PharmacoKinetics.ru The journal was registered with the Federal Service for Supervision in the Sphere of Communications, Information Technology and Mass Media (Roskomnadzor) on 02/04/2021, the certificate of registration of the mass media PINo.FS 77-80349. Copying material does not necessarily reflect the views of the publisher. We take no responsibility for the accuracy of the information contained in promotional materials.

Sites

www.Antibiotics-Chemotherapy.ru
www.ClinVest.ru
www.Hospital-Apteka.ru
www.PharmacoGenetics-Pharmacogenomics.ru

Journals

Antibiotics and Chemotherapy
Good Clinical Practice
Digest «Hospital pharmacy»
Pharmacogenetics and Pharmacogenomics

WEB-portals

www.HealthEconomics.ru
www.Market-Access-Solutions.ru
www.izdat-OKI.ru

Center of Pharmacoeconomics Research
Market Access Solutions
Publisher OKI

CLINICAL PHARMACOKINETICS

Determination of Serum/Plasma Concentrations of Psychotropic
Drugs in Therapeutic Drug Monitoring
Miroshnichenko II, Baymeeva NV, Platova AI 3

PRECLINICAL PHARMACODYNAMICS STUDIES

Comparative evaluation of echocardiographic
characteristics of the heart left ventricle
in female and male rats
*Ionova EO, Barchukova EI, Vititnova MB, Tsorin IB,
Kryzhanovskii SA* 14

Cardioprotective effects of compound ALM-802
on subendocardial ischemia models
*Tsorin IB, Barchukov VV, Vititnova MB, Likhoshervostov AM,
Mokrov GV, Kryzhanovskii SA* 18

Evaluation of the antitumor activity of 2-[3-(2-chloroethyl)-
3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonoisol) in C57BL/6 mice with
intracranially transplanted B16 melanoma
*Murazov IaG, Stukov AN, Zmitrichenko luG, Niuganen AO,
Tochilnikov GV, Latipova DH, Filatova LV, Semiglazova TYu* 23

STUDIES OF THE MECHANISM OF ACTION OF DRUGS

On the mechanism of the antiarrhythmic action
of fabomotizole hydrochloride in alcoholic cardiomyopathy
*Miroshkina IA, Kozhevnikova LM, Tsorin IB, Stolyaruk VN,
Vititnova MB, Kryzhanovskii SA, Durnev AD* 30

Study of the electrophysiological mechanisms
of anticonvulsant action of the original levetiracetam
analog the compound GIZh-290
Voronina TA, Litvinova SA, Gladysheva NA, Yakovleva AA 38

METHODS FOR DETERMINATION OF DRUGS IN BIOLOGICAL MATERIAL

Development and validation of the method
for the quantitative determination of methotrexate
in a transport medium by HPLC-MS/MS
Mylnikov PYu, Tranova Yu, Shchulkin AV, Yakusheva EN 45

OBITUARY

In Memory of YuN Chernov 52

Определение сывороточных/плазменных концентраций психотропных препаратов в терапевтическом лекарственном мониторинге

Мирошниченко И. И., Баймеева Н. В., Платова А. И.

ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Аннотация. В статье рассмотрены основные методологические приёмы проведения терапевтического лекарственного мониторинга (ТЛМ) психотропных препаратов. Описаны аналитические методы, позволяющие выполнять эти исследования. Приведена интерпретация, примеры и краткие результаты 2 исследований ТЛМ антипсихотических препаратов, выполненных на базе ФГБНУ НЦПЗ и Психиатрической больницы № 14 г. Москвы.

Ключевые слова: терапевтический лекарственный мониторинг; антипсихотические препараты; антидепрессанты

Для цитирования:

Мирошниченко И. И., Баймеева Н. В., Платова А. И. Определение сывороточных концентраций психотропных препаратов в терапевтическом лекарственном мониторинге. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):3–13. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-3-13>

Поступила: 01 октября 2020 г. **Принята:** 15 октября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г.

Determination of Serum/Plasma Concentrations of Psychotropic Drugs in Therapeutic Drug Monitoring

Miroshnichenko II, Baymeeva NV, Platova AI

FSBSI «Mental Health Research Center», Moscow, Russia

Abstract. The article considers the main methodological methods of therapeutic drug monitoring (TDM) of psychotropic drugs. Analytical methods that allow performing these studies have been described. It has been given the interpretation, examples and brief results of two studies of TDM of antipsychotic drugs made in FSBSI "Mental Health Research Center" and Psychiatric hospital No.14 in Moscow.

Keywords: therapeutic drug monitoring; antipsychotic drugs; antidepressants

For citations:

Miroshnichenko II, Baymeeva NV, Platova AI. Determination of serum concentrations of psychotropic drugs in therapeutic drug monitoring. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1): 3–13. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-3-13>

Received: October 01, 2020. **Accepted:** October 15, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Терапевтический лекарственный мониторинг психотропных средств предназначен для установления соответствия их концентрации в крови пациентов терапевтическому диапазону и выработки рекомендаций по коррекции режима дозирования. Методика включает количественное определение антипсихотиков (АП) в сыворотке/плазме крови и мониторинг их концентрации в ходе лечения.

Выявление связи между концентрацией психотропных препаратов (ПП) в крови и терапевтическим эффектом, с одной стороны, и выраженностью побочных эффектов — с другой, является важным практическим вопросом психофармакологии. В течение многих лет, с тех пор как появилась возможность измерения концентрации ПП в крови, одним из эффективных средств коррекции лекарственной терапии является терапевтический лекарственный мониторинг (ТЛМ) [1, 2, 3, 4]. Основные посылки проведения мониторинга — узкий терапевтический диапазон, значительная межиндивидуальная изменчивость и частые случаи нарушения врачебных предписаний пациентами. Особое внимание привлекает мониторинг ПП и их активных метаболитов [5]. Так, для рисперидона и венлафаксина необходимо учитывать сумму концен-

траций как исходного вещества, так и его метаболита: 9-ОН- рисперидона и О-десметилвенлафаксина, соответственно. В то же время для клозапина важным фармакокинетическим предиктором является метаболический оборот: отношение норклозапин / клозапин [6].

Основная идея ТЛМ основана на том предположении, что наблюдается равновесное состояние между уровнем лекарственного вещества в месте его действия и его концентрацией в крови. Следовательно, для многих лекарственных веществ, измерение концентрации в крови может служить источником информации о содержании этих веществ в органе-мишени. То есть, существуют средние диапазоны значений концентрации препарата в крови, соответствующие оптимальному терапевтическому эффекту. В результате проведённых многочисленных исследований для многих лекарственных препаратов были установлены «терапевтические» диапазоны концентрации, позволяющие получить у большинства больных желаемый терапевтический эффект без проявления побочного действия, вызванного передозировкой препарата [7].

Зависимость лечебного эффекта препарата от его концентрации в крови носит достаточно сложный характер. При этом следует отметить, что лечебный эффект наступает при достижении в организме не-

которой минимальной эффективной концентрации (МЭК). К сожалению, большинство лекарственных веществ не являются «терапевтически чистыми», проявляя нежелательные побочные эффекты или, другими словами, токсическое действие. При так называемой минимальной токсической концентрации (МТК) эти эффекты становятся нежелательными и, следовательно, недопустимыми. Диапазон концентраций между МЭК и МТК и является желательным терапевтическим коридором препарата.

Необходимость проведения ТЛМ обусловлена следующими основными причинами [8]:

- высокой межиндивидуальной вариацией фармакокинетических параметров, приводящей к существенным различиям уровня стационарных концентраций препарата в крови;
- для выявления соотношения между дозой и концентрацией препарата в крови, с одной стороны, и фармакологическим (или токсическим) эффектом препарата — с другой;
- узким терапевтическим коридором, когда зона положительного эффекта находится достаточно близко от зоны побочных эффектов.

Среди обстоятельств, затрудняющих проведение ТЛМ, следует отметить трудно поддающуюся адекватной оценке внутрииндивидуальную вариабельность (т. е. колебания стационарной концентрации препарата у одного и того же индивидуума), а также отсутствие аналитического метода определения концентраций препарата в крови. Целью ТЛМ является установление соответствия значений концентрации терапевтическому диапазону и выработки рекомендаций по коррекции режима дозирования.

Проведение ТЛМ при терапии психических заболеваний показано для целого ряда препаратов. Список препаратов достаточно обширный и включает в себя литий [9], трициклические антидепрессанты, производные фенотиазина, галоперидол, рисперидон, клозапин, оланзапин, [10]. ТЛМ антидепрессантов показан при переходе с терапии одного антидепрессанта на другой или при назначении на фоне антидепрессивной терапии лития [11]. Предложена градация целесообразности проведения ТЛМ [2]: уровень 1 — настоятельно рекомендуется; уровень 2 — рекомендуется; уровень 3 — полезно; уровень 4 — потенциально полезно.

Показания к проведению мониторинга / Indications for Therapeutic Drug Monitoring

ТЛМ терапии психических заболеваний рекомендуется использовать при:

- 1) шизофрении и шизоаффективных расстройствах;
- 2) биполярных расстройствах;
- 3) депрессии;
- 4) мании;
- 5) алкоголизме;

- 6) рутинном мониторинге;
- 7) подозрении на некомплаентность у пациента;
- 8) выраженных побочных эффектах;
- 9) сложных терапевтических случаях;
- 10) при политерапии, поскольку совместный приём некоторых препаратов приводят к лекарственному взаимодействию, выражающемуся в изменении фармакокинетических параметров.

Клиническая часть ТЛМ / Clinical Component of TDM

Для проведения ТЛМ кровь у пациентов (5 мл) отбирается путём венепункции после достижения равновесной концентрации ПП (5–6 периодов полувыведения после назначения лекарственной терапии). Для получения биообразца используют вакутейнеры с активатором сгустка или антикоагулянтом. Пробы забирают утром натощак, до приёма АП, во время максимального снижения его стационарной концентрации в крови, непосредственно перед очередным приёмом АП.

Риск осложнений при отборе образцов для ТЛМ минимален. К лёгким осложнениям можно отнести слабое кровотечение в месте отбора пробы, обморок или чувство головокружения после взятия крови, а также гематому.

Соответствующие рекомендации по оптимизации лекарственной терапии должны быть предоставлены лечащему врачу в период, не превышающий 4 дня.

Врачебные мероприятия, оказывающие непосредственное влияние на концентрацию препарата в крови (изменение дозы, комедикация, переход на другой препарат), должны быть доведены до сведения аналитической лаборатории. Врач должен также предоставить и иную уместную клиническую информацию (улучшение состояния больного, побочное действие, регулярность приёма препарата пациентом) — словом то, что обозначается по терминологии англоязычных авторов «physician's compliance». Пациент должен строго следовать предписаниям и рекомендациям лечащего врача — «patient's compliance». Впрочем, уместен и обратный подход, а именно проведение ТЛМ, в тех случаях, когда существует сомнение в регулярности приёма препарата данным пациентом (рис. 1).

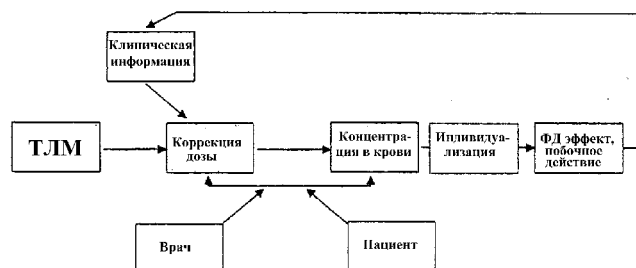


Рис. 1. Факторы, влияющие на эффективность ТЛМ
Figure 1. Factors affecting effectiveness of TDM

Общее фармакологическое действие ПП с активным метаболитом зависит от суммы концентраций в крови исходного вещества и его метаболита (общая активная часть), поэтому мониторинг концентраций только исходного соединения может приводить к ошибочным интерпретациям. Это характерно для арипипразола и, в особенности, для рисперидона, метаболический индекс которого более 2 (рис. 2).

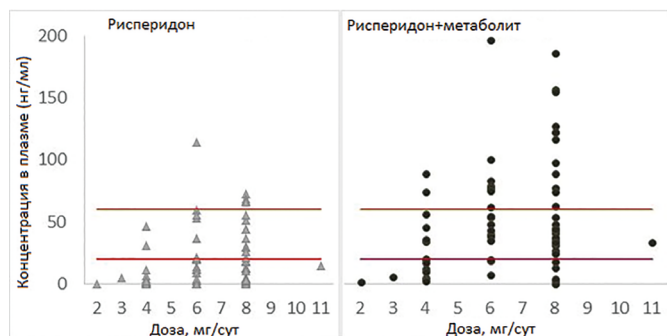


Рис. 2. Сравнение величины концентрации рисперидона и суммарной концентрации рисперидона, и его активного метаболита относительно терапевтического диапазона

Figure 2. Comparison of the risperidone concentrations and the total concentrations of risperidone and its active metabolite relative to the therapeutic range

Сбор клинической информации происходит следующим образом: лечащим врачом заполняются специальные бланки — индивидуальные регистрационные карты, в которых содержится информация о пациенте, демографические показатели (рост, масса), результаты биохимического анализа крови (билирубин, креатинин, АЛТ, АСТ, общий белок), вредные привычки, сопутствующие заболевания, сопутствующая терапия. Биообразец вместе с картой мониторинга доставляется в лабораторию, пациенту присваивается постоянный индивидуальный идентификационный код. Далее данные хранятся и обрабатываются с использованием шифров. Доступ к информации для третьих лиц исключён.

Аналитическая часть ТЛМ / Laboratory Component of TDM

В рутинной практике мониторинга наиболее распространёнными методами являются жидкостная и газовая хроматография, тандемная хромато-масс-спектрометрия (ЖХ-МС-МС), с одной стороны, и иммуноферментный анализ (ИФА), в частности ELISA, (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) — с другой [12]. Главными достоинствами методов ИФА и ЖХ-МС-МС являются возможность автоматизации (ИФА) и быстрый переход с одного вида анализа на другой при ЖХ-МС-МС. К числу недостатков следует отнести перекрестную контаминацию родственными

соединениями (ИФА), а также ионную супрессию (подавление сигнала ионами примесей в реальной пробе по сравнению с растворителем) и матричный эффект, снижающие интенсивность регистрируемого сигнала (ЖХ-МС-МС) [13]. С нашей точки зрения, предпочтительно применение ЖХ-МС-МС, поскольку при этом появляется возможность одновременно определить несколько ПП и их активных метаболитов в пробе и измерять в одном и том же образце содержание соответствующих биомаркеров.

Методика определения антипсихотиков в сыворотке крови / Method for determination of antipsychotics in serum blood

Для определения содержания АП использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию, сопряжённую с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Методика позволяет одновременно определять содержание нескольких АП и их активных метаболитов [14].

Аналитические стандарты: арипипразол и дегидро-арипипразол, галоперидол, зуклопентиксол, кветиапин, клозапин и норклозапин, оланзапин, рисперидон и 9-ОН-рисперидон, флуфеназин, хлорпромазин, хлорпротиксен, анастразол (внутренний стандарт).

Процедура обладает достаточной точностью, правильностью и воспроизводимостью. Нижний предел количественного определения (НПКО) для анализируемых веществ находится в пределах 0,5 — 1 нг/мл.

Анализируемые вещества извлекают из матрикса посредством жидкостной экстракции метил-трет-бутиловым эфиром. Разделение осуществляют на колонке Zorbax Eclipse C18 (4,6 × 150 мм, 5 мкм) (Agilent, США). В качестве подвижной фазы используют градиентную смесь раствора 0,2 % муравьиной кислоты в воде и в ацетонитриле при скорости потока 0,6 мл/мин. Анастразол служит в качестве внутреннего стандарта (ВС), поскольку вероятность его приёма пациентами с психическими заболеваниями крайне незначительна [15]. Для определяемых веществ используется способ ионизации электро распылением. Сигнал детектируют в режиме мониторинга множественных реакций (MRM). MRM переходы представлены в табл. 1. Время анализа составляет 11 минут.

Методика определения антидепрессантов в плазме крови / Method for determination of antidepressants in blood plasma

Реактивы и материалы. Хроматографическая колонка: Hypersil GOLD (30 мм × 2,1 мм; 1,9 мкм) (Thermo Scientific); предколонка: Hypersil GOLD (10 мм × 2,1 мм; 3 мкм). **Реактивы и растворители:** вода деионизованная (с сопротивлением 18 МОм), ацетонитрил, муравьиная кислота, метилтретбутиловый эфир. **Аналиты:** венлафаксин и десметилвенлафаксин

Таблица 1

Параметры количественного определения и терапевтические диапазоны антипсихотиков

Table 1

Quantitative determination parameters and therapeutic ranges of antipsychotics

Вещество / Substances	MRM	Калибровочный диапа- зон, нг/мл / Calibration range (ng/ml)	Терапевтический диапазон, нг/мл / Therapeutic range (ng/ml)	Уровень рекомендации к использованию ТЛМ / Level of recommendation to use TDM
Арипипразол	448,2→285,2	1–1000	100–500*	2
Дегидроарипипразол	446,2→285,2	1–1000	—	-
Хлорпромазин	319,1→86,1	1–1000	30–300	2
Хлорпротиксен	316,1→271,1	1–1000	20–300	3
Клозапин	327,2→270,0	1–1000	350–600	1
Норклозапин	313,2→192,0	1–1000	—	—
Галоперидол	376,2→165,0	0,5–50	2–17	1
Флуфеназин	432,8→171,2	0,5–50	1–10	1
Оланзапин	313,0→256,0	0,5–100	20–80	1
Рisperидон	411,3→191,1	0,5–100	20–60*	2
9-ОН-рисперидон	427,3→207,2	0,5–100	20–60	2
Кветиапин	384,2→253,1	1–1000	10–600	2
Зуклопентиксол	401,2→231,0	0,5–100	5–100	3
BC (анастрозол)	294,2→225,1	—	—	—

Примечание: * – включая концентрацию активного метаболита.
Note: * – including drug's active metabolite concentration.

(его метаболит), тразодон, миансерин, циталопрам, флувоксамин малеат, нортриптилин, амитриптилин, сертралин, кломипрамин, анастрозол (внутренний стандарт).

Для ТЛМ использовали образцы плазмы с Na₂EDTA в качестве антикоагулянта. В образцы плазмы крови объемом 500 мкл добавляли 50 мкл раствора анализируемых веществ в определённых концентрациях и фиксированной концентрацией внутреннего стандарта (анастрозола). Экстракцию проводили метил-третбутиловым эфиром в количестве 2 мл, затем образцы перемешивали на горизонтальном встряхивателе в течение 10 минут при 240 об/мин. После этого образцы центрифугировали при 3000 об/мин в течение 5 мин. Пробирки с центрифугированными образцами с приоткрытыми пробками помещали в морозильную камеру на -80 °C на 2 мин. Полученный экстракт перемещали в пробирки для упаривания и упаривали в токе азота при температуре 40 °C досуха. Сухой остаток растворяли в 250 мкл подвижной фазы, переливали в виалы для ВЭЖХ и помещали в автоинжектор хроматографа для последующего анализа. Объем инъекции составлял 5 мкл.

Для хроматомасс-спектрометрического анализа использовали хроматограф Dionex, включающий бинарный насос, дегазатор, автоинжектор с термостатированием, термостат колонок, совмещённый с трёхквadrupольным масс-спектрометром TSQ Quantiva (Thermo Scientific). Разделение проводилось на колон-

ке с C18 обращённой фазой Hypersil GOLD (30 мм × 2,1 мм; 1,9 мкм) (Thermo Scientific) с предколоной Hypersil GOLD (10 мм × 2,1 мм; 3 мкм) в режиме градиентного элюирования.

Подвижная фаза: буфер А: 0,2 % муравьиная кислота в воде, буфер В: 0,2 % муравьиная кислота в ацетонитриле. Скорость потока подвижной фазы составляла 0,3 мл/мин. Температура автоинжектора: 10 °C. Объем инъекции: 5 мкл. Время разгонки составляло 12 мин.

В качестве источника ионов в масс-спектрометре использовали источник с ионизацией электрораспылением (ESI), работающий в режиме положительной ионизации. Анализ проводили в режиме детектирования заданных масс (MRM) (табл. 2).

Методика обладает приемлемой чувствительностью для измерения антидепрессантов в ТЛМ: нижние пределы количественного определения всех анализов находятся в диапазоне от одного до нескольких нг/мл. Индивидуальные хроматограммы стандартного образца смеси наиболее часто назначаемых антидепрессантов в плазме крови приведены на рис. 3.

Применяемые методики для количественного определения ПП должны соответствовать предъявляемым требованиям – быть валидированы. Необходимо оценить такие показатели, как линейность, правильность, точность и предел количественного определения. Особое внимание в ТЛМ следует уделить оценке стабильности образцов в растворе и матриксе.

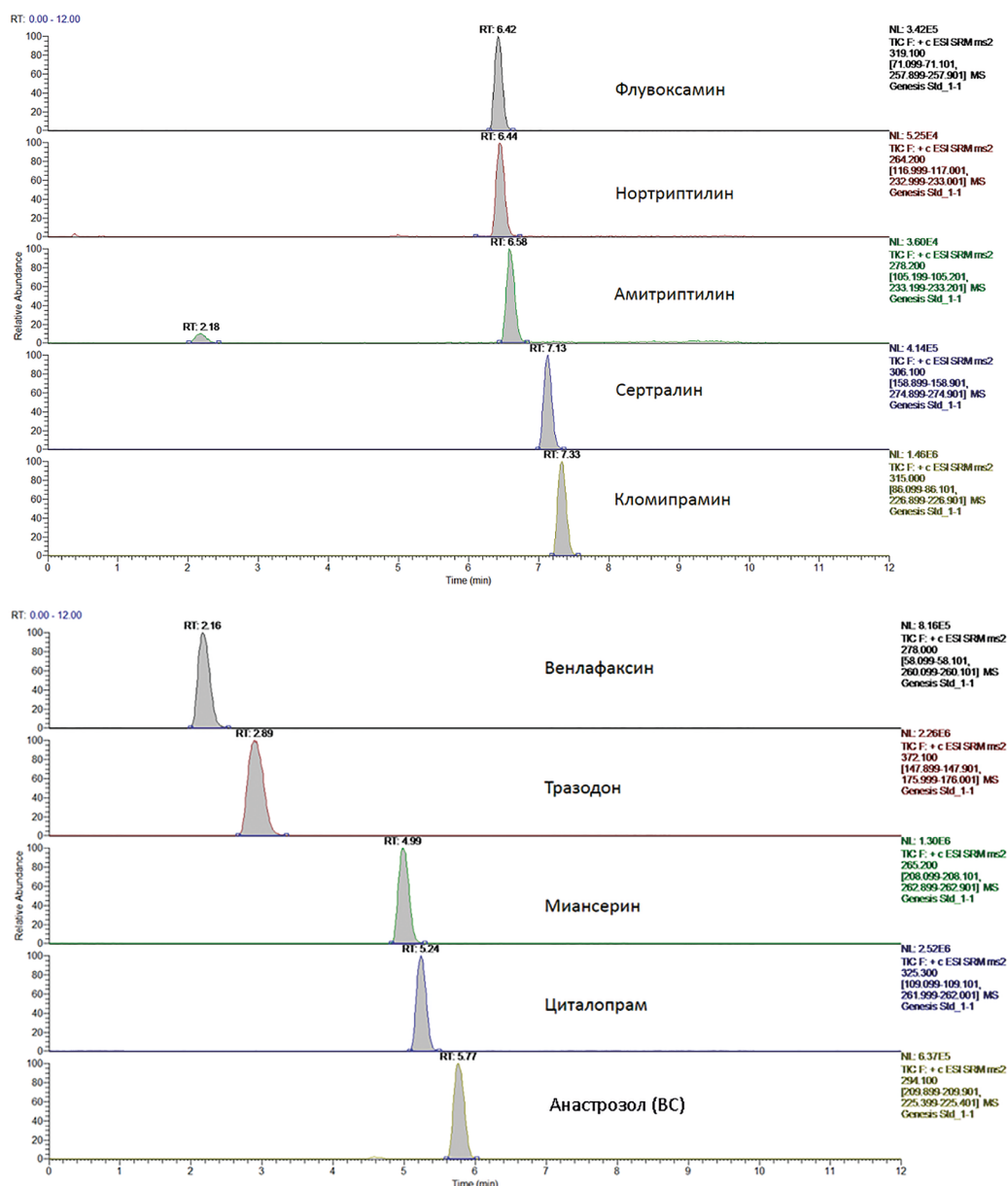


Рис. 3. Индивидуальные хроматограммы антидепрессантов в плазме крови
Figure 3. Individual chromatograms of antidepressants in blood plasma

Статистика / Statistics

Для представления полученных результатов применяли следующие приёмы математической статистики: определение среднего значения, выборочного среднеквадратичного отклонения; определение доверительных интервалов. Устанавливали корреляционную зависимость между представленными выборками (корреляцию Пирсона). Проводят сравнение данных по двустороннему t-критерию Стьюдента. Хранение и обработку данных осуществляли с помощью программ MS Excel, и SPSS v. 24. Кроме того, существуют и специализированные программы для анализа данных ТЛМ и коррекции дозирования [16].

Интерпретация полученных данных / Interpretation of Received Data

Полученные величины стационарной концентрации в сыворотке/плазме крови распределяются на следующие диапазоны:

- 1) терапевтический диапазон (ТЕР) (табл. 1–2);
- 2) субтерапевтический диапазон (СУБ), меньше МЭК;
- 3) условно токсический диапазон (ТОКС), больше МТК.

Некомплаентность или некорректный приём лекарства подозревали в следующих случаях: уровень концентрации меньше двух НПКО или при наличии

Таблица 2

Параметры количественного определения и терапевтические диапазоны антидепрессантов

Table 2

Parameters of quantitative analysis and therapeutic ranges of antidepressants

Лекарственное вещество / Drug Substance	MRM / MRM	Калибровочный диапазон, нг/мл / Calibration Range (ng/ml)	Терапевтический диапазон, нг/мл / Therapeutic Range (ng/ml)	Уровень рекомендации к проведению ТЛМ / Level of Recommendation to Use TDM
Венлафаксин	278,0→260,1	5–1000	100–400*	2
Десметилвенлафаксин	264,4→246,1	5–1000	—	—0
Тразодон	372,1→176,0	10–2000	700–1000	2
Миансерин	265,2→208,1	1–200	15–70	3
Циталопрам	325,3→262,0	2–200	50–110	1
Нортриптилин	264,2→91,0	5–1000	70–170	1
Амитриптилин	278,4→91,0	5–1000	80–200*	1
Флувоксамин	319,2→71,1	5–500	60–230	2
Имипрамин	281,2→86,0	5–1000	175–300*	1
Дезипрамин	267,0→72,1	5–1000	100–300	2
Кломипрамин	315,0→86,1	5–1000	230–450	1
Сертралин	306,1→158,9	1–500	10–150	2
Мапротилин	278,2→250,0	5–500	75–130	2
ВС (анастрозол)	294,2→225,1	—	—	—
Примечание: * — включая концентрацию активного метаболита. Note: * — including drug's active metabolite concentration.				

токсичного уровня концентрации (в 2–3 раза больше верхней границы терапевтического диапазона). Результаты такого рода немедленно сообщали лечащему врачу (по терминологии англоязычных авторов — «laboratory alert»). Последующие хроматограммы наглядно иллюстрируют результаты ТЛМ АП (рис. 4–8).

На рис. 8 представлен алгоритм проведения ТЛМ оланзапина с точки зрения клинициста. Терапевтический диапазон для этого АП составляет 20–60 нг/мл. В случае отсутствия терапевтического эффекта: если значения концентрации находятся в токсическом интервале, то рекомендуется переход на другой АП. При обнаружении низких концентраций препарата, после проверки на комплаентность целесообразно повышение дозы. В случае токсичности: при измерении низких концентраций препарата, после подтверждения количественного анализа рекомендуется проверка на комплаентность, после чего переход на другой АП или повышение дозы. Если значения располагаются в токсическом интервале, рекомендуется снижение дозы (рис. 8).

Для исследуемых веществ изучают корреляцию между концентрацией и дозой, а также строят регрессионные зависимости и находят доверительные интервалы и р-величины для коэффициентов регрессионных уравнений.

Поскольку пациенты получают ПП, как правило, в разных дозах, концентрацию нормируют относительно дозы. Применение нормированного показателя отношения концентрации к дозе (C/D) даёт возможность для дальнейших операций с данными. Гистограм-

ма распределения отношения суммы концентраций «арипипразол + дегидроарипипразол», отнесённых к дозе, представлена на рис. 9 из которого видно, что распределение отличается от нормального (эксцесс 1,4; коэффициент асимметрии — 4,11)

Результаты ТЛМ / TDM Results

Психиатрическая больница № 14 Департамента Здравоохранения Москвы / Psychiatric Hospital No. 14 of the Moscow Department of Healthcare

ТЛМ АП проводили в целевой популяции пациентов, страдающих шизофренией ($n = 41$). У большинства обследованных выявлены отклонения уровня АП от терапевтического диапазона, что отражает широкую вариабельность этого показателя и трудности индивидуального дозирования, если ориентироваться лишь на клиническую картину (рис. 10).

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья» (ФГБНУ НЦПЗ) / Federal State Budgetary Scientific Institution Mental Health Research Center (FSBSI MHRC)

ТЛМ проведён на выборке из целевой популяции, включающей 188 пациентов, находившихся в стационаре клиники ФГБНУ НЦПЗ. В исследовании было задействовано 178 мужчин и 10 женщин.

В ходе ТЛМ за период 2015–2017 гг. был проведён анализ 265 образцов, получено 432 значения концентрации АП и 249 активных метаболитов.

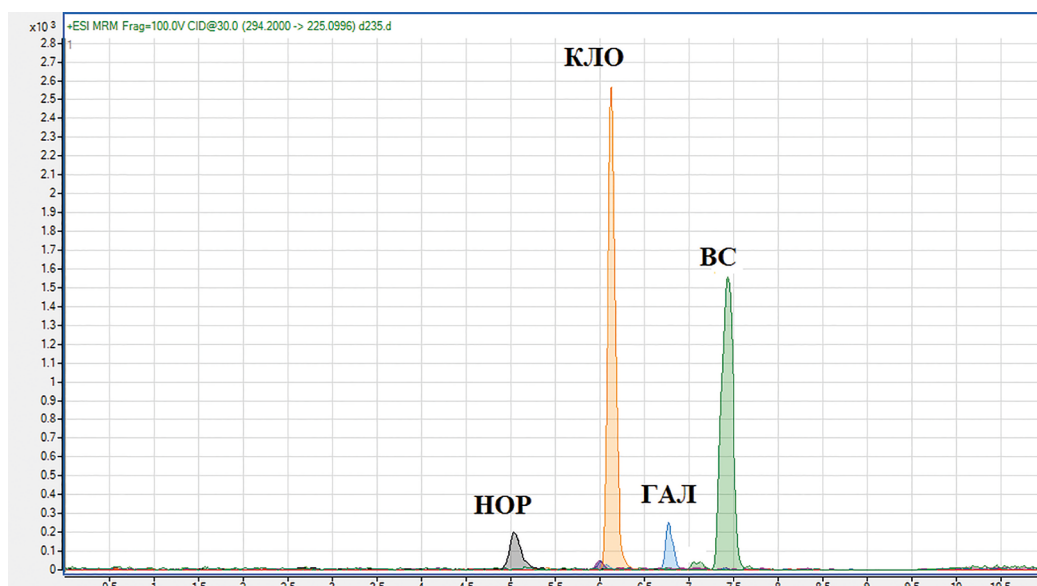


Рис. 4. Терапевтический диапазон. Хроматограмма сыворотки крови пациента, принимавшего галоперидол 6 мг/сут (концентрация — 3 нг/мл) и клозапин — 300 мг/сут (концентрация клозапина — 143 нг/мл, норклозапина — 25 нг/мл). Концентрации препаратов соответствуют терапевтическому диапазону

Figure 4. Therapeutic range. The chromatogram of the blood serum of a patient who have taken haloperidol 6 mg/day (haloperidol concentration was 3 ng/ml) and clozapine — 300 mg/day (clozapine concentration was 143 ng/ml, norclozapine — 25 ng/ml). The concentrations of the drugs correspond to the therapeutic ranges

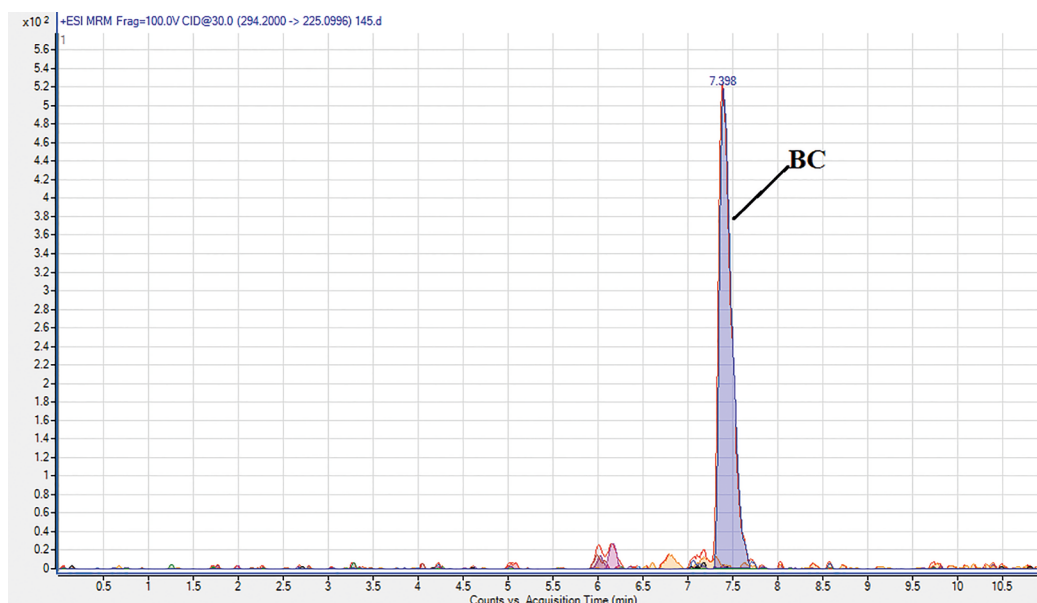


Рис. 5. Хроматограмма сыворотки крови пациента с подозрением на некомплаентность. Назначенные режимы дозирования: клозапин 200 мг/сут, рисперидон — 8 мг/сут, хлорпромазин — 100 мг/сут

Figure 5. Chromatogram of the blood serum of a patient with suspected incomppliance. Prescribed dosage regimens: 200 mg/day of clozapine, 8 mg/day of risperidone, 100 mg/day of chlorpromazine

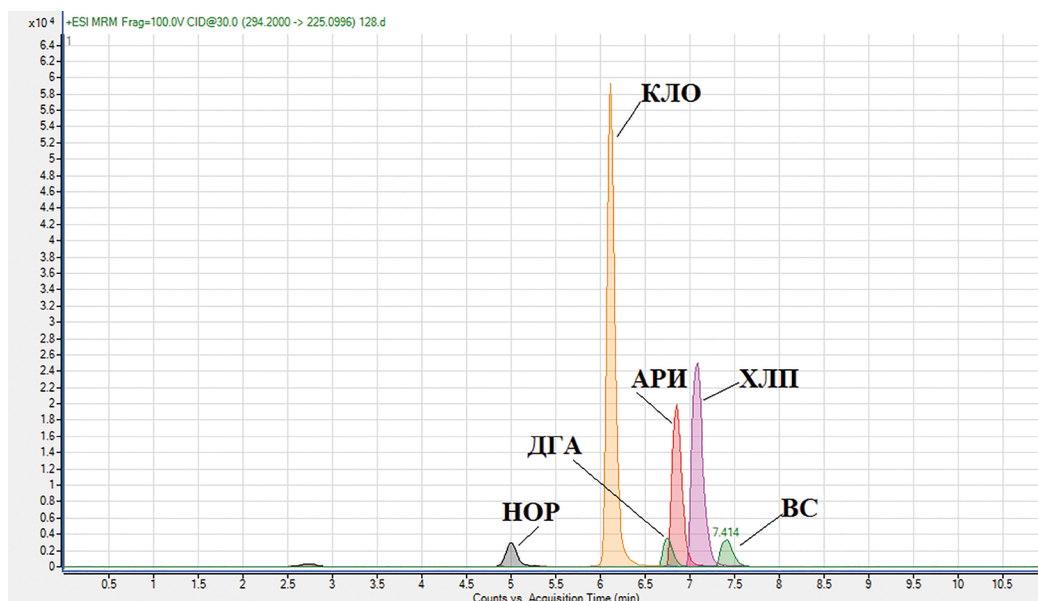


Рис. 6. Токсический диапазон. Хроматограмма сыворотки крови пациента с «laboratory alert» из-за клозапина (КЛО), принимавшего 20 мг/сут арипипразола (АРИ), 150 мг/сут клозапина (КЛО) и 100 мг/сут хлорпромазина (ХЛП). Измеренные концентрации: АРИ – 403 нг/мл, ДГА (дегидроарипипразол) – 45 нг/мл, КЛО – 1398 нг/мл, норклозапин (НОР) – 176 нг/мл, ХЛП – 132 нг/мл

Figure 6. The toxic range. The blood serum chromatogram of a patient with laboratory warning named “laboratory alert” due to clozapine (CLO), who have taken 20 mg/day of aripiprazole (ARI), 150 mg/day of clozapine (CLO), and 100 mg/day of chlorpromazine (CLP). The measured levels were: 403 ng/ml of ARI, 45 ng/ml of DHA (dehydroaripiprazole), 1398 ng/ml of CLO, 176 ng/ml of norclozapine (NOR), and 132 ng/ml of CLP

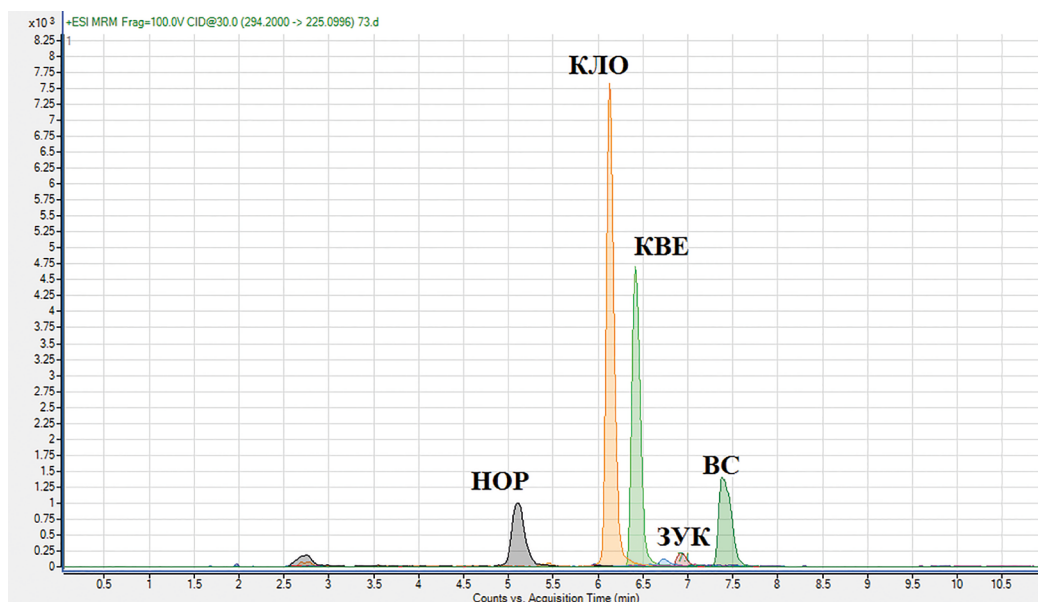


Рис. 7. Мископлаентность. Хроматограмма сыворотки крови пациента, принимавшего кветиапин (КВЕ) не по назначению врача. Назначения пациента: КЛО в дозе 200 мг/сут (концентрация КЛО – 388 нг/мл, НОР – 149 нг/мл), зуклопентиксол (ЗУК) в дозе 28,8 мг/сут (концентрация 27 нг/мл). КВЕ не был назначен, однако был обнаружен в пробе в концентрации 80 нг/мл.

Figure 7. Miscompliance. Chromatogram of blood serum of a patient who have taken quetiapine (QUE), which was not prescribed by a doctor. Patient's medications included CLO at a dose of 200 mg/day (CLO concentration was 388 ng/ml, NOR – 149 ng/ml) and zuclopentixol (ZUK) at a dose of 28.8 mg/day (its concentration was 27 ng/ml). QUE was not prescribed, but was detected in the sample at a concentration of 80 ng/ml.

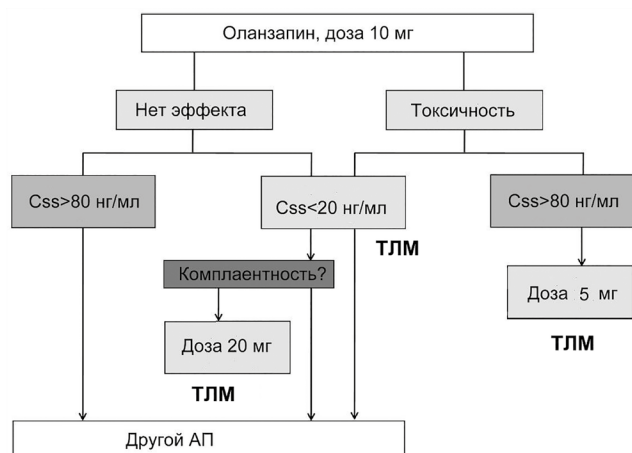


Рис. 8. Схема проведения ТЛМ оланзапина
Figure 8. Algorithm for TDM of olanzapine



Рис. 9. Гистограмма, иллюстрирующая отношение концентрации суммы активных компонентов арипипразола (АРИ+ДГА) к дозе
Figure 9. Histogram illustrating the distribution of the ratio of the total concentration of the active components of aripiprazole (ARI+DHA) to its dose

Figure 9. Histogram illustrating the distribution of the ratio of the total concentration of the active components of aripiprazole (ARI+DHA) to its dose

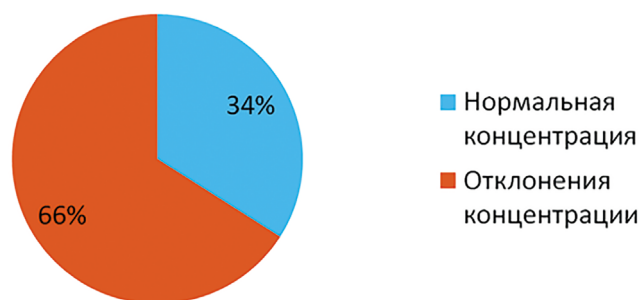


Рис. 10. Диаграмма распределения концентраций АП в ходе ТЛМ (Психиатрическая больница № 14)
Figure 10. Pie chart of antipsychotics concentration distribution in TDM (Psychiatric Hospital No. 14)

Figure 10. Pie chart of antipsychotics concentration distribution in TDM (Psychiatric Hospital No. 14)

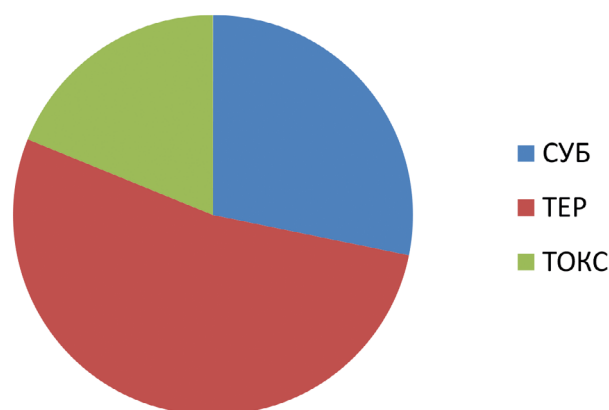


Рис. 11. Диаграмма распределения концентраций АП по диапазонам (СУБ<ТЕР<ТОКС) (ФГБНУ НЦПЗ)
Figure 11. Pie chart of antipsychotics concentration distribution by levels (subtherapeutic < therapeutic < toxic) (FSBSI MHRC)

Figure 11. Pie chart of antipsychotics concentration distribution by levels (subtherapeutic < therapeutic < toxic) (FSBSI MHRC)

Таблица 3

Усредненные дозы антипсихотиков и измеренные в ТЛМ концентрации (ФГБНУ НЦПЗ)

Table 3

Average doses of antipsychotics and its concentrations measured in TDM (FSBSI MHRC)

Препарат / Medication	n	Средняя суточная доза, мг/сут / Average Daily Dose (mg/day)	Средняя концентрация, нг/мл / Average Concentration (ng/ml)
Зуклопентиксол	39	29,0±19,0	30,3±27,9
Галоперидол	44	15,0±9,2	13,0±12,9
Кветиапин	44	471,0±332,0	388,6±522,7
Клозапин	99	129,0±72,0	439,8±442,3
Рisperидон (+метаболит)	73	6,4±1,8	49,6±44,0
Арипипразол (+метаболит)	36	18,4±7,9	535,4±478,5
Оланзапин	49	16,0±5,0	54,4±42,9
Хлорпромазин	45	151,1±103,9	74,5±138,6

Усредненные значения концентрации АП и их доз приведены в табл. 3.

Полученные величины стационарной концентрации препарата в сыворотке крови распределились следующим образом: 51 % наблюдений находились в зоне «ТЕР», 28 % — в «СУБ» и 21 % в «ТОКС» диапазоне. Таким образом, примерно у половины пациентов были обнаружены отклонения концентрации АП от оптимального уровня (рис. 11).

Заключение / Conclusion

В проведенных исследованиях в среднем у каждого второго пациента, получающего антипсихотические

препараты, были обнаружены отклонения их уровня в крови от принятых терапевтических диапазонов, что чревато развитием побочных реакций или неэффективностью терапии. Мониторинг концентрации антипсихотиков при этом проводили всем пациентам, давшим свое согласие на процедуру, что подчеркивает важность внедрения этого подхода в повседневную психиатрическую практику. Предоставляя врачу помимо клинического ещё и количественный обратный отклик в ответ на назначаемое лечение, ТЛМ существенно облегчит подбор схем и режимов дозирования. Описанные в работе методики количественного определения самых часто назначаемых психотропных препаратов позволят успешно справиться с такой задачей.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошниченко Игорь Иванович

e-mail: igormir@psychiatry.ru

ORCID ID: 0000-0003-4950-5336

SPIN-код: 4117-9703

д. м. н., зав. лабораторией фармакокинетики
ФГБНУ НЦПЗ, Москва, России

Miroshnichenko Igor I.

e-mail: igormir@psychiatry.ru

ORCID ID: 0000-0003-4950-5336

SPIN code: 4117-9703

Dr. Sci. (Med.), Head of pharmacokinetics laboratory FSBSI «Mental Health Research Center», Moscow, Russia

Баймеева Наталья Викторовна

e-mail: baymeeva_n@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-4429-4114

SPIN-код: 7080-2142

н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ НЦПЗ, Москва, России

Baymeeva Nalalia V.

e-mail: baymeeva_n@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-4429-4114

SPIN code: 7080-2142

Researcher of pharmacokinetics laboratory, FSBSI «Mental Health Research Center», Moscow, Russia

Платова Ангелина Игоревна

Автор, ответственный за переписку

e-mail: platova@psychiatry.ru

ORCID ID: 0000-0002-9682-4623

SPIN-код: 6656-2194

н. с. лаборатории фармакокинетики
ФГБНУ НЦПЗ, Москва, России

Platova Angelina I.

Corresponding author

e-mail: platova@psychiatry.ru

ORCID ID: 0000-0002-9682-4623

SPIN code: 6656-2194

Researcher of pharmacokinetics laboratory, FSBSI «Mental Health Research Center», Moscow, Russia

Литература / References

1. Buclin T, Thoma Y, Widmer N, Pascal A, Monia G, Chantal C, Laurent A, Decosterd. The Steps to Therapeutic Drug Monitoring: A Structured Approach Illustrated with Imatinib. *Front Pharmacol.* 2020; 11:177. DOI: 10.3389/fphar.2020.00177.
2. Hiemke C, Bergemann N, Clement HW, et al. Consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in neuropsychopharmacology: Update 2017. *Pharmacopsychiatry.* 2018;51(1-02):9–62. DOI: 10.1055/s-0043-116492.
3. Jönsson AK, Spigset O, Reis MA. Compilation of serum concentrations of 12 antipsychotic drugs in a therapeutic drug monitoring setting. *Ther Drug Monit.* 2019;41(3):348–356. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000585.
4. Wyska E. Pharmacokinetic considerations for current state-of-the-art antidepressants. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.* 2019;15(10):831–847. DOI: 10.1080/17425255.2019.1669560.
5. Stanke-Labesque F, Gautier-Veyret E, Chhun S, Guilhaumou R. Inflammation is a major regulator of drug metabolizing enzymes and transporters: Consequences for the personalization of drug treatment. *Pharmacol Ther.* 2020 Nov; 215:107627. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107627.
6. Legare N, Gregoire CA, De Benedicts L, Dumais A. Increasing the clozapine: norclozapine ratio with co-administration of fluvoxamine to enhance efficacy and minimize side effects of clozapine therapy. *Med Hypotheses.* 2013;80(6):689–691. DOI: 10.1016/j.mehy.2012.12.024.
7. Sutherland JJ, Morrison RD, Daniels JS, Milne SB, Ryan TP. Managing psychotropic medications in complex, real-world patients using comprehensive therapeutic drug monitoring. *ACS Chem. Neurosci.* 2017; 8: 1641–1644. DOI: 10.1021/acschemneuro.7b00209.
8. Мирошниченко ИИ. Рациональное дозирование и мониторинг лекарственных средств. — М.: Медицинское информационное агентство. 2011. 416 с. [Miroshnichenko II. Racional'noe dozirovanie i monitoring lekarstvennyh sredstv. Moscow: Medicinskoe informacionnoe agentstvo. 2011. (In Russ).].
9. Ooba N, Tsutsumi D, Kobayashi N, Hidaka S, Hayashi H, Obara T, Satoh M, Kubota K, Fukuoka N. Prevalence of therapeutic drug monitoring for lithium and the impact of regulatory warnings: analysis using japanese claims database. *Ther Drug Monit.* 2018;40(2):252–256. DOI: 10.1097/FTD.0000000000000483.
10. Gervasini G., Benítez J, Carrillo JA. Pharmacogenetic testing and therapeutic drug monitoring are complementary tools for optimal individualization of drug therapy. *Eur J Clin Pharmacol.* 2010;66(8):755–774. DOI: 10.1007/s00228-010-0857-7.
11. Müller MJ, Dragicevic A, Fric M, Gaertner I, Grasmäder K, Härtter S, Hermann E, Kuss HJ, Laux G, Oehl W, Rao ML, Rollmann N, Weigmann H, Weber-Labonte M, Hiemke C. Therapeutic drug monitoring of tricyclic antidepressants: how does it work under clinical conditions? *Pharmacopsychiatry.* 2003;36(3):98–104. DOI: 10.1055/s-2003-39983.
12. Brandhorst G, Oellerich M, Maine G, Taylor P, Veen G, Wallemacq P. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? *Clin Chem.* 2012;58(5):821–825. DOI: 10.1373/clinchem.2011.167189.
13. Tuzimski T, Petruczynik A. Review of chromatographic methods coupled with modern detection techniques applied in the therapeutic drugs monitoring (TDM). *Molecules.* 2020;25(17):4026. DOI: 10.3390/molecules25174026.
14. Miroshnichenko II., Baymeeva NV. Simultaneous determination of antipsychotic drugs and their active metabolites by LC-MS-MS and its application to therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr Sci.* 2018;56(6): 510–517. DOI: 10.1093/chromsci/bmy024.
15. Srinivas NR. Should commonly prescribed drugs be avoided as internal standard choices in new assays for clinical samples? *Bioanalysis.* 2016; 8(7):607–610. DOI: 10.4155/bio.16.21
16. Fuchs A, Chantal C, Thoma Y, Buclin T, Widmer N. Benchmarking therapeutic drug monitoring software: a review of available computer tools. *Clin Pharmacokinet.* 2013;52(1):9–22. DOI: 10.1007/s40262-012-0020-y.

Сравнительная оценка эхокардиографических характеристик левого желудочка сердца у самок и самцов крыс

Ионова Е. О., Барчукова Е. И., Вититнова М. Б., Цорин И. Б., Крыжановский С. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. Цель настоящего исследования – сравнительная оценка эхокардиографических показателей самок и самцов нелинейных крыс. В опытах на наркотизированных крысах (кетамин 100 мг/кг, в/б) показано, что у крыс самок размеры и объёмы левого желудочка меньше, чем у самцов, однако по сравнению с самцами у них фракция выброса левого желудочка, характеризующая его инотропную функцию, статистически значимо выше.

Ключевые слова: эхокардиография; крысы; самцы; самки; половые различия

Для цитирования:

Ионова Е.О., Барчукова Е.И., Вититнова М.Б., Цорин И.Б., Крыжановский С.А. Сравнительная оценка эхокардиографических характеристик левого желудочка сердца у самок и самцов крыс. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):14–17. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-14-17>

Поступила: 05 октября 2020 г. **Принята:** 20 октября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г.

Comparative evaluation of echocardiographic characteristics of the heart left ventricle in female and male rats

Ionova EO, Barchukova EI, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The aim of the present study is a comparative assessment of the echocardiographic characteristics in female and male mongrel rats. In experiments on anesthetized rats (ketamine 100 mg / kg, iv), it was shown that in female rats, the size and volume of the left ventricle are smaller than in males, but compared with males, their left ventricular ejection fraction, which characterizes its inotropic function, is statistically significantly higher.

Keywords: echocardiography; rats; males; females; sex differences

For citations:

Ionova EO, Barchukova EI, Vititnova MB, Tsorin IB, Kryzhanovskii SA. Comparative evaluation of echocardiographic characteristics of the heart left ventricle in female and male rats. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):14–17. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-14-17>

Received: October 05, 2020. **Accepted:** October 20, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Хорошо известно, что клинические проявления и тяжесть течения многих заболеваний сердечно-сосудистой системы у женщин и мужчин во многих случаях различна. Например, показано, что при хронической сердечной недостаточности интенсивность гипертрофии и ремоделирования левого желудочка сердца у женщин более выражена, чем у мужчин [1–3]. Алкогольная кардиомиопатия у женщин носит более злокачественный характер, хотя и встречается реже, чем у мужчин [4, 5]. Соответственно, схемы лечения этих патологических состояний у женщин и мужчин могут различаться.

В настоящее время поиск и изучение новых лекарственных средств для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы ведётся в основном на самцах крыс, и, естественно, при этом половые различия в течении моделируемых патологий деятельности сердца не учитываются [6–8]. Такой подход не позволяет учитывать при разработке новых лекарственных средств особенности течения заболеваний сердечно-сосудистой системы у женщин. В связи с изложенным, возникает задача разработки экспериментальных моделей заболеваний на самках. Для того чтобы решить эту задачу следует владеть знаниями об особенностях функциональной активности сердечно-сосудистой системы самок.

Целью настоящего исследования явилась сравнительная оценка эхокардиографических показателей деятельности левого желудочка сердца у самок и самцов нелинейных крыс.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на нелинейных белых крысах самцах ($n = 160$) и самках ($n = 20$) массой 180–200 г, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтиче-

ской комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Эхокардиографические исследования. Наркотизированных животных (кетамин 100 мг/кг, в/б) фиксировали в положении на спине. Измерения производили в условиях закрытой грудной клетки и спонтанного дыхания в одномерном М- и двухмерном В-модальных режимах при положении датчика эхокардиографа в парастернальной позиции по длинной оси сердца. В М-модальном режиме оценивали конечно-систолический и конечно-диастолический размеры левого желудочка сердца (КСР и КДР), затем по методу Teichholz рассчитывали конечно-систолический и конечно-диастолический объёмы левого желудочка (КСО и КДО), ударный объём (УО), такие показатели сократительной функции сердца, как фракция выброса (ФВ) и фракция укорочения (ФУ). Оценку эхокардиографических показателей проводили, как минимум, по пяти последовательным сердечным циклам. Все измерения выполняли в соответствии с Рекомендациями Американского общества и Европейской ассоциации по эхокардиографии [9]. В работе использовали цифровой ультразвуковой эхокардиограф DP-6600 с электронным микроконвексным датчиком 65C15EA (6,5/8,0 МГц).

При проведении экспериментов использовали изотонический 0,9 % раствор натрия хлорида (ООО «Мосфарм», РФ), кетамин (ФГУП «Московский эндокринный завод», РФ).

Статистический анализ результатов. Нормальность распределения проверяли по критериям Колмогорова–Смирнова и Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий по Левену. Так как выборки имели распределение близкое нормальному, то значимость различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента, в случае негомогенности дисперсий применяли приближение этого критерия для выборок с неравными дисперсиями. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Исследование особенностей геометрии и инотропной функции левого желудочка сердца проводили на нелинейных самцах ($n = 160$) и самках ($n = 20$) крыс. Анализ эхокардиографических показателей нелинейных самцов ($n = 160$) и самок ($n = 20$) крыс показал, что у самок размеры и объёмы левого желудочка сердца значительно меньше, чем у самцов (табл. 1). Так, систолические размеры левого желудочка сердца (конечно-систолический размер и конечно-систолический объём) у самцов в среднем составляли $1,72 \pm 0,01$ мм и $14,34 \pm 0,34$ мм³, соответственно, в то время как у самок эти показатели были равны, соответственно, $1,31 \pm 0,03$ мм ($p < 0,0001$) и $6,34 \pm 0,45$ мм³ ($p < 0,0001$). Тоже касается и диастолических размеров левого желудочка сердца — у самок они значимо ($p < 0,0001$) меньше: конечно-диастолический размер, соответственно, $3,00 \pm 0,06$ мм и $3,65 \pm 0,03$ мм, а конечно-диастолический объём, соответственно, $72,14 \pm 4,27$ мм³ и $125,96 \pm 2,87$ мм³. Вместе с тем, если у самцов систолические и диастолические размеры левого желудочка сердца больше, чем у самок, то показатели его инотропной функции, хотя незначительно, но статистически значимо ($p < 0,0001$) меньше. Например, фракция выброса у самок равняется $91,1 \pm 0,4$ %, тогда как у самцов $88,3 \pm 0,2$ %.

Таким образом, в результате проведённого исследования выявлены половые различия в показателях геометрии и инотропной функции левого желудочка сердца: у самок массой 180–200 г размеры левого желудочка сердца значимо меньше, чем у самцов той же массы, а его сократительная функция больше.

Выводы / Conclusions

1. Нелинейные крысы самки массой 180–200 г, по сравнению с самцами той же массы, имеют значительно меньшие размеры и объёмы левого желудочка

Таблица

Показатели геометрии и инотропной функции левого желудочка сердца самцов и самок беспородных наркотизированных (кетамин 100 мг/кг, в/б) крыс, измеренные с помощью эхокардиографии

Table

Parameters of the geometry and inotropic function of the heart left ventricle of male and female mongrel anesthetized (ketamine 100 mg/kg, iv) rats, measured by echocardiography

Пол крыс / Sex rats	n	Показатели / Parameters						
		КСР, мм LVIDs, mm	КСО, мм ³ LVESV, mm ³	КДР, мм LVIDd, mm	КДО, мм ³ LVEDV, mm ³	УО, мм ³ SV, mm ³	ФУ, % SF, %	ФВ, % EF, %
Самцы Male	160	$1,72 \pm 0,01$	$14,34 \pm 0,34$	$3,65 \pm 0,03$	$125,96 \pm 2,87$	$111,62 \pm 2,71$	$52,6 \pm 0,4$	$88,3 \pm 0,2$
Самки Female	20	$1,31 \pm 0,03$ $p < 0,0001$	$6,34 \pm 0,45$ $p < 0,0001$	$3,00 \pm 0,06$ $p < 0,0001$	$72,14 \pm 4,27$ $p < 0,0001$	$65,80 \pm 3,92$ $p < 0,0001$	$56,5 \pm 0,6$ $p < 0,0001$	$91,1 \pm 0,4$ $p < 0,0001$

Примечания: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p — указано по отношению к самцам.

Notes: The arithmetic averages and their standard errors are shown; p is indicated in relation to males.

сердца. При этом у самок инотропная функция левого желудочка значимо выше, чем у самцов.

2. При проведении исследований по поиску и доклиническому изучению новых лекарственных

средств для лечения заболеваний сердечно-сосудистой системы эксперименты целесообразно проводить не только на самцах, но и на самках.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Ионова Екатерина Олеговна

e-mail: mrakusha26@rambler.ru
ORCID ID: 0000-0003-0154-722X
SPIN-код: 5042-1952

м. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Ionova Ekaterina O.

e-mail: mrakusha26@rambler.ru
ORCID ID: 0000-0003-0154-722X
SPIN code: 5042-1952

Junior Research Scientist of Laboratory of Pharmacological Screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Барчуков Владимир Валерьевич

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-4229-3107
SPIN-код: 6743-4280

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Barchukov Vladimir V.

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-4229-3107
SPIN code: 6743-4280

Research scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Вититнова Марина Борисовна

e-mail: MB-Vit@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-7407-7516
SPIN-код: 1901-8919

к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Vititnova Marina B.

e-mail: MB-Vit@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-7407-7516
SPIN code: 1901-8919

PhD Biological Sci., Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Цорин Иосиф Борисович

e-mail: tsorin@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-3988-7724
SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Tsorin Iosif B.

e-mail: tsorin@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0002-3988-7724
SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. Biological, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Крыжановский Сергей Александрович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: SAK-538@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-2832-4739
SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kryzhanovskiy Sergey A.

Corresponding author

e-mail: SAK-538@yandex.ru
ORCID ID: 0000-0003-2832-4739
SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Regitz-Zagrosek V, Seeland U. Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Wien Med Wochenschr.* 2011;161(5-6):109–116. DOI: 10.1007/s10354-011-0892-8.
2. Taylor AL. Heart failure in women. *Curr Heart Fail. Rep.* 2015;12(2):187–195. DOI: 10.1007/s11897-015-0252-x.
3. Merz AA, Cheng S. Sex differences in cardiovascular ageing. *Heart.* 2016;102(11):825–831. DOI:10.1136/heartjnl-2015-308769.
4. Fernandez-Solo J, Estruch R, Nicolas J-M, et al. Comparison of alcoholic cardiomyopathy in women versus men. *Am J Cardiol.* 1997;80(4):481–485. DOI: 10.1016/s0002-9149(97)00399-8.
5. Pfeiffer D, Jurisch D, Neef M, Hagendorff A. Alcohol and arrhythmias. *Herz.* 2016;41(6):498–502. DOI: 10.1007/s00059-016-4463-z.
6. Тюренков И.Н., Перфилова В.Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств // В кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* — М.: Гриф и К; 2013. С.375–384. [Tyurenkov IN, Perfilova VN. Methodical recommendations for the preclinical study of the cardiotonic activity of drugs // In book: *Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Pt 1.* Moscow: Grif & Co; 2013. P. 375–384. (In Russ).]
7. Галенко-Ярошевский П.А., Каверина Н.В., Камкин А.Г., Турилова А.И., Богус С.К., Шейх-Заде Ю.Р. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств // В кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* — М.: Гриф и К; 2013. С. 385–416. [Galenko-Yaroshevskij PA, Kaverina NV, Kamkin AG, Turilova AI, Bogus SK, Shejh-Zade YR. Methodical recommendations for preclinical study of antiarrhythmic drugs // In book: *Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Pt 1.* Moscow: Grif & Co; 2013. P. 385–416. (In Russ).]
8. Чичканов Г.Г., Цорин И.Б. Методические рекомендации по изучению противоишемического (антиангинального) действия лекарственных средств // В кн. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая.* — М.: Гриф и К; 2013. С. 417–433. [Chichkanov GG, Tsorin IB. Methodical recommendations for the study of anti-ischemic (antianginal) action of drugs // In book: *Guidelines for conducting preclinical studies of medicinal products. Pt 1.* Moscow: Grif & Co; 2013. P. 417–433. (In Russ).]
9. Lang RM, Bierig M, Devereux RB et al.; Chamber Quantification Writing Group; American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee; European Association of Echocardiography. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr.* 2005;18(12):1440–1463. DOI: 10.1016/j.echo.2005.10.005.

Кардиопротекторные эффекты соединения АЛМ-802 на моделях субэндокардиальной ишемии

Цорин И. Б., Барчуков В. В., Вититнова М. Б., Лихошерстов А. М.,
Мокров Г. В., Крыжановский С. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. Цель исследования. Изучить в сравнительном аспекте кардиопротективное действие N1-(2,3,4-триметоксибензил)-N2-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этандиамина (соединения АЛМ-802) на моделях субэндокардиальной ишемии у крыс, вызываемой изопротеренолом и добутамином. Материал и методы. Острую субэндокардиальную ишемию миокарда у наркотизированных крыс (уретан 1300 мг/кг, в/в) вызывали путём инфузии изопротеренола (20 мкг/кг/мин, в/в) или добутамина (80 мкг/кг/мин, в/в). Результаты. Показано, что у наркотизированных крыс изопротеренол и добутамин вызывают практически одинаковую депрессию сегмента ST во II стандартном отведении ЭКГ. Соединение АЛМ-802 (2 мг/кг в/в), введённое за 2 мин до начала инфузии изопротеренола или добутамина, в равной степени предотвращало возникновение ишемических изменений на ЭКГ. Заключение. Неселективный β-адреномиметик изопротеренол и селективный β₁-адреномиметик добутамин вызывают у наркотизированных крыс субэндокардиальную ишемию одинаковой интенсивности. Соединение АЛМ-802 обладает выраженным противоишемическим эффектом на обеих моделях.

Ключевые слова: субэндокардиальная ишемия; изопротеренол; добутамин; рFох-ингибиторы; соединение АЛМ-802

Для цитирования:

Цорин И.Б., Барчуков В.В., Вититнова М.Б., Лихошерстов А.М., Мокров Г.В., Крыжановский С.А. Кардиопротекторные эффекты соединения АЛМ-802 на моделях субэндокардиальной ишемии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):18–22. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-18-22>

Поступила: 10 октября 2020 г. **Принята:** 25 октября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г.

Cardioprotective effects of compound ALM-802 on subendocardial ischemia models

Tsorin IB, Barchukov VV, Vititnova MB, Likhosherstov AM, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA

FSBI "Zakusov Institute of Pharmacology", Moscow, Russia

Abstract. The investigation purpose. N1-(2,3,4-trimethoxybenzyl)-N2-{2-[(2,3,4-trimethoxybenzyl)amino]ethyl}-1,2-ethanediamine (ALM-802 compounds) cardioprotective effect has been studied in rat models of subendocardial ischemia caused by isoproterenol and dobutamine. Material and methods. Acute subendocardial myocardial ischemia in anesthetized rats (urethane 1300 mg/kg, i.p.) was caused by infusion of isoproterenol (20 µg/kg/min i.v.) or dobutamine (80 µg/kg/min i.v.). Results. It was shown that in anesthetized rats, isoproterenol and dobutamine caused almost the same ST-segment depression in the II standard ECG lead. The compound ALM-802 (2 mg/kg i.v.), administered 2 minutes before the infusion start of isoproterenol or dobutamine, equally prevented the occurrence of ischemic changes on the ECG. Conclusion. The non-selective beta-adrenomimetic isoproterenol and the selective β₁-adrenomimetic dobutamine cause subendocardial ischemia of the same intensity in anesthetized rats. The compound ALM-802 has a pronounced anti-ischemic effect on both models.

Keywords: subendocardial ischemia; isoproterenol; dobutamine; pFох inhibitors; compound ALM-802

For citations:

Tsorin IB, Barchukov VV, Vititnova MB, Likhosherstov AM, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA. Cardioprotective effects of compound ALM-802 on subendocardial ischemia models. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):18–22. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-18-22>

Received: October 10, 2020. **Accepted:** October 25, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) является одним из наиболее распространённых заболеваний сердечно-сосудистой системы в развитых странах, часто приводящим к летальным исходам. В связи с этим во многих исследовательских центрах ведётся постоянный поиск лекарственных средств для лечения такого рода больных. Одним из современных подходов к решению этой проблемы является использование рFох-ингибиторов («парциальные ингибиторы окисления жирных кислот») [1]. рFох-ингибиторы подавляют окисление свободных жирных кислот и переводят энергетический метаболизм в миокарде на углеводные «рельсы» [2, 3], в результате чего они уменьшают в миокарде концентрацию недоокисленных метаболитов жирных кислот, резко возрастающую в условиях ишемии. Именно эти метаболиты оказывают на сердечную мышцу повреждающее дей-

ствие и таким образом обуславливают формирование ишемической / постишемической дисфункции и повышают риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма [4–6]. Наиболее распространёнными кардиопротективными лекарственными средствами с таким механизмом действия являются триметазидин и ранолазин [1, 2, 7, 8].

Ранее в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при проведении скрининга в ряду α,ω-диарилметильных производных бис-(ω-аминоалкил)аминов было выявлено соединение (N¹-(2,3,4-триметокси)-N²-{2-[(2,3,4-триметоксибензил)амино]этил}-1,2-этан-диамина), получившее шифр АЛМ-802, обладающее значительной антиаритмической и противоишемической активностью и которое по механизму действия предположительно относится к рFох-ингибиторам [9]. Представляло несомненный интерес изучить в сравнительном аспекте противоишемическое действие соединения АЛМ-802 на мо-

делях субэндокардиальной ишемии у крыс. Одним из способов моделирования данного патологического состояния является воздействие на сердце неселективного агониста β -адренорецепторов изопротеренола [10]. Однако инициируемая этим препаратом ишемия, вызванная резким увеличением потребности наиболее чувствительного к ишемии субэндокардиального слоя миокарда в O_2 (вследствие стимуляции встроенных в клеточную мембрану кардиомиоцитов β_1 -адренорецепторов, приводящей к резкому энергозависимому увеличению частоты и силы сердечных сокращений), протекает на фоне снижения тонуса сосудистого русла (являющегося результатом стимуляции β_2 -адренорецепторов, расположенных на клеточных мембранах гладкомышечных клеток сосудов), т. е. на фоне снижения постнагрузки на миокард и дилатации коронарных сосудов. В то же время селективный β_1 -адреномиметик добутамин не уменьшает постнагрузку на миокард и не расширяет коронарные сосуды, в связи с этим инициируемая им ишемия должна носить более «жесткий» характер. Исходя из изложенного, мы сочли целесообразным оценить в сравнительном аспекте антиишемические эффекты соединения АЛМ-802 на моделях субэндокардиальной ишемии у крыс, вызванной изопротеренолом и добутамином.

Цель исследования. Изучить в сравнительном аспекте кардиопротективное действие соединения АЛМ-802 на моделях субэндокардиальной ишемии у крыс, вызываемой неселективным β -адреномиметиком изопротеренолом и селективным β_1 -адреномиметиком добутамином.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Эксперименты выполнены на беспородных белых крысах-самцах массой 250–300 г, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животные были рандомизированы на 4 группы: 1 — контроль с изопротеренолом ($n = 14$); 2 — контроль с добутамином ($n = 9$); 3 — изопротеренол + АЛМ-802 ($n = 6$); 4 — добутамин + АЛМ-802 ($n = 9$).

Модель субэндокардиальной ишемии. Эксперименты проводили на животных, наркотизированных уретаном (1300 мг/кг в/б). Острую субэндокардиальную ишемию миокарда вызывали по методу, описанному Yamamoto S с соавторами [10]. Для этой цели животным с помощью инъектора «Линеомат» (Россия) внутривенно со скоростью 20 мкг/кг/мин вводили неселективный агонист β -адренорецепторов изопротеренол. Аналогичным образом субэндокардиальную ишемию вызывали селективным β_1 -адреномиметиком добутамином, вводя препарат внутривенно со скоростью 80 мкг/кг/мин. Об интенсивности ишемического повреждения судили по величине депрессии сегмента ST на ЭКГ (II стандартное отведение) через 5 мин от момента начала инфузии изопротеренола или добутамина. ЭКГ регистрировали с помощью компьютерного электрокардиографа «Полиспектр 8/EX» (Нейрософт, Россия).

Соединение АЛМ-802 (в/в, 2 мг/кг в 0,2–0,3 мл изотонического раствора натрия хлорида), а в контрольных сериях — изотонический раствор натрия хлорида, вводили за 2 мин до начала инфузии изопротеренола (в/в, 20 мкг/кг/мин) или добутамина (в/в, 80 мкг/кг/мин). При проведении экспериментов использовали изотонический раствор натрия хлорида (Красфарм, Россия), изопротеренол («Sigma» Германия), добутамин («Sigma», Германия), АЛМ-802 (ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова»), уретан («Acros Organics», Индия).

Статистическая обработка. Нормальность распределения проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — с помощью критерия Левена. Так как результаты экспериментов имели нормальное распределение и выборочные дисперсии были гомогенны, то для определения значимости различий использовали однофакторный дисперсионный анализ с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену–Кейлсу. Полученные результаты выражали в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Анализ результатов экспериментов показал, что оба β -адреномиметика через 5 минут после начала инфузии вызывали близкую по величине депрессию сегмента ST во втором стандартном отведении ЭКГ (таблица). Так, если неселективный β -адреномиметик изопротеренол (20 мкг/кг/мин, $n = 14$) вызывал депрессию сегмента ST на $0,145 \pm 0,012$ мВ, то β_1 -адреномиметик добутамин (80 мкг/кг/мин, $n = 9$) снижал сегмент ST на $0,111 \pm 0,016$ мВ ($p = 0,138$).

Таким образом, неселективный и кардиоселективный β_1 -адреномиметики вызывают субэндокардиальную ишемию, близкую по интенсивности. Исходя из этих результатов можно полагать, что вазодилатация, вызываемая неселективным β -адреномиметиком изо-

Таблица

Влияние соединения АЛМ-802 (2 мг/кг, в/в) на депрессию сегмента ST на ЭКГ, вызванную изопроterenолом (20 мкг/кг/мин в течение 5 мин, в/в) и добутином (80 мкг/кг/мин в течение 5 мин, в/в), у наркотизированных (уретан, 1300 мг/кг, в/б) крыс

Table

Effect of the compound ALM-802 (2 mg/kg, iv) on ECG ST segment depression caused by isoproterenol (20 µg/kg/min for 5 min, iv) and dobutamine (80 µg/kg/min for 5 min, iv) in anesthetized (urethane, 1300 mg/kg, ip) rats

Вещество	Изопроterenол		Добутамин	
	n	Депрессия сегмента ST во II стандартном отведении ЭКГ, мВ/ST segment depression in the ECG II standard lead, mV	n	Депрессия сегмента ST во II стандартном отведении ЭКГ, мВ/ST segment depression in the ECG II standard lead, mV
Контроль	14	0,145±0,012	9	0,111±0,016 $p = 0,138$
Соединение АЛМ-802	6	0,023±0,019 $p_1 = 0,0002$	9	0,028±0,016 $p = 0,84$ $p_1 = 0,0008$

Примечание: Показаны средние арифметические и их стандартные ошибки; p – вероятность ошибки I рода при сравнении с соответствующей группой с инфузией изопроterenолом; p_1 – вероятность ошибки I рода при сравнении с контролем.
Notes: The arithmetic averages and their standard errors are shown; p is the probability of the I type error when compared with the corresponding group with isoproterenol infusion; p_1 is the probability of the I type error when compared with the control.

протеренолом, не оказывает значимого компенсаторного влияния на интенсивность его проишемического действия.

Соединение АЛМ-802 (2 мг/кг в/в, $n = 6$), введенное за 2 мин до начала инфузии изопроterenолом, практически полностью предупреждало возникновение депрессии сегмента ST во втором стандартном

отведении ЭКГ (см. таблицу). Так, если в контроле депрессия ST была в среднем равна 0,145±0,012 мВ, после введения изучаемого соединения этот показатель составлял 0,023±0,019 мВ ($p = 0,0002$). Также действуют на данной модели известные рFox-ингибиторы три-метазидин и ранолазин, которые, согласно данным литературы, обладают выраженным противоишемическим действием [7, 8, 11, 12]. В многочисленных экспериментальных и клинических исследованиях показано, что триметазидин защищает миокард от ишемического повреждения, уменьшает перегрузку кардиомиоцитов кальцием, увеличивает интенсивность дыхания и биосинтеза в митохондриях, их деление, ингибирует апоптоз [1, 2]. В клинике это лекарственное средство уменьшает выраженность симптомов стенокардии напряжения [7]. Сходными эффектами обладает и ранолазин [8].

Соединение АЛМ-802 (2 мг/кг в/в, $n = 9$), введенное за 2 мин до начала инфузии добутином, так же как и в случае инфузии изопроterenолом, практически предупреждало возникновение депрессии сегмента ST во втором стандартном отведении ЭКГ (см. таблицу). Так, если в контроле этот показатель был в среднем равен 0,111±0,016 мВ, то после введения изучаемого соединения – 0,028±0,016 мВ ($p = 0,0008$).

Таким образом, соединение АЛМ-802 на обеих моделях субэндокардиальной ишемии предотвращало развитие депрессии сегмента ST на ЭКГ во втором стандартном отведении.

Выводы / Conclusions

1. Неселективный β-адреномиметик изопроterenол и β₁-адреномиметик добутамин вызывают субэндокардиальную ишемию одинаковой интенсивности, что позволяет предположить, что вазодилатация, вызываемая неселективным β-адреномиметиком изопроterenолом, не оказывает значимого компенсаторного влияния на интенсивность его проишемического действия.

2. Соединение АЛМ-802 обладает выраженным противоишемическим эффектом на обеих моделях субэндокардиальной ишемии.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Цорин Иосиф Борисович

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории

фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Tsorin Iosif B.

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. Biological, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Барчуков Владимир Валерьевич

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-4229-3107

SPIN-код: 6743-4280

н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Barchukov Vladimir V

e-mail: barchukov.pharm@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-4229-3107

SPIN code: 6743-4280

Research scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Вититнова Марина Борисовна

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN-код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Vititnova Marina B.

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN code: 1901-8919

PhD Biological Sci., Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Лихошерстов Аркадий Михайлович

ORCID ID: 0000-0001-5935-5146

SPIN-код: 1980-7331

к. х. н., консультант отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Likhosherstov Arkady M.

ORCID ID: 0000-0001-5935-5146

SPIN code: 1980-7331

PhD Chemical Sci., Consultant of drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Мокров Григорий Владимирович

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2617-0334

SPIN-код: 8755-7666

к. х. н., в. н. с. лаборатории тонкого органического синтеза отдела химии лекарственных средств ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Mokrov Grigory V.

e-mail: g.mokrov@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2617-0334

SPIN code: 8755-7666

PhD Chemical Sci., Leading researcher of the fine organic synthesis laboratory at the drug chemistry department FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Крыжановский Сергей Александрович*Автор, ответственный за переписку*

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kryzhanovskiy Sergey A.*Corresponding autor*

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Rupp H, Zarain-Herzberg A, Maisch B. The use of partial fatty acid oxidation inhibitors for metabolic therapy of angina pectoris and heart failure. *Herz*. 2002;27(7):621–636. DOI: 10.1007/s00059-002-2428-x.
2. Jaswal JS, Keung W, Wang W, Ussher JR, Lopaschuk GD. Targeting fatty acid and carbohydrate oxidation – a novel therapeutic intervention in the ischemic and failing heart. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1813(7):1333–1350. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2011.01.015.
3. Fukushima A, Milner K, Gupta A, Lopaschuk GD. Myocardial energy substrate metabolism in heart failure: From pathways to therapeutic targets. *Curr Pharm Des*. 2015;21(25):3654–3664. DOI: 10.2174/1381612821666150710150445.
4. van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, van der Vusse GJ. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res*. 2004;61(2):218–226. DOI: 10.1016/j.cardiores.2003.11.014.
5. Mamamtavrishvili N, Sanikidze T, Pavliashvili N, Kvirkvelia A, Narsia E. Some aspects of metabolic remodeling of myocard during chronic heart failure. *Georgian Med. News*. 2008;(154):33–36.
6. Tuunanen H, Knuuti J. Metabolic remodelling in human heart failure. *Cardiovasc Res*. 2011;90(2):251–257. DOI: 10.1093/cvr/cvr052.
7. Lam A, Lopaschuk GD. Anti-anginal effects of partial fatty acid oxidation inhibitors. *Curr Opin Pharmacol*. 2007;7(2):179–185. DOI: 10.1016/j.coph.2006.10.008.
8. Bhandari B, Subramanian L. Ranolazine, a partial fatty acid oxidation inhibitor, its potential benefit in angina and other cardiovascular disorder. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov*. 2007;2(1):35–39. DOI: 10.2174/157489007779606095.
9. Крыжановский С.А., Лихошерстов А.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А. Скрининг кардиотропной активности в ряду α , ω -диарилметильных производных бис-(ω -аминоалкил)аминов. *Фармакокинетика и Фармакодинамика*. 2016;(2):10–13. [Kryzhanovskii SA, Likhosherstov AM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Mokrov GV, Gudasheva TA. Screening of the compounds having cardiotropic activity among the α , ω -diarylmetil derivatives of bis-(ω -aminoalkyl) amines. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2016;(2):10–13. (In Russ).].
10. Yamamoto S, Matsui K, Sasabe M, Ohashi NJ. Effect of an orally active Na^+/H^+ exchange inhibitor, SMP-300, on experimental angina and myocardial infarction models in rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2002;39(2):234–241. DOI: 10.1097/00005344-200202000-00010.
11. Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Гудашева Т.А., Крыжановский С.А. Противоишемическая активность триамина АЛМ-802 в условиях эндотелиальной дисфункции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2019;167(4):443–446. [Barchukov VV, Tsorin IB, Likhosherstov AM, Vititnova MB, Mokrov GV, Gudasheva TA, Kryzhanovskii SA. Anti-ischemic activity of triamine ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2019;167(4):443–446.
12. Барчуков В.В., Цорин И.Б., Лихошерстов А.М., Вититнова М.Б., Мокров Г.В., Крыжановский С.А. Сравнительное изучение антиишемической активности триметазидина и соединения АЛМ-802 в условиях эндотелиальной дисфункции. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2019;(2):23–27. [Barchukov VV, Tsorin IB, Likhosherstov AM, Vititnova MB, Mokrov GV, Kryzhanovskii SA. A comparative study of the anti-ischemic activity of trimetazidine and the compound ALM-802 under conditions of endothelial dysfunction. *Farmakokinetika i Farmakodinamika*. 2019;(2):23–27. (In Russ).]. DOI: 10.24411/2587-7836-2019-10042.

Оценка противоопухолевой активности 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) у мышей C57BL/6 с трансплантированной интракраниально меланомой B16

Муразов Я. Г., Стуков А. Н., Змитриченко Ю. Г., Нюганен А. О., Точильников Г. В.,
Латипова Д. Х., Филатова Л. В., Семиглазова Т. Ю.

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. *Актуальность.* Арсенал средств противоопухолевой терапии метастазов меланомы в головной мозг ограничен. Актуальным остаётся поиск и изучение новых средств, способных проникать через гематоэнцефалический барьер и оказывать терапевтический эффект в отношении интракраниальных опухолевых очагов. *Цель.* Оценить противоопухолевую активность отечественного производного нитрозоалкилмочевин хлонизола у мышей с трансплантированной интракраниально сингенной меланомой B16. *Методы.* Эксперимент был проведён на 18 инбредных мышках самках линии C57BL/6. После интракраниальной трансплантации опухоли, выполненной по модифицированной методике, животные были рандомизированы в две группы: I. Контроль ($n = 10$) – животным однократно внутрибрюшинно вводили 0,9 % раствор натрия хлорида в объёме 10 мл/кг; II. Хлонизол ($n = 8$) – животным однократно внутрибрюшинно вводили тестируемое соединение в дозе 15 мг/кг в 0,9 % раствора натрия хлорида. Введение 0,9 % раствора натрия хлорида и хлонизола выполняли через 24 часа после трансплантации опухоли. Конечной точкой исследования была оценка общей выживаемости (ОВ) животных. *Результаты.* По сравнению с контрольной группой введение хлонизола значительно увеличило медиану ОВ мышей с 13 до 18 дней (логранговый тест, $p = 0,0005$). В группе хлонизола установлено достоверное снижение риска смерти животных на 71 % по сравнению с контрольной группой ($HR = 0,29$; 95% CI 0,10–0,82). К 15-му дню после интракраниальной трансплантации меланомы B16 все 10 мышей контрольной группы погибли от внутримозговой опухоли (100 %), а в группе хлонизола погибли 2 из 8 (25 %) мышей (точный критерий Фишера, $p = 0,0015$). *Заключение.* Несмотря на разведочный характер представленного исследования, его результаты могут служить обоснованием для дальнейшего изучения хлонизола при опухолевых поражениях головного мозга.

Ключевые слова: меланома; интракраниальная опухоль; метастазы в головной мозг; хлонизол; доклинические исследования

Для цитирования:

Муразов Я.Г., Стуков А.Н., Змитриченко Ю.Г., Нюганен А.О., Точильников Г.В., Латипова Д.Х., Филатова Л.В., Семиглазова Т.Ю. Оценка противоопухолевой активности 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиола (хлонизола) у мышей C57BL/6 с трансплантированной интракраниально меланомой B16. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):23–29. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-23-29>

Поступила: 14 октября 2020 г. **Принята:** 28 октября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г.

Evaluation of the antitumor activity of 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol) in C57BL/6 mice with intracranially transplanted B16 melanoma

Murazov YaG, Stukov AN, Zmitrichenko YuG, Niuganen AO, Tochilnikov GV, Latipova DH, Filatova LV, Semiglazova TYu
NMRC of Oncology named after N.N. Petrov of MoH of Russia, Saint-Petersburg, Russia

Abstract. *Background.* The arsenal of antitumor drug therapy for melanoma brain metastases is limited. The search and study of new agents capable to penetrate the blood-brain barrier and provide a therapeutic effect against intracranial tumors remains an unmet clinical need. *The aim* is to evaluate the antitumor activity of the domestic derivative of nitrosoalkylureas, chlonisol, in mice with intracranially transplanted syngeneic B16 melanoma. *Methods.* The experiment was carried out in 18 female inbred C57BL/6 mice. After intracranial tumor transplantation, performed according to modified technique, the animals were randomized into two groups: I. Control ($n = 10$) – the animals were injected with normal saline 10 ml/kg intraperitoneally; II. Chlonisol ($n = 8$) – the animals were treated with the test compound at a dose of 15 mg/kg in normal saline intraperitoneally. The single administration of normal saline and chlonisol was performed 24 hours after tumor transplantation. The end point of the study was overall survival (OS) of the animals. *Results.* Compared with the control group, administration of chlonisol significantly increased the median OS of mice from 13 to 18 days (log rank test, $p = 0.0005$). Chlonisol significantly decreased the risk of death by 71 % compared with the control group ($HR = 0.29$; 95 %CI 0.10–0.82). By the 15th day after intracranial transplantation of B16 melanoma, all 10 mice in the control group died from intracerebral tumors (100 %), whereas in the chlonisol group only 2 out of 8 (25 %) mice died (Fisher's exact test, $p = 0.0015$). *Conclusion.* Despite the exploratory nature of the present study, it provides a good starting point for further research of chlonisol in brain tumors.

Keywords: melanoma; intracranial tumor; brain metastases; chlonisol; preclinical studies

For citations:

Murazov YaG, Stukov AN, Zmitrichenko YuG, Niuganen AO, Tochilnikov GV, Latipova DH, Filatova LV, Semiglazova TYu. Evaluation of the antitumor activity of 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol) in C57BL/6 mice with intracranially transplanted B16 melanoma. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):23–29. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-23-29>

Received: October 14, 2020. **Accepted:** October 28, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Количество опухолей, метастазирующих в головной мозг (ГМ), значительно превышает количество первичных опухолей ГМ. Наиболее часто метастазы в центральной нервной системе (ЦНС) наблюдаются при опухолях лёгкого, молочной железы и меланоме. Меланома имеет наибольший риск метастазирования в ЦНС среди этих наиболее частых опухолей у человека. У 40–60 % пациентов с метастатической меланомой появятся метастазы в ЦНС, а по данным аутопсии до 80 % пациентов имеют поражение ЦНС. Метастазирование меланомы в ЦНС (ГМ) является основной причиной гибели пациентов от этого заболевания. Медиана общей выживаемости (ОВ) этой категории больных составляет 4–6 месяцев [1]. К сожалению, даже сегодня терапия метастазов меланомы в ГМ носит паллиативный характер и включает лучевую терапию, хирургические методы или их комбинацию. При этом медиана ОВ не превышает одного года [2, 3]. Определённые успехи были достигнуты в таргетной терапии метастазов в ЦНС меланомы с мутациями BRAF^{V600} [4]. В последние годы результаты клинических исследований ингибиторов иммунных контрольных точек (иИКТ: анти-PD-1, анти-PD-L1, анти-CTLA-4 моноклональные антитела) продемонстрировали обнадеживающие результаты при метастазах меланомы в ГМ. При этом следует учитывать, что в исследованиях иИКТ ожидаемо лучший эффект наблюдался при наличии бессимптомных метастазов в ГМ, а пациенты с симптомными метастазами в ГМ чаще всего исключались из исследований, или эффективность иИКТ у них была низкой [2]. К сожалению, из-за «финансовой токсичности» доступ к терапии иИКТ ограничен. Следует отметить, что исключение пациентов с метастазами в ЦНС/ГМ из клинических исследований характерно не только для иИКТ, но и для других лекарственных средств, что, несомненно, осложняет принятие решения о назначении терапии у этой категории больных. Поиск эффективных и доступных средств лекарственной терапии метастазов меланомы в ГМ остаётся актуальной задачей современной онкофармакологии.

Химиотерапия при метастазах в ГМ применяется нечасто из-за её низкой способности проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [5]. В историческом плане это было основной причиной исключения пациентов с метастазами в ЦНС из клинических исследований средств химиотерапии. Тем не менее, алкилирующий агент темозоломид долго применялся для лечения метастазов меланомы в ГМ, несмотря на уровень интракраниального клинического ответа 3–7 % [6]. В рамках клинического исследования I/II фазы была предпринята попытка комбинации темозоломида с представителем класса нитрозоалкилмочевин (НАМ) ломустинном. Данная комбинация оказалась неэффективной у пациентов с метастазами меланомы в ГМ [7].

В результате многолетних исследований, проводившихся в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, был получен перспективный противоопухолевый агент из класса НАМ хлонизол [8]. Хлонизол относится к группе алкилнитрозоуреидопропандиолов и на доклиническом этапе показал более выраженную противоопухолевую активность в сравнении с другим представителем класса НАМ ломустинном. Соотношение площадей под кривыми «концентрация–время» в ГМ и крови интактных животных ($AUC_{ГМ}/AUC_{кровь}$) для хлонизола составило 9,5. Это указывает на высокую способность хлонизола проникать через гематоэнцефалический барьер [9].

В эксперименте для моделирования метастатического поражения ГМ при меланоме часто используется сингенный штамм меланомы B16. Трансплантация штамма осуществляется мышам C57BL/6 в сонную артерию или сердце [10, 11], непосредственно в полшарие ГМ [12] или в стриатум с использованием стереотаксического оборудования [3]. В нашем исследовании трансплантацию опухоли выполняли по методике, являющейся модификацией метода внутримозгового заражения мышей вирусом бешенства [13].

Цель эксперимента — оценить противоопухолевую активность хлонизола у мышей C57BL/6 при интракраниальной трансплантации меланомы B16.

Материалы и методы / Materials and methods

Характеристика тестируемого объекта. Хлонизол (2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол) относится к классу НАМ (рис. 1). Молекулярные механизмы действия НАМ связаны с алкилированием и карбомоилированием макромолекул продуктами биodeградации соединений. По уровню цитогенетической активности хлонизол превосходит все другие исследованные ранее препараты класса НАМ [8, 14].

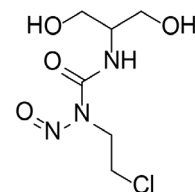


Рис. 1. 2-[3-(2-хлорэтил)-3-нитрозоуреидо]-1,3-пропандиол (хлонизол)

Figure 1. 2-[3-(2-chloroethyl)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol)

Животные, их содержание и использование. Эксперимент был проведён на 18 инбредных мышях самках линии C57BL/6, полученных из ФГУП «Питомник лабораторных животных «Рапполово» (Ленинградская область, Россия). Уход и все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, исполь-

зуемых для экспериментов или в иных научных целях (ETS N 123), Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС о защите животных, использующихся для научных целей. Протокол был одобрен локальным этическим комитетом. Животные содержались в конвенциональном виварии в стандартных условиях: температура воздуха 20–24 °С, относительная влажность 50–60 %, 12-часовой цикл светлого/тёмного времени суток. Мыши получали полнорационный брикетированный комбикорм производства компании «Лабораторкорм» (Москва, Россия) и водопроводную питьевую воду *ad libitum*.

Дизайн эксперимента. После трансплантации опухоли животные были рандомизированы в две группы: I. Контроль ($n = 10$) – мышам внутрибрюшинно однократно вводили 0,9 % раствор натрия хлорида в объёме 10 мл/кг; II. Хлонизол ($n = 8$) – животным однократно внутрибрюшинно вводилось тестируемое соединение в дозе 15 мг/кг в 0,9 % раствора натрия хлорида. Введение 0,9 % раствора натрия хлорида и хлонизола выполняли через 24 часа после трансплантации опухоли.

Интракраниальная трансплантация меланомы B16. Мышам под изофлурановым наркозом (индукция – 3 %, поддержание 1,5 %) в условиях операционной вивария в надглазничную область вблизи срединной линии головы вводили укороченную до 3 мм и вновь заточенную инъекционную иглу (23 G), через которую инокулировали 10 % взвесь опухолевых клеток в стерильном 0,9 % растворе натрия хлорида в объёме 0,025 мл на одно животное.

Оцениваемые параметры. Конечной точкой исследования была общая выживаемость (ОВ) животных. ОВ определялась как время со дня трансплантации опухоли до дня гибели животного или эвтаназии в терминальном состоянии. В течение эксперимента определяли динамику массы тела мышей в двух группах. Павших и забитых в терминальном состоянии животных подвергали полной аутопсии. Череп с ГМ фиксировали в 10 % нейтральном формалине в соотношении 1:20. После фиксации материал подвергался вырезке в сагиттальной и фронтальной плоскостях на фрагменты толщиной не более 3 мм. Далее фрагменты подвергались декальцинации в декальцинирующем растворе СофтиДЕК (Биовитрум, Россия) в соотношении 1:20 при температуре 22 °С в автоматическом ультразвуковом декальцификаторе USE 33 Medite (Германия) в течение 24 часов. После декальцинации материал отправляли в стандартную проводку в процессоре Logos Microwave Hybrid Tissue Processor (Milestone, Италия). Проведённый материал заливали в парафиновые блоки и далее изготавливали срезы на микротоме Microm HM 340E (Thermo scientific, США). Полученные парафиновые срезы толщиной 3–4 мкм окрашивали гематоксином Майера и водным раствором эозина по стандартной методике в автоматическом гистостейнере Leica CV 5030 (Leica

Microsystems, Германия). Готовые микропрепараты, окрашенные гематоксилином и эозином, отсканированы с помощью сканера гистологических препаратов Pannoramic 250 (3D Histech, Венгрия). Микрофотографии гистологических срезов выполнены с помощью программного обеспечения Case Viewer (3D Histech, Венгрия).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов эксперимента проводили с помощью пакета GraphPad Prism версии 8.0. Критерий Манна–Уитни использовали для сравнения количественных данных. Для сравнения категориальных переменных применяли точный критерий Фишера. Данные по ОВ животных графически представлены в виде кривых Каплана–Мейера. Для сравнения кривых ОВ применяли логранговый критерий. Все критерии были двусторонними. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Отношение рисков (Hazard Ratio, HR) и границы его 95 % доверительного интервала (95 % CI) рассчитывали с помощью регрессионной модели Кокса.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Степень энграфтмента опухоли составила 100 %. Рост трансплантированной интракраниально меланомы B16 сопровождался ухудшением общего состояния мышей (вялость, снижение потребления корма), снижением массы тела, клонико-тоническими судорогами. Все эти проявления роста внутримозговой опухоли были менее выражены у мышей в группе хлонизола и происходили в более поздние сроки, чем в контрольной группе. Динамика массы тела в двух группах представлена на рис. 2.

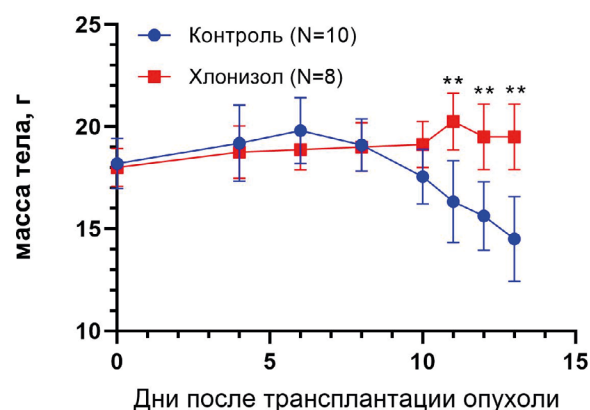


Рис. 2. Динамика массы тела животных
Figure 2. Course of mean body weight of animals

Примечания: Каждая точка представлена в виде среднего и стандартного отклонения минимум 4 измерений. ** – критерий Манна–Уитни, разница между группами статистически значима, $p \leq 0,01$.

Notes: Each data point represents mean (SD) of minimum 4 measurements. ** – significant Mann-Whitney test, $p \leq 0.01$

Опухолеспецифическая летальность животных составила 100 %. На аутопсии животных макроскопически определялась деформация черепа и асимметрия полушарий ГМ. При микроскопическом исследовании срезов черепа с ГМ мышей наблюдали солидные поля эпителиоидных резко атипичных клеток с выраженным полиморфизмом и высоким ядерно-цитоплазматическим соотношением. Опухолевые клетки имеют эозинофильную цитоплазму и округлые или овальные ядра с крупными эозинофильными ядрышками. Перитуморальная лимфоидная инфильтрация во всех случаях была крайне скудной или вовсе отсутствовала. Продукция меланоцитарного пигмента была умеренно выраженная. Отмечалась инвазия опухоли в окружающие ткани с обширной деструкцией костей черепа (рис. 3).

Кривые общей выживаемости животных представлены на рис. 4. Медиана ОВ в контрольной группе составила 13 дней, а в группе хлонинола — 18 дней. Хлонинол статистически значимо увеличивал продолжительность жизни мышей с трансплантированной интракраниально меланомой B16 (логранговый тест, $p = 0,0005$). Введение хлонинола значимо снижало риск смерти животных на 71 % по сравнению с контрольной группой (HR = 0,29; 95 % CI 0,10–0,82).

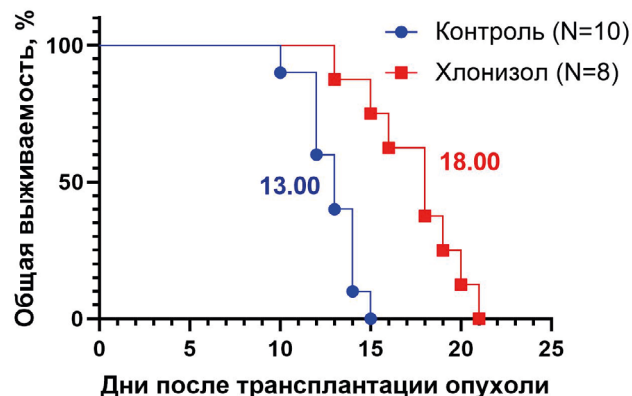


Рис. 4. Кривые Каплана–Мейера ОВ мышей в двух группах

Figure 4. Kaplan–Meier survival curves for two groups of mice

Примечания: Представлена медиана ОВ. Различия в ОВ статистически значимы; логранговый тест, $p = 0,0005$.

Notes: Median OS is presented. The difference in OS is statistically significant, log-rank test, $p = 0,0005$.

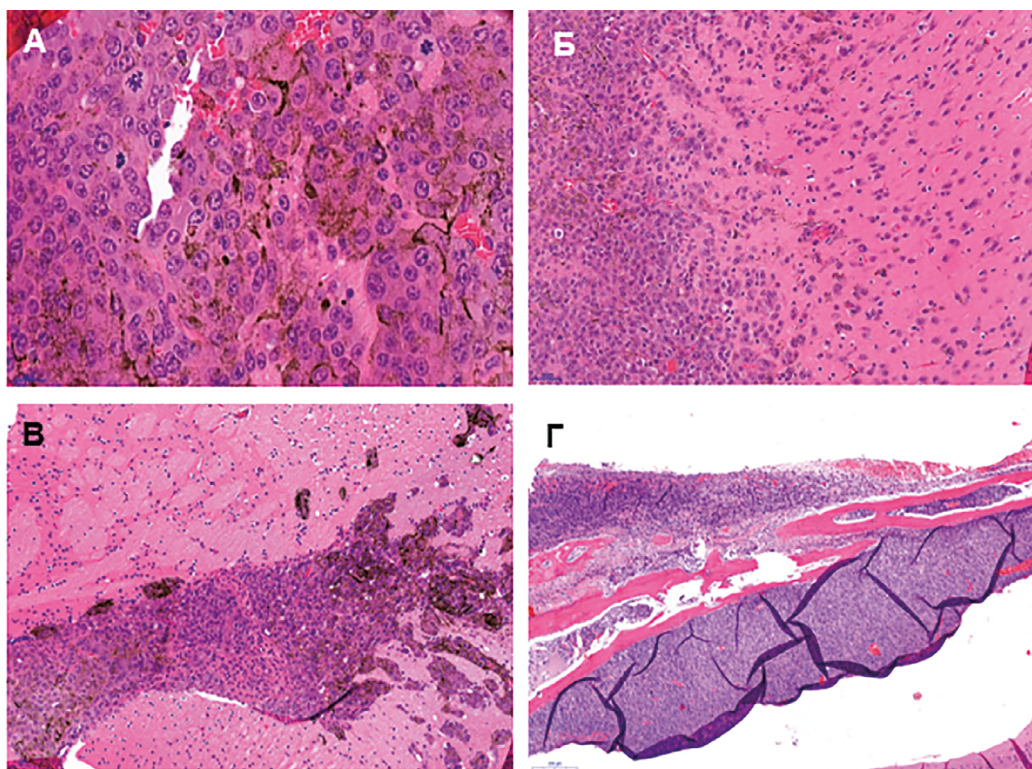


Рис. 3. Микрофотографии опухолей после интракраниальной трансплантации меланомы B16 мышам C57BL/6

Figure 3. Microscopic tumor view after intracranial transplantation of B16 melanoma in C57BL/6 mice

Примечания: А — очаг меланомы B16 с пигментом, гематоксилин/эозин, ×660; Б — ткань головного мозга с опухолевой инвазией, гематоксилин/эозин, ×210; В — инвазивный рост меланомы в ткани ГМ, гематоксилин/эозин, ×170; Г — деструкция костей черепа в результате роста опухоли, гематоксилин/эозин, ×80.

Notes: A — lesion of B16 melanoma with pigment, haematoxylin and eosin, ×660; Б — brain tissue with tumor invasion, haematoxylin and eosin, ×210; В — invasive growth of melanoma in brain tissue, haematoxylin and eosin, ×170; Г — destruction of the skull bones as a result of tumor growth, haematoxylin and eosin, ×80.

К 15-му дню после интракраниальной трансплантации меланомы B16 все 10 мышей контрольной группы погибли от внутримозговой опухоли (100 %), а в группе хлонизола погибли 2 из 8 (25 %) мышей (точный критерий Фишера, $p = 0,0015$).

Заключение / Conclusion

Впервые на собственной модификации метода интракраниальной трансплантации меланомы B16 установлена противоопухолевая активность отечественного соединения класса НАМ хлонизола при однократном внутривенном введении в дозе 15 мг/кг. Несмотря на разведочный характер проведенного исследования и небольшое количество животных, полученные результаты могут служить обоснованием для дальнейшего направленного изучения хлонизола при опухолевых поражениях ЦНС.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Участие авторов. Муразов Я.Г. — сбор и систематизация материала, написание текста статьи; Стуков А.Н. — концепция, сбор и систематизация материала, критические замечания; Змитриченко Ю.Г. — сбор и систематизация материала; Нюганен А.О. — гистологическая обработка материала, редактирование текста статьи; Точильников Г.В., Латипова Д.Х., Филатова Л.В. — редактирование текста статьи; Семиглазова Т.Ю. — критические замечания.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Муразов Ярослав Геннадьевич

Автор, ответственный за переписку

e-mail: yaroslav84@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-6573-3112

SPIN-код: 2770-5375

к. б. н., н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Murazov Iaroslav G.

Corresponding author

e-mail: yaroslav84@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-6573-3112

SPIN code: 2770-5375

PhD in Biological Sci., Research Scientist, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Стуков Александр Николаевич

e-mail: stukov2008@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-1741-6630

SPIN-код: 4652-8674

д. м. н., с. н. с. научного отдела инновационных методов терапевтической онкологии и реабилитации ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Stukov Alexander N.

e-mail: stukov2008@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-1741-6630

SPIN code: 4652-8674

Dr. Sci. (Med.), Senior Research Scientist, Department of Innovative methods of Therapeutic Oncology and Rehabilitation, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Змитриченко Юлия Геннадьевна

e-mail: zmitrichenko@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-9137-9532

м. н. с. научной лаборатории химиопрофилактики рака и онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Zmitrichenko Yuliya G.

e-mail: zmitrichenko@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-9137-9532

Junior Research Scientist, Scientific Laboratory of Cancer Chemoprevention and Oncopharmacology, FSBI «N.N. Petrov National Medical Research Center of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Нюганен Анна Олеговна

e-mail: annanyuganen@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2685-5093

SPIN-код: 2357-6059

врач-патологоанатом патологоанатомического
отделения ФГБУ «НМИЦ онкологии им.
Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-
Петербург, Россия

Nyuganen Anna O.

e-mail: annanyuganen@gmail.com

ORCID ID: 0000-0003-2685-5093

SPIN code: 2357-6059

Pathologist, Department of Pathology, FSBI
«N.N. Petrov National Medical Research Center
of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the
Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Точильников Григорий Викторович

e-mail: gr75@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-4232-8170

SPIN-код: 4366-6930

к. м. н., и. о. заведующего научной
лаборатории химиопрофилактики рака и
онкофармакологии ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-
Петербург, Россия

Tochilnikov Grigory V.

e-mail: gr75@mail.ru

ORCID ID: 0000-0003-4232-8170

SPIN code: 4366-6930

PhD Med. Sci., acting Head of the Scientific Labo-
ratory of Cancer Chemoprevention and Oncop-
harmacology, FSBI «N.N. Petrov National Medical
Research Center of Oncology» of the Ministry
of Healthcare of the Russian Federation, Saint-
Petersburg, Russia

Латипова Дилором Хамидовна

e-mail: dilat77@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-8906-0370

SPIN-код: 5124-5881

к. м. н., врач-онколог, химиотерапевт ФГБУ
«НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Latipova Dilorom V.

e-mail: dilat77@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-8906-0370

SPIN code: 5124-5881

PhD Med. Sci., Oncologist, chemotherapist, FSBI
«N.N. Petrov National Medical Research Center
of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the
Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Филатова Лариса Валентиновна

e-mail: larisa_filatova@list.ru

ORCID ID: 0000-0002-0728-4582

SPIN-код: 2564-9233

д. м. н., врач-онколог ФГБУ «НМИЦ онкологии
им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-
Петербург, Россия

Filatova Larisa V.

e-mail: larisa_filatova@list.ru

ORCID ID: 0000-0002-0728-4582

SPIN code: 2564-9233

Dr. Sci. (Med.), oncologist, FSBI «N.N. Petrov Na-
tional Medical Research Center of Oncology» of
the Ministry of Healthcare of the Russian Federa-
tion, Saint-Petersburg, Russia

Семиглазова Татьяна Юрьевна

e-mail: tsemiglazova@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-4305-6691

SPIN-код: 9773-3759

д. м. н., профессор, в. н. с. научного отдела
инновационных методов терапевтической
онкологии и реабилитации, заведующая
научным отделом инновационных методов
терапевтической онкологии и реабилитации
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Петрова»
Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Semiglazova Tatiana Yu.

e-mail: tsemiglazova@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-4305-6691

SPIN code: 9773-3759

Dr. Sci. (Med.), professor, Leading researcher,
Scientific Department of Innovative methods of
Therapeutic oncology and Rehabilitation, Head of
the Scientific Department of Innovative methods
of Therapeutic oncology and Rehabilitation, FSBI
«N.N. Petrov National Medical Research Center
of Oncology» of the Ministry of Healthcare of the
Russian Federation, Saint-Petersburg, Russia

Литература / References

1. Cohen JV, Tawbi H, Margolin KA, et al. Melanoma central nervous system metastases: current approaches, challenges, and opportunities. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2016;29(6):627–642. DOI:10.1111/pcmr.12538.
2. Di Giacomo AM, Valente M, Cerase A, et al. Immunotherapy of brain metastases: breaking a "dogma". *J Exp Clin Cancer Res.* 2019;38(1):419. DOI:10.1186/s13046-019-1426-2.
3. Taggart D, Andreou T, Scott KJ, et al. Anti-PD-1/anti-CTLA-4 efficacy in melanoma brain metastases depends on extracranial disease and augmentation of CD8+ T cell trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018;115(7): E1540–E1549. DOI:10.1073/pnas.1714089115.
4. Glitza Oliva I, Tawbi H, Davies MA. Melanoma Brain Metastases: Current Areas of Investigation and Future Directions. *Cancer J.* 2017;23(1):68–74. DOI:10.1097/PPO.0000000000000237.
5. Ostrom QT, Wright CH, Barnholtz-Sloan JS. Brain metastases: epidemiology. *Handb Clin Neurol.* 2018; 149:27–42. DOI:10.1016/B978-0-12-811161-1.00002-5.
6. Agarwala SS, Kirkwood JM, Gore M, et al. Temozolomide for the treatment of brain metastases associated with metastatic melanoma: a phase II study. *J Clin Oncol.* 2004;22(11):2101–2107. DOI:10.1200/JCO.2004.11.044.
7. Larkin JM, Hughes SA, Beirne DA, et al. A phase I/II study of lomustine and temozolomide in patients with cerebral metastases from malignant melanoma. *Br J Cancer.* 2007;96(1):44–48. DOI:10.1038/sj.bjc.6603503.
8. Stukov AN, Esikov KA, Usmanova LM, et al. Synthesis and antitumor activity of 2-[3-(2-chloroethoxy)-3-nitrosoureido]-1,3-propanediol (chlonisol). *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2020;54(6):579–581. DOI: 10.1007/s11094-020-02242-7.
9. Островская Л.А., Филов В.А., Ивин Б.А. и др. Хлонизол — новый эффективный противоопухолевый препарат из класса нитрозоалкилмочевин. *Российский биотерапевтический журнал.* 2004;3(1):37–48. [Ostrovskaya LA, Filov VA, Ivin BA, et al. Chlonizol — the new alkylnitrosourea drug with antitumor activity. *Russian biotherapeutic journal.* 1998;3(1):37–48 (In Russ).].
10. Aboody KS, Najbauer J, Schmidt NO, et al. Targeting of melanoma brain metastases using engineered neural stem/progenitor cells. *Neuro Oncol.* 2006;8(2):119–126. DOI:10.1215/15228517-2005-012.
11. Kircher DA, Silvis MR, Cho JH, Holmen SL. Melanoma Brain Metastasis: Mechanisms, Models, and Medicine. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1468. DOI:10.3390/ijms17091468.
12. Staib L, Harel W, Mitchell MS. Protection against experimental cerebral metastases of murine melanoma B16 by active immunization. *Cancer Res.* 1993;53(5):1113–1121.
13. Стуков А.Н., Филатова Л.В., Латипова Д.Х. и др. Терапевтическая активность гемцитабина при интракраниальных опухолях. *Вопросы онкологии.* 2015;61(2):274–754. [Stukov AN, Filatova LV, Latipova DKh, et al. Therapeutic activity of gemcitabine in intracranial tumors. *Voprosy onkologii.* 2015;61(2):274–279. (In Russ).].
14. Коньков С.А., Стуков А.Н., Резцова В.В. и др. Алкилнитрозоуреидодиоксаны и алкилнитрозоуреидопропандиолы — новые группы противоопухолевых соединений // *Вопр. онкологии.* 1998;44(1):97–99. [Kon'kov SA, Stukov AN, Rezcova VV, et al. Alkylnitrozoureidodioksany i alkylnitrozoureidopropandioly — novye gruppy protivopukhlevykh soedinenij. *Voprosy onkologii.* 1998;44(1):97–99. (In Russ).].

К механизму антиаритмического действия фабомотизола дигидрохлорида при алкогольной кардиомиопатии

Мирошкина И.А.¹, Кожевникова Л.М.^{1,2}, Цорин И.Б.¹, Столярук В.Н.¹, Вититнова М.Б.¹, Крыжановский С.А.¹, Дурнев А.Д.¹

¹ – ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Заварова», Москва, Россия

² – ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», Москва, Россия

Аннотация. Известно, что основной причиной летальности от хронического алкоголизма является алкогольная кардиомиопатия (АКМП). Для АКМП крайне высок риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма, исходом которых приблизительно у 40 % такого рода больных является внезапная сердечная смерть. **Материалы и методы.** Эксперименты проводили на разработанной нами трансляционной модели АКМП, которая формируется у крыс к концу 24-й недели принудительного приёма 10 % раствора этанола. Для изучения механизмов, лежащих в основе антиаритмического действия фабомотизола дигидрохлорида, использовали комплекс морфогистологических, электрофизиологических и молекулярных исследований. **Результаты.** Показано, что на фоне систематической терапии фабомотизола дигидрохлоридом (15 мг/кг, в/б) ежедневно в течение 28 дней, начатой по окончании 24-й недели алкоголизации, по сравнению с алкоголизированным контролем значительно уменьшается жировая дистрофия миокарда и восстанавливается порог электрической фибрилляции желудочков сердца. Согласно результатам молекулярных исследований, фабомотизола дигидрохлорид значительно подавляет выявленную у контрольных алкоголизированных животных аномальную экспрессию мРНК генов ключевых рецепторов и белков, ответственных за поддержание в кардиомиоцитах гомеостаза ионов Ca^{++} и регуляцию их ритмической активности: регуляторных белков Epac1 ($p = 0,021$), Epac2 ($p = 0,018$), CaM ($p = 0,00001$), а также RyR2 ($p = 0,031$), IP3R2 ($p = 0,006$) рецепторов. **Заключение.** Полученные результаты позволяют высказать предположение о том, что антиаритмическое действие фабомотизола дигидрохлорида в условиях АКМП связано с его способностью подавлять аномальную активность регуляторных белков Epac2 и RyR2, IP3R2 рецепторов.

Ключевые слова: фабомотизола дигидрохлорид; алкогольная кардиомиопатия; жировая дистрофия миокарда; электрическая стабильность кардиомиоцитов; Epac1; Epac2; CaM; RyR2; IP3R2

Для цитирования:

Мирошкина И.А., Кожевникова Л.М., Цорин И.Б., Столярук В.Н., Вититнова М.Б., Крыжановский С.А., Дурнев А.Д. К механизму антиаритмического действия фабомотизола дигидрохлорида при алкогольной кардиомиопатии. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):30–37. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-30-37>

Поступила: 18 октября 2020 г. **Принята:** 30 октября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г.

On the mechanism of the antiarrhythmic action of fabomotizole hydrochloride in alcoholic cardiomyopathy

Miroshkina IA¹, Kozhevnikova LM^{1,2}, Tsorin IB¹, Stolyaruk VN¹, Vititnova MB¹, Kryzhanovskii SA¹, Durnev AD¹

¹ – FSBI “Zakusov Institute of Pharmacology”, Moscow, Russia

² – FSBI «Institute of General Pathology and Pathophysiology», Moscow, Russia

Abstract. It is known that the alcoholic cardiomyopathy (ACMP) is the main reason for lethality from chronic alcoholism. For ACMP the risk of development of malignant violations of a heart rhythm which result approximately at 40% of such patients is sudden heart death is extremely high. **Materials and methods.** Experiments were made on the ACMP translational model developed by us which is formed at rats by the end of the 24th week of compulsory reception of 10 % of ethanol solution. For studying the mechanisms which are the responsible of antiarrhythmic action of a fabomotizole dihydrochloride used a complex of morphohistological, electrophysiological and molecular researches. **Results.** It is shown that against the background of systematic therapy fabomotizole dihydrochloride (15 mg/kg, i.p.) daily within 28 days after 24 weeks of alcoholization, in comparison with alcoholized control the fat dystrophy of a myocardium significantly decreases and the threshold of electric fibrillation of heart ventricles is restored. According to results of molecular researches, a fabomotizole dihydrochloride significantly suppresses revealed in control alcoholized animals the abnormal mRNA expression of key receptor genes and proteins responsible for maintenance in cardiomyocytes of a homeostasis of ions of Ca^{++} and regulation of their rhythmic activity: regulatory proteins Epac1 ($p = 0,021$), Epac2 ($p = 0,018$), CaM ($p = 0,00001$) and also RyR2 ($p = 0,031$), IP3R2 ($p = 0,006$) receptors. **Conclusion.** The obtained results suggest that antiarrhythmic action of a fabomotizole dihydrochloride in the conditions of ACMP is connected with its ability to suppress abnormal activity of regulatory proteins Epac2 and RyR2, IP3R2 receptors.

Keywords: fabomotizole dihydrochloride; alcoholic cardiomyopathy; fat dystrophy of a myocardium; electric stability of cardiomyocytes; Epac1; Epac2; RyR2; IP3R2

For citations:

Miroshkina IA, Kozhevnikova LM, Tsorin IB, Stolyaruk VN, Vititnova MB, Kryzhanovskii SA, Durnev AD. On the mechanism of the antiarrhythmic action of fabomotizole hydrochloride in alcoholic cardiomyopathy. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):30–37. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-30-37>

Received: October 18, 2020. **Accepted:** October 30, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Основной причиной летальности от хронического алкоголизма (50–60 % случаев) является алкогольная кардиомиопатия (АКМП), которая составляет до 47 % случаев от всех дилатационных кардиомиопатий [1, 2]. Четырёхлетняя летальность пациентов со сформировавшейся АКМП в случае продолжения приёма алкоголя достигает 50 % [3]. Основным клиническим

проявлением АКМП, помимо признаков хронической сердечной недостаточности, являются злокачественные нарушения сердечного ритма. Согласно результатам крупного перекрестного исследования, включившего в себя 75 430 историй болезней пациентов с АКМП, у 48 % из них были выявлены преимущественно злокачественные нарушения сердечного ритма, среди которых преобладала фибрилляция/трепетание предсердий (32 %) и желудочковая тахикардия (8 %) [4].

Риск развития злокачественных желудочковых аритмий возникает при снижении фракции выброса левого желудочка сердца ниже 40 % [5]. Поскольку течение АКМП практически в 50 % случаев отягощают преимущественно злокачественные нарушения сердечного ритма, нет ничего удивительно в том, что у этой категории больных крайне высок риск внезапной сердечной смерти (ВС). ВС диагностируется у 30–40 % пациентов с АКМП [6]. Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что среди всех причин ВС алкогольная кардиомиопатия занимает 2–3 место [7], а у лиц, моложе 35 лет, страдающих хроническим алкоголизмом, ВС диагностируется чаще, чем при других аритмогенных заболеваниях, в том числе аритмогенной кардиомиопатии правого желудочка и ишемической болезни сердца [8].

Ранее на разработанной нами трансляционной модели АКМП у крыс было показано, что в период абстиненции разработанный и фармакологически изученный в ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» анксиолитик фабомотизола дигидрохлорид оказывает кардиопротективное действие. Препарат, активизируя репаративные процессы в миокарде, уменьшает конечно-систолический и конечно-диастолический размеры левого желудочка сердца и увеличивает его инотропную функцию [9]. Кардиопротективное действие фабомотизола дигидрохлорид, по-видимому, во многом связано с его агонистическим влиянием на σ_1 -рецепторы [10] кардиомиоцитов (КМ), являющиеся своеобразным возникшим в ходе эволюции ремонтным комплексом клетки [11].

Цель исследования. Изучение морфологических, электрофизиологических и молекулярных механизмов, лежащих в основе антиаритмической активности фабомотизола дигидрохлорида у крыс с АКМП.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Опыты проводили на белых беспородных крысах-самцах изначальной массой 180–200 г, полученных из Филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Животные имели ветеринарный сертификат и прошли карантин в виварии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Животных содержали в соответствии с приказом Минздрава России № 199н от 01 апреля 2016 года «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Крысы основной и контрольной групп содержались в индивидуальных клетках стандарта Т/3. Все работы с лабораторными животными были выполнены в соответствии с общепринятыми нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова,

международными правилами (European Communities Council Directive of November 24, 1986 (86/609/EEC)), а также в соответствии с «Правилами работы с животными», утверждёнными биоэтической комиссией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Экспериментальный протокол. На 1-м этапе исследования животных рандомизировали на две группы: 1-я ($n = 8$) — интактные крысы, получавшие обычный рацион питания и свободный доступ к воде; 2-я ($n = 16$) — животные, получавшие обычный рацион питания и в качестве единственного источника жидкости 10 % алкоголь. По окончании 24-й недели, после подтверждения наличия у крыс 2-й группы эхокардиографических признаков сформировавшейся АКМП, алкоголизацию животных 2-й группы прекращали и крыс вновь рандомизировали на две подгруппы: 2а — основная и 2б — контрольная. Животным подгруппы 2а ($n = 8$) ежедневно в течение 28 дней вводили фабомотизола дигидрохлорид (15 мг/кг, в/б) в 0,2–0,3 мл изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида; крысам подгруппы 2б ($n = 8$) по аналогичной схеме вводили эквивалентный объём изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида. Через сутки после последней инъекции животных подвергали эвтаназии, вскрывали грудную клетку и забирали сердца для гистологических и молекулярных исследований. В отдельной серии экспериментов оценивали влияние фабомотизола дигидрохлорида на порог электрической фибрилляции желудочков сердца. Животные были рандомизированы на 3 группы: 1-я ($n = 6$) — интактные животные, 2-я ($n = 6$) — АКМП и 3-я ($n = 6$) — АКМП + фабомотизола дигидрохлорид. Фабомотизола дигидрохлорид (15 мг/кг, в/б) вводили ежедневно в течение 28 дней после эхокардиографического подтверждения наличия АКМП по окончании 24 недель алкоголизации. Животные 2-й группы по аналогичной схеме получали эквивалентный объём изотонического 0,9 % раствора натрия хлорида.

Определение порога фибрилляции. Крыс анестезировали (уретан, 1300 мг/кг, в/б) и фиксировали на операционном подогреваемом столике Surgi Suite (Kent Scientific Corporation, США) в положении на спине и переводили на искусственное дыхание при помощи аппарата искусственной вентиляции лёгких для мелких животных (Ugo Basele, Италия). Частоту и глубину дыхания подбирали индивидуально для каждого животного. Затем вскрывали грудную клетку, производили стернэктомию, перикардотомию. На свободную стенку левого желудочка сердца на расстоянии 0,5 см друг от друга подшивали два позолоченных электрода. Порог электрической фибрилляции (ПЭФЖ) сердца определяли повторяющимся сканированием уязвимого периода сердечного цикла серией из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся интенсивности (длительность стимула — 4 мс, частота — 50 имп/с). За порог фибрилляции желудочков

принимали минимальную силу тока, вызывающую при двухкратном повторении фибрилляцию желудочков. В работе использовали электростимулятор HSE Stimulator (Hugo Sach Electronik, Германия). В течение всего эксперимента регистрировали ЭКГ во II стандартном отведении. В качестве регистратора использовали электрокардиограф ЭК 4Т-02 (ОАО «Красногвардеец», Россия). Визуальный контроль регистрируемых параметров в течение всего эксперимента производили при помощи 4-канального осциллоскопа фирмы Siemens (Германия).

Морфологические исследования. Крыс декапитировали, сердца извлекали из грудной клетки, фиксировали в 10 % забуференном растворе формалина и заключали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 5 мкм вырезали и помещали на предметное стекло с полилизинным покрытием (Menzel). Их окрашивали галлоцианин-хромовыми квасцами с 1 % водным раствором эозина. Срезы оценивали в проходящем свете (увеличение $\times 100$, $\times 200$, $\times 400$) под микроскопом Nikon eclipse 55i (Nikon, Япония). В дальнейшем гистологические срезы сердец фотографировали. Фотографии сердец сохраняли в формате Jpeg и анализировали с помощью программы Adobe Photoshop CS5.

Молекулярные исследования. Наркотизированных крыс (уретан, 1300 мг/кг, в/б) декапитировали, вскрывали грудную клетку, извлекали сердца, брали образец ткани левого желудочка. Образцы тканей отмывали от крови и очищали от соединительной ткани и жира в физиологическом растворе хлорида натрия при $+4^\circ\text{C}$, затем помещали в раствор RNeasy (США, Ambion) и хранили при температуре -20°C .

Выделение суммарной РНК. Образцы, извлечённые из раствора RNeasy, освобождали от остатков жидкости и гомогенизировали при помощи жидкого азота и фарфоровой ступки, переносили в TRI[®] Reagent (США, Sigma) и проводили выделение тотальной РНК в соответствии с протоколом производителя TRI[®] Reagent.

Концентрацию суммарной РНК в образцах определяли на спектрофотометре NanoDrop[®] ND-1000 («Thermo Fisher Scientific Inc.», США). В дальнейшую пробоподготовку брали образцы суммарной РНК с отношением показателей абсорбции при длинах волн 260/280 нм не ниже 2,0.

Приготовление образцов суммарной РНК, свободной от ДНК. Выделенную суммарную РНК (1 мкг) для предотвращения контаминации геномной ДНК обрабатывали ДНКазой I. Добавив все компоненты, смесь инкубировали при 37°C в течение 30 минут. Фермент инактивировали нагреванием при 65°C в течение 10 минут, предварительно добавив 25 мМ ЭДТА, из расчёта 1 мкл на 10 мкл реакционной смеси, для предотвращения гидролиза РНК в процессе нагревания.

Синтез первой цепи комплементарной ДНК. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием гексамерных Random праймеров и обратной транс-

криптазы M-MuLV в составе набора RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (США) в соответствии с протоколом производителя. Синтезированную кДНК хранили при -20°C .

Полимеразная цепная реакция «в реальном времени» (ПЦР-РВ). Для амплификации фрагментов кДНК исследуемых генов и генов «домашнего хозяйства» использовали наборы специфических праймеров и универсальный набор реактивов для проведения ПЦР-РВ фирмы «Евроген» (Россия), содержащий референтный краситель ROX. В качестве гена «домашнего хозяйства» был использован ген β -актина. Праймеры для генов предоставлены ООО «ДНК-Синтез» с дополнительным праймером-зондом, содержащим флуоресцентный краситель FAM и его тушитель BHQ1. ПЦР-РВ проводили в 96-луночном ПЦР-планшете («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) на амплификаторе CFX96TM Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США).

Статистическая обработка. Нормальность распределения полученных данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Результаты морфометрических и молекулярных исследований обрабатывали с помощью однофакторного дисперсионного анализа с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Ньюмену–Кейлсу. Полученные результаты представляли в виде средних арифметических и их стандартных ошибок. Так как распределение электрических порогов фибрилляции значительно отличалось от нормального, то для статистической обработки этих данных использовали непараметрический аналог однофакторного дисперсионного анализа по Крускалу–Уоллису с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Полученные результаты представляли в виде медиан и нижнего и верхнего квартилей. Для обработки качественных данных использовали критерий точной вероятности Фишера с учётом множественности сравнений.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Анализ результатов гистологических исследований свидетельствует о том, что у крыс алкоголизированного контроля визуализируется диффузное венозное и капиллярное полнокровие миокарда с эритростазом. Отмечается выраженный полиморфизм КМ — наличие атрофичных клеток одновременно с клетками в состоянии умеренной гипертрофии. Между отдельными группами КМ обнаруживались небольшие кровоизлияния. Миофибриллы клеток сердечной мышцы имели слабую поперечную исчерченность. У всех животных в данной группе на гистопрепаратах заметны признаки жировой дистрофии миокарда. Так, в цитоплазме групп КМ и в межмышечной строме визуализируются жировые включения различной величины — от мелких до средних (рис. 1Б).

Гистоархитектоника сердца крыс с АКМП, получавших фабомотизола дигидрохлорид, была сохранена. Сосуды были полнокровны. Между отдельными группами КМ обнаруживались небольшие кровоизлияния. Признаки нарушения реологии крови в поле зрения (диффузное полнокровие миокарда, эритростаз), в отличие от алкоголизированного контроля, обнаруживались только в отдельных случаях (рис. 1В). Клетки сердечной мышцы имели слабо выраженную поперечную исчерченность. Полиморфизм КМ был менее выражен, чем у алкоголизированных контрольных животных. Жировые включения в КМ и в межмышечной строме были обнаружены только у 2 животных из 8 ($p = 0,014$).

Как следует из вышеизложенных данных, на фоне систематической терапии фабомотизола дигидрохлоридом не только наблюдается значимое уменьшение размеров правого и левого желудочков сердца, что свидетельствует о том, что препарат инициирует обратное ремоделирование миокарда, но и также значимо уменьшается интенсивность патогномичной для АКМП жировой дистрофии миокарда.

Известно, что жировая дистрофия миокарда является одним из морфологических триггеров, инициирующих развитие злокачественных нарушений сердечного ритма [12–15]. В силу сказанного, представлялось интересным оценить, как уменьшение под влиянием фабомотизола дигидрохлорида жировой дистрофии миокарда влияет на электрическую стабильность КМ у животных с АКМП.

Для ответа на этот вопрос в отдельной серии экспериментов определяли влияние фабомотизола дигидрохлорида на ПЭФЖ.

Результаты проведенных экспериментов свидетельствуют о том, что у контрольных (интактных) животных ($n = 6$) ПЭФЖ составлял $0,7 (0,5 \div 1,5)$ мА, тогда как у крыс, длительно потреблявших 10 % раствор

этанол ($n = 6$), этот показатель был статистически значимо ниже ($p < 0,01$) и составлял $0,4 (0,4 \div 0,4)$ мА. Не менее важен и тот факт, что ПЭФЖ $\geq 0,5$ мА регистрировался у всех контрольных животных, тогда как в группе алкоголизированных крыс — лишь у 1 из 6, а у остальных был существенно ниже ($p = 0,023$).

Таким образом, у алкоголизированных животных наблюдается статистически значимое снижение ПЭФЖ, что указывает на увеличение электрической нестабильности КМ.

У алкоголизированных крыс, получавших фабомотизола дигидрохлорид, ПЭФЖ был значительно выше ($p = 0,030$, по сравнению с группой контрольных животных с АКМП и составлял $0,7 (0,5 \div 0,7)$ мА, при этом у всех 6 животных этот показатель был $\geq 0,5$ мА ($p = 0,023$).

Таким образом, фабомотизола дигидрохлорид восстанавливает электрическую стабильность КМ в условиях АКМП.

С целью изучения механизмов антиаритмического действия фабомотизола дигидрохлорида были исследованы возможные молекулярные механизмы, лежащие в основе способности препарата восстанавливать электрическую стабильность КМ при АКМП. Для этой цели методом ПЦР в реальном времени оценивали влияние фабомотизола дигидрохлорида на уровень экспрессии генов ключевых рецепторов и белков, ответственных за поддержание в КМ гомеостаза ионов Ca^{++} и регуляцию их ритмической активности.

Анализ полученных данных показал, что в КМ контрольных алкоголизированных животных (подгруппа 2б) по сравнению с интактными животными значимо увеличивается экспрессия мРНК генов для регуляторных белков CaM , Eras1 и рецепторов RyR2 , которым, согласно литературным данным, принадлежит одна из ключевых ролей в поддержании гомеостаза ионов Ca^{++} [16, 17]. Все различия статистически значимы ($p < 0,05$) (рис. 2).

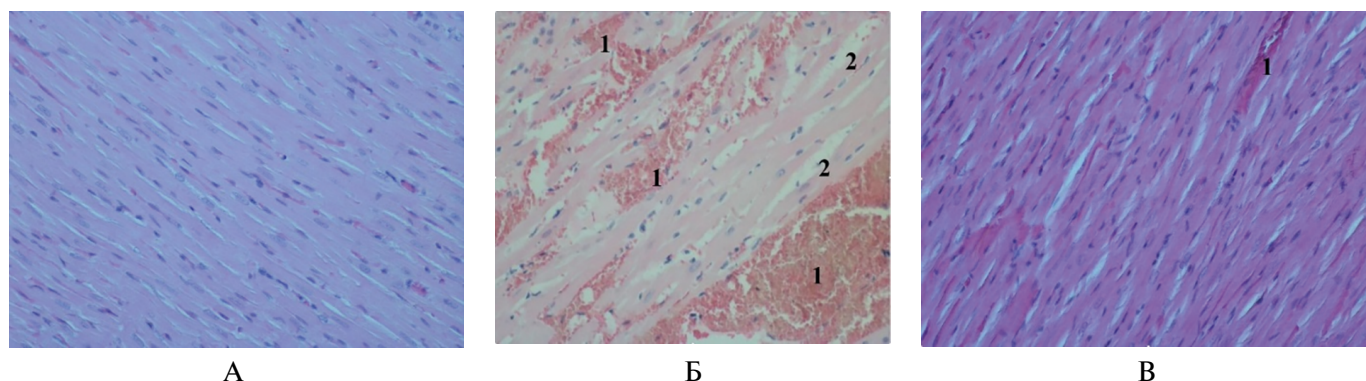


Рис. 1. Гистологическая картина миокарда: А — интактных крыс; Б — контрольных алкоголизированных животных; В — крыс, получавших фабомотизола дигидрохлорид

Figure 1. Histological picture of the myocardium: А-intact rats; Б-control alcoholized animals; В-rats treated with fabomatozole dihydrochloride

Примечания: 1 — диффузное полнокровие; 2 — жировая дистрофия миокарда. Окраска галлоцианин-эозином. Увеличение 10×20.
Notes: 1-diffuse plethora; 2 — fatty dystrophy of the myocardium. Staining with gallocyanin-eosin. The magnification is 10×20.

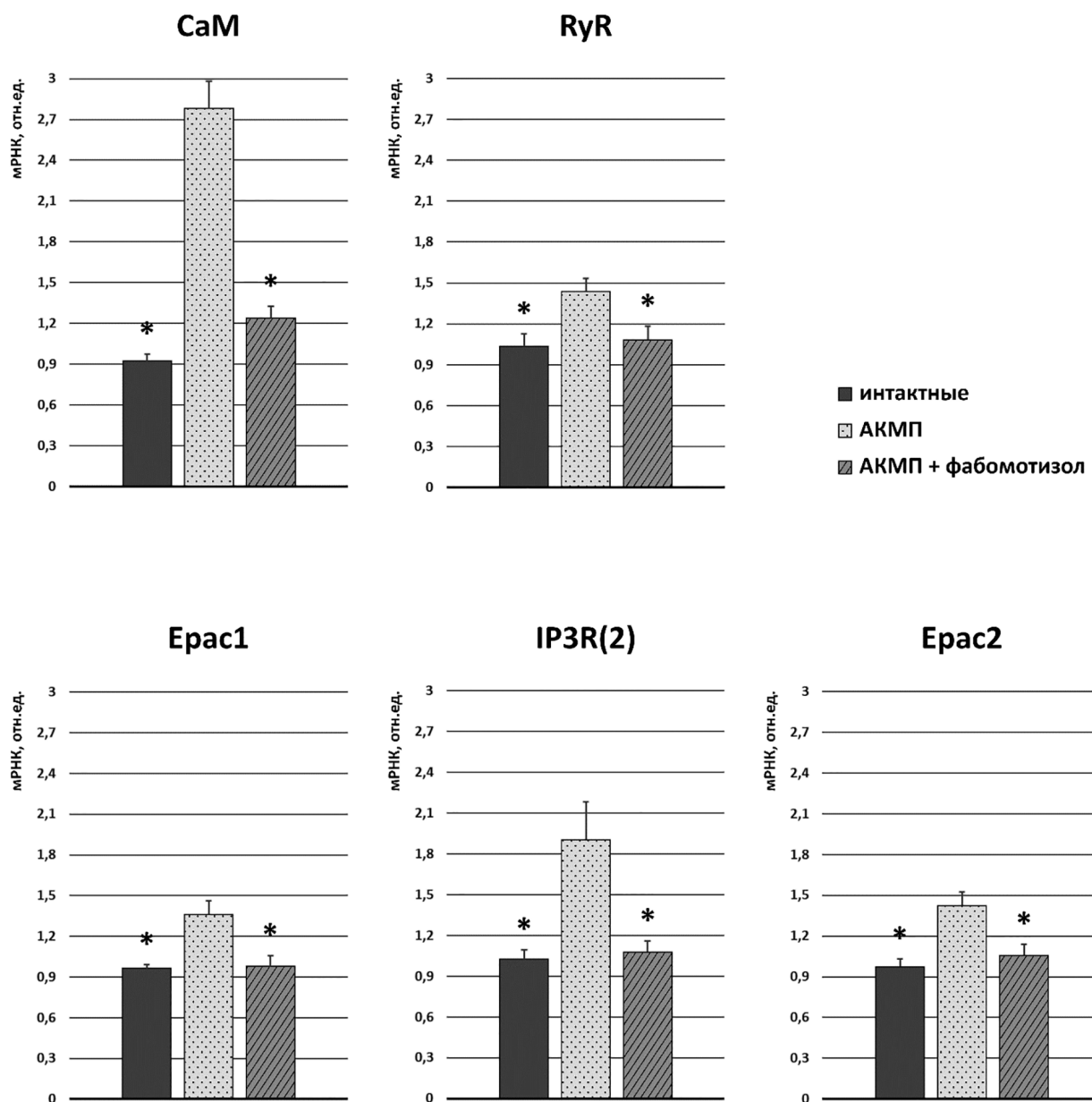


Рис. 2. Влияние фабомотизола гидрохлорида на уровень экспрессии мРНК генов для рецепторов и регуляторных белков – CaM, RyR2, IP3R2, Erac1 и Erac2 – у крыс с АКМП.

Figure 2. Effect of fabomotizol hydrochloride on the level of mRNA expression of genes for receptors and regulatory proteins-SaM, RyR2, IP3R2, Erac1 and Erac2-in rats with ACMP.

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем АКМП.

Note: * – $p < 0.05$ compared to the ACMP control.

Это позволяет предположить, что в результате токсического воздействия алкоголя и его метаболитов в КМ нарушается гомеостаз ионов Ca^{++} и, как следствие этого, снижается их инотропная функция, что и было подтверждено при проведении эхокардиографических исследований [18]. Следует также отметить, что с аномальной экспрессией регуляторных белков Erac1, в определённой мере, может быть связано и развитие патологического ремоделирования миокарда у крыс с АКМП [18], поскольку известно, что этот патоло-

гический процесс ассоциируется с гиперэкспрессией этих регуляторных белков [19, 20].

Помимо этого, показано, что длительный приём алкоголя вызывает существенный рост экспрессии в КМ IP3R2 и сопряжённых с ними RyR2 (см. рис. 2), что может свидетельствовать об оксидативном стрессе саркоплазматического ретикулума (СПР) [21].

Известно, что в КМ RyR2, а также IP3R2, расположенные на наружной мембране СПР, регулируют поступление ионов Ca^{++} из цистерн СПР в цитозоль

КМ, что обеспечивает не только поддержание гомеостаза ионов Ca^{++} , но и играет ключевую роль как в регуляции их ритмической активности [22], так и поддержании энергообеспечения клеток сердца, а их гиперэкспрессия увеличивает риск развития злокачественных нарушений ритма сердца. Также показано, что в КМ контрольных животных зарегистрирован существенный прирост ($p < 0,05$) экспрессии регуляторного белка *Eras2* (см. рис. 2), гиперэкспрессия которого также инициирует нарушения сердечного ритма [23]. Следует также отметить, что IP3R2, расположенные в области контакта наружной мембраны СПР с наружной мембраной митохондрий (область МАМ), регулируют поступление ионов Ca^{++} в митохондрии, что необходимо для поддержания их энергообразующей функции. Гиперэкспрессия IP3R2 влечёт за собой перегрузку митохондрий ионами Ca^{++} и, как следствие, нарушение продукции АТФ [24]. Таким образом, в КМ алкоголизованных животных наблюдается рост экспрессии мРНК генов ключевых рецепторов и белков, ответственных за поддержание в КМ гомеостаза ионов Ca^{++} и регуляцию их ритмической энергопродуцирующей активности, что наряду с нарушением гомеостаза ионов Ca^{++} , влекущего за собой снижение сократительного статуса сердечной мышцы и дефицит энергообразования, существенно повышает риск развития злокачественных нарушений сердечного ритма, что характерно для АКМП.

Иная картина наблюдается у животных, получавших систематическую экспериментальную терапию фабомотизола дигидрохлоридом, на фоне которой в КМ значительно уменьшается (практически до уровня определённого у интактных животных) экспрессия регуляторных белков *Eras1* ($p = 0,021$) и *CaM* ($p = 0,00001$), а также *RyR2* рецепторов ($p = 0,031$) (см. рис. 2), что позволяет с определённой долей

уверенности говорить о том, что на фоне терапии фабомотизола дигидрохлоридом в КМ восстанавливается гомеостаз ионов Ca^{++} . Также есть все основания полагать, что на фоне терапии фабомотизола дигидрохлоридом подавляется стресс СПР, поскольку в КМ значительно снижается уровень экспрессии не только *RyR2*, но и *IP3R2* ($p = 0,006$). При этом уровень экспрессии наиболее представленных в КМ IP3R2 соответствует таковому у интактных животных (см. рис. 2). Эти результаты, наряду с данными о снижении экспрессии аритмогенного регуляторного белка *Eras2* ($p = 0,018$), позволяют говорить о том, что на фоне систематической терапии фабомотизола дигидрохлоридом аритмогенный потенциал КМ резко снижается, а восстановление до физиологического уровня экспрессии IP3R2 свидетельствует также и о возможной нормализации энергообразующей функции митохондрий.

Таким образом, полученные результаты позволяют высказать предположение о том, что антиаритмическое действие анксиолитика фабомотизола дигидрохлорида может быть связано с его способностью подавлять аномальную экспрессию *RyR2* и *IP3R2* рецепторов, а также регуляторных белков *Eras2*, и тем самым препятствовать развитию / подавлять стресс СПР, а также восстанавливать гомеостаз ионов Ca^{++} и энергообразующую функцию митохондрий. Также следует отметить, что полученные результаты практически полностью согласуются с результатами исследований японских исследователей, которые в модельных экспериментах, воспроизводящих гипертрофию миокарда перегрузкой давлением, показали, что длительная терапия (+)-пентазоцином, который также как фабомотизола дигидрохлорид обладает свойствами агониста σ_1 -рецепторов, препятствует развитию стресса СПР за счёт оптимизации уровня экспрессии в КМ *RyR2* и *IP3R2* рецепторов [25].

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мирошкина Ирина Александровна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN-код: 4697-7938

н. с. лаборатории лекарственной токсикологии
ФГБНУ «НИИ фармакологии имени
В.В. Закусова», Москва, Россия

Цорин Иосиф Борисович

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN-код: 4015-3025

д. б. н., в. н. с. лаборатории
фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ
фармакологии имени В.В. Закусова», Москва,
Россия

Miroshkina Irina A.

Corresponding author

e-mail: iris10.81@mail.ru

ORCID ID: 0000-0002-3208-198X

SPIN code: 4697-7938

Research scientist of the laboratory of drug toxicology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Tsorin Iosif B.

e-mail: tsorin@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-3988-7724

SPIN code: 4015-3025

Dr. Sci. Biological, Leading researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Кожевникова Любовь Михайловна

ORCID ID: 0000-0002-1323-6472

SPIN-код: 6882-6933

д. м. н., в. н. с. лаборатории фармакологического ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия; зав. лабораторией хронического воспаления и микроциркуляции ФГБНУ «НИИОПП», Москва, Россия

Kozhevnikova Lubove M.

ORCID ID: 0000-0002-1323-6472

SPIN code: 6882-6933

Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia; Head of laboratory of laboratory of chronic inflammation and microcirculation of FSBI «IGPP», Moscow, Russia

Столярук Валерий Николаевич

ORCID ID: 0000-0002-4779-427X

SPIN-код: 3405-8229

к. м. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Stolyaruk Valeriy N.

ORCID ID: 0000-0002-4779-427X

SPIN code: 3405-8229

PhD Med. Sci., Senior Researcher Scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Вититнова Марина Борисовна

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN-код: 1901-8919

к. б. н., с. н. с. лаборатории фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Vititnova Marina B.

e-mail: MB-Vit@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0002-7407-7516

SPIN code: 1901-8919

PhD Biological Sci., Senior researcher scientist of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Крыжановский Сергей Александрович

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN-код: 6596-4865

д. м. н., зав. лабораторией фармакологического скрининга ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Kryzhanovskiy Sergey A.

e-mail: SAK-538@yandex.ru

ORCID ID: 0000-0003-2832-4739

SPIN code: 6596-4865

Dr. Sci. (Med.), Head of laboratory of pharmacological screening FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Дурнев Андрей Дмитриевич

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN-код: 8426-0380

д. м. н., профессор, член-корр. РАН, зав. лабораторией лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Durnev Andrei Dmitrievich

ORCID ID: 0000-0003-0218-8580

SPIN code: 8426-0380

Dr. Sci. (Med.), professor, corresponding member RAS, Head of the department of drug toxicology, FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Guzzo-Merello G, Cobo-Marcos M, Gallego-Delgado M, Garcia-Pavia P. Alcoholic cardiomyopathy. *World J. Cardiol.* 2014;6(8):771–781. DOI: 10.4330/wjc.v6.i8.771.
2. Семенова В.Г., Антонова О.И., Евдокushкина Г.Н., Гаврилова Н.С. Потери населения России в 2000–2008 гг., обусловленные алкоголем: масштабы, структура, тенденции. *Социальные аспекты здоровья населения.* 2010;14(2):34–37. [Semenova VG, Antonova OI, Evdokushkina GN, Gavrilova NS. Losses of the population of Russia in 2000–2008 caused by alcohol: scales, structure, and tendencies. *Social aspects of population health.* 2010;14(2):34–37. (In Russ).].
3. Fang W, Luo R, Tang Y, Hua W et al. The Prognostic factors of alcoholic cardiomyopathy: A single-center cohort study. *Medicine (Baltimore).* 2018;97(31): e11744. DOI: 10.1097/MD.00000000000011744.

4. Sulaiman S, Yousef N, Benjamin MM, Sundararajan S et al. Burden of arrhythmia and electrophysiologic procedures in alcoholic cardiomyopathy hospitalizations. *Int J Cardiol.* 2020;304:61–68. DOI: 10.1016/j.ijcard.2020.01.068.
5. Guzzo-Merello G, Dominguez F, González-López E, Cobo-Marcos M et al. Malignant ventricular arrhythmias in alcoholic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* 2015;199:99–105. DOI: 10.1016/j.ijcard.2015.07.029.
6. Iacovoni A, De Maria R, Gavazzi A. Alcoholic cardiomyopathy. *J Cardiovasc Med (Hagerstown).* 2010;11(12):884–892. DOI: 10.2459/JCM.0b013e32833833a3.
7. Пермяков А.В., Пирогов А.С., Якимов И.А. Алкогольная кардиомиопатия по данным ГУЗ «БСМЭ» МЗ УР (г. Ижевска) за 3 года (2000–2002 гг.). Проблемы экспертизы в медицине. 2003;3(2):11–13. [Permyakova AV, Pirogov AC, Yakimov IA. Alcoholic cardiomyopathy on

the data of Izhevskforensic-legal department for 3 years (2000–2003). Problems of expertise in medicine. 2003;3(2):11–13. (In Russ.).

8. Гордеева М.В., Митрофанова Л.Б., Пахомов А.В., Велеславова О.Е. и др. Внезапная сердечная смерть молодых людей. Вестник аритмологии. 2012;68:34–44. [Gordeeva MV, Mitrofanova LB, Pakhomov AV, Veleslavova OE et al. Sudden cardiac death adolescents and young adult. *Vestnik aritmologii*. 2012;68:34–44. (In Russ).].

9. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., Столярук В.Н. и др. К возможности использования афобазола для лечения алкогольной кардиомиопатии и профилактики сопутствующих ей осложнений. Молекулярная медицина. 2015;(4):35–42. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Kolik LG, Stolyaruk VN et al. About possibility of the use of afobazol for treatment of alcoholic cardiomyopathy and prevention of its concomitant complications. *Molekulyarnaya meditsina*. 2015;(4):35–42. (In Russ).]

10. Середенин С.Б., Цорин И.Б., Вититнова М.Б., Столярук В.Н., Чичканов Г.Г., Крыжановский С.А. К механизму противоишемического действия препарата «Афобазол». Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013;155(6):723–727. [Seredenin SB, Tsorin IB, Vititnova MB, Stolyaruk VN, Chichkanov GG, Kryzhanovskii SA. On the mechanism of anti-ischemic effects of afobazole. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2013;155(6):723–727. (In Russ).]

11. Середенин С.Б., Воронин М.В. Нейрорецепторные механизмы действия афобазола. Экспериментальная и клиническая фармакология. 2009;72(1):3–11. [Seredenin SB, Voronin MV. Neuroreceptor mechanisms involved in the action of afobazole. *Eksperimental'naya i klinicheskaya farmakologiya*. 2009;72(1):3–11. (In Russ).]. DOI: 10.30906/0869-2092-2009-72-1-3-11

12. Le Heuzey JY, Copie X, Henry P, Halimi F et al. Mechanisms of atrial fibrillation: recent advances. *Arch Mal Coeur Vaiss*. 1994;87(Spec №3):41–45.

13. Haverkamp W, Rolf S, Osterziel KJ, Dietz R, Peters S. Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Herz*. 2005;30(6):565–570. DOI: 10.1007/s00059-005-2733-2.

14. Yang Z, Bowles NE, Scherer SE, Taylor MD et al. Desmosomal dysfunction due to mutations in desmoplakin causes arrhythmogenic right ventricular dysplasia/cardiomyopathy. *Circ Res*. 2006;99(6):646–655. DOI: 10.1161/01.RES.0000241482.19382.c6.

15. Calore M, Lorenzon A, De Bortoli M, Poloni G, Rampazzo A. Arrhythmogenic cardiomyopathy: a disease of intercalated discs. *Cell Tissue Res*. 2015;360(3):491–500. DOI: 10.1007/s00441-014-2015-5.

16. Hohendanner F, McCulloch AD, Blatter LA, Michailova AP. Calcium and IP3 dynamics in cardiac myocytes: Experimental and computational perspectives and approaches. *Front Pharmacol*. 2014;5:35. DOI: 10.3389/fphar.2014.00035.

17. Oestreich EA, Wang H, Malik S et al. Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca2+ mobilization in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 2007;282(8):5488–5495. DOI: 10.1074/jbc.M608495200.

18. Крыжановский С.А., Цорин И.Б., Колик Л.Г., Столярук В.Н. и др. Трансляционная модель алкогольной кардиомиопатии. Молекулярная медицина. 2015;(3):40–47. [Kryzhanovskii SA, Tsorin IB, Kolik LG, Stolyaruk VN et al. Translation model of alcoholic cardiomyopathy. *Molekulyarnaya meditsina*. 2015;(3):40–47. (In Russ).].

19. Ulucan C, Wang X, Baljinnyam E et al. Developmental changes in gene expression of Epac and its upregulation in myocardial hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(3):H1662–1672. DOI: 10.1152/ajpheart.00159.2007.

20. Métrich M, Lucas A, Gastineau M et al. Epac mediates beta-adrenergic receptor-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circ Res*. 2008;102(8):959–965. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164947.

21. Nikolaienko R, Bovo E, Zima AV. Redox dependent modifications of ryanodine receptor: Basic mechanisms and implications in heart diseases. *Front Physiol*. 2018;9:1775. DOI: 10.3389/fphys.2018.01775.

22. Harzheim D, Movassagh M, Foo RS et al. Increased InsP3Rs in the junctional sarcoplasmic reticulum augment Ca2+ transients and arrhythmias associated with cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(27):11406–11411. DOI: 10.1073/pnas.0905485106.

23. Hothi SS, Gurung IS, Heathcote JC et al. Epac activation, altered calcium homeostasis and ventricular arrhythmogenesis in the murine heart. *Pflugers Arch*. 2008;457(2):253–270. DOI: 10.1007/s00424-008-0508-3.

24. Mammucari C, Patron M, Granatiero V, Rizzuto R. Molecules and roles of mitochondrial calcium signaling. *Biofactors*. 2011;37(3):219–227. DOI: 10.1002/biof.160.

25. Tagashira H, Bhuiyan MS, Fukunaga K. Diverse regulation of IP3 and ryanodine receptors by pentazocine through σ_1 -receptor in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;305(8):H1201–212. DOI: 10.1152/ajpheart.00300.2013.

Изучение электрофизиологических механизмов противосудорожного действия оригинального аналога леветирацетама – соединения ГИЖ-290

Воронина Т. А., Литвинова С. А., Гладышева Н. А., Яковлева А. А.

ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Аннотация. В исследовании использована методика кобальтовой эпилепсии, которая позволяет у крыс с долгосрочно вживлёнными в корковые и подкорковые структуры мозга электродами в течение длительного времени мониторировать динамику образования и мигрирования Эпи-очагов. Установлено, что в контроле на 1-й стадии развития Эпи системы Эпи активность наиболее выражена в электрокортикограммах ипсилатеральной коры, а на 2-й – стабильной стадии развития Эпи системы – в контрлатеральной коре и подкорковых структурах. Соединение ГИЖ-290 (оригинальный структурный аналог леветирацетама) уменьшает число Эпи разрядов и их длительность на 2-й, стабильной стадии развития Эпи системы. Структурной мишенью действия соединения ГИЖ-290 являлся гиппокамп. Соединение ГИЖ-290 избирательно статистически значимо уменьшает как число, так и длительность Эпи разрядов только в гиппокампе и не влияет на очаги эпилептической активности в ипси- и контрлатеральной коре и гипоталамусе.

Ключевые слова: соединение ГИЖ-290; фенил-пирролидон; кобальтовая эпилепсия; ЭЭГ; эпилептическая система; крысы; гиппокамп

Для цитирования:

Воронина Т.А., Литвинова С.А., Гладышева Н.А., Яковлева А.А. Изучение электрофизиологических механизмов противосудорожного действия оригинального аналога леветирацетама – соединения ГИЖ-290. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):38–44. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-38-44>

Поступила: 24 октября 2020 г. **Принята:** 04 ноября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г.

Study of the electrophysiological mechanisms of anticonvulsant action of the original levetiracetam analog the compound GIZH-290

Voronina TA, Litvinova SA, Gladysheva NA, Yakovleva AA

FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Abstract. The study used the method of cobalt epilepsy, which allows rats with long-term implanted electrodes in the cortical and subcortical structures of the brain to monitor the dynamics of the formation and migration of Epi-foci for a long time. It was found that in the control at the 1st stage of development of the Epi system, Epi activity is most pronounced in the electrocorticograms of the ipsilateral cortex, and at the 2nd, stable stage of development of the Epi system – in the contralateral cortex and subcortical structures. The compound GIZH-290 (the original structural analogue of levetiracetam) reduces the number of Epi discharges and their duration at the 2nd, stable stage of the development of the Epi system. The target structure of the GIZH-290 compound was the hippocampus. The compound GIZH-290 selectively statistically significantly reduces both the number and duration of Epi – discharges only in the hippocampus and does not affect the foci of epileptic activity in the ipsi- and contralateral cortex and hypothalamus.

Keywords: compound GIZH-290; phenylpyrrolidone; cobalt epilepsy; EEG; epileptic system; rats; hippocampus

For citations:

Voronina TA, Litvinova SA, Gladysheva NA, Yakovleva AA. Study of the electrophysiological mechanisms of anticonvulsant action of the original levetiracetam analog the compound GIZH-290. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):38–44. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-38-44>

Received: October 24, 2020. **Accepted:** November 04, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Эпилепсия является одним из наиболее распространённых неврологических заболеваний, которой страдают около 75 млн человек в мире (дети, взрослые и пожилые; мужчины и женщины), и представляет собой гетерогенную группу заболеваний (около 40 форм), имеющих определённые клинические проявления и различный прогноз [1–5]. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в лечении эпилепсии, не менее чем у 30–40 % пациентов развивается фармакорезистентность, и у них не удаётся добиться полного прекращения приступов на фоне противоэпилептической терапии [1, 2, 6]. Противоэпилептическими препаратами (ПЭП) первой линии для лечения различных форм эпилепсии в настоящее время являются вальпроаты, карбамазепин и леветирацетам (ЛЕВ), основными преимуществами ЛЕВ перед другими ПЭП является его низкая токсичность и способность преодолевать фармакорезистентность при лечении традиционными ПЭП [1, 7, 8].

Соединение ГИЖ-290 (2,6-диметиланилид (2-оксо-4-фенилпирролидин-1-ил) уксусной кислоты) является оригинальным аналогом ЛЕВ, синтезированным в отделе химии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова». Исследование его фармакологических свойств в лаборатории психофармакологии показали, что соединение ГИЖ-290 в диапазоне доз 2,5–10 мг/кг обладает отчётливой противосудорожной активностью и также, как ЛЕВ (600 мг/кг), оказывает эффект в специфических для рацетамов тестах антагонизма с пилокарпином и литий пилокарпином [9].

Согласно современным представлениям, генерация эпилептических приступов в мозге определяется формированием эпилептической системы (Эпи система), которая вовлекает различные корковые и подкорковые структуры мозга, и защитной – противоэпилептической системы [1, 10–14]. По определению Г.Н. Крыжановского [10, 11], Эпи система – это динамическая, постепенно усложняющаяся патологическая структурно-функциональная система. Структура мозга, в которой расположен Эпи очаг, становится де-

терминатной (доминантной) структурой и навязывает свою активность другим структурам мозга, образуя в них вторичные Эпи очаги и, таким образом, формируя Эпи систему мозга, которая состоит из структур с очагами Эпи активности, путей распространения Эпи разрядов и структур, способствующих генерализации Эпи разряда. Клинические проявления припадков зависят от локализации Эпи очага и от особенностей организации Эпи системы.

В исследованиях, выполненных нами ранее [15, 16], по выявлению структурных мишеней мозга, на которые оказывает действие ЛЕВ, показано, что на второй стадии формирования Эпи системы наибольшая выраженность противосудорожного эффекта ЛЕВ выявляется в гиппокампограммах, что выражается в нормализации биоэлектрической активности и появлении регулярного тета-ритма, что свидетельствует о влиянии ЛЕВ на гиппокампальные очаги эпилептиформной активности и в меньшей степени на корковые.

Целью настоящего исследования явилось изучение электрофизиологических механизмов реализации противосудорожного действия оригинального аналога леветирацетама — соединения ГИЖ-290 с выявлением структурных мишеней мозга, на которые направлено действие соединения.

Материалы и методы / Materials and methods

Животные. Исследование проводили на аутбредных половозрелых крысах самцах массой 220–250 г, полученных из питомника Филиал «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская область). Животные содержались в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утверждёнными постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 29 августа 2014 г. № 51. Организацию и проведение работы осуществляли в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами: Приказом Минздрава РФ №199 от 1 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» и Директивой 2010/63/EU

Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Зарукосова» (Протокол №1 от 31.01.2020 г.).

Методика фокальной хронической кобальт-индуцированной эпилепсии, используемая в настоящем исследовании, моделирует парциальные (фокальные) и вторично-генерализованные судороги в хроническом эксперименте и широко используется для изучения механизмов действия противосудорожных веществ в России [15–18] и за рубежом [19–21] и рекомендована Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств, ФБГУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России [22].

Операции по вживлению долгосрочных электродов в структуры мозга крыс (в сенсомоторную зону коры левого и правого полушарий, дорзальный отдел гиппокампа, латеральные ядра гипоталамуса) осуществляли под хлоралгидратным наркозом (300 мг/кг) с помощью стереотаксического прибора по координатам атласа мозга крыс. Индифферентный электрод, используемый при монополярной записи, помещался в носовой кости черепа. Корковые электроды изготавливались из нихромовой проволоки диаметром 120 микрон, в лаковой изоляции. Кончик электрода зачищался. В качестве подкорковых электродов использовалась нихромовая проволока диаметром 70–90 микрон. Концы электродов припаивались к серебряным штырькам, которые крепились на поверхности черепа зубным висфат-цементом протакрилом. Запись биоэлектрической активности производилась в условиях свободного передвижения животного по экспериментальной камере. Для того чтобы избежать артефактов от движения штырьков, использовались специальные пружинные контакты.

Эпилептогенный очаг создавали аппликацией порошка металлического кобальта на поверхность сенсомоторной области коры левого полушария мозга крыс (ипсилатеральная кора) (рис. 1). С этой целью в кости черепа просверливалось трепанационное отверстие, в которое вводилась стеклянная канюля с порошком кобальта (диаметр канюли соответствовал диаметру отверстия и не превышал 1 мм). Канюля

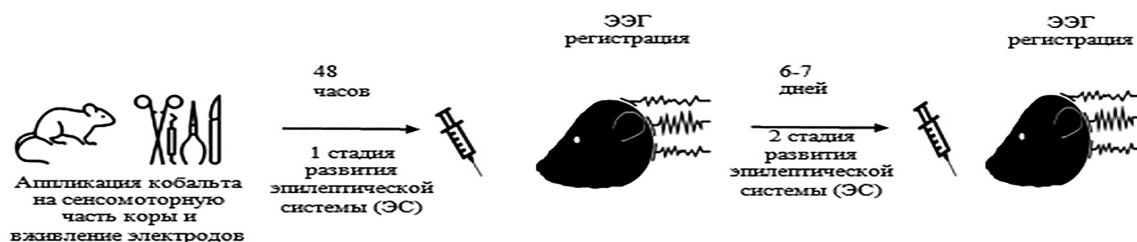


Рис. 1. Схема ЭЭГ исследований на модели хронической кобальтовой эпилепсии

Figure 1. Scheme of EEG studies on the model of chronic cobalt epilepsy

опускалась на поверхность коры (твёрдая мозговая оболочка предварительно вскрывалась тонкой инъекционной иглой). В развитии эпилептической системы, вызванной аппликацией кобальта на сенсомоторную кору мозга, выделяют несколько стадий. Основными из них являются стадия формирования первичного и вторичного эпилептогенных очагов через 48 часов после операции, стадия генерализованной эпилептиформной активности (ЭпА) в различных структурах мозга со стабильным уровнем синхронизированных пароксизмальных разрядов на 6-й день после аппликации кобальта (вторая стадия развития ЭпА).

Регистрация биопотенциалов мозга осуществлялась с помощью программно-аппаратного комплекса «Нейросенсор-Нейро-КМ» (СТАТОКИН, Россия), работающего на базе IBM-PC Intel Core i5, с установленными фильтрами на 32 Гц, с постоянной времени (0,03 с) и записью цифровой компьютерной ЭЭГ для последующей обработки данных.

Исследуемое вещество ГИЖ-290 (5 мг/кг) и леветирацетам (200 мг/кг) вводили внутривенно на 2- и 6-й день после фоновой записи, которая проводилась в течение 15–30 мин, и противосудорожный эффект соединения регистрировали через 1 и 2 часа после введения. Динамика эпилептической активности (ЭпА) у крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом и влияния на неё веществ регистрировалась через 48 часов после аппликации кобальта (1-я стадия) и через 6 дней (2-я стадия) развития эпилептической системы (ЭС). Оценивали изменение числа и длительности разрядов в минуту в следующих структурах мозга крыс: ипсилатеральной коре, контрлатеральной коре, гиппокампе и гипоталамусе.

Статистическая обработка результатов / Statistical processing of results

После проверки на нормальность распределения по критерию Шапиро–Уилка достоверность отличий между группами определяли методом двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). При статистической обработке экспериментальных данных использовали критерий Стьюдента. Подсчитывались средние значения и стандартные ошибки среднего (стандартное отклонение) ($M \pm s.e.m.$).

Результаты исследования и обсуждение / Research results and discussion

Динамика эпилептической активности (ЭпА) на модели кобальтовой эпилепсии (контрольные исследования) / Dynamics of epileptic activity (EpA) on the model of cobalt epilepsy (control studies)

Аппликация кобальта на кору головного мозга крысы вызывает гиперактивность нейронов, локализованных в месте введения, что выражается в появлении эпилептиформных пароксизмальных разрядов на

ЭЭГ. Формирующийся эпилептогенный очаг является началом развития динамической постоянно усложняющейся структурно-функциональной системы. Функциональная организация этой системы характеризуется наличием детерминантного и зависимых очагов. При этом детерминантный очаг усиливает и синхронизирует активность других очагов, объединяя их в единый комплекс.

На 1-й стадии развития Эпилептической системы (через 48 часов после аппликации кобальта) фоновая запись ЭЭГ (контроль) крыс показала, что разряды ЭпА выявлялись во всех исследуемых структурах (табл. 1) и характеризовались острыми высокоамплитудными волнами, пиками, а также синхронно возникающими пароксизмальными разрядами. Наибольшее число разрядов $5,8 \pm 0,28$ и наибольшая их продолжительность $1,33 \pm 0,47$ наблюдалась в ипсилатеральной коре, в зонах, близких месту в сенсомоторной области коры левого полушария, куда накладывали кобальт. В подкорковых структурах и контрлатеральной коре число разрядов и их длительность были значительно меньше (табл. 1). Так в гиппокампе число разрядов составило $3,72 \pm 0,37$, а длительность разрядов $0,3 \pm 0,08$.

На 2-й стадии развития Эпилептической системы в контроле (фоновая запись) у крыс отмечалось формирование вторичных очагов, регистрируемых по увеличению числа разрядов и их длительности в электрограммах контрлатеральной коры и подкорковых структурах, которые в ипсилатеральной коре были выражены в меньшей степени (табл. 2, рис. 2). Во второй стадии развития Эпи системы, в сравнении с показателями судорожной активности в первой стадии, число Эпи разрядов в контрлатеральной коре увеличилось в 2,5 раза, в гипоталамусе — в 2,5 раза и в гиппокампе — в 2 раза.

Полученные результаты свидетельствуют о перемещении генерирующих пароксизмальную активность очагов из ипсилатерального полушария в контрлатеральное полушарие и подкорковые структуры.

При наличии очага (фокальная эпилепсия) в сенсомоторной коре распространение ЭпА по коре происходит благодаря кортикальным механизмам с вовлечением интернейронов. Наряду с этим, распространение ЭпА происходит через кортикоталамо-кортикальную активацию с образованием вторичных очагов в контрлатеральной коре и подкорковых структурах, а нисходящие влияния реализуются через кортикоспинальный путь [1, 10–14]. При лимбических очагах в Эпи систему вовлекаются образования гиппокампального круга, поясная извилина, свод, передняя комиссура и другие [1, 10–14].

Влияние соединения ГИЖ-290 на динамику эпилептической активности (ЭпА) у крыс на модели кобальтовой эпилепсии / Effect of the compound GIZH-290 on the dynamics of epileptic activity (EpA) in rats on the model of cobalt epilepsy

Таблица 1

Влияние ГИЖ-290 на число и длительность судорожных разрядов на 1-й стадии формирования Эпи системы в корковых и подкорковых структурах мозга крыс

Table 1

Effect of GIZH-290 on the number and duration of convulsive discharges at the 1st stages of Epi system formation in the cortical and subcortical structures of the rat brain

Структуры мозга Brain structures	Контроль (фоновая запись) / Control (background recording)		ГИЖ-290 (5 мг/кг) через 1 час / GIZH-290 (5 mg/kg) after 1 h	
	Число разрядов ЭпА за минуту / Average number of discharges per minute	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с / Average duration of di scharges per minute	Число разрядов ЭпА за минуту / Average number of discharges per minute	Длительность разрядов ЭпА, за минуту / Average duration of dischar ges per minute
	1 стадия формирования Эпилептической системы / 1st stage of Epi system development (epileptogenesis)			
Кора ипсилатеральная / Ipsilateral cortex	5,8±0,28	1,33±0,47	7,6±0,56	1,19±0,28
Кора контрлатеральная / Contralateral cortex	4,36±2,16	0,4±0,14	3,45±1,06	0,4±0,28
Гипоталамус / Hypothalamus	3,75±0,77	0,62±0,53	4,3±0,98	0,4±0,14
Гиппокамп / Hippocampus	3,72±0,37	0,3±0,08	4,62±2,36	0,39±0,04

Таблица 2

Влияние ГИЖ-290 на число и длительность судорожных разрядов на 2-й стадиях формирования Эпи системы в корковых и подкорковых структурах мозга крыс

Table 2

Effect of GIJ-290 on the number and duration of convulsive discharges at the 2nd stage of Epi system formation in the cortical and subcortical structures of the rat brain

Структуры Мозга / Brain structures	Контроль (фоновая запись) / Control (background recording)		ГИЖ-290 (5 мг/кг) через 1 час / GIZH-290 (5 mg/kg) after 1 h	
	Число разрядов ЭпА за минуту / Average number of discharges per minute	Длительность разрядов ЭпА, за минуту, с / Average duration of disc harges per minute	Число разрядов ЭпА за минуту / Average number of discharges per minute	Длительность разрядов ЭпА, за минуту / Average duration of dis charges per minute
	2 стадия формирования Эпилептической системы / 2nd stage of Epi system development (epileptogenesis)			
Кора ипсилатеральная / Ipsilateral cortex	8,36±1,86	1,43±0,07	10,98±0,64	1,51±0,1
Кора контрлатеральная / Contralateral cortex	10,95±2,19	1,99±0,19	6,97±2,41	0,91±0,12
Гипоталамус / Hypothalamus	9,34±1,89	1,13±0,24	9,8±2,17	1,05±0,23
Гиппокамп / Hippocampus	6,87±0,39	1,03±0,09	4,74±0,72*	0,63±0,04*

Примечание: * — $p \leq 0,05$ по сравнению с фоном (парный критерий Стьюдента).

Note: * — $p \leq 0.05$ compared to the background (Student's paired test).

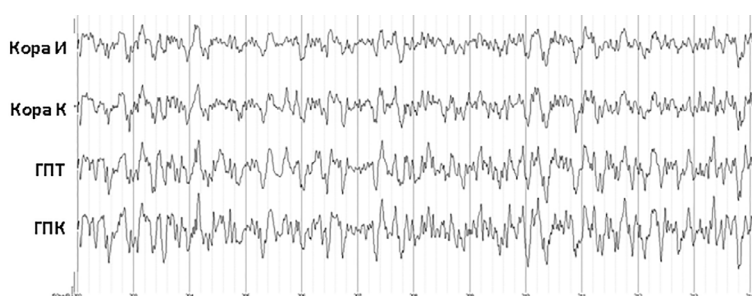


Рис. 2. Биоэлектрическая активность (фоновая запись) в структурах мозга крыс (Кора И — ипсилатеральная кора, Кора К — контрлатеральная кора, ГПТ — гипоталамус, ГПК — гиппокамп) на 2-й стадии развития Эпи системы

Figure 2. Bioelectric activity (background recording) in rat brain structures (Кора И — ipsilateral cortex, Кора К — contralateral cortex, ГПТ — hypothalamus, ГПК — hippocampus) at the 2nd stage of Epi system development

На 1-й стадии развития Эпилептической системы соединение ГИЖ-290 в дозе 5 мг/кг (внутрибрюшинно) через 1 час после введения не оказывало влияния на пароксизмальную активность крыс, индуцированную кобальтом, что регистрировалось по отсутствию изменений, по сравнению с контролем. Число Эпи разрядов и их длительность существенно не изменялась по сравнению с контролем во всех структурах мозга: ипсилатеральной коре, контралатеральной коре, гипоталамусе и гиппокампе (см. табл. 1).

На 2-й стадии формирования Эпилептической системы через 1 час после введения соединения ГИЖ-290 (5 мг/кг (внутрибрюшинно)) наблюдалось статистически достоверное ($p \leq 0,05$) уменьшение числа эпилептических разрядов (на 31 %) и длительности эпилептических разрядов (на 38 %) в гиппокампе (см. табл. 2, рис. 3). Вместе с тем, соединение ГИЖ-290 не оказывало существенного влияния на ЭПА в других исследуемых структурах мозга: ипсилатеральной коре, контралатеральной коре и гипоталамусе (см. табл. 2, рис. 3).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании данные свидетельствуют о том, что на первой стадии развития Эпи системы эпилептическая активность у контрольных крыс с кобальт-индуцированным Эпи очагом была более выражена в электрокортикограммах ипсилатеральной коры, тогда как в подкорковых структурах — латеральном гипоталамусе и дорзальном гиппокампе — эпилептиформная активность была представлена в меньшей степени. В противоположность этому, на второй стадии развития Эпи системы ЭПА была более выражена в подкорковых структурах. Полученные в настоящем исследовании данные о состоянии Эпи системы на 1-й и 2-й стадиях её развития у крыс с кобальт-индуцированным эпилептогенным очагом соответствуют результатам исследований, полученным ранее [15–21].

Установлено, что соединение ГИЖ-290 — оригинальный структурный аналог ЛЕВ на модели хронической парциальной эпилепсии, индуцированной аппликацией кобальта, уменьшает число Эпи разрядов и их длительность на 2-й, стабильной стадии развития Эпи системы. Структурой-мишенью действия соединения ГИЖ-290 являлся гиппокамп, поскольку соединение избирательно статистически значимо уменьшает как число, так и длительность Эпи раз-

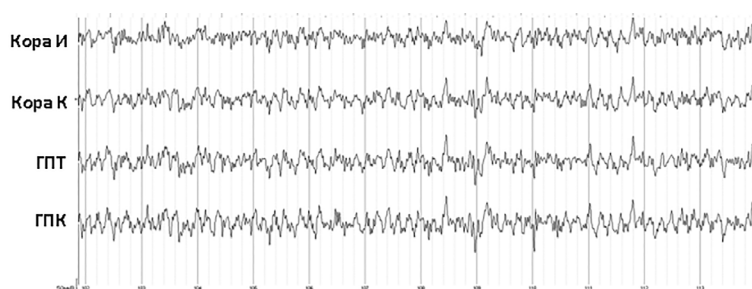
рядов только в гиппокампе и не влияет на очаги ЭПА в ипси- и контралатеральной коре и гипоталамусе. Показано, что гиппокамп, по сравнению с другими структурами мозга, имеет наиболее низкий порог возникновения эпилептических разрядов, но в тоже время клонические и тонические судороги возникают лишь при существенном увеличении электрической стимуляции [1, 10, 11].

Известно, что клинические проявления припадков и коморбидные нарушения зависят от локализации Эпи очага и от особенностей организации Эпи системы. Структурной мишенью действия соединения ГИЖ-290, также как и ЛЕВ, является гиппокамп — структура мозга, принимающая участие в различных процессах: механизмах памяти, эмоционального поведения, в регуляции вегетативных реакций, в управлении произвольными движениями и др. Наиболее ярко проявляется участие гиппокампа в процессах памяти: внимания, кратковременной памяти и её консолидации, функционировании пространственной памяти [23–26]. Уменьшение объёма гиппокампа является одним из ранних диагностических признаков при болезни Альцгеймера. При поражении гиппокампа у больных с синдромом Корсакова утрачивается память на текущие события при сохранности долговременной памяти. При двустороннем поражении гиппокампа, в частности, при хирургическом удалении очага эпилептической активности в случаях височной эпилепсии, у пациентов также возникают нарушения памяти.

В недавнем исследовании, опубликованном в 2019 г. в *Science* [26], при изучении процессов пространственной памяти у крыс с использованием различных лабиринтов, показано, что ключевым механизмом, лежащим в основе планирования действий и консолидации памяти, являются особые остроконечные пульсирующие волны в электрической активности нейронов гиппокампа. Показано, что когда у крысы начинает формироваться новая поведенческая стратегия с привлечением прошлого опыта (при её помещении в новый лабиринт) у неё в гиппокампе повышается частота длинных волн (длительностью более 100 миллисекунд). Ранее нами было показано, что ГИЖ-290 оказывает позитивное влияние на память, что выражается в способности соединения улучшать как процесс обучения, так и процесс вос-

Рис. 3. Влияние соединения ГИЖ-290 (5 мг/кг) на биоэлектрическую активность в структурах мозга крыс (Кора И — ипсилатеральная кора, Кора К — контралатеральная кора, ГПТ — гипоталамус, ГПК — гиппокамп) на 2-й стадии развития Эпи системы

Figure 3. Effect of the compound GIZH-290 (5 mg/kg) on bioelectric activity in rat brain structures (Kopa И — ipsilateral cortex, Kopa К — contralateral cortex, ГПТ — hypothalamus, ГПК — hippocampus) at the 2nd stage of Epi system development



произведения пространственного навыка в водном лабиринте Морриса [9].

Таким образом, можно полагать, что в механизм реализации противосудорожного и мнемотропного эффектов соединения ГИЖ-290 вовлекаются гиппокампальные структуры.

Работа выполнена в рамках государственного задания (проект № 0521-2019-0007) «Разработка средств лечения эпилепсии, болезни Паркинсона и аутизма на основе новых данных патогенеза заболеваний».

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Воронина Татьяна Александровна
Автор, ответственный за переписку

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-3566-6203

д. м. н., профессор, руководитель лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Voronina Tatiana A.
Corresponding author

e-mail: voroninata38@gmail.com

ORCID ID: 0000-0002-3566-6203

Dr. Sci. (Med.), professor, Head of the Laboratory of Psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литвинова Светлана Александровна

ORCID ID: 0000-0001-9139-2334

к. б. н., в. н. с. лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Litvinova Svetlana A.

ORCID ID: 0000-0001-9139-2334

PhD in Biological Sci., leading researcher Laboratory of Psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Гладышева Наталия Анатольевна

Лаборант исследователь лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Gladysheva Natalia A.

Laboratory assistant researcher of the Laboratory of Psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Яковлева Алла Анваровна

Лаборант исследователь лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», Москва, Россия

Yakovleva Alla A.

Laboratory assistant researcher of the Laboratory of Psychopharmacology FSBI «Zakusov Institute of Pharmacology», Moscow, Russia

Литература / References

1. Карлов В.А. *Эпилепсия у детей и взрослых женщин и мужчин: руководство для врачей*. — М.: Медицина; 2019. — 893 С. [Karlov VA. *Epilepsy in children and adult women and men: a guide for doctors*. Moscow: Medicine; 2019. (In Russ).]
2. Авакян Г.Н., Воронина Т.А., Хромых Е.А. *Эпилепсии. Патогенез. Патогенетическая терапия. Пособие для врачей*. — М.: 2007. — 148 С. [Avakyan GN, Voronina TA, Khromykh EA. *Epilepsii. Patogenez. Patogeneticheskaya terapiya. Posobie dlya vrachei*. Moscow: 2007. (In Russ).]
3. ВОЗ World Health Organization. International Classification of Functioning Disability and Health. 2017.
4. Hauser WF. The descriptive epidemiology of epilepsy. *Epilepsy: translational, clinical and social aspects. Proceeding of the conference Moscow*. 2013;83—117.
5. Wolf P. Nosology of the epilepsies and its reflection in classification. *Comprehensive Epileptology. Proceeding of the conference Saint Petersburg*. 2011;181—189.
6. Kwan P, Brodie MJ. Refractory epilepsy: mechanisms and solutions. *Expert Rev Neurother*. 2006;6(3):397—406. DOI: 10.1586/14737175.6.3.397.
7. De Smedt T, Raedt R, Vonck K, Boon P. Levetiracetam: part II, the clinical profile of a novel anticonvulsant drug. *CNS Drug Rev*. 2007;13(1):57—78. DOI: 10.1111/j.1527-3458.2007.00005.x.

8. Mohanraj R, Parker PG, Stephen LJ, Brodie MJ. Levetiracetam in refractory epilepsy: a prospective observational study. *Seizure*. 2005;14(1):23—27. DOI: 10.1016/j.seizure.2004.02.006.

9. Ковалев И.Г., Воронина Т.А., Литвинова С.А., Жмуренко Л.А., Мокров Г.В. Сравнение противосудорожных и мнемотропных свойств новых производных 4-фенилпирролидона, леветиретама и пиретама. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2017;80(6):13—18. [Kovalev IG, Voronina TA, Litvinova SA, Zhmurenko LA, Mokrov GV. Comparison of the anticonvulsant and mnemotropic properties of new derivatives of 4-phenylpyrrolidone, Levetiracetam, and Piracetam in outbred mice and rats. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2017;80(6):13—18. (In Russ).] DOI: 10.30906/0869-2092-2017-80-6-13-18

10. Крыжановский Г.Н. Детерминантные структуры в патологии нервной системы. — М.: Медицина; 1980, 359 С. [Kryzhanovsky GN. *Determinantnye struktury v patologii nervnoy sistemy*. Moscow: Medicine; 1980. (In Russ).]

11. Крыжановский Г.Н. Дисрегуляторная патология. — М.: Медицина; 2002, 247 С. [Kryzhanovsky GN. *Disregulyacionnaya patologiya*. Moscow: Medicine; 1980. (In Russ).]

12. Неробкова Л.Н., Авакян Г.Г., Воронина Т.А., Авакян Г.Н. Клиническая электроэнцефалография. Фармакоэлектроэнцефалография. — М.: ГЭОТАР-Медиа; 2020. — 288 с. (Серия «Библиотека врача-специалиста»). [Nerobkova LN, Avakyan GG, Voronina TA, Avakyan GN.

Klinicheskaya elektroencefalografiya. Farmakoelektroencefalografiya. Moscow: GEOTAR-Media; 2020. (In Russ).]

13. Воронина Т.А., Авакян Г.Г., Неробкова Л.Н., Литвинова С.А., Авакян Г.Н. Новые биомолекулярные мишени для создания противоэpileптических препаратов. *Эpileпсия и пароксизмальные состояния*. 2015;7(4):59–65. [Voronina TA., Avakyan GG, Nerobkova LN, Litvinova SA, Avakyan GN. New biomolecular targets for antiepileptic drugs. *Epilepsy and Paroxysmal conditions*. 2015;7(4):59–65. (In Russ).]. DOI: 10.17749/2077-8333.2015.7.4.059-065.

14. Lason W, Chlebicka M, Rejdak K. Research advances in basic mechanisms of seizures and antiepileptic drug action. *Pharmacol Rep*. 2013;65(4):787–801. DOI: 10.1016/s1734-1140(13)71060-0.

15. Литвинова С.А., Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Кутепова И.С., Авакян Г.Г., Авакян Г.Н. Особенности действия левитинола на развитие судорожной активности у крыс с кобальт-индуцированной хронической эpileпсией. *Эpileпсия и пароксизмальные состояния*. 2018;10(1):52–62. [Litvinova SA, Voronina TA, Nerobkova LN, Kutepova IS, Avakyan GG, Avakyan GN. Effects of levetinol on epileptiform activity of the brain in rats with cobalt-induced epilepsy. *Epilepsy and paroxysmal conditions*. 2018;10(1):52–62. (In Russ).]. DOI: 10.17749/2077-8333.2018.10.1.052-062.

16. Litvinova Svetlana, Voronina Tatyana, Nerobkova Lubov, Kutepova Inga, Avakyan Georgii, and Avakyan Gagik. Levetiracetam effect and electrophysiological mechanism of action in rats with cobalt-induced chronic epilepsy. *Eur J Pharmacol*. 2019;854:380–386. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.04.041.

17. Авакян Г.Н., Неробкова Л.Н., Воронина Т.А., Маркина Н.В., Митрофанов А.А. Влияние карбамазепина на структурно-функциональные связи в развитии эpileптической системы. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2002;65(2):7–10. [Avakyan GN, Nerobkova LN, Voronina TA, Markina NV, Mitrofanov AA. The effect of carbamazepine on structural and functional connections in the development of the epileptic system. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2002;65(2):7–10. (In Russ).]

18. Воронина Т.А., Стойко М.И., Неробкова Л.Н., Авакян Г.Н., Крайнева В.А. Анализ влияния фенитоина на распространение судорог и эpileптический статус, вызванный нейротоксином гомоцистеи-

ном тилактоном у крыс с кобальтовой эpileпсией. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2003;66(1):5–8. [Voronina TA, Stoiko MI, Nerobkova LN, Avakyan GN, Kraineva VA. Analysis of the effect of phenytoin on the spread of seizures epileptic status caused by the neurotoxin homocysteine thialactone in rats with cobalt epilepsy. *Experimental and Clinical Pharmacology*. 2003;66(1):5–8. DOI: 10.30906/0869-2092-2002-65-1-15-18

19. Bregman B, F Le Saux, Trottier S, Chauvel P, Maurin Y. Chronic Cobalt-induced Epilepsy: Noradrenaline Ionophoresis and Adrenoceptor Binding Studies in the Rat Cerebral Cortex. *J Neural Transm*. 1985;63(2):109–118. DOI: 10.1007/BF01252611.

20. Hyon Mee Chun, Jae Moon Kim1, Young Ho Lee. Pattern of Hippocampal Cell Changes in Cobalt / Homocysteine induced Status Epilepticus. *The Korean J. Anat*. 2002;35(1): 37–42.

21. Walton NY, Jaing Q, Hyun B, Treiman DM. Lamotrigine vs. phenytoin for treatment of status epilepticus: comparison in an experimental model. *Epilepsy Res*. 1996;24(1):19–28. DOI: 0.1016/0920-1211(96)00007-1.

22. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. — М.: Гриф и К; 2012; Часть 1. Глава 14: С.235–350. [Voronina TA, Nerobkova LN. Guidelines for the preclinical study of anticonvulsant activity of drugs. Guidelines for preclinical studies of drugs. Moscow: Grif I K; 2012; Part 1. Chapter 14: p. 235–350 (In Russ).]

23. Виноградова О.С. Гиппокамп и память. — М.: Наука; 1975, 388 С. [Vinogradova OS. Gippokamp i pamyat'. Nauka. 1975. (In Russ).]

24. Broadbent NJ, Squire LR, Clark RE. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(40):14515–14120. DOI: 10.1073/pnas.0406344101.

25. Mizuno K, Giese K.P. Hippocampus-dependent memory formation: do memory type-specific mechanisms exist? *J Pharmacol Sci*. 2005;98(3):191–197. DOI: 10.1254/jphs.crj05005x.

26. Fernández-Ruiz A, Oliva A, Fermino de Oliveira E, Rocha-Almeida F, Tingley D, Buzsáki G. Long-duration hippocampal sharp wave ripples improve memory. *Science*. 2019;364(6445):61082–1086. DOI: 10.1126/science.aax0758.

Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС

Мыльников П. Ю., Транова Ю., Шулькин А. В., Якушева Е. Н.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, Россия

Аннотация. Актуальность. BCRP – эффлюксный белок-транспортёр, играющий важную роль в фармакокинетике широкого спектра лекарственных веществ. Активность BCRP в опытах *in vitro* оценивается по транспорту субстратов белка-транспортёра (метотрексата и др.) через билипидную мембрану клеток, гиперэкспрессирующих BCRP, например, клетках линии Сасо-2. Цель: разработать и валидировать методику количественного определения субстрата BCRP – метотрексата в транспортной среде клеток линии Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС. Методы исследования. Работа выполнена на ВЭЖХ-хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США) с tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США). Условия хроматографического анализа были следующими: колонка UCT Selectra C18 4,6 mm × 100 mm 5µm, 100A, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, температура разделения – 35 °C, скорость потока – 0,3 мл/мин, объём вводимой пробы – 2 мкл, время анализа – 10 мин. Использовали градиентный режим элюирования: соотношение раствора 0,1 % муравьиной кислоты и ацетонитрила составило на 0 мин 75 и 25 %; 0,4 мин – 60 и 40 %; 6 мин – 20 и 80 %; 8 мин – 75 и 25 %. В данных условиях время удерживания метотрексата – 3,11 мин. Условия детектирования: метотрексат – положительный режим ионизации, 455,15 m/z → 308,125 m/z, энергия столкновения – 22,99 В, фрагментация источника – 5, давление CID-газа – 2 мТорр. Извлечение метотрексата из транспортной среды (раствор Хэнкса с 25 мМ Хепес и 1 % диметилсульфоксида) после инкубирования с клетками линии Сасо-2 в течение 3 ч осуществляли смесью метанол+вода в соотношении 1:1. Результаты. Разработанная методика была валидирована по следующим параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов. Подтверждённый аналитический диапазон методики составил 60–10 000 нмоль/л в транспортной среде. Выводы: разработана и валидирована методика количественного определения метотрексата в транспортной среде клеток линии Сасо-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Ключевые слова: метотрексат; ВЭЖХ-МС/МС; клетки линии Сасо-2; BCRP

Для цитирования:

Мыльников П.Ю., Транова Ю., Шулькин А.В., Якушева Е.Н. Разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде методом ВЭЖХ-МС/МС. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2021;(1):45–51. <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-45-51>

Поступила: 01 ноября 2020 г. **Принята:** 15 ноября 2020 г. **Опубликована:** 20 февраля 2021 г

Development and validation of the method for the quantitative determination of methotrexate in a transport medium by HPLC-MS/MS

Mylnikov PYu, Tranova Yu, Shchulkin AV, Yakusheva EN

FSBEI HE "I.P. Pavlov Ryazan State Medical University" of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Ryazan, Russia

Abstract. Relevance. BCRP is an efflux transporter protein that plays an important role in the pharmacokinetics of a wide range of drugs. The BCRP activity *in vitro* experiments is assessed by the transport of transporter protein substrates (methotrexate, etc.) across the bilipid membrane of cells overexpressing BCRP, for example, Caco-2 cells. The aim is to develop and validate a method for the quantitative determination of the BCRP substrate, methotrexate, in the transport medium of Caco-2 cells by HPLC-MS/MS. Methods. The work was performed on an Ultimate 3000 HPLC chromatograph (ThermoFisher, USA) with a TSQ Fortis tandem mass-selective detector (ThermoFisher, USA). The conditions of chromatographic analysis were as follows: column UCT Selectra C18 4.6 mm * 100 mm 5µm, 100A, Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, separation temperature 35 °C, flow rate 0.3 ml/min, injected sample volume - 2 µl, analysis time - 10 min. Used a gradient elution: the ratio of the solution of 0.1 % formic acid and acetonitrile was at 0 min 75 and 25 %; 0.4 min 60 and 40 %; 6 minutes 20 and 80 %; 8 minutes 75 and 25 %. Under these conditions, the retention time of methotrexate is 3.11 minutes. Detection conditions: methotrexate - positive ionization mode, 455.15 m / z → 308.125 m / z, collision energy 22.99 V, source fragmentation 5, CID gas pressure 2 mTorr. The extraction of methotrexate from the transport medium (Hanks solution with 25 mM Hepes and 1% dimethyl sulfoxide) after incubation with Caco-2 cells for 3 h was carried out with a mixture of methanol + water in a ratio of 1: 1. Results. The developed method was validated according to the following parameters: selectivity, linearity, accuracy, precision, limit of quantitative determination, sample transfer, sample stability. The confirmed analytical range of the method was 60 -10,000 nmol / L in the transport medium. Conclusions: a method for the quantitative determination of methotrexate in the transport medium of Caco-2 cells by HPLC-MS / MS was developed and validated.

Keywords: methotrexate; HPLC-MS/MS; Caco-2 cells; BCRP

For citations:

Mylnikov PYu, Tranova Yu, Shchulkin AV, Yakusheva EN. Development and validation of the method for the quantitative determination of methotrexate in a transport medium by HPLC-MS/MS. *Farmakokinetika i farmakodinamika*. 2021;(1):45–51. (In Russ). <https://doi.org/10.37489/2587-7836-2021-1-45-51>

Received: November 01, 2020. **Accepted:** November 15, 2020. **Published online:** February 20, 2021

Введение / Introduction

Белок устойчивости к раку молочной железы (BCRP, ABCG2) является одним из важнейших представителей суперсемейства ABC-транспортёров, который участвует в эффлюксе ксенобиотиков. BCRP был первоначально обнаружен в 1998 году в клетках рака молочной железы, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [1]. В дальнейшем было показано, что BCRP экспрессируется в синцитиотрофобластах плаценты, на апикальной мембране эпителия тонкой кишки, на билиарной мембране гепатоцитов, в мембране эндотелиальных клеток микрососудов головного мозга человека [2, 3]. Такая локализация данного белка-транспортёра в тканях организма указывает на то, что BCRP, помимо участия в развитии резистентности опухолей к химиотерапии, также играет важную роль в фармакокинетике — абсорбции, распределении и удалении лекарственных веществ, являющихся его субстратами.

BCRP имеет широкий спектр субстратов, который постоянно увеличивается с момента его открытия. К ним относят: митоксантрон, топотекан, метотрексат, нитрофурантоин, празозин, глибурид, циметидин, флавоноиды, порфирины, эстрон-3-сульфат (E1S) и др. [4, 5].

Учитывая вышеизложенное, для повышения безопасности терапии в США и Европе рекомендуется все новые лекарственные препараты тестировать на принадлежность к субстратам и ингибиторам BCRP. При этом первоначально исследования проводят на клетках, гиперэкспрессирующих данный белок-транспортёр, а затем при положительных результатах *in vitro* — на добровольцах [5].

Согласно рекомендациям FDA, в качестве тест системы *in vitro* могут использоваться клетки линии Caco-2 (аденокарциномы ободочной кишки человека) [6], а в качестве субстрата BCRP рекомендуется метотрексат [5].

Поэтому целью настоящего исследования явилась разработка и валидация методики количественного определения метотрексата в транспортной среде для клеток линии Caco-2 методом ВЭЖХ-МС/МС.

Материалы и методы / Material and methods

Использованные реактивы и оборудование / Reagents and equipment used

В исследовании использовали субстанцию метотрексата («Sigma Aldrich», Германия). Структурная формула метотрексата представлена на рис. 1.

Для выполнения ВЭЖХ использовали следующие реактивы: Вода ВЭЖХ-МС («Panreac», Испания), кислота муравьиная 98 % для аналитики («Panreac», Испания), ацетонитрил для UV-IR-HPLC («Panreac», Испания), метанол для HPLC («Merck», Германия).

Работа выполнена на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Ultimate 3000» («ThermoFisher», США), оснащённом градиентным насосом, дегазатором, автосамплером, УФ-детектором и tandemным масс-селективным детектором TSQ Fortis («ThermoFisher», США).

Управление совмещённой системой ВЭЖХ-МС/МС и обработку данных проводили при помощи программного обеспечения «Thermo Scientific Xcalibur (ver. 4.2.47)».

Условия хроматографического анализа были следующими.

Колонка UCT Selectra C18 4,6 mm×100 mm 5 um, 100A, предколонка Selectra C18 Guard Cartridges SLC-18GDC46-5UM, температура разделения — 35 °C. Скорость потока — 0,3 мл/мин.

Использовали градиентный режим элюирования по следующей программе (табл. 1).

Ионизацию молекул проводили в режиме положительной ионизации на электроспрее при атмосферном давлении.

Режим детектирования: sheath gas (оболочечный газ) — 35 л/мин, aux gas (вспомогательный газ) — 7 л/мин, sweep gas (продувочный газ) 0 л/мин, температура трубки для переноса ионов — 300 °C, температура испарителя — 350 °C.

Условия детектирования: метотрексат — положительный режим ионизации, 455,15 m/z → 308,125 m/z, энергия столкновения — 22,99 В, фрагментация источника — 5, CID gas — 2 mTorr.

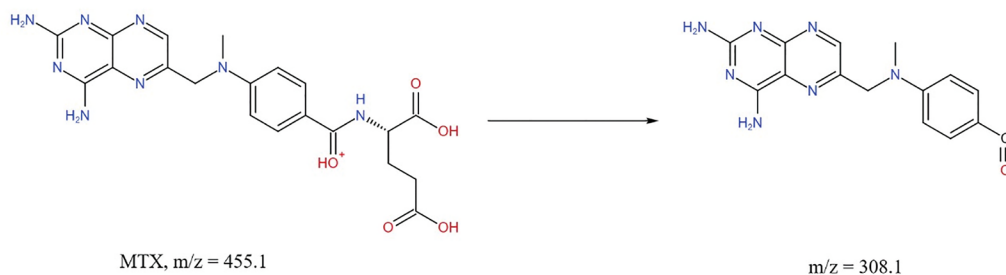


Рис. 1. Структурная формула метотрексата и основного продукта его фрагментации
Figure 1. Structure of methotrexate and the main product of its fragmentation

Таблица 1

Соотношение компонентов подвижной фазы в зависимости от времени, прошедшего с начала хроматографического анализа

Table 1

The ratio of the components of the mobile phase depending on the time elapsed since the beginning of the chromatographic analysis

Время / Time	Раствор муравьиной кислоты 0,1 % / Solution formic acid 0.1 %	Ацетонитрил / Acetonitrile
0,0 мин	75 %	25 %
0,4 мин	60 %	40 %
6,0 мин	20 %	80 %
8,0 мин	75 %	25 %

Скорость потока: 0,3 мл/мин, объём вводимой пробы составил 2 мкл.

Время анализа — 10 мин.

В данных условиях время удерживания метотрексата составило 3,11 мин.

Пробоподготовка / Sample Preparation

В качестве матрицы использовали транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ Хепес («Sigma-Aldrich», Германия) и 1 % диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия), после инкубирования с клетками линии Сасо-2 в течение 3 ч. Образцы матрицы замораживали и хранили при -80°C до анализа.

Извлечение метотрексата из транспортной среды осуществляли смесью метанол+вода в соотношении 1:1. Для этого к 50 мкл образца транспортной среды добавляли 950 мкл смеси метанол : вода, тщательно перемешивали на встряхивателе Vortex (Heidolph, Германия), после чего центрифугировали в течение 10 мин при скорости 13000 g на центрифуге Avanti JXN-3 Beckman Coulter («Beckman Coulter», США). Надосадочную жидкость переносили в вials объёмом 1 мл и помещали в автосамплер.

Приготовление сток-раствора (матричного раствора) и калибровочных растворов / Preparation of stock solution (matrix solution) and calibration solutions

2,3 мг метотрексата растворяли в 5 мл метанола для получения раствора 0,46 мг/мл или 10^{-6} моль/мл или 1 ммоль/л, а затем к 1 мл полученного раствора добавляли 9 мл смеси вода : метанол (1:1) для получения раствора 100 мкмоль/л. Из него готовили калибровочные растворы. Матричный раствор хранили при температуре -20°C .

В работе использовали следующие калибровочные стандарты: 60, 100, 200, 600, 1000, 2000 и 10 000 нмоль/л.

Калибровочные стандарты для валидации были приготовлены путём последовательного разбавления матричного раствора транспортной средой. Диапазон концентраций метотрексата выбирался ис-

ходя из концентраций, ожидаемых в исследовании на клетках линии Сасо-2. Концентрации целевых соединений в анализируемых пробах определяли методом абсолютной калибровки.

Валидация / Validation

Валидацию биоаналитической методики проводили на основе Руководства по экспертизе лекарственных средств, том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, 2016, а также Руководств FDA Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evolution and Research (CDER). U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018 и EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011 по следующим параметрам [7–10]:

- селективность;
- калибровочная кривая (линейность);
- нижний предел количественного определения;
- точность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- прецизионность (на уровнях внутри цикла, между циклов);
- перенос пробы;
- стабильность образцов.

Результаты и обсуждение / Results and discussion

Селективность. Проводили анализ холостой пробы транспортной среды без добавления стандарта метотрексата и образцов транспортной среды с добавлением метотрексата до конечных концентраций 60–10000 нмоль/л. На хроматограммах образцов холостой транспортной среды не наблюдалось пиков со временем удерживания, соответствующим времени удерживания метотрексата (рис. 2, 3).

Предел обнаружения метотрексата в транспортной среде при помощи используемой аналитической методики составил 20 нмоль/л, при этом соотношение сигнала к шуму (базовой линии) было не менее 3.

Нижний предел количественного определения метотрексата составил 60 нмоль/л. При этом отношение сигнала к шуму было не ниже 10, а точность и прецизионность определения не превышали 20 %.

Калибровочная кривая. Проводили анализ 7 образцов холостой транспортной среды с добавлением матричного раствора метотрексата до получения концентраций — 60, 100, 200, 600, 1000, 2000, 10 000 нмоль/л. По полученным значениям были построены калибровочные графики в координатах зависимость площадь пика метотрексата от концентрации метотрексата. Были получены следующие уравнения линейной регрессии: $y = 276,898 + 31,4557 \cdot x$,

$R^2 = 0,9993$, $W = 1/x$; $y = -2,62086 + 31,1129 \cdot x$,
 $R^2 = 0,9991$, $W = 1/x$; $y = -98,8244 + 31,5429 \cdot x$,
 $R^2 = 0,9989$, $W = 1/x$. Рассчитанные коэффициенты корреляции соответствовали принятой норме (не менее 0,99). Отклонения концентраций калибровочных образцов, рассчитанные по уравнению линейной зависимости, от номинальных значений приведены в табл. 2.

Точность и прецизионность. Выполняли анализ образцов транспортной среды с добавлением стандартных растворов метотрексата до получения концентраций 60, 200, 4800 и 8000 нмоль/л. Анализ выполняли в рамках трёх циклов. В первом цикле оценивали прецизионность и точность внутри цикла, для этого анализировали по 5 образцов для каждой концентрации метотрексата. Во втором и третьем цикле тестировали прецизионность и точность между циклами. Полученные величины прецизионности (относительного

стандартного отклонения) и точности (относительной погрешности) соответствовали принятым нормам (не более 20 % для нижнего предела количественного определения и не более 15 % — для остальных точек) (табл. 3, 4).

Стабильность. Для оценки стабильности метотрексата в транспортной среде при хранении в замороженном состоянии готовили образцы с концентрацией метотрексата 60, 200, 4800 и 8000 нмоль/л. Половину образцов анализировали сразу после приготовления, а остальные — после хранения в замороженном состоянии (при -80°C) в течение 60 дней. Исследовали по 3 независимых образца. Рассчитанные концентрации метотрексата до и после заморозки статистически значимо не различались.

Перенос пробы. При последовательном анализе пробы с концентрацией метотрексата 10 000 нмоль/л

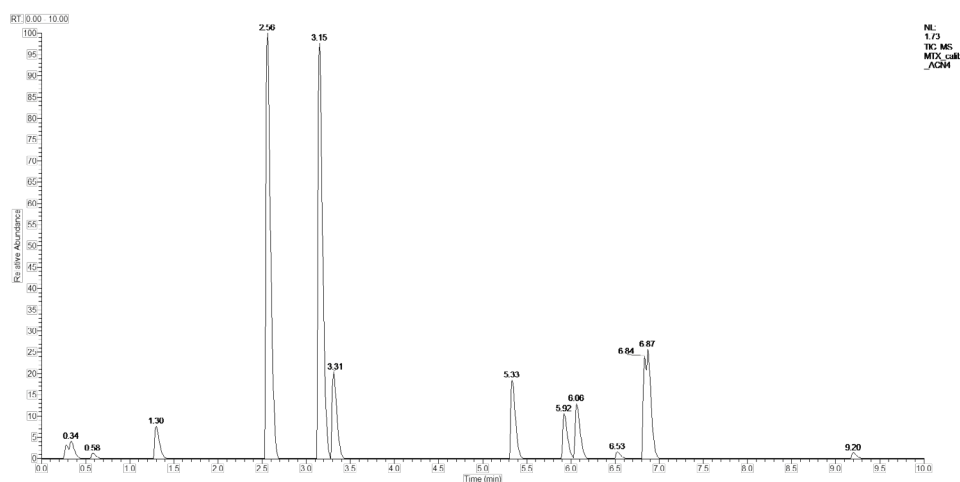


Рис. 2. Хромотограмма холостой транспортной среды
Figure 2. Chromatogram of the blank transport medium

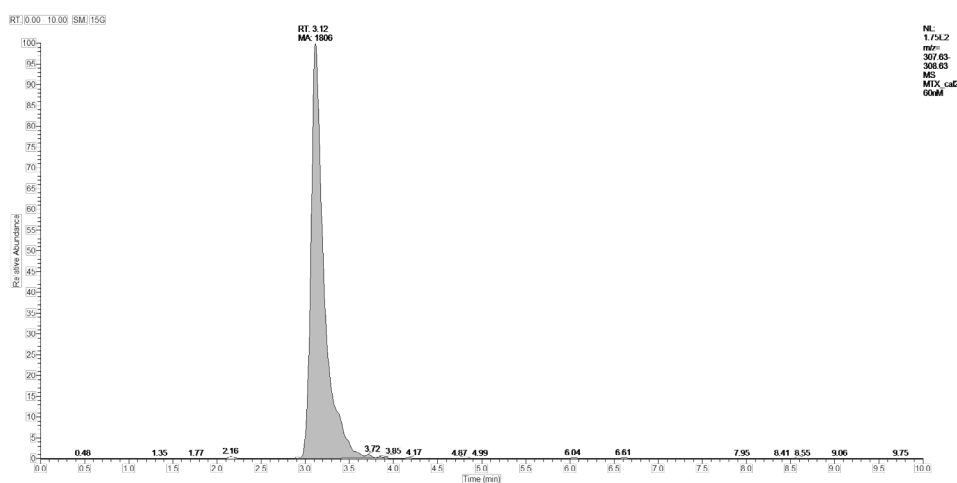


Рис. 3. Хромотограмма холостой транспортной среды с добавлением стандарта метотрексата до конечной концентрации 60 нмоль/л
Figure 3. Chromatogram of a blank transport medium with the addition of a methotrexate standard to a final concentration of 60 nmol/L

Таблица 2

Отклонения концентраций метотрексата в калибровочных образцах от их номинальных значений

Table 2

Deviations of methotrexate concentrations in calibration samples from their nominal values

Концентрация номинальная, нмоль/л / Nominal concentration, nmol/l	График 1		График 2		График 3	
	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность / Accuracy	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность / Accuracy	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность / Accuracy
60,0	59,8	0,36	70,4	17,3	65,9	9,8
100,0	100,1	0,12	96,8	3,19	102,9	2,9
200,0	191,4	4,3	193,7	3,16	184,1	7,96
600,0	658,0	9,7	572,1	4,7	626,8	4,47
1000,0	948,7	5,1	968,4	3,16	947,9	5,2
2000,0	1999,9	0,01	1907,9	4,6	1891,1	5,4
10 000,0	10 002,1	0,02	10 150,7	1,5	10141,2	1,41

Таблица 3

Точность и прецизионность методики количественного определения метотрексата в транспортной среде внутри цикла

Table 3

Accuracy and precision of the method for quantitative determination of methotrexate in the transport medium within the cycle

Концентрация номинальная, нмоль/л / Nominal concentration, nmol/l	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность, % / Accuracy, %	Среднее, нмоль/л / Mean, nmol/l	Средняя точность, % / Mean accuracy, %	SD	Прецизионность, % / Precision, %
60,0	69,5	15,78	67,2	11,9	3,1	5,1
	63,6	6,1				
	71,1	18,5				
	65,2	8,7				
	66,4	10,7				
200,0	209,9	4,9	210,5	5,3	17,7	8,8
	211,9	5,9				
	222,3	11,1				
	181,6	9,2				
	227,0	13,5				
4800,0	5148,1	7,3	4990,2	3,9	121,9	2,5
	4937,3	2,9				
	4825,6	0,5				
	4982,1	3,8				
	5058,1	5,38				
8000,0	7806,3	2,4	7717,6	3,5	267,1	3,3
	7768,6	2,9				
	7266,2	9,17				
	7767,6	2,9				
	7979,5	0,26				

Таблица 4

Точность и прецизионность методики количественного определения метотрексата в транспортной среде между циклами

Table 4

Accuracy and Precision of Methotrexate Quantification Method in Transport Medium Between Cycles

Концентрация номинальная, нмоль/л / Nominal concentration, nmol/l	Концентрация рассчитанная, нмоль/л / Calculated concentration, nmol/l	Точность, % / Accuracy, %	Среднее, нмоль/л / Mean, nmol/l	Средняя точность, % / Mean accuracy, %	SD	Прецизионность, % / Precision, %
60,0	67,2	11,9	68,1	13,6	1,9	3,1
	66,9	11,5				
	70,3	17,3				
200,0	210,5	5,3	195,2	2,4	14,4	7,2
	181,9	9,02				
	193,1	3,47				
4800,0	4990,2	3,9	4877,5	1,6	97,6	2,0
	4818,2	0,38				
	4824,2	0,5				
8000,0	7717,6	3,5	7761,9	2,9	38,4	0,5
	7783,1	2,7				
	7785,2	2,68				

и образца чистой транспортной среды на хроматограмме чистой транспортной среды отсутствовали пики, соответствующие по времени удерживания пикам метотрексата.

Заключение / Conclusion

Разработана и валидирована методика количественного определения метотрексата в транспортной среде клеток линии Сасо-2. Экстракция метотрексата выполнялась добавлением к пробе смеси метанола и воды в соотношении 1:1. Количественное определение проводилось методом ВЭЖХ-МС/МС. Разработанная методика была валидирована по следующим валидационным параметрам: селективность, линейность, точность, прецизионность, предел количественного определения, перенос пробы, стабильность образцов.

Подтверждённый аналитический диапазон методики составил 60–10 000 нмоль/л в транспортной среде. Полученный аналитический диапазон позволяет применять разработанную методику для оценки концентрации метотрексата в транспортной среде при изучении влияния тестируемых веществ на активность белка-транспортера BCRP.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ / ADDITIONAL INFORMATION

Участие авторов. Мыльников П.Ю. — разработка и валидация методики; Транова Ю. — культивирование клеток линии Сасо-2, работа с хроматографом; Шулькин А.В. — анализ полученных данных, написание статьи; Якушева Е.Н. — общее руководство работой, редактирование статьи.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Мыльников Павел Юрьевич
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-7829-2494
SPIN-код: 8503-3082

ассистент кафедры фармакологии с курсом фармации факультета дополнительного профессионального образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России, Рязань, Россия

Mylnikov Pavel Yu.
e-mail: dukeviperlr@gmail.com
ORCID ID: 0000-0001-7829-2494
SPIN code: 8503-3082

assistant of the Department of Pharmacology with the course of Pharmacy of the Faculty of Additional Professional Education FSBEI HE RyazSMU MOH Russia, Ryazan, Russia

Транова Юлия

e-mail: yulyatran@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-5068-1201

очный аспирант кафедры фармакологии
с курсом фармации факультета
дополнительного профессионального
образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
России, Рязань, Россия

Tranova Julia

e-mail: yulyatran@gmail.com

ORCID ID: 0000-0001-5068-1201

full-time postgraduate student of the Department
of Pharmacology with the course of Pharmacy of
the Faculty of Additional Professional Education
FSBEI HE RyazSMU MOH Russia, Ryazan, Russia

Шулькин Алексей Владимирович

Автор, ответственный за переписку

e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

ORCID ID: 0000-0003-1688-0017

SPIN-код: 2754-1702

д. м. н., профессор, доцент кафедры
фармакологии с курсом фармации факультета
дополнительного профессионального
образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
России, Рязань, Россия

Shchulkin Alexey V.

Corresponding author

e-mail: alekseyshulkin@rambler.ru

ORCID ID: 0000-0003-1688-0017

SPIN code: 2754-1702

Dr. Sci. (Med.), Professor, associate Professor of
the Department of Pharmacology with the course
of Pharmacy of the Faculty of Additional Profes-
sional Education FSBEI HE RyazSMU MOH
Russia, Ryazan, Russia

Якушева Елена Николаевна

e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

ORCID ID: 0000-0001-6887-4888

SPIN-код: 2865-3080

д. м. н., профессор, зав. кафедрой
фармакологии с курсом фармации факультета
дополнительного профессионального
образования ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава
России, Рязань, Россия

Yakusheva Elena N.

e-mail: e.yakusheva@rzgmu.ru

ORCID ID: 0000-0001-6887-4888

SPIN code: 2865-3080

Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Depart-
ment of Pharmacology with the course of Phar-
macy of the Faculty of Additional Professional
Education FSBEI HE RyazSMU MOH Russia,
Ryazan, Russia

Литература / References

1. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95(26):15665–15670. DOI: 10.1073/pnas.95.26.15665.
2. Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res*. 2001;61(8):3458–3464.
3. Scheffer GL, Scheper RJ. Drug resistance molecules: lessons from oncology. *Novartis Found Symp*. 2002;243:19–31.
4. Chen ZS, Robey RW, Belinsky MG et al. Transport of methotrexate, methotrexate polyglutamates, and 17beta-estradiol 17-(beta-D-glucuronide) by ABCG2: effects of acquired mutations at R482 on methotrexate transport. *Cancer Res*. 2003;63(14):4048–4054.
5. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Guidance for Industry Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations, 2012, 75 P.
6. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). *In Vitro*

Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry, 2020, 43 P.

7. Изучение биоэквивалентности воспроизведенных лекарственных средств. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К; 2013. — 328 с. [Izuchenie bioekvivalentnosti vosproizvedennykh lekarstvennykh sredstv. Rukovodstvo po ekspertize lekarstvennykh sredstv. Tom I. Moscow: Grif i K; 2013. (In Russ).]

8. Руководства по экспертизе лекарственных средств Том I, правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза, Совет Евразийской экономической комиссии, решение от 3 ноября 2016 №85. [Rukovodstva po ekspertize lekarstvennykh sredstv Tom I, pravil provedeniya issledovaniy bioekvivalentnosti lekarstvennykh preparatov v ramkakh Evraziiskogo ekonomicheskogo soyuza, Sovet Evraziiskoi ekonomicheskoi komissi, reshenie ot 3 noyabrya 2016 №85. (In Russ).]

9. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). Bioanalytical method validation. U.S. Government Printing Office: Washington, DC, 2018, 41 P.

10. EMA Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency. Committee for medicinal products for human use: London, 2011, 23 P.

ПАМЯТИ

Юрия Николаевича ЧЕРНОВА

5 ноября 1937 г. – 1 января 2021 г.

In Memory of Chernov Yuri Nikolaevich

(05.11.1937 – 01.01.2021)



1 января 2021 г. ушёл из жизни профессор **Юрий Николаевич Чернов**, доктор медицинских наук, заслуженный врач РФ, академик Международной академии человека в аэрокосмических системах, член-корреспондент РАЕН, Почётный доктор Государственного научно-исследовательского Испытательного института Военной Медицины Министерства Обороны, специалист в области клинической фармакологии и авиакосмической радиобиологии, почётный профессор Воронежского государственного медицинского университета имени Н. Н. Бурденко.

Юрий Николаевич Чернов родился 5 ноября 1937 г. в городе Воронеже. Стремление к научно-исследовательской работе проявилось уже в школьные годы, за работы по биологии награждён почётной грамотой ЦК ВЛКСМ (1954), бронзовой медалью участника ВДНХ (1954).

После окончания Воронежского медицинского института 1961 году по специальности «лечебное дело» работал врачом-терапевтом. В январе 1964 года поступил в аспирантуру при кафедре фармакологии Воронежского медицинского института, в 1971 году защитил диссертацию на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по теме «Влияние пчелиного яда (апизартрона) и его сочетания с маточным молочком (апилаком) на течение и исход экспериментального миокардита». Работа была, издана на пяти языках, получила признание на XXIII Международном конгрессе по пчеловодству Апимондия, Москва (1971).

С 1971 г. по 1987 г. Юрий Николаевич Чернов, работая ассистентом, старшим преподавателем, доцентом кафедры фармакологии, сочетает научно-исследовательскую, педагогическую работу с организационной и общественной деятельностью. С 1973 года был назначен заместителем декана, с 1992 г. по 2006 г. трижды был избран деканом лечебного факультета Воронежской государственной медицинской академии.

Юрий Николаевич Чернов 33 года работал в деканате самого большого лечебного факультета ВГМУ им. Н.Н. Бурденко.

Будучи выдающимся организатором и разносторонне эрудированным человеком, Юрий Николаевич умел стратегически мыслить и успешно решать поставленные задачи, опираясь на знание человеческой психологии, жизненный опыт и умение конструктивно вести беседу.

Справедливость и беспристрастность, честность и открытость, проницательность, самоконтроль, именно за эти качества Юрий Николаевич пользовался уважением и авторитетом среди профессорско-преподавательского состава, аспирантов, ординаторов и студентов, среди которых ходила крылатая фраза: «Чернов лечфаку больше чем декан, не всем дано деканами родиться...».

В 1980 году приказом Министра Обороны Юрий Николаевич Чернов был прикомандирован к Государственному НИИИ авиационной и космической медицины (с 1999 «ГНИИИ ВМ» МО), где под руко-

водством академика МАА В.В. Антипова занимался проблемами противорадиационной защиты экипажей летательных аппаратов.

В 1987 г. Юрий Николаевич Чернов возглавил впервые созданную, при его активном участии, в Воронежской медицинской академии кафедру клинической фармакологии, которой заведовал до 2011 г., а затем оставался почётным профессором кафедры клинической фармакологии ВГМУ имени Н.Н. Бурденко. Являясь примером высокого профессионализма и большого трудолюбия, с неугасимой энергией привержённый своему делу, Юрий Николаевич умел поддержать, ободрить коллег, поселить веру в успех и мотивировать сотрудников на движение вперёд.

В период с 1980 г. по 1991 г. на базе Государственного научно-исследовательского испытательного института (авиационной и космической медицины) проводил диссертационное исследование, в 1991 г. защитил докторскую диссертацию. Темой его исследований было изучение биохимических сдвигов в головном мозге на фоне функциональных и поведенческих проявлений лучевого поражения ЦНС и разработка средств фармакологической коррекции данных нарушений.

Талантливый учёный фармаколог, токсиколог профессор Чернов Ю.Н. всегда стремился к разработке новых направлений научных исследований, необходимых для решения задач в клинической практике.

Под руководством Юрия Николаевича Чернова проводились научные исследования по мониторингованию побочного действия лекарственных препаратов, фармакогенетике и экологической фармакологии, клинической фармакологии препаратов для лечения сахарного диабета, артериальной гипертензии, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, лекарственному взаимодействию, противомикробной терапии, фармакологической коррекции эндотелиальной дисфункции.

Важное значение профессор Чернов Ю.Н. придавал вопросам фармакоэкономики и фармакоэпидемиологии, включая разработку программного обеспечения для расчёта стоимости фармакотерапии в реальной клинической практике.

Научные исследования включали в себя не только клинические работы, но и труды по экспериментальной фармакологии, в том числе способ оптимизации терапии отравления антипсихотическими препаратами, поиск адаптогенной активности природных соединений, изучение при помощи фармакологического анализа структурных и гистохимических изменений в коре головного мозга при церебральном синдроме острой лучевой болезни, фармакологическую коррекцию облучения сверхсмертельными дозами ионизирующей радиации, с последующей разработкой новых радиопротекторов.

Основные научные исследования на базе Института авиационной и космической медицины проводи-

лись в области радиобиологии, также была разработана комплексная оценка здоровья лиц операторских профессий для обеспечения высокого уровня боеспособности и продления «профессионального долголетия» личного состава ВВС, принципы эффективного и безопасного назначения лекарственных средств у лиц операторских профессий.

Профессор Ю.Н. Чернов является автором 520 научных публикаций, 5 учебников по клинической фармакологии, 27 учебных пособий, 6 монографий, 2 глав национального руководства по клинической фармакологии (2009), практического руководства по авиационной и клинической медицине (2011), 42 патентов и 5 программных обеспечений, зарегистрированных в Реестре программ РФ.

Профессором Ю.Н. Черновым создана научная школа учёных клинических фармакологов, под его руководством подготовлено и защищено 32 кандидатских диссертации, 4 докторские диссертации, его ученики успешно работают в России, странах СНГ, Европы, США и Великобритании.

Замечательный педагог, блестящий оратор Юрий Николаевич Чернов много сил отдавал вопросам преподавания клинической фармакологии, его яркие лекции всегда вызвали интерес аудитории студентов, аспирантов, клинических ординаторов, врачей последипломного обучения. Профессор Чернов Ю.Н. участвовал в разработке учебных программ по дисциплине для медицинских вузов страны, в создании методических пособий, направленных на формирование системного подхода к освоению необходимых профессиональных знаний у студентов выпускных курсов для эффективного и безопасного применения лекарственных препаратов. Наличие незаурядных деловых и личностных качеств помогало ему в решении многочисленных задач.

Профессор Чернов Ю.Н. впервые в Центрально-Черноземном регионе организовал курс постдипломной подготовки врачей клинических фармакологов. Результатом его усилий стала организация службы клинической фармакологии Воронежской и Липецкой области, подготовка врачей — клинических фармакологов для медицинских организаций Тамбова и Белгорода.

В течение 5 лет профессор Ю.Н. Чернов был в составе Фармакологического комитета СССР (1-я комиссия); состоял Членом правления Ассоциации клинических фармакологов стран СНГ, Членом проблемной комиссии № 32.02 РАМН «Фармакология сердца и сосудов»; Членом бюро проблемной комиссии № 32.06 «Клиническая фармакология» — Первый МГМУ им. Сеченова, Членом диссертационного совета ВГМУ им Н.Н. Бурденко.

Член редколлегии журналов «Экспериментальная и клиническая фармакология» (Москва), «Лекарственные средства» (Москва), федерального ежегодного руководства «Формулярная система».

Профессор Ю.Н. Чернов внёс научный вклад в развитие и укрепление международных связей фармакологов нашей страны с европейским научным сообществом.

Начиная с 1997 до 2018 гг. активно поддерживал научные контакты с институтом клинической фармакологии клиники Шарите (Германия), где проводились совместные исследования по изучению роли полиморфных ферментов в развитии различных видов рака и где под его руководством была выполнена научная работа «Генотипирование ферментов лекарственного метаболизма».

Профессор Ю.Н. Чернов – клинический фармаколог высшей врачебной квалификации, заслуженный врач России, имел звание «Отличник здравоохранения», за достижения в космической медицине и многочисленные открытия награждён почётной грамотой

Главкома ВВС, орденом «Дружбы народов», медалью «Ветеран ВВС», медалью им. Ю.А. Гагарина, медалью ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, медалью Г.К. Жукова, медалью «Ветеран труда», знаком отличия «За заслуги перед Воронежской областью», лауреат форума «Золотой фонд Воронежской области» в номинации «образование».

Юрий Николаевич Чернов был большим учёным, замечательным педагогом, яркой личностью, глубоким и мужественным человеком. Высокий профессионализм, мудрость и добросердечное отношение профессора Чернов Ю.Н. всегда будут в памяти научной общественности, а также его многочисленных учеников, коллег и всех, кто знал и работал с Юрием Николаевичем.

Светлая память!

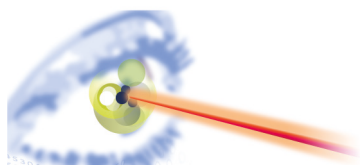


Васин М.В., д. м. н., профессор кафедры медицины катастроф РМАНПО; ст. н. с., Научно-исследовательский испытательный центр (авиационно-космической медицины и военной эргономики) Центрального НИИ ВВС МО РФ.

Есауленко И.Э., ректор ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, д. м. н., профессор, академик РАЕН, заслуженный работник высшей школы РФ.

Кукус В.Г., д. м. н., академик РАН, профессор, Первый МГМУ им. И.М. Сеченова.

Ушаков И.Б., академик РАН, ГНЦ РФ-ФМБЦ им. А.И. Бурназяна ФМБА России.



**Издательство
ОКИ**

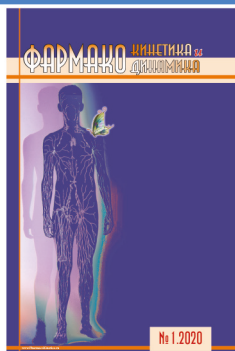
ООО «Издательство ОКИ» выпускает 4 периодических научных специализированных медико-фармацевтических журналов, предназначенных для врачей, провизоров, фармацевтов, специалистов НИИ, преподавателей и студентов медицинских и фармацевтических ВУЗов, организаторов здравоохранения, клинических исследователей, фармакологов, сотрудников фармацевтических компаний, служащих регулирующих органов, членов Комитетов по Этике.

Сайт издательства: www.izdat-oki.ru



Журнал **«Качественная клиническая практика»** публикует материалы по планированию и проведению клинических исследований лекарственных средств, фармакоэкономике, фармакоэпидемиологии, биомедицинской этике, фармаконадзору, которые используются в преподавательской работе во многих медицинских ВУЗах.

Сайт журнала: www.clinvest.ru



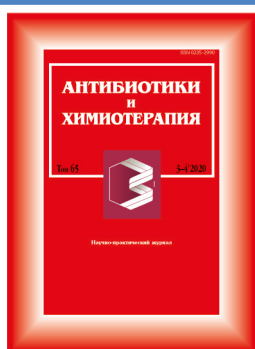
Журнал **«Фармакокинетика и Фармакодинамика»** освещает фундаментальные и прикладные аспекты доклинических и клинических исследований фармакокинетики, в частности терапевтического лекарственного мониторинга, фармакодинамического и биофармацевтического изучения препаратов, их взаимодействия, оценки их биодоступности и биоэквивалентности.

Сайт журнала: www.pharmacokinetica.ru



Журнал **«Фармакогенетика и фармакогеномика»** публикует оригинальные статьи о проведённых клинических, клинко-экспериментальных и фундаментальных научных работах, обзоры, лекции, описания клинических случаев, а также вспомогательные материалы по всем актуальным проблемам персонализированной медицины

Сайт журнала: www.pharmacogenetics-pharmacogenomics.ru



Журнал **«Антибиотики и химиотерапия»** освещает проблемы поиска и получения новых антибиотиков, ферментов, биологически активных веществ, а также вопросы экспериментальной химиотерапии бактериальных и вирусных инфекций.

Сайт журнала: www.antibiotics-chemotherapy.ru

УЧЕБНЫЕ ПОСОБИЯ



«УПРАВЛЕНИЕ КЛИНИЧЕСКИМИ ИССЛЕДОВАНИЯМИ» описывает методологию эффективного управления проектом по изысканию, разработке и выводу на фармацевтический рынок лекарственных средств, начиная с этапа поиска перспективных химических соединений, проведения доклинических испытаний веществ-кандидатов, клинических исследований лекарств-кандидатов, фармаконадзора, управления данными, анализа полученных данных, составления окончательного отчёта об исследовании, получения регистрационного удостоверения, публикации результатов, заканчивая организацией пострегистрационных исследований безопасности, проведением неинтервенционных и фармакоэпидемиологических исследований, а также процесс обеспечения качества, проведения аудита и инспекций уполномоченных органов здравоохранения, создания стандартных операционных процедур, архивирования документов исследования. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и государств – членов Евразийского экономического союза.



«ФАРМАКОНАДЗОР» описывает методологию фармаконадзора, организацию пострегистрационных исследований безопасности, фармакоэпидемиологических и неинтервенционных исследований, организацию системы фармаконадзора в фармацевтической компании, чрезвычайные ситуации в клинических исследованиях, особенности фармаконадзора у беременных и кормящих. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации и государств – членов Евразийского экономического союза.



«ВКЛЮЧЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОГРАНИЧИТЕЛЬНЫЕ ПЕРЕЧНИ: ПОШАГОВЫЙ АЛГОРИТМ» —

это невероятно полезный и компактный ресурс по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни лекарственных препаратов. После прочтения этой книги процесс включения в Перечни сложится из разрозненных пазлов в единую картину. На страницах книги авторы профессионально, шаг за шагом, подробно и доходчиво объясняют методы сбора доказательной базы, рассказывают о методологии проведения сравнительной оценки эффективности и безопасности, клинико-экономических исследований и анализа влияния на бюджет, современных рекомендациях по подготовке Предложения на включение в ограничительные Перечни. Изложенный материал основывается на современных регулирующих требованиях законодательства Российской Федерации.



«ИССЛЕДОВАНИЯ РЕАЛЬНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ»

освещает правовые вопросы, методологию планирования и проведения исследований реальной клинической практики для формирования основанных на них доказательств, методы сбора данных, этическую экспертизу и статистический анализ таких исследований. Впервые в России обобщены термины и определения касавшиеся исследований реальной клинической практики.

Приобрести книги можно по тел. +7 (910) 449-22-73 или e-mail: eva88@list.ru
ООО «Издательство ОКИ», <https://izdat-ok.ru>